

DANIELA DORNELES

**INFLUÊNCIA DO EMPREGO DE VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae*  
NA ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO DE UVA TERCÍ ORIUNDA DO  
MUNICÍPIO DE COLOMBO - PR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Tania Maria Bordin Bonfim

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Iara Maria P. Machado

CURITIBA

2003

# TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELA DORNELES

INFLUÊNCIA DO EMPREGO DE VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* NA ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO DE UVA TERCI ORIUNDA DO MUNICÍPIO DE COLOMBO - PR"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

*Tania Maria Bordin Bonfim*

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim (orientadora)  
Departamento de Farmácia  
Universidade Federal do Paraná

*Marcelo Maraschin*

Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
Departamento de Fitotecnia  
Universidade Federal de Santa Catarina

*Maria Lucia Masson*

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Lucia Masson  
Departamento de Engenharia Química  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 12 de dezembro de 2003

Dedico esse trabalho aos vinicultores de Colombo, na tentativa de oferecer uma alternativa mais segura na obtenção de vinhos de qualidade.

Dedico também ao meu marido Rui e à minha filha Julia, os quais tanto amo.

## AGRADECIMENTOS

Às Professoras Dra. Tania Maria Bordin Bonfim, Dra. Miriam Blümei Chociai e Dra. Iara Maria Pereira Machado do Departamento de Farmácia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela amizade e constante estímulo e orientação que possibilitaram a concretização desse trabalho.

Ao Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sediado em Curitiba, e em especial, à Farmacêutica Kazumi Yamazaki Ochiai pela cordialidade e orientação nas análises de vinho.

À Secretaria Municipal de Agricultura de Colombo pelo apoio e divulgação do projeto junto aos produtores de vinho da região e, em especial, à vinícola do Sr. Pedrinho Strapasson pela doação das uvas para realização desse trabalho.

À vinícola Franco Italiana, localizada em Colombo, pelo engarrafamento dos vinhos obtidos no laboratório.

Ao Professor Dr. Maurício Passos e ao Jonathan, do Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa da Universidade Federal do Paraná, pela disposição em sempre querer ajudar e incentivar o andamento da dissertação.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná e aos professores que, de uma forma ou outra, participaram da minha formação, em especial ao Professor Dr. Roberto Pontarolo.

Aos colegas Danilo, Thaís, Kely, Lilian e demais colegas da pós-graduação, pela convivência e estímulo constantes.

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia de Fermentações, em especial à Viviane, pelo seu alto astral e sua ajuda nas horas necessárias.

Aos funcionários que ajudaram na obtenção do suco de uva, em especial à Geni, sempre prestativa e carinhosa.

Aos meus pais e à minha irmã Larissa, que sempre me incentivaram a estudar e lutar pelos meus ideais. Sem o apoio deles no cuidado de minha filha, esse trabalho não teria sido concretizado.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1 UVAS E SUAS CARACTERÍSTICAS .....	4
3.2 VITICULTURA NO BRASIL .....	6
3.3 PRODUÇÃO DE VINHO NO BRASIL .....	8
3.4 PRODUÇÃO DE VINHO EM COLOMBO .....	13
3.5 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA .....	14
3.6 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA .....	16
3.7 LEVEDURAS SELECIONADAS .....	19
3.8 LEVEDURAS SELVAGENS VERSUS LEVEDURAS SELECIONADAS .....	23
3.9 BACTÉRIAS CONTAMINANTES NO VINHO .....	26
3.10 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	27
3.10.1 Sólidos Solúveis .....	27
3.10.2 Açúcares .....	28
3.10.3 pH .....	30
3.10.4 Acidez .....	30
3.10.5 Álcoois .....	32
3.10.5.1 Etanol .....	32
3.10.5.2 Metanol .....	33
3.10.6 Ésteres .....	34
3.10.7 Aldeídos .....	35
3.10.8 Compostos Nitrogenados .....	36
3.10.9 Compostos com Enxofre .....	38

3.10.9.1 Sulfato .....	38
3.10.9.2 Sulfito .....	39
3.10.9.3 Ácido sulfídrico .....	39
3.10.9.4 Dióxido de enxofre .....	41
3.10.10 Cloretos .....	43
3.10.11 Ferro .....	43
3.10.12 Cobre .....	44
3.10.13 Cinzas .....	45
3.10.14 Extrato Seco .....	46
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 MATERIAL .....	48
4.1.1 Uvas .....	48
4.1.2 Leveduras .....	48
4.1.3 Reagentes .....	49
4.2 MÉTODOS .....	49
4.2.1 Análises Prévias no Suco de Uva .....	49
4.2.2 Esmagamento das Uvas .....	49
4.2.3 Correção do Suco de Uva .....	50
4.2.4 Adição das Leveduras .....	50
4.2.5 Processo Fermentativo .....	51
4.2.5.1 Fermentação tumultuosa .....	52
4.2.5.2 Descuba .....	52
4.2.5.3 Fase complementar .....	52
4.2.5.4 Primeira trasfega .....	53
4.2.5.5 Segunda trasfega .....	53
4.2.6 Engarrafamento .....	53
4.2.7. Vinho produzido em Colombo .....	54
4.2.8 Análises Físico-químicas .....	54
4.2.8.1 Teor de sólidos totais .....	54
4.2.8.2 Açúcares redutores .....	54
4.2.8.3 Açúcares não redutores .....	55
4.2.8.4 pH .....	55
4.2.8.5 Acidez total .....	55

4.2.8.6	Acidez volátil corrigida .....	55
4.2.8.7	Acidez fixa .....	55
4.2.8.8	Grau alcoólico real .....	55
4.2.8.9	Metanol .....	56
4.2.8.10	Estér (acetato de etila) .....	56
4.2.8.11	Aldeído (acetaldeído) .....	56
4.2.8.12	Teor de nitrogênio (número de formalina) .....	56
4.2.8.13	Sulfatos .....	56
4.2.8.14	Anidrido sulfuroso total .....	57
4.2.8.15	Cloretos .....	57
4.2.8.16	Cobre e ferro .....	57
4.2.8.17	Densidade .....	57
4.2.8.18	Extrato seco e extrato seco reduzido .....	57
4.2.8.19	Cinzas .....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1	ANÁLISES PRÉVIAS NO SUCO DE UVA .....	59
5.2	ESMAGAMENTO DAS UVAS .....	59
5.3	CORREÇÃO DO SUCO DE UVA .....	60
5.3.1	Açúcar (Chaptalização) .....	60
5.3.2	Nitrogênio .....	60
5.3.3	Sulfitagem .....	61
5.4	ADIÇÃO DAS LEVEDURAS .....	62
5.5	FERMENTAÇÃO TUMULTUOSA .....	63
5.6	DESCUBA .....	64
5.7	FASE COMPLEMENTAR .....	66
5.8	PRIMEIRA TRASFEGA .....	66
5.9	SEGUNDA TRASFEGA .....	68
5.10	ENGARRAFAMENTO DO VINHO .....	69
5.11	ANÁLISES DOS PRODUTOS FINAIS .....	70
5.11.1	Análise dos Açúcares Totais .....	70
5.11.2	Análise do pH .....	71
5.11.3	Análise da Acidez Total .....	71
5.11.4	Análise da Acidez Volátil Corrigida .....	72

5.11.5	Análise da Acidez Fixa .....	73
5.11.6	Análise do Grau Alcoólico Real .....	73
5.11.7	Análise do Metanol .....	74
5.11.8	Análise dos Ésteres (Acetato de Etila) .....	75
5.11.9	Análise dos Aldeídos (Acetaldeído) .....	76
5.11.10	Análise do Nitrogênio .....	77
5.11.11	Análise dos Sulfatos .....	77
5.11.12	Análise do Anidrido Sulfuroso Total .....	78
5.11.13	Análise de Cloretos .....	79
5.11.14	Análise de Ferro .....	79
5.11.15	Análise de Cobre .....	80
5.11.16	Análise das Cinzas .....	81
5.11.17	Análise do Extrato Seco Reduzido e Relação Álcool/Extrato Seco Reduzido .....	81
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	VISTA PANORÂMICA DA CULTURA DA VIDEIRA NO MUNICÍPIO DE COLOMBO-PR.....	13
FIGURA 2 -	VINÍCOLA DE UM PRODUTOR DO MUNICÍPIO DE COLOMBO-PR QUE UTILIZA BARRIL DE CARVALHO EM UMA ETAPA DA PRODUÇÃO DO VINHO.....	14
FIGURA 3 -	UVA TERCÍ ( <i>V. labrusca</i> ), CULTIVADA NO MUNICÍPIO DE COLOMBO.....	48
FIGURA 4 -	DIAGRAMA DE FLUXO DE ELABORAÇÃO DO VINHO EM LABORATÓRIO.....	51
FIGURA 5 -	ADIÇÃO DE LEVEDURAS AO SUCO DE UVA .....	63
FIGURA 6 -	BAGAÇO DA UVA OBTIDO NO QUINTO DIA DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , VARIEDADE CK.....	65
FIGURA 7 -	BAGAÇO DA UVA OBTIDO NO QUINTO DIA DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , VARIEDADE BDX.....	65
FIGURA 8 -	BAGAÇO DA UVA OBTIDO NO QUINTO DIA DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , VARIEDADE BC.....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ÁREAS DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE UVAS NO PARANÁ - SAFRA 00/01 .....	6
TABELA 2 -	ÁREAS DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE UVAS NO PARANÁ - SAFRA 01/02 .....	7
TABELA 3 -	CLASSIFICAÇÃO DAS UVAS NO BRASIL .....	7
TABELA 4 -	COMERCIALIZAÇÃO DE VINHOS DO RIO GRANDE DO SUL POR TIPO, EM MIL LITROS .....	9
TABELA 5 -	CONSUMO <i>PER CAPITA</i> DE VINHOS NO BRASIL - 1995 A 2001 .....	10
TABELA 6 -	PRODUÇÃO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE UVAS E VINHOS NO BRASIL DE 1991 A 2000 .....	11
TABELA 7 -	CLASSIFICAÇÃO DO VINHO DE MESA QUANTO AO TEOR DE AÇÚCAR .....	15
TABELA 8 -	VALORES MÁXIMOS E MÍNIMOS FIXADOS PARA VINHO DE MESA .....	16
TABELA 9 -	TOLERÂNCIA AO ÁLCOOL, A 20°C, DOS MICROORGANISMOS DO VINHO .....	27
TABELA 10 -	CONTEÚDO DE FERRO E COBRE DE VINHOS .....	45
TABELA 11 -	CONTEÚDO DE CINZAS EM VINHOS DE MESA .....	46
TABELA 12 -	ANÁLISES REALIZADAS NO SUCO DE UVA OBTIDO NO LABORATÓRIO.....	59
TABELA 13 -	ANÁLISES EFETUADAS NOS MOSTOS APÓS ADIÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS NO TEMPO ZERO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS REALIZADOS NO LABORATÓRIO.....	62
TABELA 14 -	ANÁLISES EFETUADAS NOS VINHOS NO QUINTO DIA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , REALIZADOS NO LABORATÓRIO.....	64

TABELA 15 - QUANTIDADE (g/L) DE AÇÚCAR ADICIONADO AOS MOSTOS NO QUINTO DIA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS REALIZADOS NO LABORATÓRIO .....	65
TABELA 16 - ANÁLISES EFETUADAS NOS VINHOS APÓS 41 DIAS DO INÍCIO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , REALIZADOS NO LABORATÓRIO .....	67
TABELA 17 - CONCENTRAÇÃO (g/L) DE AÇÚCAR NOS VINHOS APÓS 131 DIAS DO INÍCIO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , REALIZADOS NO LABORATÓRIO E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	68
TABELA 18 - RESÍDUOS PRESENTES APÓS 131 DIAS DO INÍCIO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , REALIZADOS NO LABORATÓRIO .....	69
TABELA 19 - CONCENTRAÇÃO FINAL DE AÇÚCAR TOTAL (g/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	70
TABELA 20 - pH FINAL DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	71
TABELA 21 - ACIDEZ TOTAL (mEq/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	72

TABELA 22 -	ACIDEZ VOLÁTIL CORRIGIDA (mEq/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	72
TABELA 23 -	ACIDEZ FIXA (mEq/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	73
TABELA 24 -	GRAU ALCOÓLICO REAL (°GL) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	74
TABELA 25 -	CONCENTRAÇÃO DE METANOL (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	75
TABELA 26 -	CONCENTRAÇÃO DE ÉSTERES (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	75
TABELA 27 -	CONCENTRAÇÃO DE ALDEÍDOS (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	76

TABELA 28 -	CONCENTRAÇÃO FINAL DE NITROGÊNIO (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	77
TABELA 29 -	CONCENTRAÇÃO DE SULFATOS (g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	78
TABELA 30 -	CONCENTRAÇÃO DE ANIDRIDO SULFUROSO TOTAL (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	79
TABELA 31 -	CONCENTRAÇÃO DE CLORETOS (mg NaCl/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	79
TABELA 32 -	CONCENTRAÇÃO DE FERRO (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	80
TABELA 33 -	CONCENTRAÇÃO DE COBRE (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	80

TABELA 34 -	CONCENTRAÇÃO DE CINZAS (g/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	81
TABELA 35 -	EXTRATO SECO REDUZIDO (g/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	82
TABELA 36 -	RELAÇÃO ÁLCOOL / EXTRATO SECO REDUZIDO DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO .....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

g	- Grama
%	- Por cento
% (p/p)	- Por cento (peso / peso)
% (p/v)	- Por cento (peso / volume)
% (v/v)	- Por cento (volume / volume)
µg	- Micrograma
mL	- Mililitro
µg/g	- Micrograma / Grama
µg/mL	- Micrograma / Mililitro
µmol	- Micromol
AOAC	- Association of Official Analytical Chemists
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g/L	- Grama / Litro
hL	- Hectolitro
kg/ha	- Kilograma / hectare
L	- Litro
mEq/L	- Miliequivalente / Litro
mg	- Miligrama
mg/kg	- miligrama / kilograma
mg/L	- Miligrama / Litro
N	- Normal
nm	- Nanômetro
°C	- Grau Celsius
°GL	- Grau Gay Lussac
OIV	- Office International de la Vigne et du Vin
PM	- Peso molecular
t	- Tonelada
UFC/mL	- Unidades Formadoras de Colônia / mililitro
µM	- Micromolar

## RESUMO

Dentre as diferentes castas de uvas cultivadas no Paraná, a variedade Terci é a mais utilizada para o preparo de vinho tinto na região de Colombo. Anualmente 130 hectares de videiras produzem 1300 toneladas de uvas comuns da espécie *Vitis labrusca* e 800.000 L de vinho artesanal no município. A produção é realizada em pequenas vinícolas e envolve antigas tradições no preparo da bebida, como a falta de padronização no preparo do suco de uva e a fermentação espontânea. A utilização de leveduras selvagens é um dos fatores que expõe os vinicultores à obtenção de vinhos com altos teores de produtos indesejáveis e com características não previsíveis a cada safra. Este trabalho objetivou estudar a influência do emprego de variedades de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinho tinto de uva Terci oriunda do município de Colombo. A técnica de preparo dos vinhos seguiu o sistema clássico de vinificação para vinhos tintos e as amostras foram analisadas de acordo com os padrões oficiais do Ministério da Agricultura, além das análises de acetaldeído, ésteres, cobre, ferro e nitrogênio. Os resultados demonstraram diferenças significativas nas amostras, principalmente em relação aos teores de acidez volátil, acetaldeído, ésteres e metanol, comprovando que com a utilização de leveduras selecionadas melhoram-se os parâmetros de qualidade e padronização do vinho.

Palavras-chave: vinho tinto; leveduras selecionadas; fermentação.

## ABSTRACT

Among different grape varieties cultivated in Paraná, Terci is the most used to prepare red wine in Colombo County. Annually, 130 hectares of vine are cultivated, producing 1,300 tons of ordinary varieties of *Vitis labrusca*. These grapes provide 800,000 L/year of traditional table wine, without any standard procedure. The production is made in little wine industries and under old traditions, as the lack of standardization in the preparation of the grape juice and spontaneous fermentation. The use of indigenous yeast is one of the factors that exposes the producers to obtain wines with high levels of undesirable components and unpredictable characteristics every harvest. The aim of this work was to study the influence of using *Saccharomyces cerevisiae* varieties in the elaboration of Terci red wine from Colombo County. The wine making method followed the classic red vinification system and the samples were analyzed according to the table wine official methods. Acetaldehyde, esters, copper, iron and nitrogen parameters were also observed. The essays performed showed significant differences mainly over volatile acids, acetaldehyde, esters and methanol contents, confirming that the use of selected yeast improve the quality parameters and standardization of the wine.

Keywords: red wine; selected yeasts; fermentation.

## 1 INTRODUÇÃO

O vinho é definido como a bebida proveniente da fermentação alcoólica do mosto de uva sadia, fresca e madura (BENASSI, 1997). Seu real aparecimento é desconhecido, mas há indicações de estar sendo preparado desde a época dos Assírios, em torno de 3500 a.C. Foi introduzido por comerciantes na Europa e outros países do Mediterrâneo ainda no período pré-cristão. Em meados do século passado o cultivo de videira foi iniciado em alguns locais da América do Sul e do Norte (CATALUÑA, 1984; JOSHI; PANDEY, 1999).

A produção do vinho ao longo da história era baseada no empirismo. Somente com as descobertas de Louis Pasteur, em 1861, sobre os princípios da fermentação alcoólica é que sua produção se tornou científica (CATALUÑA, 1984; DEQUIN, 2001). Atualmente, bebe-se os melhores vinhos nunca antes produzidos, graças a um maior conhecimento sobre o cultivo das uvas, a bioquímica e a microbiologia da fermentação, ao emprego de tecnologia avançada na produção e à existência de técnicas analíticas para medir os componentes dessa bebida (ZOECKLEIN et al., 2001).

A Europa é o maior produtor mundial de vinhos. Entre seus países, os que mais se destacam desde 1985 são a França e Itália, com produção anual aproximada de 59,65 e 58,77 milhões de hectolitros, respectivamente (PACHECO, 1999).

No Brasil, o Rio Grande do Sul produz 90% do vinho nacional, classificando nosso país em 17.º lugar na produção mundial. A indústria vinícola brasileira ainda é jovem se comparada com qualquer outro tipo de indústria, entretanto, desde 1970, passa por uma fase de industrialização dos seus processos (RIZZON et al., 1992; PACHECO, 1999).

O vinho elaborado a partir de uvas híbridas ou americanas é o mais comercializado em nosso país. Apresenta muitas características indesejáveis, principalmente quando é originário de pequenas vinícolas ligadas a antigas tradições na forma de produzi-los. Segundo COPAT (1988), o caminho para elevar definitivamente seu consumo não é outro senão melhorar cada vez mais sua qualidade. Atuando-se num mercado que impõe que cada vez mais os vinhos estejam disponíveis a baixo custo e com características sensoriais e sanitárias

constantes, durante todo seu prazo de validade e a cada lote, não se considera mais suficiente que os mesmos sejam bons e límpidos apenas durante sua produção (COPAT, 1988; COSTA, 1993; BRUETSCHY et al., 2000).

Desde 1999, um projeto de extensão firmado entre a Universidade Federal do Paraná e a comunidade de Colombo visa a observação criteriosa do processo artesanal utilizado pelos produtores da região para caracterizar as principais dificuldades técnicas e apresentar propostas alternativas de melhoramento da tecnologia de produção do vinho. Durante a realização de visitas técnicas, os principais problemas relacionavam-se com a falta de padronização durante a fase de preparo do suco de uvas para a fermentação, a falta de procedimentos de desinfecção adequados e a falta da utilização de microorganismos selecionados (BONFIM et al., 2002). Sabe-se que a fermentação espontânea, por meio de leveduras selvagens, pode acarretar nuances diferenciadas nos parâmetros sensoriais e físico-químicos do vinho, prejudicando sua qualidade e reprodutibilidade de obtenção (Embrapa Uva e Vinho, 1987; COMI; CROATTINI, 1997; PRETORIUS, 2001; LOPES et al., 2002).

Assim sendo, com a finalidade de melhorar os parâmetros de qualidade e garantir uma melhor padronização de suas características, sugere-se utilizar leveduras selecionadas que otimizarão o processo fermentativo e tornarão o vinho obtido mais competitivo no mercado. Na medida em que esses procedimentos são aplicados, deixa-se de lado o empirismo e permite-se obter um vinho de melhor qualidade a cada safra (Embrapa Uva e Vinho, 1987; COMI; CROATTINI, 1997; PRETORIUS; VAN DER WESTHUIZEN; AUGUSTYN, 1999; CHOCIAI et al., 2000; LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; PRETORIUS, 2000; LOPES et al., 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência do emprego de variedades da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinho tinto de uva Terci oriunda do município de Colombo, Paraná.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) testar três diferentes variedades de leveduras selecionadas na elaboração de vinho tinto suave de mesa a partir de uva Terci, cultivada no município de Colombo;
- b) estabelecer os principais componentes químicos do vinho a serem controlados, de acordo com a sua influência no produto final e nas exigências da legislação brasileira;
- c) eleger métodos de identificação e/ou doseamento desses componentes aplicáveis às condições laboratoriais disponíveis e comparar às amostras obtidas com o vinho produzido no município de Colombo;
- d) oferecer uma proposta viável para produção de um vinho de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira aos produtores do município de Colombo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 UVAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

A matéria-prima da indústria vinícola é a uva, a partir da qual se elabora o mosto para a produção de vinho. Sua composição é influenciada não só pelo teor de açúcar fornecido para a fermentação, como também pelo seu teor de nitrogênio, potássio, teor de acidez, seus aromas vegetativos e seu estado sanitário (CHOCIAI et al., 2000; ZOECKLEIN et al., 2001).

O cacho de uva é formado por 3 a 7% de engaço e 93 a 97% por bago ou grão. O grão, por sua vez, está formado por película ou casca, sementes e polpa (COSTA, 1993). As proporções relativas de cada uma dessas partes são muito variáveis, não somente em função da variedade da uva, mas também pela forma de cultivo, condições meteorológicas, solos, pragas e doenças (CHOCIAI et al., 2000). Superposta à sua qualidade, está a prática do vinicultor que pode adaptar seu cultivo e a elaboração do vinho para reforçar ou suavizar os aromas, os sabores e as texturas, de modo a elaborar um produto bem equilibrado e integrado (LONA, 1993; ZOECKLEIN et al., 2001).

A película é de importância fundamental na vinificação, pois além de conter leveduras, que transformam o açúcar em álcool, possui ainda as matérias corantes que dão a cor desejada ao vinho (PATO, 1978; PACHECO, 1999). Na sua parte externa, encontra-se uma matéria cerosa que pode desprender-se facilmente, chamada pruína. A pruína protege as células internas do grão contra a ação das chuvas e da umidade, além de reter os diversos microorganismos que por ação das correntes de vento chegam ao seu contato (PATO, 1978; CATALUÑA, 1984).

A polpa é de consistência variável, dependendo da uva. Ela forma o mosto, cujo componente maior é a água (70 a 80% do volume total), seguido dos açúcares (glicose e frutose), taninos e matérias corantes, ácidos orgânicos (tartárico, málico e cítrico), substâncias minerais (potássio, ferro, cálcio e fosfato), matérias nitrogenadas e pectinas (PATO, 1978; CHOCIAI et al., 2000).

As sementes encontram-se no centro do grão e geralmente são quatro, mas podem ser encontradas em quantidades inferiores ou mesmo ausentes. Na vinificação, as sementes não devem ser esmagadas, para evitar o excesso de

tanino, que daria gosto adstringente, e o excesso de óleo e ácidos, que prejudicariam as qualidades sensoriais do vinho (PATO, 1978; PACHECO, 1999).

As uvas estão classificadas em três principais grupos (I, II e III), de acordo com sua origem (PACHECO, 1999).

As do grupo I (*V. vinifera* ou européias) são as uvas oriundas da bacia do Mediterrâneo e intensamente cultivadas nos países da Europa. Essas videiras produzem uvas de casca fina, de alta qualidade, para produção de vinhos finos. No Brasil, a proporção atual da produção dessas uvas é de 30 a 40%, aproximadamente, enquanto na França, Chile e Argentina é quase de 100%. Entre as mais conhecidas, pode-se citar Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chenin blanc, Merlot e Pinot Noir (PACHECO, 1999).

As do grupo II (americanas) são assim chamadas por terem sua origem na América do Norte e América Central, embora, posteriormente, tenham sido cultivadas em vários países por meio da técnica da enxertia. São mais resistentes que as viníferas, produzem maior quantidade de grãos, mas sua qualidade é muito inferior (baixo teor de açúcar e elevada acidez). Entre as mais destacadas deste grupo, estão a Bordô, Concord, Herbemont e Isabel (PACHECO, 1999).

As do grupo III (híbridas) resultam da enxertia entre as européias e as americanas. Esse processo resultou dos esforços no combate a *Phylloxera*, inseto que ataca as partes aéreas e raízes da videira, e é usado até hoje nas regiões desfavoráveis à produção de vinhos finos, como a América Central e alguns países da América do Sul, inclusive o Brasil (PACHECO, 1999).

Em geral, os efeitos do solo e clima sobre o cultivo das videiras estão interligados. É complexa a influência do solo sobre a qualidade da uva. A videira desenvolve-se melhor em solos frouxos ou soltos, pedregosos, permeáveis, não muito úmidos nem muito secos, onde as raízes possam penetrar. Os terrenos alcalinos são os mais convenientes para se obter uvas ricas em açúcares; os terrenos argilosos, pelo ferro que possuem, dão uvas com muita matéria corante e os terrenos vulcânicos são bons para o cultivo da vinha, pela riqueza em fósforo e potássio que possuem (CHOCIAI et al., 2000).

### 3.2 VITICULTURA NO BRASIL

A produção de uva no Brasil concentra-se nas regiões Sul e Sudeste e em menor proporção no Nordeste, sendo os maiores produtores os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Pernambuco. Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2001, a produção nacional de uva foi de aproximadamente 1,012 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 16,417 mil kg/ha.

Na mesorregião de Curitiba, incluindo municípios como Araucária, Balsa Nova, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Campo Magro, Colombo, Contenda, Quatro Barras, São José dos Pinhais, entre outros, referente a safra de 2001/2002, foram registrados, pelo Secretaria Estadual da Agricultura do Paraná, uma área total de plantio de 295 hectares, produzindo 2767 toneladas de uvas, o que correspondeu a 3,07% da produção total do Estado. As TABELAS 1 e 2 apresentam os valores de área de cultivo e produção de uva nas safras 2000/2001 e 2001/2002, respectivamente, para região de Colombo, mesorregião de Curitiba e total do Estado do Paraná, tanto para as variedades de uva de mesa como vinífera.

TABELA 1 - ÁREAS DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE UVAS NO PARANÁ - SAFRA 00/01

LOCAL	CULTURA	ÁREA (ha)	PRODUÇÃO (t)
Colombo	Uva de mesa	96,00	969,00
	Vinífera	34,00	343,00
Mesorregião Curitiba	Uva de mesa	191,00	1.840,00
	Vinífera	115,00	1.017,00
Paraná	Uva de mesa	4.247,92	80.113,60
	Vinífera	1.696,80	14.693,60

FONTE: SECRETARIA ESTADUAL DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ. Uva 00/01.doc. Dados referentes à plantação de uva no estado do Paraná. Curitiba, 27 out. 2003. Arquivo (97 KB). Word for Windows 6.0.

TABELA 2 - ÁREAS DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE UVAS NO PARANÁ - SAFRA 01/02

LOCAL	CULTURA	ÁREA (ha)	PRODUÇÃO (t)
Colombo	Uva de mesa	96,00	979,00
	Vinífera	34,00	345,00
Mesorregião Curitiba	Uva de mesa	184,00	1.773,00
	Vinífera	111,00	994,00
Paraná	Uva de mesa	4.446,20	75.086,60
	Vinífera	1.855,25	15.113,70

FONTE: SECRETARIA ESTADUAL DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ. Uva 01/02.doc. Dados referentes à plantação de uva no estado do Paraná. Curitiba, 27 out. 2003. Arquivo (100 KB). Word for Windows 6.0.

De acordo com a PORTARIA n.1012 do Ministério da Agricultura (1978), as uvas brasileiras para fins industriais foram classificadas em cinco grupos, por ordem decrescente de qualidade, conforme TABELA 3 (CATALUÑA, 1984).

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DAS UVAS NO BRASIL

CLASSIFICAÇÃO	UVAS
Grupo I	Viníferas nobres
Grupo II	Viníferas superiores
Grupo III	Viníferas especiais
Grupo IV	Comuns superiores (Americanas)
Grupo V	Comuns (Americanas)

FONTE: CATALUÑA, E. *Uvas e vinhos*. Rio de Janeiro: Ed. Globo, 1984.

No Paraná, podemos destacar a uva Bordô (*V. labrusca*), de origem americana e conhecida em nosso Estado como Terceira, sendo classificada como comum superior. Foi cultivada pela primeira vez em 1840 por Henry Ives em Ohio, Estados Unidos, justificando seu nome original como Ives ou Ives Seedling (CAMARGO, 1989, PACHECO, 1999).

Hoje, seu cultivo limita-se ao Brasil. Atualmente, é a terceira casta em ordem de importância no Rio Grande do Sul, superada pela Isabel e Herbemont. Pelo volume relativo de produção, é também importante nos Estados de Minas Gerais e Santa Catarina. Registros dão conta de que foi introduzida no Brasil em 1904 procedente de Portugal (CAMARGO, 1989, PACHECO, 1999).

A uva Bordô apresenta elevado teor de matéria corante em sua película, por isso é usada para a elaboração de vinho e de suco de uva destinados a cortes com produtos à base de Isabel e de Concord, estes com coloração pouco pronunciada. Eventualmente, é comercializada para consumo *in natura*, por ser de maturação precoce (CAMARGO, 1989; PACHECO, 1999). Possui aroma pronunciado proveniente do antranilato de metila (CHOCIAI et al., 2000).

### 3.3 PRODUÇÃO DE VINHO NO BRASIL

A vitivinicultura no Brasil iniciou no século XVI com a vinda de nossos descobridores, mas foi somente no século XX que na realidade teve certa importância econômica, e isto se deve justamente à vinda dos imigrantes italianos em 1875, posteriormente aos alemães, franceses e portugueses (COPAT, 1988; PROTAS; MELLO, 2003).

A videira se desenvolveu em muitas regiões do Brasil, pela sua grande extensão territorial e pela grande quantidade de climas e microclimas existentes, porém teve seu maior desenvolvimento no Estado do Rio Grande do Sul, mais intensamente nos municípios de Bento Gonçalves, Garibaldi, Farroupilha, Caxias do Sul, Flores da Cunha, Antônio Prado e Carlos Barbosa, os quais possuem as condições de solo e clima favoráveis ao cultivo da videira. Esta região é responsável por 97,5% dos vinhos elaborados no Estado e por 90,2% dos vinhos elaborados no Brasil (COPAT, 1988; PROTAS; MELLO, 2003).

A produção de vinho está basicamente solidificada nas variedades híbridas e americanas, que representam mais de 80% do volume total de produção, onde aproximadamente 90% são tintas. Entre as justificativas que levam ao seus desenvolvimentos estão a grande resistência às enfermidades fúngicas, elevada produtividade e facilidade nos tratos culturais e segurança de produção (COPAT, 1988; PROTAS; MELLO, 2003).

Apesar do vinho fino nacional ter sofrido uma queda de 45% no volume absoluto comercializado no período de 1997 a 2002 (TABELA 4), em decorrência principalmente da competição com os vinhos importados, o vinho comum apresenta um crescimento equilibrado, com taxas positivas que somam 30% ao longo do período analisado. Este comportamento está em parte relacionado com o poder

aquisitivo da população, à preferência pelas características de gosto e aroma "foxado" (comum) típico das variedades de *V. labrusca*, à simpatia dos consumidores por produtos tipo "colonial" e à facilidade de encontrar os produtos, mesmo nos locais mais remotos do país (PROTAS; MELLO, 2003).

TABELA 4 - COMERCIALIZAÇÃO DE VINHOS DO RIO GRANDE DO SUL POR TIPO, EM MIL LITROS

VINHOS	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Comum	<b>174.768</b>	<b>181.576</b>	<b>200.578</b>	<b>221.023</b>	<b>221.023</b>	<b>227.447</b>
Tinto	127.693	133.479	150.857	172.183	176.793	181.274
Rosado	13.550	12.980	13.221	9.150	7.283	8.435
Branco	33.524	35.117	36.499	39.688	37.440	37.738
Especial	<b>790</b>	<b>194</b>	<b>235</b>	<b>249</b>	<b>492</b>	<b>270</b>
Tinto	136	500	56	178	281	259
Rosado	145	2	112	...	13	...
Branco	509	142	67	71	198	11
Viníferas	<b>46.442</b>	<b>32.456</b>	<b>37.096</b>	<b>34.195</b>	<b>28.701</b>	<b>25.439</b>
Tinto	18.303	11.925	14.706	15.119	12.112	12.110
Rosado	1.997	1.585	1.479	1.021	790	650
Branco	26.141	18.945	20.910	18.055	15.798	12.679

FONTE: PROTAS, J. F. S.; MELLO, L. M. R. A vitivinicultura brasileira: o panorama mercadológico e suas perspectivas. In: III SEMINÁRIO ESTADUAL DE FRUTICULTURA: TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE VIDEIRAS, 2003, Palmas-PR. *Anais*, Palmas-PR, 2003. p. 15-21.

NOTA: ... Dado não disponível.

Segundo dados da Office International de la Vigne et du Vin (OIV), o Brasil tem-se situado entre os vinte maiores produtores de vinho no mundo. Em 1996, o país ocupava o 17.º lugar, com produção de 2,32 milhões de hL/ano. Quanto ao consumo, ele ocupa o 38.º lugar, com 1,85 L/*per capita*/ano (PACHECO, 1999). A TABELA 5 demonstra o consumo *per capita* de vinhos no Brasil no período de 1995 a 2001 (PROTAS; MELLO, 2003).

TABELA 5 - CONSUMO *PER CAPITA* DE VINHOS NO BRASIL - 1995 A 2001

<b>ANO</b>	<b>CONSUMO (<i>per capita</i>)</b>
1995	1,51
1996	1,58
1997	1,62
1998	1,60
1999	1,80
2000	1,89
2001	1,81

FONTE: PROTAS, J. F. S.; MELLO, L. M. R. A vitivinicultura brasileira: o panorama mercadológico e suas perspectivas. In: III SEMINÁRIO ESTADUAL DE FRUTICULTURA TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE VIDEIRAS, 2003, Palmas-PR. *Anais*, Palmas-PR, 2003. p. 15-21.

A TABELA 6 demonstra a produção, importação e exportação de uvas e vinhos no Brasil desde 1991, de acordo com dados divulgados pelo Ministério da Agricultura.

TABELA 6 - PRODUÇÃO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE UVAS E VINHOS NO BRASIL DE 1991 A 2000

DADO	continua									
	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Produção total de uva (t)	<b>305.548</b>	<b>358.378</b>	<b>361.456</b>	<b>409.600</b>	<b>410.330</b>	<b>317.293</b>	<b>384.555</b>	<b>313.671</b>	<b>425.266</b>	<b>521.757</b>
Produção de uva vinífera (t)	64.545	75.708	74.296	77.313	66.111	62.166	64.100	45.769	56.678	74.259
Produção de uva comum (t)	241.003	282.670	287.160	332.287	344.219	255.127	320.455	267.902	368.588	447.498
Produção total de vinho (1000 L)	<b>172.285</b>	<b>215.861</b>	<b>224.809</b>	<b>260.807</b>	<b>260.483</b>	<b>198.242</b>	<b>229.804</b>	<b>184.684</b>	<b>272.351</b>	<b>329.236</b>
Produção de vinho de viníferas (1000 L)	45.519	52.613	53.054	58.734	47.126	45.325	46.988	33.869	45.830	56.210
Produção de vinhos comuns (1000 L)	126.766	163.248	171.755	202.073	213.357	152.917	182.816	150.815	226.521	273.026
Importações de vinho (t)	8.198	6.174	12.167	21.794	28.710	22.631	24.018	24.171	28.449	31.332
Exportações de vinho (t)	4.299	7.508	20.299	15.073	14.704	15.370	16.199	7.791	7.641	6.554
Disponibilidade <i>per capita</i> de vinho e derivados (kg/hab/ano)	1,20	1,44	1,43	1,74	1,76	1,30	1,49	1,24	1,79	2,14
Principais produtores de uva (1000 t)										
Rio Grande do Sul	393	505	489	479	480	368	455	334	475	521
São Paulo	123	124	120	135	137	150	227	181	176	202
Paraná	38	41	30	43	39	53	50	53	70	72

TABELA 6 - PRODUÇÃO, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE UVAS E VINHOS NO BRASIL DE 1991 A 2000

DADO											conclusão
	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	
Principais Exportadores de uva (t)											
Turquia	37	436	563	975	159	615	4.322	5.337	9.793	529	
Argentina	238	4.898	2.704	5.933	8.336	12.318	9.243	6.638	5.055	4.108	
Estados Unidos	1.401	364	120	2.417	3.040	3.136	3.476	2.136	619	693	
Principais Importadores de vinho (t)											
Itália	583	558	1.440	3.027	4.179	3.975	5.268	5.717	6.686	8.812	
Chile	1.418	1.073	1.634	2.408	2.659	1.991	2.841	3.211	4.331	5.571	
Portugal	1.478	1.081	1.837	2.886	4.242	4.453	5.181	4.679	4.424	5.102	
França	81	374	1.053	2.047	2.304	2.191	4.056	4.635	4.688	4.411	

FONTE: Ministério da Agricultura (2000).

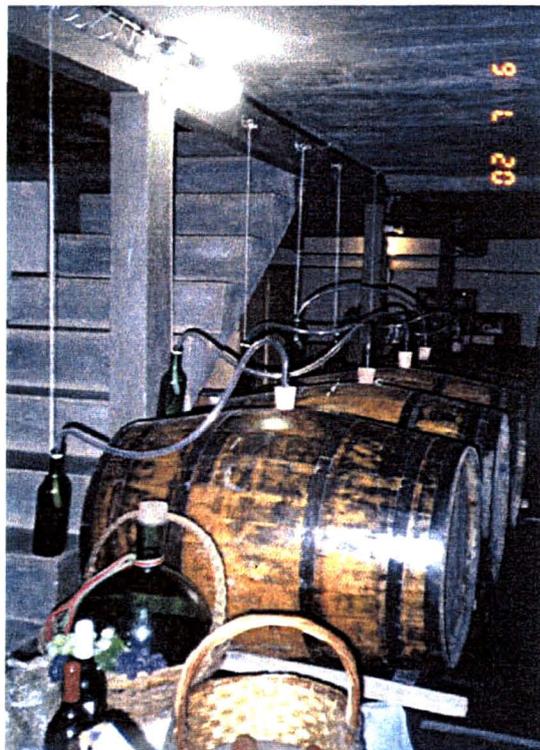
### 3.4 PRODUÇÃO DE VINHO EM COLOMBO

O município de Colombo, na região metropolitana de Curitiba, produz 1,3 mil toneladas de uva por ano e 800 mil litros de vinho artesanal, segundo dados da Secretaria Municipal de Agricultura, Abastecimento e Meio Ambiente dessa localidade. É interessante ressaltar que a produção artesanal dos vinhos de Colombo ultrapassou significativamente a produção total de vinhos de mesa registrados no estado do Paraná, 570.773 litros, segundo dados do Ministério da Agricultura referentes ao ano de 2002. Desse total, 77,55% são de vinhos tinto de mesa, registrando um aumento de 43,69% de representatividade dos vinhos tintos em relação ao ano de 1999.

FIGURA 1 – VISTA PANORÂMICA DA CULTURA DA VIDEIRA NO MUNICÍPIO DE COLOMBO-PR



FIGURA 2 – VINÍCOLA DE UM PRODUTOR DO MUNICÍPIO DE COLOMBO-PR QUE UTILIZA BARRIL DE CARVALHO EM UMA ETAPA DA PRODUÇÃO DO VINHO



Nas FIGURAS 1 e 2 pode-se observar a cultura da videira e as instalações utilizadas no preparo artesanal do vinho no município de Colombo em propriedades particulares.

### 3.5 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

De acordo com a LEI FEDERAL n. 7.678 do Ministério da Agricultura (1988), vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura. Pode ser classificado quanto à classe, à cor e ao teor de açúcar.

Quanto à classe:

- a) de mesa;
- b) leve;
- c) champanha ou espumante;
- d) licoroso;
- e) composto;
- f) outros.

Quanto à cor:

- a) tinto;
- b) rosado ou "rosé";
- c) branco.

Quanto ao teor de açúcar:

- a) "brut";
- b) extra-seco;
- c) seco ou "sec" ou "dry";
- d) meio seco;
- e) meio doce;
- f) suave;
- g) doce.

Quanto ao tipo de uva utilizada:

- a) vinhos finos ou nobres: aqueles elaborados com variedades de uvas *V. vinifera*;
- b) vinhos especiais: aqueles elaborados com variedades de uvas *V. vinifera* e outras uvas híbridas e/ou americanas até o máximo de dois quintos;
- c) vinhos comuns ou de consumo: aqueles elaborados com variedades híbridas ou americanas.

Quanto ao teor de açúcares totais, calculado em g/L de glicose, o vinho de mesa será denominado de seco, meio-seco ou suave, conforme TABELA 7.

TABELA 7 - CLASSIFICAÇÃO DO VINHO DE MESA QUANTO AO TEOR DE AÇÚCAR

CLASSIFICAÇÃO	GLICOSE (g/L)
Seco	3 a 5
Meio seco	5 a 20
Suave	Mais de 20

FONTE: DECRETO n. 99.066 do Ministério da Agricultura (1990).

O adoçamento do vinho somente poderá ser efetuado com sacarose na forma sólida, no próprio vinho ou com mosto de uva, concentrado ou não.

TABELA 8 – VALORES MÁXIMOS E MÍNIMOS FIXADOS PARA VINHO DE MESA

ANÁLISE	MÁXIMO	MÍNIMO
Álcool etílico (em °GL a 20 °C)	13,00	10,00
Acidez total (mEq/L)	130,00	55,00
Acidez volátil corrigida (mEq/L)	20,00	-
Sulfatos totais, em sulfato de potássio (g/L)	1,00	-
Anidrido sulfuroso total (g/L)	0,35	-
Cloretos totais, em cloreto de sódio (g/L)	0,20	-
Cinzas (g/L) – vinhos comuns tinto	-	1,50
Relação álcool em peso – extrato seco reduzido - vinhos comuns tinto	4,80	-
Álcool metílico (g/L)	0,35	-

FONTE: PORTARIA n. 229 do Ministério da Agricultura (1988).

Segundo a PORTARIA n. 229 do Ministério da Agricultura (1988), que estabelece os padrões de identidade e qualidade do vinho, vinho de mesa é o vinho com graduação alcoólica de 10 a 13 °GL a 20 °C e deverá obedecer os limites fixados na TABELA 8.

### 3.6 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

A fermentação alcoólica no preparo do vinho é realizada num ambiente não-estéril, onde diferentes espécies de leveduras estão sempre presentes. A fermentação com o suco natural de uva é iniciada pelas leveduras apiculatas (*Hanseniaspora*, *Kloeckera*), sendo substituídas no decorrer da fermentação pela levedura *S. cerevisiae*. Durante diferentes estágios da fermentação também é possível isolar outras espécies como *Candida stellata*, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia membranaefaciens*, etc (HEARD; FLEET, 1985; ARAUJO et al., 1998; HENICK-KLING et al., 1998; CIANI; PEPE, 2002).

A fermentação espontânea (do suco/mosto não sulfitado) é produzida por uma sucessão de populações de leveduras (procedentes da própria uva ou da adega) que iniciam com espécies relativamente débeis, ainda que numericamente superiores, presentes no fruto. Entretanto, essas espécies são sensíveis à concentração crescente de álcool e seus metabolismos são mais difíceis de serem previstos em comparação aos das cepas de *S. cerevisiae*. Durante um período de

dois dias, dependendo da temperatura, a atividade das espécies nativas diminui e se estabelecem as populações selvagens de *S. cerevisiae*, que continuam a fermentação (PRETORIUS; VAN DER WESTHUIZEN; AUGUSTYN, 1999; PRETORIUS, 2000; ZOECKLEIN et al., 2001).

Segundo estudo realizado em fermentações espontâneas de mostos da região de Malbec, na Patagônia, por LOPES et al. (2002), as populações de *S. cerevisiae* demonstraram uma alta variabilidade nos polimorfismos moleculares, superiores às diversidades encontradas em fermentações espontâneas provenientes da França, Espanha e Argentina. De um total de 58 cepas molecularmente caracterizadas, 29 foram diferenciadas, embora mais que 60% do total da biomassa eram representadas por apenas nove cepas diferentes.

Nesse mesmo estudo, uma sucessão de cepas minoritárias foi observada tanto na fermentação em escala laboratorial como na escala industrial, onde apenas poucas variedades predominaram durante o processo. Duas cepas de *S. cerevisiae* foram comuns em ambas escalas, e podem ter sido originadas, segundo SANGORRÍN et al. (2002), da biota de *Saccharomyces* associada às áreas da cantina onde os mostos foram processados.

Segundo FLEET (1992), no início da fermentação, a pequena quantidade de espécies selvagens de *Saccharomyces* não permite que as mesmas sejam detectadas no mosto. Entretanto, após a fase lag, elas são capazes de crescer e produzir álcool suficiente (aproximadamente 5%) para inibir as outras leveduras selvagens e dominar a fermentação alcoólica. Esta é a sucessão desejada em fermentações espontâneas, uma vez que muitas leveduras selvagens não-*Saccharomyces* são capazes de produzir quantidades relativamente altas de metabólitos indesejáveis e inibitórios, como os álcoois superiores, ácido acético e acetaldeído (ROMANO et al., 1992).

As leveduras *Brettanomyces* sp e sua forma esporulante, *Dekkera*, têm sido isoladas no mundo todo em adegas que não realizam uma adequada desinfecção de seus equipamentos, e são consideradas o principal problema dos vinhos tintos, assim como dos vinhos brancos de mesa amadurecidos em barricas. São capazes de produzir de 10 a 11% de álcool. Elas são especialmente difíceis de controlar porque suas presenças podem passar despercebidas até que o vinho esteja

completamente contaminado. A formação de 4-etil-fenol, a partir do ácido p-cumárico se atribui diretamente às suas presenças (ZOECKLEIN et al., 2001).

As leveduras *Kloeckera* e *Hanseniaspora* se desenvolvem em abundância durante as primeiras etapas das fermentações nativas (PRETORIUS; VAN DER WESTHUIZEN; AUGUSTYN, 1999; ZOECKLEIN et al., 2001) e podem representar as espécies dominantes em mostos/sucos não tratados com sulfitos. Há informações que a *Kloeckera apiculata* cresce em presença de até 150 mg/L de SO<sub>2</sub>. Tanto *Kloeckera* como *Hanseniaspora* podem produzir quantidades importantes de ácido acético e acetato de etila (ZOECKLEIN et al., 2001).

Há estudos de cepas contaminantes de *Hanseniaspora uvarum*, *C. rugosa*, *P. anomala*, *P. kluyveri* e *P. pijperi* que podem preocupar o vinicultor que está utilizando cepas sensíveis de *S. cerevisiae* (ZOECKLEIN et al., 2001; ZAGORC et al., 2001).

Durante a fase inicial nas fermentações espontâneas, muito pouco açúcar é metabolizado e apenas uma pequena quantidade de álcool é produzida. Neste período, o número de leveduras do gênero *Saccharomyces* é baixo, as leveduras não-*Saccharomyces* são capazes de alcançar altas densidades celulares e podem persistir durante a fermentação alcoólica (HEARD; FLEET, 1985; HENICK-KLING et al., 1998).

ARAUJO et al. (1998), observaram que os gêneros *Kloeckera* e *Saccharomyces* são os mais freqüentes nas uvas do mundo todo. De acordo com HEARD e FLEET (1986), *S. cerevisiae* foi a levedura dominante nos mostos australianos, entretanto foi encontrado um crescimento significativo de *K. apiculata* (*K. lindneri*), *C. stellata* e *C. pulcherrima*. ARAUJO et al. (1998), também detectaram estas espécies em duas variedades de uvas brancas da Venezuela, embora *Candida* sp predominou. Leveduras pertencentes a esse gênero não apresentam boas propriedades enológicas, uma vez que elas só crescem em baixos teores de álcool, são extremamente oxidativas e a maioria não fermenta glucose.

Por outro lado, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes* e *Torulopsis* (recentemente designada como *Candida*) têm sido encontrada na França e *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Torulospira* foram as leveduras predominantes em mostos de uvas frescas da região de Utiel-Requena na Espanha. *Schizosaccharomyces pombe*

foi encontrado em 40% dos mostos da Sicília, e é considerado um componente típico da microflora das uvas daquela região, segundo FLORENZANO; BALLONI; MATERASSI <sup>1</sup>, citado por ARAUJO et al. (1998). As leveduras *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia* e *Brettanomyces* têm sido relacionadas à oxidação do vinho, devendo desta forma serem evitadas nos mostos (ARAUJO et al., 1998).

Fermentações em temperaturas abaixo de 20°C favorecem o crescimento e a sobrevivência de leveduras não-*Saccharomyces* sobre as *Saccharomyces* e aumentam sua tolerância ao álcool, especialmente a *K. apiculata* (HEARD; FLEET, 1988), além do risco de provocarem sabores indesejáveis ao vinho (EGLI et al., 1998). Segundo FLEET (1990), além da *K. apiculata*, espécies de *Candida* podem crescer na presença de *S. cerevisiae* e até exceder sua população em baixas temperaturas de fermentação, ocasionando mudanças nas propriedades sensoriais dos vinhos.

### 3.7 LEVEDURAS SELECIONADAS

Nenhum campo enológico tem evoluído tanto nos últimos anos como o da Microbiologia. Até há 20 anos, a seleção das leveduras era para a maioria das cantinas sem importância. Antes de 1962 não existiam leveduras secas ativas para vinificação. A partir de 1970, algumas empresas começaram a empregar diferentes cepas de leveduras para fermentar o mesmo mosto. Com o passar dos anos, a maioria das cantinas ampliou suas atividades e experimentaram diferentes cepas. Atualmente, em função da facilidade na obtenção das leveduras, os produtores escolhem as cepas pelas características da fermentação que desejam (ZOECKLEIN et al., 2001).

Segundo COMI; CROATTINI (1997), o uso de leveduras selecionadas secas ativas assegura um início rápido de fermentação, uma qualidade uniforme e a expressão das características aromáticas específicas da variedade, além de não haver necessidade da pré-multiplicação, pois podem ser adicionadas diretamente ao mosto. Elas também reduzem o tempo de fermentação.

<sup>1</sup>FLORENZANO, G.; BALLONI, W.; MATERASSI, R. Contribution to the ecology of *Schizosaccharomyces* on grapes. *Vitis*, v. 16, p. 38-44, 1977.

As leveduras selecionadas dessecadas garantem a fermentação completa e melhoram as características sensoriais dos vinhos quando comparado aos resultados obtidos com leveduras selvagens (QUEROL, 1992; COMI; CROATTINI, 1997).

Segundo PATO (1978), o uso de leveduras selecionadas permite que a fermentação inicie-se mais rápido, os vinhos resultantes são mais aromáticos, com melhor rendimento alcoólico e se conservam sem excesso de gás sulfuroso.

O critério para seleção de leveduras reside na habilidade de melhorar a qualidade e a consistência do vinho. Depende de suas características enológicas, como a taxa fermentativa, a tolerância ao álcool e ao anidrido sulfuroso, características de floculência, a presença de fatores *killer* (toxina proteica liberada pela levedura capaz de destruir outras leveduras (VAN VUUREN; JACOBS, 1992)), produção de ácido acético, produção de gás sulfídrico, metabolismo do ácido málico, alta produção de álcool, rendimento alcoólico, produção de glicerol, produção de acetaldeído e tolerância térmica (COMI; CROATTINI, 1997).

ZOECKLEIN et al. (2001) enumeram as principais vantagens da utilização das leveduras selecionadas como sendo a utilização completa dos açúcares fermentáveis, maior tolerância ao álcool, produção de H<sub>2</sub>S controlada, menor formação de ácido acético e acetaldeído, menor tendência a formar espuma e clarificação mais eficaz. BAUER; PRETORIUS (2000), PRETORIUS (2000) e ZOECKLEIN et al. (2001) também destacam que o uso de leveduras selecionadas proporciona rápido começo da fermentação ativa e taxa previsível da conversão de açúcar a álcool.

Comparativamente, leveduras naturais podem produzir características negativas durante a produção de vinho como altas concentrações de ácido acético ou alterações nos aromas típicos dos vinhos (COMI; CROATTINI, 1997). KRAUS; SCOOP; CHEN (1981) consideram muito importante que as leveduras selecionadas possam ser secas sem perder sua vitalidade e atividade.

Em estudo realizado com 20 leveduras dessecadas (18 *S. cerevisiae* e 2 *S. bayanus*), foi demonstrado que as leveduras secas ativas possuem uma alta taxa fermentativa e um número maior de células viáveis. Produzem uma quantidade adequada de álcool e são tolerantes ao anidrido sulfuroso. A produção de glicerol e ácido acético foram menores em todas as variedades. Foi observado também que

certas variedades possuíam o caráter *killer*. Cada cepa teve uma discreta capacidade de reduzir o ácido málico, podendo por esta razão ser útil à desacidificação biológica (COMI, CROATTINI, 1997).

No Brasil, a primeira levedura selecionada de uso industrial, denominada Embrapa-20B, foi uma linhagem de *S. cerevisiae* isolada em 1984 entre 89 linhagens de leveduras, a partir de mostos de uva branca Riesling Itália. Entre suas principais características estão o alto poder fermentativo, a elevada tolerância ao álcool e à pressão, a baixa capacidade em produzir compostos secundários indesejáveis e a capacidade de desenvolver aromas de alta qualidade. Até 1984 todas as leveduras utilizadas no Brasil eram totalmente importadas. No período de 1985 a 1987 mais de 11 milhões de litros de vinho foram elaborados anualmente com a nova levedura selecionada pelo Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, localizado em Bento Gonçalves (Embrapa Uva e Vinho, 1987).

O melhoramento genético, baseado em técnicas genéticas clássicas (mutagênese, hibridização, fusão de protoplastos) aliado posteriormente à biologia molecular, aumentou substancialmente as possibilidades de modificar cepas industriais em função das características desejáveis no produto final. Nos últimos 20 anos, os principais alvos para o desenvolvimento de diferentes variedades de *S. cerevisiae* estão voltados para o melhoramento da performance fermentativa e simplificação do processo, aliado ao aumento da qualidade do produto, como as características sensoriais e higiênicas (VILANOVA et al., 2000; DEQUIN, 2001).

Segundo MASNEUF; AIGLE; DUBOURDIEU (1996), o estudo genético de leveduras para vinificação é relativamente recente quando comparado às leveduras de panificação. A maioria das leveduras comerciais disponíveis são variedades de *S. cerevisiae*, incluindo aquelas descritas por enologistas como *S. bayanus*.

Tentativas genéticas clássicas foram utilizadas para a obtenção de leveduras de vinificação no início dos anos 80, em função da procura de novas cepas que apresentassem novas características. Entretanto, a falta de especificidade dos métodos tornou difícil modificar precisamente uma característica sem afetar outras. Nos últimos 10 anos, com a demanda de mercado elevada, o número de leveduras selecionadas geneticamente passou de 20 para mais de 100, graças às substanciais contribuições de trabalhos envolvendo a tecnologia de DNA recombinante (DEQUIN, 2001).

Entre os alvos específicos para o melhoramento genético das leveduras de vinificação pode-se destacar:

- a) o desenvolvimento de variedades de *S. cerevisiae* capazes de degradar completamente o ácido málico em ácido láctico, substituindo o papel das bactérias lácticas, que podem eventualmente alterar os vinhos, e/ou produzir metabólitos indesejáveis;
- b) acidificação biológica utilizando uma variedade de *S. cerevisiae* produtora de ácido láctico em mostos com acidez insuficiente. A alta estabilidade e as propriedades sensoriais deste ácido orgânico justificam sua produção;
- c) decréscimo da concentração de ácido acético, o principal componente da acidez volátil, através do controle do nível de expressão da acetaldeído desidrogenase citossólica codificada por *ALD6*;
- d) desenvolvimento de variedades de leveduras que secretem enzimas capazes de facilitar a clarificação dos vinhos e a obtenção do suco de uvas, incrementando o rendimento do suco e a liberação de vários compostos presentes nas cascas das uvas. Tais enzimas, pectinases, glucanases e xilanases, já existem disponíveis comercialmente, mas apresentam um custo elevado além de algumas enzimas indesejáveis, como, segundo VILANOVA et al. (2000) arabinofuranosidases e esterases, as quais liberam grupamentos metila provenientes da pectina, que podem aumentar o teor de metanol nos vinhos.
- e) aumento do aroma dos vinhos pela modificação das vias metabólicas de *S. cerevisiae* existentes associada à produção de compostos aromáticos. Segundo ROMANO et al. (1985), mutantes da via biossintética do ergosterol têm demonstrado produzir monoterpenos (geraniol, citronelol e linalol) similares àqueles encontrados nas uvas de variedade floral.
- f) redução do ácido sulfídrico, cuja produção pode ser afetada pela variedade de levedura utilizada na fermentação. Segundo ROMANO et al (1985), leveduras com baixa produção de ácido sulfídrico têm sido obtidas por hibridização. Apesar do imenso progresso durante 20 anos de estudo de microorganismos geneticamente modificados, somente duas leveduras foram oficialmente aprovadas para uso comercial pelo governo inglês, uma levedura para panificação e outra para cervejaria. O maior

obstáculo para comercialização é a aceitação pelo público, que desconhece seu potencial e seu uso seguro (DEQUIN, 2001).

### 3.8 LEVEDURAS SELVAGENS VERSUS LEVEDURAS SELECIONADAS

A utilização de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* é atualmente uma realidade nas indústrias de vinho e envolve isolamento de diferentes variedades originadas de regiões vínicas do mundo inteiro (HENICK-KLING et al., 1998; ARAUJO et al., 1998; VILANOVA et al., 2000, LOPES et al., 2002).

A inoculação com uma cultura comercial inicial tem a intenção de estabelecer uma população dominante de uma cepa de *S. cerevisiae* selecionada desde o início da fermentação, para assegurar sua dominância. Este procedimento resulta numa produção rápida de álcool e a conseqüente minimização do crescimento de leveduras não-*Saccharomyces* presentes. Evita a formação de componentes indesejáveis, reduz o tempo da fermentação e permite a obtenção de vinhos com aromas previsíveis (HENICK-KLING et al., 1998).

O uso de cultura inicial selecionada (Lalvin K1-Marked A2DE2 420655) em combinação com pequenas doses de sulfito apresentou o mesmo efeito sobre a população de leveduras comparado a uma alta dose de sulfito individual. Entretanto pode-se perceber que a inoculação com uma cepa inicial tem a vantagem adicional de obtenção de uma fermentação segura e previsível (HENICK-KLING et al., 1998).

É importante observar que a adição de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* não impede a presença de outras cepas durante a fermentação. Conforme resultados demonstrados por EGLI et al. (1998), diferentes culturas iniciais podem dominar em diferentes graus, permitindo que diferentes números de cepas de *Saccharomyces* selvagens cresçam. Assim, cada tipo de fermentação seleciona uma mistura diferente de leveduras selvagens, indicando que a escolha de uma cultura inicial cria populações únicas.

Através de um método de detecção de padrões de restrição de DNA mitocondrial de leveduras, QUEROL et al. (1992) estudaram a dinâmica da população presente no processo fermentativo em mostos inoculados e não inoculados de dois produtores da região mediterrânea da Espanha. Nas primeiras fases da fermentação, uma grande diversidade de cepas de *S. cerevisiae* foi

observada, mas somente algumas delas estavam presentes durante todo o processo. Curiosamente, a diversidade de cepas foi maior na fermentação inoculada que na natural, em ambos produtores. Este fato pode ser explicado assumindo que a cepa inoculada perturba o equilíbrio do ecossistema. Na realidade, algumas das cepas mais freqüentes dos mostos não inoculados foram também as cepas selvagens mais comuns presentes nos primeiros estágios das fermentações inoculadas. O crescimento da levedura inoculada poderia favorecer o desenvolvimento de uma minoria de outras cepas selvagens por inibir o crescimento de cepas selvagens responsáveis pela fermentação natural.

Há considerável contravérsia sobre uso de leveduras puras selecionadas em fermentações vínicas. Segundo QUEROL; JIMENEZ; HUERTA (1990), na fermentação natural, uma sucessão de gêneros de leveduras é observada durante os primeiros estágios do processo, seguido de certas espécies de *Saccharomyces*, as quais então dominam os estágios mais ativos até o final da fermentação. Sugere-se que esta sucessão de espécies permite a obtenção de um aroma mais complexo do vinho. Alguns pesquisadores alegam que o uso de leveduras selecionadas pode suprimir significativamente o desenvolvimento de leveduras naturais durante a fermentação. Por outro lado, HEARD; FLEET (1985) postularam que as variedades de *S. cerevisiae* inoculadas podem influenciar benéficamente o desenvolvimento de variedades de *Saccharomyces* selvagens pela inibição do crescimento de leveduras não-*Saccharomyces*.

CIANI; PEPE (2002) observaram que nas fermentações espontâneas, devido ao baixo nível inicial de leveduras selvagens (*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*), constata-se fermentações lentas, atribuídas talvez às condições difíceis de fermentação.

HENICK-KLING et al. (1998) observaram que uma cultura pura inicial com alta densidade e viabilidade celular dominou completamente a população selvagem de *S. cerevisiae* presente no mosto. Esta cultura também suprimiu fortemente as leveduras não-*Saccharomyces* que apresentavam alta densidade celular inicial. Este domínio provavelmente é devido à produção de etanol advindo destas leveduras, como também à competição por nutrientes e produção de compostos tóxicos. Variações na extensão do domínio podem ser esperadas dependendo da cepa, da preparação da cultura e da densidade celular inicial.

Segundo CIANI; PEPE (2002), o domínio das culturas inoculadas nem sempre está garantido e depende das condições de vinificação, como viabilidade e nível do inóculo ( $5 \times 10^6$  células/mL), uso correto do inóculo, características metabólicas e fisiológicas da cultura inicial e a tecnologia de preparação do vinho (clarificação, temperatura de fermentação, adição de dióxido de enxofre, etc). Em fermentações com vinho tinto, a extensiva presença de leveduras selvagens durante os estágios intermediários da fermentação é provavelmente devido às cascas da uva (nicho natural das leveduras).

Ainda que numericamente menos prevalentes, outras leveduras selvagens (por exemplo, *Brettanomyces* sp e sua forma esporulante equivalente *Dekkera* e espécies não *cerevisiae* de *Saccharomyces*) também podem, em ausência de sulfito, começar a multiplicar-se no suco. Estudos demonstraram que a presença de *Brettanomyces* / *Dekkera* sp em co-cultivos com *S. cerevisiae* no princípio da fermentação, e inoculados até a metade dela, afetam negativa e significativamente as populações de *Saccharomyces* em comparação com as fermentações com cultivos puros de *Saccharomyces* (ZOECKLEIN et al., 2001).

Além das leveduras fermentativas, o vinicultor deve se preocupar com a contaminação do vinho pelas leveduras formadoras de véu. Várias espécies, incluindo algumas cepas de *Saccharomyces*, podem crescer oxidativamente formando uma película sobre a superfície do vinho inadequadamente armazenado e exposto ao ar. Exemplos desses microorganismos são as leveduras nativas da uva, como *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* e *Metschnikowia* que sobrevivem à fase fermentativa. Em condições oxidativas, o etanol, assim como o glicerol e os ácidos orgânicos (principalmente malato) servem como substrato para a formação de acetaldeído, ácido acético e acetato de etila. O crescimento incontrolado determina a diminuição da concentração do álcool e mudanças no pH e na acidez total. Para controlar seus crescimentos, costuma-se manter o vinho em tanques completamente cheios e selados, além da adição de  $\text{SO}_2$  e baixas temperaturas (ZOECKLEIN et al., 2001).

### 3.9 BACTÉRIAS CONTAMINANTES NO VINHO

Entre as bactérias contaminantes no vinho, o *Acetobacter* e *Gluconobacter* quando presentes podem levar à formação de ácido acético, de forma que seu crescimento pode aumentar significativamente o conteúdo de ácidos voláteis. Quando a fermentação é lenta ou está paralisada, o crescimento de *Acetobacter* e *Gluconobacter* pode determinar a formação de ácido glucônico por oxidação da glucose. Em condições oxidativas, *Gluconobacter oxydans* pode oxidar o glicerol do suco de uva ou mosto (com até 5% de etanol), formando di-hidroxiacetona, a qual afeta as propriedades sensoriais do vinho (ZOECKLEIN et al., 2001).

As bactérias de ácido láctico são responsáveis pela oxidação enzimática do ácido málico presente no vinho à ácido L-lático e CO<sub>2</sub> (fermentação malolática). Dependendo das cepas implicadas, podem ser produzidos diversos produtos secundários que também afetam as propriedades sensoriais do vinho. Estudos têm demonstrado que as bactérias do ácido láctico são originadas provavelmente das uvas, na superfície dos grãos e nas folhas da planta (menos de 10<sup>2</sup> UFC/ml). Outros trabalhos indicam como fonte os equipamentos contaminados da adega (ZOECKLEIN et al., 2001).

Os vinhos de mesa contêm glicídios suficientes para servir como fonte de energia para o crescimento das bactérias lácticas, as quais também parecem utilizar concentrações mínimas de ácidos dos vinhos secos, menos de 0,1%, para sua sobrevivência. A glucose e arabinose foram identificadas como os açúcares mais comumente utilizados. Concentrações de glucose na ordem de 0,5 μM são suficientes para suportar o crescimento das bactérias do ácido láctico (ZOECKLEIN et al., 2001).

Certas cepas de leveduras podem inibir com êxito o crescimento das bactérias lácticas quando crescem em co-cultivos. Esse antagonismo pode ser o resultado da competição pelos nutrientes ou pela produção de agentes antimicrobianos solúveis (ZOECKLEIN et al., 2001).

Na TABELA 9 compara-se a tolerância relativa ao álcool dos principais grupos de microorganismos do vinho. A tolerância ao álcool está intimamente relacionada com a temperatura de armazenamento e o pH do vinho (ZOECKLEIN et al., 2001).

TABELA 9 - TOLERÂNCIA AO ÁLCOOL, A 20°C, DOS MICROORGANISMOS DO VINHO

GRUPO	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE ÁLCOOL PARA O CRESCIMENTO (% v/v)
Leveduras do vinho	16
Espécies de <i>Saccharomyces</i> sp	10-13
<i>Acetobacter</i> sp	10-15
<i>Gluconobacter oxydans</i>	<5
Bactérias do ácido láctico (exceto <i>Lactobacillus trichoides</i> )	10-16

FONTE: ZOECKLEIN, B. W. et al. **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.

### 3.10 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas são uma ferramenta importante na uniformidade do vinho. A maioria dos tipos de vinhos comerciais pode e deve normalizar-se mediante as análises químicas dos principais componentes. Conforme vão sendo identificados, torna-se mais fácil prever sua qualidade. Além disso, as análises físico-químicas têm um valor indiscutível para o estudo das características de uma certa casta, a fim de verificar a influência e a ação de certos tratamentos executados na vinificação e de outros trabalhos executados na cantina (COSTA, 1993).

#### 3.10.1 Sólidos Solúveis

Sólidos solúveis indicam o amadurecimento da uva e sua potencial produção de álcool, além de permitirem controlar a taxa de fermentação e proporcionarem um índice relativo do conteúdo de açúcares nas misturas (ZOECKLEIN et al., 2001). Segundo AMERINE; OUGH (1976), costuma-se usar o valor de sólidos solúveis como uma medida do conteúdo de açúcar dos mostos. Os vinicultores de algumas regiões medem os sólidos solúveis na época da vindima, antes de tomar decisões sobre a chaptalização.

Internacionalmente, os sólidos solúveis se expressam utilizando as escalas °Brix, °Balling, °Baumé ou °Oechsle. Os sacarômetros que medem °Brix ou °Balling estão calibrados para determinar concentrações de sacarose em gramas por 100 gramas de solução. Entre os procedimentos densimétricos utilizados para medir os

sólidos solúveis em laboratório, estão a hidrometria e a refratometria. A hidrometria se baseia no princípio de que um objeto desloca um peso equivalente ao líquido no qual está submerso, sendo o volume deslocado pelo objeto inversamente proporcional à sua densidade. A refratometria se baseia na mudança do ângulo de incidência da luz através de meios de diferentes densidades ópticas, com distinto número de moléculas interagindo com a luz (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001).

### 3.10.2 Açúcares

Os açúcares predominantes na uva são a glucose e frutose. Em algumas variedades de *V. labrusca* se encontram pequenas quantidades de sacarose e outros açúcares (AMERINE; OUGH, 1976). Na fermentação alcoólica as leveduras utilizam esses açúcares de seis carbonos, que recebem também o nome de açúcares redutores, pois contêm hidroxilas oxidáveis. Nas uvas, a glucose e frutose se encontram aproximadamente na mesma concentração, em torno de 10 g/100 g de suco em ambos os casos. O segundo açúcar é a sacarose, representando entre 0,2 a 1 g/100 g (ZOECKLEIN et al., 2001).

Durante a fermentação, as leveduras utilizam glucose e frutose de maneira diferente, dependendo da quantidade de açúcar redutor presente, isto é, de 17 a 20%, a glucose fermenta mais rapidamente; de 20 a 25%, ambos açúcares fermentam igualmente e acima de 25%, a frutose fermenta mais rapidamente (ZOECKLEIN et al., 2001).

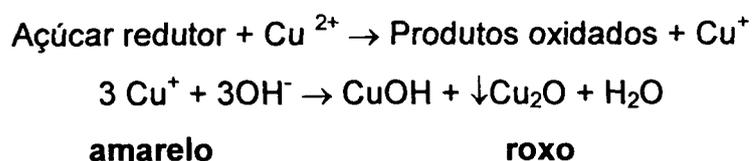
O dissacarídeo sacarose, ainda que não fermentável, é hidrolisado pela enzima invertase, originando glucose e frutose. Uma vez que as leveduras produzem sua própria enzima invertase, a chaptalização dos mostos com sacarose não causa problemas na fermentabilidade. Segundo COSTA (1993), o aumento do grau alcoólico prejudica a secreção das enzimas pelas leveduras. Seu doseamento é determinado pelo conteúdo de açúcares redutores antes e depois de seu tratamento com ácido clorídrico, responsável pela sua inversão (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001).

Os monossacarídeos de cinco carbonos, denominados pentoses, podem representar aproximadamente 28% do conteúdo de açúcar redutor de um vinho de

mesa seco, o qual, segundo AMERINE; OUGH (1976), contém em média 0,1% de açúcar redutor. Pelo fato desse grupo de açúcares não ser fácil de ser separado analiticamente, ele está incluído nas análises de açúcares redutores (ZOECKLEIN et al., 2001). Por causa desses açúcares, entre eles, a arabinose e a xilose, a dosagem de açúcares redutores jamais é nula no vinho seco. Seu teor situa-se entre 1 e 2 g/L (AQUARONE, 1983).

Em estudo realizado com leveduras isoladas de variedades de uvas brancas *French Colombard* e *Ugni Blanc* por ARAUJO et al. (1998), observou-se que a maioria das leveduras (58,1%) fermentavam 3 ou 4 açúcares, tendo cepas de *Saccharomyces* e *Brettanomyces* entre elas, sendo esta produtora de ácidos indesejáveis. A glucose foi o açúcar mais fermentado (76,7%), seguido da galactose (60,5%), maltose (58,1%), sacarose (32,6%) e rafinose (9,3%). Nenhuma levedura fermentou lactose.

Quanto aos polissacarídeos, podemos citar a celulose e a hemicelulose, os quais são os constituintes principais da parede celular da uva e que podem estar presentes em pequenas quantidades no vinho por hidrólise ácida. Além destes, têm-se a pectina, heteropolissacarídeo formado principalmente por ácido galacturônico. Analiticamente, os açúcares redutores podem ser determinados por técnicas químicas ou enzimáticas e por HPLC. Os métodos químicos implicam geralmente na reação com  $\text{Cu}^{2+}$  em solução alcalina. Como pode ser observado nas seguintes equações, os açúcares redutores como a glucose e a frutose reduzem o cobre (II) a cobre (I) em condições alcalinas (AMERINE; OUGH, 1976):



Esta reação depende de variáveis como tipo e concentração de açúcares presentes, concentração de álcali, temperatura e duração da reação (ZOECKLEIN et al., 2001). O método de Eynon-Lane é um procedimento oficial pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2000) baseado na redução do cobre (AMERINE; OUGH, 1976).

### 3.10.3 pH

O pH é uma medida do conteúdo de prótons livres em solução, assim sendo, duas soluções de ácidos diferentes podem ter a mesma acidez total, mas terá mais força ácida aquela que contiver o ácido mais dissociável, isto é, o ácido mais forte. É particularmente importante pelo seu efeito sobre os microorganismos, sobre a cor, sabor, potencial redox e sobre a proporção entre o dióxido de enxofre livre e combinado (AMERINE; OUGH, 1976; PATO, 1978; AQUARONE, 1983).

O pH dos mostos para vinho de mesa deve estar na faixa de 3,1 a 3,6, o qual deve ser observado antes da colheita da uva. Geralmente, o pH de um vinho novo, livre de dióxido de carbono é mais alto que do mosto que o originou, sendo em torno de 3,6 para vinhos de mesa. Sua importância está relacionada à resistência às enfermidades. Vinhos com pH superior a 3,5 apresentam-se em deficientes condições de conservação, por permitirem a evolução da flora microbiana prejudicial (AMERINE; OUGH, 1976; PATO, 1978).

Segundo ZOECKLEIN et al. (2001), o pH dos vinhos brancos é inferior a 3,4, enquanto vinhos tintos podem apresentar valores superiores, devido ao contato das cascas e sementes antes e durante a fermentação.

### 3.10.4 Acidez

A acidez de um vinho tem papel fundamental na beleza da cor, na intensidade e persistência dos aromas e na sua estabilidade, mas o seu sabor será equilibrado e harmônico somente se existir perfeito equilíbrio entre os ácidos orgânicos (LONA, 1991; ZOECKLEIN et al., 2001). As normas comerciais impõe ao suco de uva uma acidez em torno de 0,6 a 0,9%, sendo que os vinhos doces devem apresentar uma acidez em torno de 0,4 a 0,65% (AMERINE; OUGH, 1976).

Nos vinhos encontram-se diversos ácidos orgânicos que podem ser originados da própria uva ou durante o processo de fermentação (AQUARONE, 1983; ZOECKLEIN et al., 2001). Entre os originários da uva encontram-se o ácido tartárico, o ácido málico e o ácido cítrico, os quais juntamente com o ácido succínico formado durante a fermentação e os ácidos inorgânicos, se agrupam em uma

categorias de acidez denominada de acidez fixa. (LONA, 1991; ZOECKLEIN et al., 2001).

O ácido tartárico é o ácido típico da uva, estando presente em maior quantidade (0,2 a 1% p/v) e regulando a acidez do vinho. Sua concentração diminui por precipitação sob a forma de cristais de bitartarato de potássio e tartarato de cálcio, ocasionada pelo aumento da concentração de álcool e diminuição da temperatura que ocorrem durante o processo de fermentação (BENASSI, 1997; ZOECKLEIN et al., 2001). O ácido málico está presente em menor quantidade quanto mais madura for a uva. Sua concentração varia de 0,1 a 0,8%, podendo esta quantidade ser alterada pela fermentação malolática, levando a um aumento na concentração de ácido láctico e redução da acidez (LONA, 1991; BENASSI, 1997; ZOECKLEIN et al., 2001).

Entre os ácidos originários da fermentação, encontram-se principalmente os ácidos acético, láctico e succínico. Os dois primeiros são denominados de ácidos voláteis, assim como os ácidos propiônico e butírico, presentes em menor proporção (COSTA, 1993). O ácido acético é o principal constituinte da acidez volátil e é formado a partir do acetaldeído. Baixa acidez volátil é uma boa indicação da sanidade e qualidade do vinho. Geralmente, a concentração de ácido acético não ultrapassa 0,5 a 0,7 g/L; acima desse limite, a ação de bactérias patogênicas ou acéticas deve ser considerada (AMERINE; OUGH, 1976; BENASSI, 1997).

O ácido láctico não é considerado propriamente como um ácido envolvido na azedia como o ácido acético. Ele se arrasta ligeiramente pelo vapor, dependendo do tipo de equipamento utilizado, da quantidade de vapor disponível e do seu teor no vinho, dificultando a definição de acidez volátil. A presença de ácido sulfuroso é outra dificuldade, pois ele é destilado parcialmente junto com o ácido acético. Sua correção é importante quando o conteúdo de dióxido de enxofre é alto (AMERINE; OUGH, 1976).

Para a determinação da acidez, além do pH e acidez total (acidez fixa e volátil), pode-se utilizar outras técnicas de dosagem individual, através de métodos colorimétricos e enzimáticos, que exigem longo tempo de análise, ou ainda por cromatografia em papel, camada delgada e HPLC, que tem a vantagem de determinar simultaneamente uma grande parte dos ácidos. Nas metodologias de

HPLC empregam-se diferentes mecanismos para separação dos diversos compostos (BENASSI, 1997; ZOECKLEIN et al., 2001).

Foi observado que, em níveis equivalentes de acidez, a ordem de percepção da acidez dos ácidos comuns dos vinhos é málico, tartárico, cítrico e láctico. A presença do etanol e sacarose desfavorecem a percepção dos ácidos, enquanto que os fenóis podem aumentar os níveis ácidos mínimos detectáveis (ZOECKLEIN et al., 2001).

### 3.10.5 Álcoois

O conteúdo alcoólico de um vinho influi na sua estabilidade, assim como em suas propriedades sensoriais. Entre os álcoois mais importantes presentes em um vinho estão o etanol, glicerol, alguns álcoois superiores e o metanol (AMERINE; OUGH, 1976; AQUARONE, 1983; ZOECKLEIN et al., 2001).

#### 3.10.5.1 Etanol

A formação do álcool por meio de leveduras presentes no suco está subordinada ao teor de oxigênio disponível no meio e à concentração de açúcares fermentáveis. Uma vez que as leveduras estão metabolicamente equipadas para crescer em condições em que o oxigênio está em abundância ou em quantidades limitadas, em condições aeróbicas (oxidativas), onde a concentração de açúcares fermentáveis é menor que 3%, as leveduras utilizam rotas respiratórias que levam à formação de gás carbônico e água. Para que o seu metabolismo fermentativo seja ativado, há necessidade da presença de glucose (superior a 4-5%) para induzir os sistemas da piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, que levarão à descarboxilação do piruvato a acetaldeído e a subsequente redução a etanol (ZOECKLEIN et al., 2001).

As diferentes espécies e cepas de leveduras têm distintas capacidades para utilizar os carboidratos para formar álcool e outros produtos, assim como para crescer em diferentes concentrações de álcool. A maioria das cepas de *S. cerevisiae* é inibida à medida que a quantidade de álcool se aproxima de 14 a 15% (v/v), mas algumas cepas são mais tolerantes (ZOECKLEIN et al., 2001).

Segundo as metodologias, os procedimentos para determinação de álcool em bebidas se dividem em métodos físicos e químicos (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001). Entre os métodos físicos, descritos por AMERINE; OUGH (1976), têm-se a medida do ponto de ebulição, análise do destilado por hidrômetro, picnômetro, balança hidrostática, índice de refração e cromatografia gasosa. Entre os métodos químicos temos a oxidação pelo dicromato e a análise enzimática. ZOECKLEIN et al. (2001) descreve estes métodos, exceto o uso de picnômetro, balança hidrostática e índice de refração, e acrescenta o uso do HPLC na determinação do etanol.

#### 3.10.5.2 Metanol

O álcool metílico não é um produto normal da fermentação, sendo resultado da hidrólise da pectina metilada presente nas uvas (AMERINE; OUGH, 1976; VILANOVA et al., 2000; ZOECKLEIN et al., 2001). Aproximadamente dois terços dos grupos de ácidos carboxílicos da pectina natural estão esterificados com metanol.

Durante a vinificação, usam-se pectinases para aumentar a produção de suco e para a extração da cor e clarificação. Tal método deve ser realizado com cautela para evitar a formação excessiva de metanol. Em estudo realizado com uvas da variedade Albariño por VILANOVA et al. (2000) foi detectado que os mostos suplementados com enzimas pécticas comerciais aumentaram duas vezes mais o nível de metanol presente nos vinhos, devido à atividade de metil-esterases sobre a pectina.

A análise do metanol não é uma prática de rotina na indústria vinícola, mas se pode realizar facilmente por cromatografia gasosa (ZOECKLEIN et al., 2001). O método oficial e o citado pela OIV (1990) consistem em separar o metanol dos constituintes não voláteis, por meio de destilação simples, como no processo do etanol. O metanol se oxida a formaldeído, o qual reage com o ácido cromotrópico, formando um composto colorido, determinado espectrofotometricamente a 575 nm (AMERINE; OUGH, 1976).

### 3.10.6 Ésteres

Os ésteres têm geralmente características frutais e florais importantes nas propriedades sensoriais dos vinhos. Eles podem ser classificados em dois grupos: os que são produzidos a partir de acetato e etanol de álcoois fixos e os que são produzidos a partir de etanol e precursores de ácidos graxos de cadeia linear (ZOECKLEIN et al., 2001).

Os ésteres do primeiro grupo incluem os acetatos de etila, isobutila, isoamila, 2-fenetil e hexil. Exemplos do segundo grupo são os ésteres de etila dos ácidos hexanóico, octanóico e decanóico. Sua importância nas propriedades sensoriais é bem menor (ZOECKLEIN et al., 2001).

Segundo AMERINE; OUGH (1976), não é somente o ácido acético responsável pelo odor de deterioração, como também um alto conteúdo de acetato de etila e possivelmente pequenas quantidades de outros produtos de decomposição. Uma vez que ambos produtos são geralmente produzidos simultânea e proporcionalmente, a quantidade de ácido acético pode ser um bom referencial para estimar a concentração de acetato de etila presente, e portanto o grau de deterioração do vinho.

De acordo com AVAKYANTS et al.<sup>2</sup>, citado por FRAILE et al. (2000), o aroma fundamental dos vinhos é devido a quatro ésteres (acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila e octanoato de etila), dois álcoois (isobutílico e isoamílico) e acetaldeído.

Por cromatografia gasosa já foram identificados cerca de 32 ésteres do vinho. A uva normalmente não apresenta concentração elevada de ésteres, exceto de antranilato de metila na uva Concord e outras variedades de *V. labrusca*. O antranilato de metila é o principal éster responsável pelo odor "foxado" de vinhos de *V. labrusca* (AQUARONE, 1983).

<sup>2</sup>AVAKYANTS, S. P. et al. Khromato-mass-spektrometricheskoe issledovanie letuchikh vesnchestv vina. *Vinodel. Vinograd. SSSR*, v. 41, p. 50-53, 1981.

### 3.10.7 Aldeídos

Devido ao seu limite sensorial baixo, os aldeídos representam um importante papel no aroma e bouquet dos vinhos, e, entre eles, o acetaldeído é o principal componente, constituindo mais que 90% do conteúdo total de aldeído. O acetaldeído é originado como um produto intermediário do metabolismo da levedura a partir do piruvato, por meio de enzimas da via glicolítica, e é um precursor para o acetato, acetoína e etanol. Tanto o piruvato como o acetaldeído deveriam ser considerados como precursores na formação da valina e leucina. Outros autores demonstraram que os metabólitos piruvato, acetaldeído e ácido acético podem ser utilizados na síntese de aminoácidos, originados de álcoois superiores ou seus precursores (ROMANO et al, 1994).

A quantidade de acetaldeído presente nos vinhos aumenta com o envelhecimento, devido à oxidação do álcool etílico, ou à atividade de leveduras formadoras de véu ou à aeração. Segundo WEEKS<sup>3</sup> e LAFON-LAFOURCADE<sup>4</sup>, citados por ROMANO et al. (1994), o uso de altas concentrações de dióxido de enxofre nos mostos de uva causa um aumento considerável no nível de acetaldeído pelas células das leveduras. De acordo com AMERINE; OUGH (1976) e ROMANO et al. (1994), o conteúdo de acetaldeído aumenta com o aumento da temperatura de fermentação. O aumento do acetaldeído em temperaturas acima de 30°C pode ser devido à inibição da álcool desidrogenase, enzima responsável em reduzir o acetaldeído a etanol.

A habilidade em produzir acetaldeído é uma propriedade de diferentes leveduras do vinho e os dados disponíveis indicam que as cepas de *S. cerevisiae* produzem relativamente altos níveis de acetaldeído, de 50 a 120 mg/L, embora outras leveduras, como a *Kloeckera apiculata*, *C. krusei*, *C. stellata*, *Hansenula anomala* e *Metschnikowia pulcherrima* produzem baixos níveis, de quantidades não detectadas a 40 mg/L (ROMANO et al., 1994).

<sup>3</sup>WEEKS, C. Production of sulfur dioxide-binding compounds and of sulfur dioxide by two *Saccharomyces* yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, p. 32-39, 1969.

<sup>4</sup>LAFON-LAFOURCADE, S. Role des microorganismes dans la formation de substances combinant le SO<sub>2</sub>. **Bull. Off. Int. Vigne Vin**, v. 58, p. 590-604, 1985.

Em estudo realizado com 86 cepas de *S. cerevisiae* por ROMANO et al. (1994), foi observado considerável variação na produção de acetaldeído, demonstrando que a variedade de levedura é um fator determinante no conteúdo de acetaldeído nos vinhos. A consistente relação encontrada entre o acetaldeído e o conteúdo total de álcoois superiores parece indicar um papel chave do acetaldeído na biossíntese desses álcoois, provavelmente como um precursor na formação da valina e leucina, das quais o isobutanol e o álcool isoamílico derivam.

Existem diferentes métodos químicos para a determinação de acetaldeído. Pode-se ser realizado diretamente pela determinação iodométrica ou por formação de derivados coloridos medidos espectrofotometricamente. Além disso, o acetaldeído pode ser determinado por cromatografia gasosa. O método oficial utiliza o método iodométrico, em pH entre 8,8 e 9,5, intervalo no qual o bissulfito liberado do acetaldeído é doseado com iodo 0,05 N (AMERINE; OUGH, 1976; PORTARIA n. 076, do Ministério da Agricultura, 1986).

### 3.10.8 Compostos Nitrogenados

Os compostos nitrogenados do mosto e do vinho desempenham um papel importante na fermentação, clarificação e na potencial instabilidade microbiana. *Influem no desenvolvimento do aroma e do buquê do vinho.* Entre os compostos nitrogenados dos vinhos, temos as proteínas, os polipeptídeos, aminoácidos, amidas e amoníaco. O conteúdo total de nitrogênio no mosto varia entre 60 a 2400 mg N/litro (ZOECKLEIN et al., 2001).

A amônia representa a principal forma de nitrogênio disponível para o metabolismo das leveduras. À medida que as uvas amadurecem, diminui-se o amoníaco e aumenta o nitrogênio de peptídeos e proteínas (PEYNAUD; MAURIE<sup>5</sup>, apud ZOECKLEIN et al., 2001). Segundo OUGH<sup>6</sup>, citado por ZOECKLEIN et al. (2001), sua concentração varia entre 24 a 209 mg/L nas uvas e até 50 mg/L nos

<sup>5</sup>PEYNAUD, E.; MAURIE, A. Sur l'évolution de l'azote dans le différentes parties du raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. Agr.*, v. 2, p.15-25, 1953.

<sup>6</sup>OUGH, C. S. Substances extracted during skin contact with white must. I. General wine composition and quality changes with contact time. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 20, p. 93-100, 1969.

vinhos.

Entre os aminoácidos, a prolina e a arginina são os que se encontram em maiores concentrações no mosto. As aminas histamina e tiramina se formam por descarboxilação bacteriana a partir dos aminoácidos correspondentes. Foram analisados os efeitos da histamina, tiramina e beta-feniletilamina em humanos, onde somente a última se relacionou com dores de cabeça e náuseas (LUTHY; SCHLATTER<sup>7</sup>, apud ZOECKLEIN et al., 2001).

Os componentes do sabor que contêm nitrogênio são importantes na enologia. Por exemplo, o antranilato de metila e a orto-aminoacetofenona se relacionam com o sabor acre (foxê) das uvas labrusca e híbridos relacionados (AQUARONE, 1983; ZOECKLEIN et al., 2001). A manipulação dos compostos nitrogenados pode influir no *bouquet* de fermentação.

Os compostos nitrogenados das uvas disponíveis metabolicamente para as leveduras (aminoácidos e amônio) são denominados de nitrogênio alfa amino livres (FAN – *free alpha amino nitrogen*) (ZOECKLEIN et al., 2001). BELY et al. (1990), observaram que a concentração mínima necessária de FAN para uma fermentação satisfatória do mosto de vinho de mesa é de 140 mg/L. Por outro lado, ZOECKLEIN et al. (2001), indicaram que uma taxa máxima de fermentação requer 800 a 900 mg N/L, com 400 a 500 mg N/L assimiláveis.

A deficiência de FAN no suco é usualmente corrigida adicionando-se amônio na forma de fosfato diamônio. Nos Estados Unidos, a adição máxima permitida de sais de amônio é de 968 mg/L, enquanto que nos países da União Européia é de 300 mg/L. A correção do teor de nitrogênio evita fermentações lentas e incompletas. Deve-se evitar a adição de uréia como fonte de nitrogênio, pois seu uso proporciona a formação de carbamato de etila, o qual há suspeitas de ser um agente cancerígeno leve (ZOECKLEIN et al., 2001).

Fontes excelentes de nitrogênio para *Saccharomyces* são os aminoácidos glutamina, glutamato, asparagina, aspartato, serina e alanina, além do íon amônio (ZOECKLEIN et al., 2001). Em função das cepas de *S. cerevisiae*, são destacadas diferentes maneiras de utilização desses aminoácidos (ZOECKLEIN et al., 2001).

<sup>7</sup>LUTHY, J.; SCHLATTER, C. Biogene amina in Lebensmitteln: zur Wirkung von Histamin, Tyramin und Beta-phenylethylamin auf den Menschen. *Z. Lebensm. Unter. Forsch.*, v. 177, p. 43, 1983.

Constatou-se que as leveduras assimilam de 30% a 46% de nitrogênio total durante a fermentação. A maior parte se utiliza logo após o início da fermentação. O uso de variedades de leveduras que tenham uma forte demanda de um aminoácido limitante para seu desenvolvimento pode constituir um método para estabilizar os vinhos doces.

A interação entre os compostos fenólicos em vinhos tintos e brancos elimina ou reduz a concentração de algumas proteínas em solução. A alta quantidade de proteínas em Pinot Noir australianos causou instabilidade na cor, devido á sua aglutinação e co-precipitação com taninos e pigmentos (ZOECKLEIN et al., 2001).

### 3.10.9 Compostos com Enxofre

O enxofre, em suas distintas formas, é importante para as leveduras na biossíntese de proteínas, vitaminas e co-enzimas. Seus compostos voláteis desempenham um papel importante nas propriedades sensoriais indesejáveis do vinho. Pode ser encontrado na forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), aminoácido (metionina, cisteína e cistina), glutathion (tripeptídeo), vitaminas (biotina e tiamina), na acetil CoA e no ácido lipóico (ZOECKLEIN et al., 2001).

#### 3.10.9.1 Sulfato

Sua concentração no suco de uvas varia amplamente segundo a variedade da fruta, solo e safra (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001).

Segundo ESCHENBRUCH (1974), concentrações de 5 a 10 mg/L são suficientes para permitir o desenvolvimento de células de leveduras. Uma vez dentro das células, o sulfato tem que se reduzir a um estado de oxidação mais baixo ( $\text{S}^{2-}$ ), o qual é utilizado para formação de cisteína e metionina.

Os limites legais para os sulfatos, calculados como sulfato de potássio, são de 2 g/L nos Estados Unidos e de 3 g/L em alguns outros países. Os tintos da Califórnia, apresentam uma concentração em torno de 0,5 a 1,0 g/L (como sulfato potássico), enquanto que os brancos, alcançam uma concentração de 0,5 a 2,0 g/L, e em certas situações podem até ultrapassar o limite de 2 g/L, indicando que o uso contínuo de altas concentrações de dióxido de enxofre e o armazenamento dos

vinhos em ambientes quentes, conduzem a um acúmulo de sulfato até aproximar-se dos limites legais (AMERINE; OUGH, 1976).

### 3.10.9.2 Sulfito

É um produto intermediário na série de reações em que se produzem cisteína e metionina e que pode ser liberado ao vinho, contribuindo ao SO<sub>2</sub> total.

ESCHENBRUCH (1974), detectou que 20 de 250 cepas de *S. cerevisiae* produziam mais de 25 mg/L de dióxido de enxofre durante a fermentação. Entre estas, 5 produziam entre 60 e 70 mg/L. Por tal motivo, a produção “*in situ*” de sulfito é um fator importante para selecionar a cepa da levedura (ZOECKLEIN et al., 2001).

### 3.10.9.3 Ácido sulfídrico

Produz um odor semelhante a ovo podre quando em concentrações acima de 50-80 µg/L. Sua fonte mais importante provém da redução do sulfito nos mostos deficientes em nitrogênio. Quando não corrigido, o ácido sulfídrico pode reagir com outros componentes do vinho e formar mercaptanos, que também têm propriedades desagradáveis e difíceis de eliminar (ZOECKLEIN et al., 2001).

A quantidade de ácido sulfídrico depende da classe e quantidade de enxofre nas uvas. O enxofre elementar, por exemplo, é utilizado como fungicida em todo o mundo. Ele varia no mosto desde 0,3 até 8,9 mg/L. Concentrações de 1 a 5 mg/L de enxofre antes da fermentação são suficientes para produzir quantidades indesejáveis de ácido sulfídrico (THOUKIS; STERN<sup>8</sup>; apud ZOECKLEIN et al., 2001).

Além do enxofre elementar, a cepa da levedura e seu estado fisiológico durante a fermentação alcoólica também influenciam na concentração de ácido sulfídrico. Segundo RANKINE<sup>9</sup>, citado por ZOECKLEIN et al. (2001), um dos

<sup>8</sup>THOUKIS, G.; STERN, L. A. A review of some studies of the effect of sulfur of formation of off odors in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 13, p. 133-140, 1962.

<sup>9</sup>RANKINE, B.C. Nature, origin and prevention of H<sub>2</sub>S aroma in wines. **J. Sci. Food Agric.**, v. 14, p. 75-91, 1963.

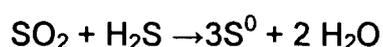
principais problemas associados ao uso de leveduras nativas para fermentação pode ser a produção de quantidades excessivamente altas de ácido sulfídrico. Não se sabe ao certo as razões dessas diferenças, mas algumas leveduras apresentam deficiências no seu metabolismo de enxofre. Um requerimento absoluto das vitaminas pantotenato e/ou piridoxina pode ser a causa da produção de quantidades importantes de ácido sulfídrico.

Além disso, as leveduras que realizam a fermentação mais rapidamente, produzem quantidades de ácido sulfídrico relativamente elevadas, causando uma diminuição mais imediata do potencial redox (ZOECKLEIN et al., 2001).

Quando o mosto apresenta pouco nitrogênio assimilável, a atividade proteolítica da levedura é estimulada, com a liberação de ácido sulfídrico dos aminoácidos que contêm enxofre. A supressão de H<sub>2</sub>S tem sido conseguida pela adição exógena de nitrogênio, na forma de amônio (fosfato de diamônio) e outros suplementos na fermentação (JOSHI; PANDEY, 1999; ZOECKLEIN et al., 2001).

O grau de clarificação também influencia na formação de ácido sulfídrico. Os sólidos da uva retêm o enxofre elementar e proporcionam uma fonte de nitrogênio para as proteínas que incluem aminoácidos com enxofre, de maneira que se forma mais ácido sulfídrico na fermentação de sucos com maior quantidade de sólidos.

A adição de SO<sub>2</sub> pode reduzir a concentração de H<sub>2</sub>S porque induz sua oxidação a enxofre elementar, o qual se precipita e pode ser eliminado por centrifugação ou filtração (ZOECKLEIN et al., 2001):



Assim, a química do suco e do vinho, como pH alto, quantidade assimilável de nitrogênio, incluindo as vitaminas B<sub>6</sub> e pantotenato, quantidade de sulfito e de sulfato e a concentração de etanol, o estado de oxidação-redução do mosto e do vinho e parâmetros físicos como sólidos em suspensão e a temperatura alta de fermentação influenciam no teor de ácido sulfídrico presente no vinho (ZOECKLEIN et al., 2001).

#### 3.10.9.4 Dióxido de enxofre

A utilização de dióxido de enxofre como agente anti-séptico é muito antiga. Em princípio, o gás era obtido por combustão do enxofre, mas devido à dificuldade de medir seguramente a quantidade de dióxido de enxofre formada por este método ou à quantidade absorvida pelo vinho, hoje são utilizadas outras fontes de dióxido de enxofre. As mais comuns são o metabissulfito de potássio, os recipientes de dióxido de enxofre comprimido e as dissoluções do gás em água (AMERINE; OUGH, 1976).

Pelo fato do *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos determinar que o mesmo poderia causar problemas de saúde para alguns indivíduos asmáticos, foi imposto um limite pela OIV de no máximo 350 mg/L (ZOECKLEIN et al., 2001).

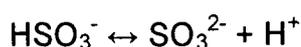
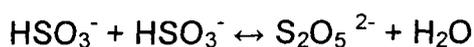
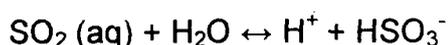
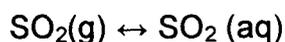
Existe uma tendência em reduzir o dióxido de enxofre utilizado na indústria do vinho por razões de saúde pública, pela melhor qualidade da fruta, pelo desejo de realizar a fermentação malolática, e para obter vinhos mais delicados (menor quantidade de fenóis nos vinhos brancos e maior flexibilidade nos tintos) (ZOECKLEIN et al., 2001).

O dióxido de enxofre dissolvido em água pode se apresentar como bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), ou  $\text{SO}_2$ . O ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ), não existe por si (ZOECKLEIN et al., 2001). Nos mostos e vinhos o íon bissulfito reage com acetaldeído para formar o acetaldeído- $\alpha$ -hidroxi sulfonato, chamado também de complexo bissulfítico (AMERINE; OUGH, 1976). Este complexo, segundo ZOECKLEIN et al. (2001), é um produto do ponto de vista sensorial, mais neutro.

Os pigmentos de antocianina possuem uma afinidade menor pelo bissulfito, formando, entre outros, o composto incolor 4-bissulfito de antocianina. Pode-se formar até 85% de 4-bissulfito de antocianina em vinhos jovens após a adição de 15 mg/L de  $\text{SO}_2$ . Tal união pode afetar de maneira significativa a polimerização dos fenóis, a estabilidade da cor e a flexibilidade dos taninos nos vinhos tintos jovens. Entretanto, os vinhos tintos mais velhos retêm mais da metade de sua cor devido à presença das antocianinas poliméricas, que são resistentes à adição de  $\text{SO}_2$  por substituição prévia. Cinquenta a setenta por cento do total de  $\text{SO}_2$  adicionado ao suco pode se unir aos açúcares como glicose, xilose e arabinose, produzindo substâncias pouco estáveis (ZOECKLEIN et al., 2001). Todo dióxido de enxofre que reage desta forma é chamado de dióxido de enxofre combinado, sendo o restante

denominado de dióxido de enxofre livre (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001).

Entre as diversas formas inorgânicas do dióxido de enxofre, há um equilíbrio que depende das quantidades presentes, do pH e da temperatura (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001). Geralmente pode-se supor as seguintes reações:



A temperatura modifica este equilíbrio de uma maneira complexa, uma vez que o dióxido de enxofre passa a forma gasosa a temperaturas altas. Assim mesmo, ao aumentar a acidez, se desloca o equilíbrio para a esquerda. No pH do vinho é dominante a espécie química  $\text{HSO}_3^-$ .

O  $\text{SO}_2$  ligado tem pouco efeito inibidor sobre a maioria das leveduras e bactérias do ácido acético, ainda que se acredita que a concentrações superiores a 50 mg/L o complexo acetaldeído - bissulfito inibe as bactérias do ácido láctico. A forma molecular não dissociada do dióxido de enxofre livre ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) é o agente antimicrobiano mais importante. De acordo com o pH do suco ou do vinho, sua quantidade varia consideravelmente. A concentração de 30 mg/L de  $\text{SO}_2$  livre pode ser muito em um vinho de pH baixo, e pouco em outro de pH superior, para controlar o crescimento microbiano (ZOECKLEIN et al., 2001).

Além disso, fatores como número de células viáveis e conteúdo de etanol, influenciam na quantidade de  $\text{SO}_2$  necessária para controlar o crescimento microbiano. Em geral, as bactérias do suco e do mosto são mais sensíveis aos efeitos do dióxido de enxofre que as leveduras (ZOECKLEIN et al., 2001).

Um dos métodos reconhecidos internacionalmente para análise de  $\text{SO}_2$  no vinho é o método de Monier-Williams, o qual determina o anidrido sulfuroso total por retrocesso com tiosulfato. O método de Ripper para o dióxido de enxofre, que existe há mais de 100 anos, se utiliza iodo padrão para titular o  $\text{SO}_2$  total ou livre de uma amostra. Embora saiba-se que esse método é um pouco impreciso, é o mais

empregado nas adegas. Esse procedimento tem a desvantagem em virtude da presença dos açúcares, aldeídos e outras substâncias que consomem o iodo em quantidade variável, conforme a composição do vinho e a temperatura (AMERINE; OUGH, 1976; CATALUÑA, 1984).

WARNER et al. (1986) observaram que o método de Monier-Williams detecta mais de 90% do conteúdo de sulfito adicionado às uvas destinadas ao preparo de vinho de mesa. LAWRENCE et al. (1990) compararam três métodos por cromatografia líquida com o método de Monier-Williams para determinação de sulfito total em vinhos brancos. Todos os quatro métodos apresentaram resultados similares, com detecção a partir de 1 µg/g de vinho.

Há um crescente interesse em desenvolver métodos sensíveis, rápidos e confiáveis para análise do dióxido de enxofre, cuja novidade afeta mais a instrumentação que a química. Técnicas de interesse atual são as análises enzimáticas, cromatografia de gás e líquida, potenciometria e polarometria, espectrofotometria, absorção atômica e espectrometria fluorimétrica (ZOECKLEIN et al., 2001).

#### 3.10.10 Cloretos

O crescente interesse do conteúdo de sódio e cloro nos vinhos é uma consequência do emprego de colunas trocadoras aniônicas para estabilização do tartarato, do cultivo de videiras próximo às regiões litorâneas, da possibilidade de utilização de aditivos clorados e das restrições legais no conteúdo de cloretos.

Geralmente a determinação do conteúdo de cloretos dos vinhos se efetua de forma direta e por isso deve ser eliminado o material colorido que pode interferir no ponto final, separando o cloreto na forma de cloreto de bário ou passando o vinho através de uma coluna de troca aniônica forte (AMERINE; OUGH, 1976).

#### 3.10.11 Ferro

O ferro do mosto está parcialmente fixado pelas leveduras durante a fermentação, dependendo da porcentagem de perdas devido à aeração dos mostos em fermentação, da presença ou ausência de material corante e das quantidades

relativas de leveduras. Os vinhos jovens, fermentados sem contato com metais, apresentam somente de 1 a 5 mg/L de ferro, enquanto vinhos fermentados em dornas de ferro ou de liga de ferro, ou ainda provenientes de mostos com alto teor deste metal, apresentam, quantidades entre 10 a 30 mg/L (AMERINE; OUGH, 1976; PATO, 1978).

O conteúdo de ferro é importante para o vinicultor uma vez que concentrações acima de 7 mg/L podem conferir turbidez ou alterações de cor à bebida. Sua presença acelera a oxidação dos vinhos. O estado de oxidação do ferro depende das condições oxidantes do vinho. Os vinhos mantidos durante muito tempo fora do contato com o ar, como, por exemplo, os engarrafados, possuem quase todo o ferro na forma ferrosa. A forma férrica aparece na aeração dos vinhos (AMERINE; OUGH, 1976). A precipitação de fosfato férrico coloidal produz nos vinhos brancos uma turbidez de aspecto leitoso. O tanato férrico precipita na forma de uma película azul negrusca, denominada de casse azul (AMERINE; OUGH, 1976; PATO, 1978).

Existem diversos métodos para a determinação exata de ferro, como a determinação colorimétrica direta do vinho com tiocianato, com orto-fenantrolina ou com 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001). As determinações de rotina de ferro são efetuadas cada vez mais por espectrofotometria de absorção atômica (AMERINE; OUGH, 1976; RIZZON et al., 1992; ZOECKLEIN et al., 2001).

### 3.10.12 Cobre

Os mostos e vinhos jovens contêm mínimas quantidades de cobre, em torno de 0,1 a 0,3 mg/L. Entretanto, quando o vinhedo é tratado com pulverização de cobre podem ser introduzidas ao mosto quantidades maiores (MANFROI; RIZZON, 1996). O contato dos mostos ou dos vinhos com recipiente de cobre também podem aumentar o seu conteúdo. Durante a fermentação as leveduras fixam a maior parte do cobre contido nos mostos (AMERINE; OUGH, 1976; PATO, 1978).

A presença do cobre está relacionada com a casse oxidativa que ocorre geralmente em vinhos brancos engarrafados em condições fortemente redutoras (PATO, 1978; ZOECKLEIN et al., 2001).

Tanto os teores de cobre quanto os de ferro podem ser aumentados à medida que aumenta o tempo de maceração durante a fase tumultuosa, segundo estudo realizado com vinhos Cabernet Sauvignon (MANFROI; RIZZON, 1996).

O cobre reage com ditiocarbamato de dietilo e forma um complexo colorido que se mede espectrofotometricamente a 450 nm. (ZOECKLEIN et al., 2001). Uma alternativa rápida aos procedimentos químicos, tanto para cobre como para ferro é a espectrofotometria de absorção atômica (ZOECKLEIN et al., 2001; FRESCHI et al., 2001).

A TABELA 10 descreve o conteúdo de ferro e cobre de algumas regiões, segundo AMERINE; OUGH (1976).

TABELA 10 - CONTEÚDO DE FERRO E COBRE DE VINHOS

REGIÃO	FERRO (mg/L)		COBRE (mg/L)	
	Intervalo	Média	Intervalo	Média
Califórnia	0,0 a 35,0	4,86	0,04 a 0,43	0,11
França	3,5 a 26,0	8,81	0,54 a 1,78	1,28
Alemanha	2,24 a 9,89	5,82	0,00 a 3,68	1,24
Itália	1,5 a 90,0	16,0	0,12 a 1,12	0,36

FONTE: AMERINE, M. A. OUGH, C. S. *Análisis de vinos y mostos*. Zaragoza: Ed. Acibia. 1976.

NOTA: Os resultados não são comparáveis entre si devido ao diferente número de amostras utilizadas.

### 3.10.13 Cinzas

As cinzas são a matéria inorgânica que resta depois de evaporar e incinerar um mosto ou um vinho. Durante a calcinação os cátions se convertem a carbonatos ou outros sais minerais anidros. A TABELA 11 expõe valores de cinzas em diversos tipos de vinho (AMERINE; OUGH, 1976). Segundo AQUARONE (1983), o vinho contém de 2 a 4 g/L de sais de ácidos orgânicos e minerais. Em 1 litro de vinho existe cerca de 1 g de potássio, 100 mg de magnésio e cálcio e algumas dezenas de miligramas de sódio.

O metal mais importante das cinzas é o potássio, que em virtude da pouca solubilidade do bitartarato de potássio, torna-se muito instável (COSTA, 1993).

TABELA 11 - CONTEÚDO DE CINZAS EM VINHOS DE MESA

REGIÃO	N.º AMOSTRAS	MÍNIMO (g/L)	MÁXIMO (g/L)	MÉDIA (g/L)
França	64	1,20	3,90	1,84
Alemanha	434	1,31	3,97	2,05
Hungria	10	1,92	4,46	2,97
Itália	1168	1,10	4,80	2,06
Portugal	606	1,00	4,00	2,61
Turquia	105	1,02	4,60	2,16

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

### 3.10.14 Extrato Seco

O extrato consiste convencionalmente nos sólidos solúveis não voláteis que permanecem depois de eliminar o álcool de uma amostra de vinho. A OIV define o extrato como os materiais não voláteis do vinho em condições físicas pré-determinadas. Assim o extrato inclui os açúcares, ácidos fixos, glicerina, 2,3-butilenoglicol e fenóis (PATO, 1978; ZOECKLEIN et al., 2001). Quanto maior é o conteúdo inicial de açúcar do mosto, maior é o resíduo não alcoólico do vinho resultante (AMERINE; OUGH, 1976). A quantidade de extrato em um vinho tinto seco é superior a 30 g/L, maior que um vinho branco (20 a 30 g/L) em função da quantidade superior de fenóis. Seu valor permite distinguir os vinhos de pouco corpo com aqueles de corpo superior (ZOECKLEIN et al., 2001). Entretanto, segundo PATO (1978) os vinhos tintos podem apresentar valores de extrato seco de 15 até 35 g/L, considerando-se vulgares as oscilações entre 20 e 26 para os tintos sem grande percentual de açúcar residual, o que foi confirmado em trabalho realizado por MANFROI; RIZZON (1996), em trabalho com vinhos da cultivar Cabernet Sauvignon.

O aumento de exposição da polpa e a temperatura de fermentação aumentam proporcionalmente o pH, potássio, proteínas, a extração de fenóis e portanto o valor do extrato (ZOECKLEIN et al., 2001).

A determinação do extrato seco total em vinhos com o método densimétrico indireto (Fórmula de Taberié) e o direto pela evaporação a 100 °C foram estudados. Concluiu-se que o método indireto pela fórmula de Taberié proporciona resultados mais constantes que o método pela evaporação a 100 °C (COSTA, 1993).

O extrato seco reduzido é o valor obtido da diferença entre o extrato seco total e o teor de açúcar e é muito utilizado para descobrir falsificações no vinho (AMERINE; OUGH, 1976). A técnica oficial ainda leva em consideração o teor de sulfatos quando os mesmos forem maiores que 1 g/L.

Em trabalho realizado por MIELE, RIZZON, ZANUZ (1994), em vinhos tintos secos de três cultivares, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir e Cabernet Franc, safra 1993, foram encontrados teores de extrato seco reduzido entre 20,92 a 26,09 g/L. Foram encontrados valores entre 3,43 e 4,33 da relação álcool/ extrato seco reduzido.

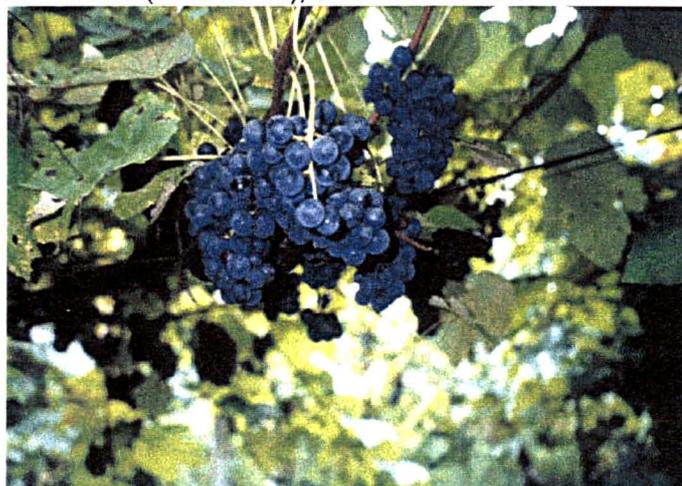
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Uvas

A elaboração dos vinhos foi realizada com a variedade de uva Terci, a mesma utilizada para elaboração de vinhos tintos na região de Colombo.

FIGURA 3 - UVA TERCÍ (*V. labrusca*), CULTIVADA NO MUNICÍPIO DE COLOMBO



A uva utilizada foi disponibilizada pela vinícola Pedro Strapasson, município de Colombo, com o apoio da Secretaria da Agricultura, Abastecimento e Meio Ambiente dessa localidade, no mês de janeiro de 2002, período em que o produtor determinou como sendo o mais adequado para a vindima. No término da vindima, as uvas foram transportadas em caixas de isopor até o laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações.

#### 4.1.2 Leveduras

Três variedades de leveduras secas comerciais, adaptadas ao preparo de vinho tinto, foram utilizadas para a fermentação do suco de uva, provenientes do fabricante Danster Ferment AG, localizado na Suíça:

- a) Uvaferm BC - *S. cerevisiae*, variedade *bayanus*
- b) Uvaferm CK - *S. cerevisiae*, variedade *cerevisiae*
- c) Uvaferm BDX - *S. cerevisiae*, variedade *cerevisiae*.

As principais especificações de cada variedade de levedura utilizada, segundo o fabricante, são: população viável maior que 15 bilhões/g; presença de leveduras não-*Saccharomyces* inferior a 0,0006% da população; presença de bactérias inferior a 0,006% da população; microorganismos patogênicos ausentes; matéria seca maior que 93%.

#### 4.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados na realização das análises são de grau de pureza adequado, para análise, das marcas Synth e Merck.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Análises Prévias no Suco de Uva

Uma alíquota de uvas desengaçadas foi pesada e posteriormente esmagada e filtrada, utilizando-se uma gase, para determinação do teor de sólidos solúveis, açúcares redutores e não redutores, acidez total e teor de nitrogênio.

A partir destas análises foram planejadas as correções de açúcar, nitrogênio e sulfitos do suco de uva, de modo a garantir a obtenção do grau alcoólico desejado (entre 10 a 13 °GL), o desenvolvimento da levedura que irá fermentar o suco e a redução dos microorganismos indesejáveis na fermentação, respectivamente.

### 4.2.2 Esmagamento das Uvas

As uvas foram lavadas, desengaçadas e os grãos maduros e sadios foram manualmente rompidos, de forma suave, para a liberação da polpa e sumo (esmagamento) (PATO, 1978; MENEGUZZO, 1990; CHOCIAI et al., 2000). Os mesmos foram distribuídos de forma homogênea entre dornas de fermentação de aço inoxidável, com capacidade para 20 e 10 litros. Os volumes das dornas não

foram totalmente preenchidos para que durante a fermentação tumultuosa não ocorresse extravasamento do mosto.

Tais dornas foram previamente lavadas com água e desinfetadas com solução de metabissulfito de potássio 0,1% (p/v).

#### 4.2.3 Correção do Suco de Uva

Conforme análises efetuadas no item 4.2.1, foi realizada a correção do suco de uva.

A correção do teor de açúcar, também conhecido como chaptalização, foi planejada em duas etapas, no início e após a fermentação tumultuosa (CHOCIAI et al., 2000). A quantidade de açúcar necessária para a obtenção de um vinho suave (20 g/L), com graduação alcoólica de 13 °GL é de 28 °Brix, que corresponde a 28% (p/v) de sacarose. A dissolução da sacarose foi realizada antes de sua adição ao mosto para evitar problemas de solubilização (CHOCIAI et al., 2000).

O teor de nitrogênio recomendado no início da fermentação é de 300 mg/L e o mesmo foi corrigido com a adição de fosfato de diamônio ( $\text{NH}_2\text{HPO}_4$  - PM = 132,06) (ZOECKLEIN et al., 2001).

O crescimento de microrganismos indesejáveis na fermentação foi evitado com a adição de anidrido sulfuroso, processo conhecido como sulfitagem (PATO, 1978; MENEGUZZO, 1990; CHOCIAI et al., 2000; CIANE; PEPE, 2002; LOPES et al., 2002). O teor de sulfitos respeitou o recomendado para uvas sadias e maduras, sendo adicionados 75 mg  $\text{SO}_2$ /L na forma de metabissulfito de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  - PM = 222,33) (CHOCIAI et al., 2000). Cada 75 mg de  $\text{SO}_2$  recomendado por litro de mosto corresponde a 131,6 mg de metabissulfito de potássio por litro de mosto, o qual foi acrescentado proporcionalmente em cada dorna de fermentação.

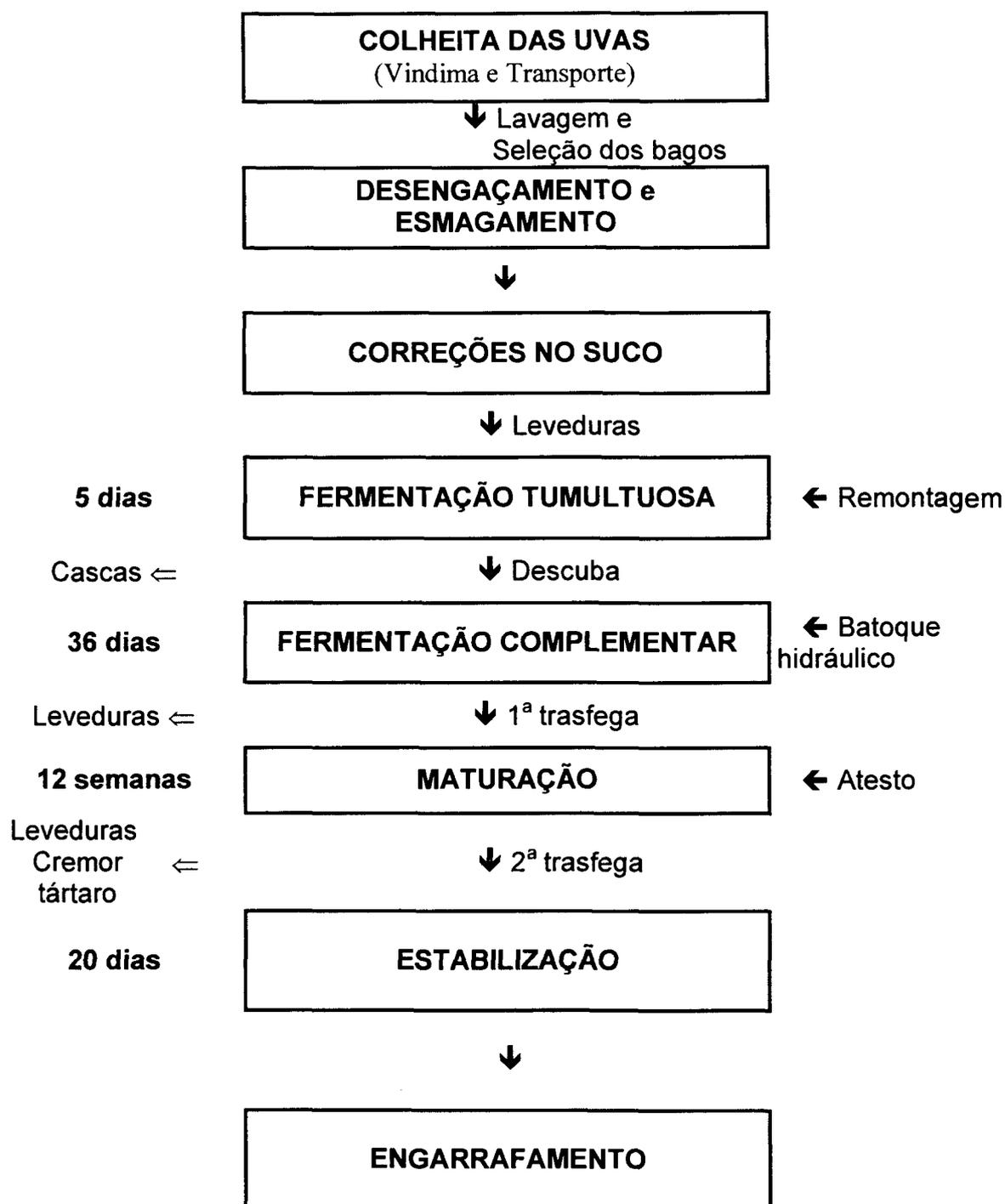
#### 4.2.4 Adição das Leveduras

As leveduras secas foram adicionadas após 6 horas da adição do metabissulfito de potássio no suco de uva, na proporção sugerida pelo fornecedor de 20 g/100 L e foram rehidratadas antes de sua incorporação.

#### 4.2.5 Processo Fermentativo

A metodologia de elaboração seguiu o sistema clássico de vinificação para vinhos tintos, conforme descrito na FIGURA 4 (PATO, 1978; MENEGUZZO, 1990; CHOCIAI et al., 2000), em sala com controle de temperatura.

FIGURA 4 - DIAGRAMA DE FLUXO DE ELABORAÇÃO DO VINHO EM LABORATÓRIO



#### 4.2.5.1 Fermentação tumultuosa

Após a realização das correções e a inoculação da levedura *S. cerevisiae*, inicia-se a transformação da maioria dos açúcares fermentáveis em álcool etílico e gás carbônico. O gás carbônico provocou a formação do "chapéu", que foi remontado pelo menos três vezes ao dia em cada mosto, durante 4 dias, com o auxílio de uma pá (PATO, 1978; MENEGUZZO, 1990, MANFROI; RIZZON, 1996; CHOCIAI et al., 2000). No segundo dia após o início da fermentação, as dornas foram fechadas.

O término desta fase está relacionado à diminuição na intensidade de desprendimento de gás carbônico em cada dorna.

#### 4.2.5.2 Descuba

Após oito horas da última remontagem, foi separado o bagaço do suco parcialmente fermentado, processo conhecido como descuba (MANFROI; RIZZON, 1996; CHOCIAI et al., 2000). Esta operação foi realizada pela parte superior do tanque de fermentação.

Análises de açúcares, teor alcoólico, acidez e teor de nitrogênio foram realizadas em cada amostra de mosto. Nova quantidade de açúcar foi calculada para ser incorporada nessa segunda fase.

#### 4.2.5.3 Fase complementar

Após a adição de açúcar na descuba, foi adaptado um batoque hidráulico contendo solução de metabissulfito de potássio, em cada dorna, para evitar o contato das amostras com o oxigênio durante a fase complementar. Nessa fase, os açúcares que não foram fermentados são lentamente e totalmente transformados em álcool. O gás carbônico formado vai borbulhando no batoque hidráulico e quando esse borbulhamento cessou, fez-se a primeira trasfega (PATO, 1978; CHOCIAI et al., 2000).

#### 4.2.5.4 Primeira trasfega

Com o objetivo de separar o vinho das substâncias sólidas acumuladas no fundo do recipiente (leveduras, cremor tártaro e outros constituintes que podem vir a alterar o vinho), procedeu-se ao bombeamento do vinho para outra dorna, devidamente limpa e desinfetada (trasfega) (MENEGUZZO, 1990; CHOCIAI et al., 2000).

Todo material utilizado na trasfega foi devidamente desinfetado com solução de metabissulfito de potássio a 0,1% (p/v) e os recipientes para transferência dos vinhos foram esterilizados em autoclave.

Novamente foram feitas análises de açúcares, teor alcoólico, acidez e teor de nitrogênio. Para obtenção de bebidas com as características de vinhos suaves foram realizadas correções de açúcar nas amostras.

#### 4.2.5.5 Segunda trasfega

A metodologia empregada na segunda trasfega foi a mesma utilizada durante a primeira, com o objetivo de continuar a separar o material indesejável que precipitou no fundo da dorna durante o período de maturação. Nessa segunda trasfega novamente foi corrigido o teor de açúcar das amostras para obtenção de vinhos suaves, conforme determinado nos objetivos.

#### 4.2.6 Engarrafamento

O engarrafamento dos vinhos foi realizado manualmente, com o auxílio de um funil, em garrafas de vidro âmbar de 750 mL de capacidade, previamente desinfetadas com solução hidroalcoólica. Durante o processo de transferência dessas bebidas, evitou-se o máximo de contato com o ar, de forma que os vinhos foram vertidos lentamente pelas paredes dos recipientes (MENEGUZZO, 1990).

#### 4.2.7 Vinho produzido em Colombo

A vinícola de propriedade de Pedro Strapasson, localizada no município de Colombo, forneceu o vinho tinto suave de mesa, safra 2002, obtido por fermentação espontânea, seguindo a técnica de elaboração herdada de seus antepassados. A escolha do vinho tinto suave de mesa foi em decorrência do consumo elevado do mesmo pela comunidade de Colombo.

#### 4.2.8 Análises Físico-químicas

Os três vinhos tintos suaves, obtidos dos três experimentos realizados no laboratório e o vinho produzido pela Vinícola Pedro Strapasson foram analisados quanto ao teor de açúcar total, pH, acidez total, acidez volátil corrigida, grau alcoólico, metanol, ésteres (acetato de etila), aldeídos (acetaldeído), teor de nitrogênio, sulfatos, anidrido sulfuroso total, cloretos, ferro e cobre, cinzas, extrato seco total e reduzido.

Cada análise foi realizada em triplicata, com amostras representativas de mosto e vinho, de forma a se obter resultados confiáveis e estatisticamente significativos. Para cada resultado obtido nos produtos finais foi determinado o desvio padrão, calculado a partir dos três resultados obtidos em cada análise realizada nos vinhos.

##### 4.2.8.1 Teor de sólidos totais

Pelo método de hidrometria (ZOECKLEIN et al., 2001).

##### 4.2.8.2 Açúcares redutores

Segundo método oficial, método de Eynon-Lane (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura).

#### 4.2.8.3 Açúcares não redutores

Segundo método oficial, método de Eynon-Lane (PORTARIA n.076, 1986, Ministério da Agricultura).

#### 4.2.8.4 pH

Método eletrometricopotenciométrico (VOGT et al., 1984).

#### 4.2.8.5 Acidez total

Segundo método oficial, por titulometria (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura).

#### 4.2.8.6 Acidez volátil corrigida

Segundo método oficial de Cazenave-Ferré (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura).

#### 4.2.8.7 Acidez fixa

Segundo método oficial, pelo cálculo da diferença entre acidez total e volátil (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura).

#### 4.2.8.8 Grau alcoólico real

Segundo método oficial (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), utilizando para determinação da densidade balança hidrostática Densimat - Gibertini Elettronica SRL.

#### 4.2.8.9 Metanol

Segundo método oficial para bebidas destiladas (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV - 1601 PC.

#### 4.2.8.10 Estér (acetato de etila)

Segundo método oficial para bebidas destiladas, por titulometria (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura).

#### 4.2.8.11 Aldeído (acetaldeído)

Segundo método oficial para bebidas destiladas (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), por titulometria através do método iodométrico.

#### 4.2.8.12 Teor de nitrogênio (número de formalina)

O número de formalina é determinado pela neutralização de 100 ml da amostra de vinho com solução de NaOH 1 N na presença de fenolftaleína até coloração levemente rósea ou pH 8,2; posteriormente é adicionado 10 mL de solução de formalina neutra 40% (pH 8,5) e a amostra é titulada novamente até coloração levemente rósea ou pH 8,2. Cada mL de NaOH 1 N gasto na segunda titulação equivale a 0,014 g de N/100 mL de amostra (WALTER, 1953)

#### 4.2.8.13 Sulfatos

Segundo método oficial (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), por precipitação semi-quantitativa com cloreto de bário.

#### 4.2.8.14 Anidrido sulfuroso total

Segundo método oficial (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), por titulometria indireta do iodo residual (Método de Monier-Williams, segundo AMERINE; OUGH, 1976).

#### 4.2.8.15 Cloretos

Segundo método oficial (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), por titulometria pela técnica de Charpentier-Volhard.

#### 4.2.8.16 Cobre e ferro

Segundo método AOAC (2000), em espectrômetro de absorção atômica de chama da marca Varian.

As amostras foram previamente tratadas por digestão úmida com ácido nítrico.

O cobre foi determinado a 324,7 nm, cuja faixa de leitura é de 0,03 a 10 µg/mL. O ferro foi determinado a 248,3 nm, cuja faixa de leitura é de 0,06 a 15 µg/mL. Tais comprimentos de onda coincidem com os citados por MANFROI; RIZZON (1996).

#### 4.2.8.17 Densidade

Segundo método oficial (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), utilizando balança hidrostática Densimat - Gibertini Elettronica SRL.

#### 4.2.8.18 Extrato seco e extrato seco reduzido

O extrato seco (ES) foi calculado segundo método oficial, pela fórmula de Taberié e o extrato seco reduzido pela diferença do ES em relação ao teor de açúcar total presente na amostra (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura).

#### 4.2.8.19 Cinzas

Segundo método oficial (PORTARIA n. 076, 1986, Ministério da Agricultura), por gravimetria, após incineração da amostra a 550 °C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES PRÉVIAS NO SUCO DE UVA

A partir de uma amostra de uvas desengaçadas (1259,45 g), foi obtido por esmagamento uma alíquota de suco de 1180 mL, que após filtração por meio de gase resultou em um volume de 740 mL. A partir desse suco foram realizadas as análises de sólidos solúveis, acidez, teor de nitrogênio e açúcares, conforme descrito na TABELA 12, visando a correção do suco a ser fermentado.

TABELA 12 - ANÁLISES REALIZADAS NO SUCO DE UVA OBTIDO NO LABORATÓRIO

ANÁLISES	RESULTADOS
Sólidos solúveis	14,5 °Brix
Acidez total	128,63 mEq/L
Teor de nitrogênio	84 mg/L
Açúcares redutores	142,80 g/L
Açúcares não redutores	1,728 g/L

### 5.2 ESMAGAMENTO DAS UVAS

Após o esmagamento manual das uvas desengaçadas, obteve-se o suco, que foi distribuído homogeneamente nas dornas de fermentação, perfazendo três lotes. O processo de esmagamento permitiu que a fermentação fosse mais eficaz, possibilitando a obtenção de vinhos mais tintos; além da incorporação de oxigênio ao mosto, fator indispensável para o bom desenvolvimento das leveduras. Essa etapa também contribuiu para o controle da fermentação, permitindo a obtenção de vinhos quase que completamente secos em curto prazo de tempo. Vale ressaltar que o processo de desengaçamento das uvas também é importante, uma vez que o engajo promove a obtenção de vinhos tânicos, encorpados, ácidos e menos brilhantes (PATO, 1978; MENEGUZZO, 1990; CHOCIAL et al., 2000).

## 5.3 CORREÇÃO DO SUCO DE UVA

### 5.3.1 Açúcar (Chaptalização)

Cerca de 90% dos sólidos solúveis de um vinho é composto por açúcares fermentáveis e por isso ele permite o cálculo aproximado do rendimento em álcool (AMERINE; OUGH, 1976).

Assim sendo, o teor de sólidos solúveis desejável para se obter um vinho com graduação alcoólica de 13 °GL varia em torno de 26 °Brix, segundo a equação de Gay -Lussac para fermentação alcoólica. Teoricamente, um determinado peso de açúcar fermentável deve produzir 51,5% (p/p) de etanol:



Além disso, o vinho suave deverá ter no mínimo 20 g/L de glicose, o que corresponde a 2 °Brix. Somando-se esses valores obtém-se um teor de açúcar final de 28 °Brix ou 28% (p/p).

Conforme demonstrado pela TABELA 12, pode-se observar que a uva encontra-se 0,5 °Brix abaixo do teor mínimo de sólidos normalmente encontrado em uvas maduras (15-19 °Brix, CHOCIAL et al., 2000).

Esta diferença é justificada em decorrência do clima e solo da região, que nem sempre são os ideais para cada safra, impedindo a maturação completa do fruto (MIELE, RIZZON, ZANUZ, 1994). Sendo assim, foram estimados mais 14g/100mL de açúcar para atingir o desejado.

A quantidade de açúcar a ser adicionada em cada dorna foi dividida em duas partes, sendo metade adicionada no início da fermentação e a outra metade após a descuba. Tal procedimento evitou a retenção de açúcar pelo bagaço durante a fermentação tumultuosa (CHOCIAL et al., 2000).

### 5.3.2 Nitrogênio

O teor de nitrogênio recomendado para uma adequada fermentação é em torno de 300 mg/L, pois evita que as leveduras utilizem aminoácidos como fonte de

nitrogênio. Muitos aminoácidos ao serem degradados liberam compostos sulfurados de odor desagradável e indesejável ao vinho (ZOECKLEIN et al., 2001). Segundo a TABELA 12, o teor de nitrogênio presente no suco é de 84 mg/L, restando 216 mg/L de nitrogênio a ser incorporada ao meio.

### 5.3.3 Sulfitagem

Prática bastante importante e necessária na vinificação, pois tem o objetivo de paralisar momentaneamente o desenvolvimento de microorganismos existentes no mosto, particularmente os indesejáveis. (PATO, 1978; MENEGUZZO, 1990; CHOCIAI et al., 2000). Entre as vantagens do anidrido sulfuroso, pode-se destacar a ação seletiva sobre as leveduras que produzem os melhores aromas e que apresentam maior capacidade de produção de álcool, ação antioxidante, antioxidásica, reguladora da temperatura, clarificante, conservante e dissolvente (PATO, 1978; AQUARONE, 1983; CHOCIAI et al., 2000).

Segundo CHOCIAI (2000), as doses utilizadas de anidrido sulfuroso dependem do estado de maturação da uva, do teor de acidez e do seu estado sanitário. Para mostos de uvas sadias, de maturação média e acidez elevada: 3 a 5 g SO<sub>2</sub> /100 L; para mostos de uvas sadias, bem maduras e acidez fraca: 5 a 10 g SO<sub>2</sub> /100 L; para mostos de uvas com podridão: 10 a 20 g SO<sub>2</sub>/100 L. Considerando-se tais indicações, foram adicionados 75 mg de SO<sub>2</sub>/L de mosto.

Além de uma dosificação muito homogênea no mosto, é importante considerar as relações de equilíbrio entre o valor do pH em função do anidrido sulfuroso livre, que resultará no anidrido sulfuroso ativo, ou seja, em forma molecular, que é o verdadeiro antioxidante e anti-séptico (PATO, 1978; COPAT, 1988). Têm-se uma boa proteção com 1,5 mg/L de anidrido sulfuroso molecular, aproximadamente 20 mg/L de anidrido sulfuroso livre, a um pH 3,0 e álcool a 11 °GL. Como as uvas comuns brasileiras possuem pH de 2,8 a 3,0, nos indicam que quantidades de 50 a 60 mg/L de anidrido sulfuroso total são o suficiente (COPAT, 1988). Segundo PATO (1978), em um pH 3,0 deve ser acrescentado 60 mg/L de gás sulfuroso ou 120 mg/L no estado de metabissulfito de potássio.

Sugere-se que sua adição permitiu controlar a microflora das fermentações, uma vez que o mesmo é extremamente tóxico para a maioria das leveduras não-

*Saccharomyces* (FLEET, 1992). Ela também contribuiu para um início rápido de fermentação, conforme descrito por COPAT (1988).

HENICK-KLING et al. (1998) observaram que a suscetibilidade ao sulfito é variável. Tem sido demonstrado que *Kloeckera apiculata* é suscetível a menos que 5 mg/L de dióxido de enxofre livre, enquanto que *C. guilliermondii* e *Zygosaccharomyces spp* são resistentes a pelo menos 10 vezes esta concentração. Assim, é importante salientar que o efeito do sulfito pode ser seletivo na redução da diversidade de leveduras. A população resultante dessa redução produz vinhos com diferentes características aromáticas (HENICK-KLING et al., 1998).

#### 5.4 ADIÇÃO DAS LEVEDURAS

Segundo instruções do fornecedor, as leveduras secas devem ser adicionadas na proporção de 20 g/100 L no suco de uva e devem ser rehidratadas antes de sua incorporação.

TABELA 13 - ANÁLISES EFETUADAS NOS MOSTOS APÓS ADIÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS NO TEMPO ZERO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS REALIZADOS NO LABORATÓRIO

LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pH	AÇÚCARES REDUTORES (g/L)	AÇÚCARES NÃO REDUTORES (g/L)	AÇÚCARES TOTAIS (g/L)	ACIDEZ TOTAL (mEq/L)
Variedade CK	2,72	180,20	29,95	210,15	132,50
Variedade BDX	2,53	164,40	28,04	192,44	128,80
Variedade BC	2,58	173,70	39,07	212,77	127,70

Após a adição das leveduras (tempo zero da fermentação) em cada dorna, foram retiradas amostras dos mostos para análises de pH, açúcares redutores e não redutores e acidez total. Conforme observado na TABELA 13, a análise de açúcares totais confirmou o teor de açúcar total necessário para o início da fermentação, ou seja, em torno de 21 °Brix (210 g/L). A acidez das amostras apresentou-se elevada provavelmente em função do tipo de uva utilizada e das condições de solo e clima em que foram cultivadas no município de Colombo (CHOCIAI et al, 2000).

Na FIGURA 5 observa-se a adição de leveduras ao suco de uvas.

FIGURA 5 - ADIÇÃO DE LEVEDURAS AO SUCO DE UVA



## 5.5 FERMENTAÇÃO TUMULTUOSA

Durante essa fase, com duração de 5 dias, foram observadas diferenças entre as variedades de leveduras utilizadas. No mosto que continha a levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade BC houve o aparecimento da semente das uvas no chapéu, conforme demonstrado na FIGURA 8. Tal aparecimento pode sugerir uma possível secreção de enzimas pectolíticas pela levedura em questão que degradariam a matéria pécica presente nas cascas e polpa da fruta, permitindo assim a exposição das sementes. A fermentação ocorrida na dorna com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade CK se apresentou aparentemente mais vigorosa (maior desprendimento de gás carbônico), o que poderia ser explicado pelo seu caráter *killer*. O aroma do vinho obtido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade BDX foi o mais agradável.

Foi observada a importância da operação de remontagem, que evitou o superaquecimento do processo e facilitou a dissolução dos pigmentos encontrados na casca das uvas. A temperatura de fermentação não ultrapassou os 28 °C, uma vez que, segundo MENEGUZZO (1990), MANFROI; RIZZON (1996) e CHOCIAI et al. (2000), a temperatura não deve ultrapassar 30 °C, ou, segundo PATO (1978), 35°C.

## 5.6 DESCUBA

A descuba foi realizada após 5 dias do início do processo fermentativo. Nessa etapa foram realizadas análises de pH, açúcares redutores e não redutores, teor alcoólico, acidez volátil, acidez fixa e acidez total e teor de nitrogênio. Conforme resultados apresentados na TABELA 14, pode-se observar nas três variedades uma redução dos açúcares totais proporcional, de acordo com a equação de Gay Lussac, ao teor de álcool etílico formado. O teor de nitrogênio diminui em função de seu consumo pelas leveduras durante a fase de reprodução. Apesar do pH permanecer quase invariável, a acidez total aumenta, já que alguns ácidos, como principalmente o ácido succínico, o ácido acético e o ácido láctico, são formados em quantidades moderadas durante a fermentação (AQUARONE, 1983; DEQUIN, 2001).

TABELA 14 - ANÁLISES EFETUADAS NOS VINHOS NO QUINTO DIA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae*, REALIZADOS NO LABORATÓRIO

ANÁLISES	Variedade CK	Variedade BDX	Variedade BC
pH	2,59	2,52	2,58
Açúcares totais (g/L)	12,30	11,08	7,07
Teor alcoólico (°GL)	10,80	10,60	11,50
Acidez volátil (mEq/L)	5,01	4,06	3,11
Acidez fixa (mEq/L)	168,80	178,90	152,20
Acidez total (mEq/L)	173,81	182,96	155,31
Teor nitrogênio (mg/L)	28,00	28,00	14,00

Em função do teor de açúcar e o teor alcoólico determinados nessa fase, foi feita a correção complementar do teor de açúcar no vinho, considerando a necessidade de se obter um vinho com graduação alcoólica em torno de 13 °GL e apresentar um teor de açúcar final a partir de 20 g/L, conforme especificado pela legislação brasileira para vinhos suaves. A quantidade de açúcar adicionado está especificada na TABELA 15. O volume decorrente da prensagem do vinho e o bagaço foram descartados.

TABELA 15 - QUANTIDADE (g/L) DE AÇÚCAR ADICIONADO AOS MOSTOS NO QUINTO DIA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS REALIZADOS NO LABORATÓRIO

LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AÇÚCAR ADICIONADO (g/L)
Variedade CK	51,70
Variedade BDX	55,90
Variedade BC	43,00

Nas FIGURAS 6, 7 e 8 observa-se o bagaço das uvas após o processo de descuba.

FIGURA 6 – BAGAÇO DA UVA OBTIDO NO QUINTO DIA DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*, VARIEDADE CK



FIGURA 7 - BAGAÇO DA UVA OBTIDO NO QUINTO DIA DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*, VARIEDADE BDX



FIGURA 8 - BAGAÇO DA UVA OBTIDO NO QUINTO DIA DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*, VARIEDADE BC



### 5.7 FASE COMPLEMENTAR

Essa fase durou 36 dias, próximo ao previsto em literatura, 20 a 30 dias (PATO, 1978; CHOCIAI et al., 2000). Nesse período as dornas ficaram completamente fechadas, para evitar o contato com o oxigênio do ar, além de ter sido adaptado um batoque hidráulico.

Houve uma lenta transformação dos açúcares que ainda não haviam sido fermentados. Aparentemente observou-se uma melhora no odor dos vinhos, o que pode ser explicado pela formação de ésteres que contribuem para a formação do aroma nessa etapa.

### 5.8 PRIMEIRA TRASFEGA

Antes da primeira trasfega, no 41º dia do início do processo, foram retiradas amostras de cada tipo de vinho para análises de pH, açúcares redutores e não redutores, teor alcoólico, acidez volátil, acidez fixa e acidez total e teor de nitrogênio.

Analisando-se a TABELA 16, observou-se que novamente nas três amostras, uma parte dos açúcares foi fermentada, aumentando o teor de álcool etílico formado. A acidez volátil evoluiu discretamente no meio que continha a variedade CK, diminuiu no meio que estava presente a variedade BDX e permaneceu constante no meio que continha a variedade BC. A acidez total diminuiu em média

9,44% em relação aos valores apresentados na descuba, dando indicativos de uma possível fermentação malolática, que consiste na transformação do ácido málico em láctico e CO<sub>2</sub>. (MENEGUZZO, 1990; LONA, 1991; CHOCIAI et al., 2000). Sua importância está relacionada ao fato de diminuir a acidez total do fermentado, contribuindo para melhoria de sua qualidade (LONA, 1991; CHOCIAI et al., 2000).

O meio que continha a variedade BDX foi o que mais diminuiu esta acidez, confirmando a característica favorável dessa variedade em relação à fermentação malolática, segundo ficha técnica do fornecedor. O teor de nitrogênio permaneceu estável, uma vez que nesta fase, em função do teor alcoólico, não há mais formação de biomassa suficiente para consumir o nitrogênio.

Após a primeira trasfega, os vinhos ficaram mais claros e límpidos, justificado pela visível precipitação de resíduos provenientes da fermentação e de sais pouco solúveis de ácido tartárico presentes nas fases iniciais.

TABELA 16 - ANÁLISES EFETUADAS NOS VINHOS APÓS 41 DIAS DO INÍCIO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae*, REALIZADOS NO LABORATÓRIO

ANÁLISES	Variedade CK	Variedade BDX	Variedade BC
pH	2,57	2,55	2,63
Açúcares redutores (g/L)	3,00	4,00	4,30
Açúcares não redutores (g/L)	3,84	2,88	5,47
Açúcares totais (g/L)	6,84	6,88	9,77
Teor alcoólico (°GL)	14,00	13,80	13,60
Acidez volátil (mEq/L)	5,43	3,23	3,10
Acidez fixa (mEq/L)	157,03	156,60	138,33
Acidez total (mEq/L)	162,46	159,83	141,43
Teor nitrogênio (mg/L)	28,00	28,00	14,00

Em função do teor de açúcares obtido, nova adição de sacarose foi realizada para complementação do açúcar necessário para elaboração de um vinho suave (20 g/L).

Os vinhos produzidos foram adicionados nas dornas de 10 litros até completar seu volume e o restante foi acondicionado em balões volumétricos previamente esterilizados de 2 ou 3 litros, conforme quantidade de cada vinho.

Esses balões foram envoltos por papel alumínio para que não sofressem interferência da luz.

## 5.9 SEGUNDA TRASFEGA

Após o período de aproximadamente três meses foi realizada a segunda trasfega. As trasfegas permitem que o vinho apresente melhores condições de conservação, tanto do ponto de vista sanitário como organoléptico e devem ser realizadas pelo menos duas vezes durante a produção de um vinho (PATO, 1978). Antes da mesma, foram retiradas amostras de cada tipo de vinho para análise de açúcares redutores e não redutores, conforme demonstrado na TABELA 17. O teor de açúcares de uma amostra de vinho, produzido por fermentação espontânea, do município de Colombo também foi determinado para servir como referência.

TABELA 17 – CONCENTRAÇÃO (g/L) DE AÇÚCAR NOS VINHOS APÓS 131 DIAS DO INÍCIO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae*, REALIZADOS NO LABORATÓRIO E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

VINHOS	AÇÚCAR REDUTOR (g/L)	AÇÚCAR NÃO REDUTOR (g/L)	AÇÚCAR TOTAL (g/L)
<b>S. <i>cerevisiae</i>, variedade CK</b>	18,25	0	18,25
<b>S. <i>cerevisiae</i>, variedade BDX</b>	16,50	0	16,50
<b>S. <i>cerevisiae</i>, variedade BC</b>	7,25	0	7,25
<b>Colombo</b>	101,76	1,44	103,20

Uma vez que o objetivo do trabalho é a obtenção de vinhos suaves, o teor de açúcar dos vinhos foi corrigido com sacarose, de forma a ser obtido vinhos com concentração final de açúcar em torno de 40 g/L.

Observa-se que nesse período houve um consumo de açúcar pelas variedades CK (1,79 g/L) e BDX (3,58 g/L) e um maior consumo pela variedade BC (12,72 g/L), sem no entanto aumentar o teor alcoólico, conforme demonstrado na TABELA 24.

Durante a realização da segunda trasfega, foi observada a presença de resíduos formados durante a maturação dos vinhos, no fundo de cada dorna. Conforme demonstrado na TABELA 18, o vinho fermentado pela levedura BDX foi o

que apresentou maior quantidade de resíduos, denominados de borras, seguido pelo vinho fermentado pela levedura CK e BC. A precipitação dessas borras é desejável no vinho por contribuir para sua clarificação e principalmente sua estabilização, uma vez que entre os constituintes da borra encontram-se restos de leveduras e outros microorganismos, bem como sais menos solúveis no meio. Os microorganismos presentes podem alterar o vinho, produzindo produtos de odor desagradável, como o ácido sulfídrico ou mercaptana (AQUARONE, 1983).

TABELA 18 - RESÍDUOS PRESENTES APÓS 131 DIAS DO INÍCIO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae*, REALIZADOS NO LABORATÓRIO

LEVEDURA	RESÍDUOS
CK	++
BDX	++++
BC	+

NOTA ESPECÍFICA: ++++ = muito intenso

++ = moderado

+ = discreto

## 5.10 ENGARRAFAMENTO DO VINHO

Baseado na observação do aspecto dos vinhos após a segunda trasfega (clarificação natural eficiente), foi decidido que não seria necessário uma terceira trasfega. Em função disso, os procedimentos de clarificação e filtração não foram realizados, reforçados ainda pelo fato de que tais procedimentos não são realizados nas adegas de Colombo.

Os vinhos foram engarrafados 20 dias após a adição da sacarose para evitar a ocorrência de uma leve fermentação dentro do recipiente de envase, o que poderia ocasionar estouro da embalagem pelo aumento da pressão interna (liberação de dióxido de carbono), além de, segundo MENEGUZZO (1990), uma possível turvação e precipitação de algum componente.

Como os vinhos comuns possuem características aromáticas jovens, devem ser consumidos rapidamente, pois seu envelhecimento ocasiona perdas de características sensoriais (COPAT, 1988). Considera-se um vinho tinto jovem aquele elaborado para ser consumido em um ou dois anos (MIELE, RIZZON, ZANUZ, 1994), obtidos por meio de fermentações curtas (MANFROI; RIZZON, 1996).

## 5.11 ANÁLISES DOS PRODUTOS FINAIS

Segundo LOPES et al. (2002), a capacidade de uma cepa selecionada de *S. cerevisiae* dominar a fermentação vai depender das características das leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* presentes naturalmente no mosto. Este comportamento pode ser previsível através de microfermentações, uma vez que as leveduras presentes em pequena escala, podem representar a escala industrial, tanto para as cepas de *Saccharomyces*, como para as cepas de não-*Saccharomyces*. Assim, fermentações em pequena escala representam uma valiosa ferramenta no estudo microbiológico e físico-químico de fermentações vínicas.

### 5.11.1 Análise dos Açúcares Totais

O teor de açúcares totais dos vinhos ficou próximo ao valor planejado durante sua elaboração, 40 g/L, conforme pode ser observado na TABELA 19, classificando os vinhos, segundo DECRETO n. 99.066/90 (1990), do Ministério da Agricultura, como suaves. O vinho do município de Colombo apresenta-se 62,29% mais doce que os vinhos elaborados com as leveduras selecionadas. Esta diferença pode ser explicada pela dificuldade técnica dos produtores em padronizar o teor de açúcar do suco antes da fermentação (BONFIM et al., 2002).

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO FINAL DE AÇÚCAR TOTAL (g/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (g/L)
Vinho (variedade CK)	36,42 (± 0,92)
Vinho (variedade BDX)	36,92 (± 1,86)
Vinho (variedade BC)	43,42 (± 1,56)
Vinho de Colombo	103,20 (± 2,17)

### 5.11.2 Análise do pH

O pH possui fundamental importância na análise gusto-tátil e de cor, já que o pH baixo propicia cor roxo viva, que é muito importante nos vinhos jovens, como também ajuda na durabilidade do mesmo (COPAT, 1988).

Geralmente o pH de um vinho novo de mesa é inferior a 3,6 (AMERINE; OUGH, 1976), o valor máximo para sua correta conservação (FRAILE et al., 2000). Segundo COPAT (1988), o pH de vinhos tintos comuns está entre 3,0 a 3,2. Os resultados demonstrados na TABELA 20 estão adequados quando comparados aos dados referenciados.

TABELA 20 - pH FINAL DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA
Vinho (variedade CK)	3,09 ( $\pm$ 0,03)
Vinho (variedade BDX)	3,05 ( $\pm$ 0,02)
Vinho (variedade BC)	3,08 ( $\pm$ 0,01)
Vinho de Colombo	3,14 ( $\pm$ 0,02)

### 5.11.3 Análise da Acidez Total

O conhecimento da acidez durante a elaboração e no produto final permite possíveis correções do seu teor (AMERINE; OUGH, 1976).

Na TABELA 21 são apresentados os resultados da acidez total. As variedades CK e BDX apresentaram acidez acima do permitido pela legislação (130 mEq/L). Segundo COPAT (1988), todas as amostras estão acima do teor ideal de 80 mEq/L, sendo necessário um processo de desacidificação, como a fermentação malolática, para diminuí-la. O alto teor de açúcar das amostras mascara um pouco esta acidez, segundo ZOECKLEIN et al. (2001). Vinhos doces podem ser vendidos com acidez mais elevada, já vinhos secos devem ser corrigidos (COPAT, 1988).

A acidez elevada das amostras pode ser relacionada à acidez demonstrada pelo suco de uva utilizado nos experimentos. A variedade Terci apresenta como

principal característica baixo teor de açúcar e elevada acidez, assim como outras representantes das uvas classificadas como americanas (CHOCIAI et al., 2000).

TABELA 21 - ACIDEZ TOTAL (mEq/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mEq/L)
Vinho (variedade CK)	140,13 ( $\pm$ 2,46)
Vinho (variedade BDX)	143,15 ( $\pm$ 0,72)
Vinho (variedade BC)	126,84 ( $\pm$ 1,39)
Vinho de Colombo	102,60 ( $\pm$ 0,78)

#### 5.11.4 Análise da Acidez Volátil Corrigida

A acidez volátil está relacionada principalmente à presença dos ácidos acético, fórmico e butírico. Um alto conteúdo de ácido acético tem menos importância nos vinhos velhos que nos jovens. Os limites são estabelecidos porque uma acidez volátil alta indica a presença de microorganismos indesejáveis após a elaboração, principalmente o *Acetobacter*, que eventualmente pode converter o vinho em vinagre (COSTA, 1993).

Durante a fermentação alcoólica normal, sem a presença de bactérias contaminantes, se formam pequenas, mas mensuráveis, quantidades de ácido acético que normalmente não superam 0,030 g/100 mL (AMERINE; OUGH, 1976).

TABELA 22 - ACIDEZ VOLÁTIL CORRIGIDA (mEq/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mEq/L)
Vinho (variedade CK)	6,13 ( $\pm$ 0,07)
Vinho (variedade BDX)	2,72 ( $\pm$ 0,63)
Vinho (variedade BC)	2,73 ( $\pm$ 0,27)
Vinho de Colombo	11,22 ( $\pm$ 0,06)

Na TABELA 22 são apresentados os resultados da acidez volátil corrigida, onde todos vinhos apresentaram valores dentro dos limites da legislação brasileira, que registra um máximo de 20 mEq/L. O vinho artesanal apresentou o maior valor, o

que pode ser atribuído ao processo de fermentação espontânea que aumenta a probabilidade de produtos indesejáveis nos vinhos.

#### 5.11.5 Análise da Acidez Fixa

Caracterizada pela diferença entre a acidez total e a acidez volátil corrigida. Inclui os ácidos málico, tartárico, cítrico, succínico e os ácidos inorgânicos.

TABELA 23 - ACIDEZ FIXA (mEq/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mEq/L)
Vinho (variedade CK)	133,87
Vinho (variedade BDX)	140,43
Vinho (variedade BC)	124,11
Vinho de Colombo	91,38

As variações de acidez fixa posteriores à fermentação são de grande utilidade para distinguir a atividade de microorganismos que reduzem a acidez contra aqueles que geram acidez volátil (AMERINE; OUGH, 1976). Na TABELA 23 são apresentados os resultados da acidez fixa.

#### 5.11.6 Análise do Grau Alcoólico Real

O conhecimento da concentração de etanol no vinho é importante para comprovar o rendimento do mesmo a partir de uma determinada concentração de açúcar, para verificar se o vinho cumpre o limite legal e para observar sua influência sensorial (AMERINE; OUGH, 1976).

Conforme demonstrado na TABELA 24, o teor alcoólico dos vinhos obtidos com as cepas CK, BDX e BC apresentaram uma média 0,46 °GL acima de 13 °GL, valor permitido pela legislação e do teor médio dos vinhos tintos brasileiros, cuja faixa varia entre 11,30 a 11,70 °GL, segundo MIELE, RIZZON, ZANUZ (1994). O vinho referência apresentou 2,43 °GL de diferença. Segundo AMERINE e OUGH

(1976), vinhos de mesa com teor alcoólico acima de 14 °GL adquirem sabor ardente, associado ao excesso de etanol.

TABELA 24 - GRAU ALCOÓLICO REAL (°GL) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (°GL)
Vinho (variedade CK)	13,59 (± 0,21)
Vinho (variedade BDX)	13,49 (± 0,10)
Vinho (variedade BC)	13,31 (± 0,19)
Vinho de Colombo	15,43 (± 0,21)

O teor alcoólico atingido pelas leveduras selecionadas comprovou sua eficácia em fermentar prontamente os açúcares disponíveis e sua resistência a teores alcoólicos mais elevados, conforme especificado pelo fornecedor.

#### 5.11.7 Análise do Metanol

O metanol é originado da hidrólise da pectina metilada presente nas uvas. Seu conteúdo varia de 120 a 250 mg/L. Não está claro se o metanol desempenha um papel sensorial nos vinhos, ainda que a formação de ésteres de metila pode ser importante (ZOECKLEIN et al., 2001).

A legislação brasileira estabelece um valor máximo de 350 mg/L de metanol, uma vez que do ponto de vista toxicológico, o metanol, após ingestão, é degradado a formaldeído e posteriormente a ácido fórmico, o qual pode levar a uma acidose metabólica intensa, além de distúrbios neurológicos, digestivos e visuais.

Na TABELA 25 são apresentados os resultados da análise de metanol dos vinhos. Nenhum deles ultrapassou o valor máximo permitido pela legislação brasileira. Assim como na determinação da acidez volátil, o maior teor de metanol encontrado foi no vinho artesanal, em decorrência do processo de fermentação espontânea, que possivelmente poderia ter favorecido o desenvolvimento de algum microorganismos com atividade pectolítica predominante.

TABELA 25 – CONCENTRAÇÃO DE METANOL (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg/L)
Vinho (variedade CK)	216,33 (± 3,89)
Vinho (variedade BDX)	162,76 (± 2,31)
Vinho (variedade BC)	200,37 (± 0,00)
Vinho de Colombo	260,48 (± 0,00)

#### 5.11.8 Análise dos Ésteres (Acetato de Etila)

Os ésteres são normalmente formados durante e no final da fermentação pelas leveduras, pelas bactérias lácticas e acéticas, e durante o envelhecimento na madeira ou na garrafa. O acetato de etila é o éster presente no vinho que apresenta as concentrações mais altas (ZOECKLEIN et al., 2001) e é formado no final do processo fermentativo, principalmente em condições aeróbicas (MAURICIO et al, 1997). Pelo seu caráter volátil, em concentrações acima de 150 mg/L, pode contribuir junto com o ácido acético ao odor característico de vinagre encontrado nos vinhos, embora em concentrações inferiores a 50 mg/L eles podem contribuir à complexidade do vinho (FRAILE et al., 2000).

Na TABELA 26 são apresentados os resultados da análise de ésteres dos vinhos, expressos em acetato de etila. Os resultados indicam, conforme demonstrado por FRAILE et al. (2000), que os vinhos obtidos por leveduras selvagens possuem uma maior capacidade de produzir ésteres durante a fermentação.

TABELA 26 - CONCENTRAÇÃO DE ÉSTERES (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg/L)
Vinho (variedade CK)	169,35 (± 0,00)
Vinho (variedade BDX)	131,96 (± 9,33)
Vinho (variedade BC)	103,37 (± 0,00)
Vinho de Colombo	327,70 (± 0,00)

NOTA: Resultados expressos em acetato de etila

### 5.11.9 Análise dos Aldeídos (Acetaldeído)

Segundo SCHREIER, (1979), o acetaldeído é um produto normal da fermentação alcoólica e suas concentrações podem variar de 10 a 300 mg/L. Em vinhos brancos, o acetaldeído é visto como um indicador de oxidação do vinho, embora em vinhos tintos ele deve estar presente em quantidades acima de 100 mg/L. Em concentrações de 500 mg/L, o vinho é considerado impróprio para venda. Em vinhos de mesa comuns, o acetaldeído causa um sabor indesejável de oxidação. AQUARONE (1983) contradiz o teor normal de acetaldeído em vinhos tintos, ao citar que nos vinhos tintos a concentração de acetaldeído é bem mais reduzida que nos brancos, normalmente menor que 50 mg/L, devendo-se à presença de taninos e antocianinas.

Na TABELA 27 são apresentados os resultados da análise de aldeídos dos vinhos, expressos em acetaldeído. Mais uma vez o vinho de Colombo foi o que apresentou maior valor de acetaldeído, o que segundo ROMANO et al. (1994), está atribuído ao uso de leveduras não selecionadas, entre elas as leveduras formadoras de véu, bem como a uma maior aeração do vinho. O acetaldeído presente contribui negativamente ao vinho de Colombo, pois segundo HENICK-KLING et al. (1998), o limite sensorial para este subproduto é de 100 mg/L. A variedade BC produziu pouco acetaldeído, conforme previsto em especificação do fornecedor. Foram encontrados valores entre 50 e 120 mg/L em diferentes variedades de vinhos (FRAILE et al., 2000).

TABELA 27 - CONCENTRAÇÃO DE ALDEÍDOS (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg/L)
Vinho (variedade CK)	36,99 (± 0,00)
Vinho (variedade BDX)	58,96 (± 1,63)
Vinho (variedade BC)	38,15 (± 1,63)
Vinho de Colombo	106,36 (± 0,00)

Nota: Resultados expressos em acetaldeído.

### 5.11.10 Análise do Nitrogênio

Na TABELA 28 são apresentados os resultados do teor de nitrogênio dos vinhos. Pode-se observar que o teor de nitrogênio inicial de 300 mg/L foi utilizado basicamente durante a fermentação tumultuosa, onde havia maior necessidade de sua utilização para o metabolismo das leveduras. Após esta etapa o teor de nitrogênio permaneceu sem grandes variações, onde o menor valor foi apresentado pela variedade BC. O vinho de Colombo apresentou um teor de nitrogênio superior aos demais vinhos possivelmente pela utilização de aminoácidos como fonte alternativa de nitrogênio pelas leveduras.

TABELA 28 - CONCENTRAÇÃO FINAL DE NITROGÊNIO (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg/L)
Vinho (variedade CK)	25,06 (± 3,95)
Vinho (variedade BDX)	20,50 (± 0,00)
Vinho (variedade BC)	13,67 (± 0,00)
Vinho de Colombo	37,59 (± 4,83)

### 5.11.11 Análise dos Sulfatos

Na TABELA 29 são apresentados os resultados da análise de sulfato dos vinhos, expresso em mg  $K_2SO_4/L$ . Os mesmos são provenientes das uvas, como também da oxidação do dióxido de enxofre (AMERINE; OUGH, 1976; ZOECKLEIN et al., 2001). Pode-se observar que todas as amostras apresentaram valores abaixo do valor máximo de 1 g  $K_2SO_4/L$  especificado pela legislação.

A determinação de sulfato é útil para comprovar casos de falsificação de vinhos com baixo conteúdo ácido, aos quais foi adicionado ácido sulfúrico (AMERINE; OUGH, 1976).

TABELA 29 - CONCENTRAÇÃO DE SULFATOS (g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L)
Vinho (variedade CK)	<0,7
Vinho (variedade BDX)	<0,7
Vinho (variedade BC)	<0,7
Vinho de Colombo	<0,7

#### 5.11.12 Análise do Anidrido Sulfuroso Total

Na TABELA 30 são apresentados os resultados da análise de anidrido sulfuroso dos vinhos. Ele é importante devido à sua ação anti-séptica e anti-fermentativa. O anidrido sulfuroso inicial inoculado nos mostos das leveduras selecionadas foi de 75 mg/L, mas conforme citado por COMI; CROATTINI (1997), é impossível prever quanto de SO<sub>2</sub> será utilizado durante a fermentação. Uma certa quantidade de SO<sub>2</sub> adicionada nas etapas preliminares é perdido durante a fermentação (BENASSI, 1997). MIELE, RIZZON, ZANUZ (1994) consideram 35 mg/L de anidrido sulfuroso total um valor baixo, apesar de haver uma tendência mundial em reduzir as doses na elaboração de vinhos. Mesmo assim, sugere-se uma nova adição de metabissulfito de potássio, principalmente aos vinhos fermentados com as variedades BDX e BC, como forma de evitar um possível desenvolvimento de microorganismos contaminantes prejudiciais à qualidade do vinho. Uma vez que a variedade CK apresenta um caráter *killer*, ela promete ser um substituto mais refinado, específico e infinitamente melhor adaptado à produção de vinhos com menor teor de anti-sépticos químicos, segundo CARRAU (1988).

Apesar de baixos, estes valores estão de acordo com os encontrados por COSTA (1993), para a mesma variedade de uva. COSTA (1993) adicionou aos vinhos concentrações entre 80 a 120 mg/L de metabissulfito de potássio em três etapas durante o processo e o consumo médio de anidrido sulfuroso total foi proporcional ao observado com as três variedades de levedura utilizadas.

TABELA 30 - CONCENTRAÇÃO DE ANIDRIDO SULFUROSO TOTAL (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg/L)
Vinho (variedade CK)	6,09 (± 2,43)
Vinho (variedade BDX)	9,27 (± 4,86)
Vinho (variedade BC)	9,27 (± 0,92)
Vinho de Colombo	16,69 (± 0,00)

#### 5.11.13 Análise de Cloretos

De acordo com os resultados demonstrados na TABELA 31, nenhum vinho ultrapassou o limite máximo de cloretos permitido pela legislação e expressos como 200 mg de NaCl/L. Os valores apresentados estão também de acordo com a literatura, pois, segundo AMERINE; OUGH (1976), os vinhos de mesa normais contêm entre 30 a 150 mg/L de cloretos.

TABELA 31 - CONCENTRAÇÃO DE CLORETOS (mg NaCl/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg NaCl/L)
Vinho (variedade CK)	49,76 (± 0,00)
Vinho (variedade BDX)	52,52 (± 3,91)
Vinho (variedade BC)	46,99 (± 3,91)
Vinho de Colombo	44,23 (± 0,00)

#### 5.11.14 Análise de Ferro

Na TABELA 32 são apresentados os resultados da análise de ferro dos vinhos. Todas as amostras, segundo AMERINE; OUGH (1976), PATO (1978) e MIELE, RIZZON, ZANUZ (1994), apresentaram valores bem abaixo daqueles normalmente encontrados (1 a 5 mg/L). Tal fato deve-se principalmente à não utilização de recipientes de ferro durante o processo de fabricação, tanto do vinho artesanal, como dos vinhos laboratoriais.

O ferro, segundo ZOECKLEIN et al. (2001), em concentrações superiores, altera o sistema redox do vinho a favor da oxidação, influencia nas características

sensoriais e participa na formação de compostos com taninos e fosfatos que produzem instabilidades, também denominadas de casses. A instabilidade de ferro na forma de quebra de fosfato férrico somente é produzida na faixa de pH entre 2,9 a 3,6. Portanto, se o ferro está presente em concentrações críticas, qualquer prática que modifique o pH, pode afetar o potencial de produção de quebra.

TABELA 32 - CONCENTRAÇÃO DE FERRO (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg/L)
Vinho (variedade CK)	0,28
Vinho (variedade BDX)	0,19
Vinho (variedade BC)	0,25
Vinho de Colombo	0,32

#### 5.11.15 Análise de Cobre

Na TABELA 33 são apresentados os resultados da análise de cobre dos vinhos. Nenhuma amostra ultrapassou o valor de 0,3 mg/L, citado por AMERINE; OUGH (1976) e PATO (1978). O cobre causa turbidez nos vinhos cujo conteúdo ultrapassa 0,2 a 0,4 mg/L por formarem complexos com proteínas (AMERINE; OUGH, 1976).

TABELA 33 - CONCENTRAÇÃO DE COBRE (mg/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (mg/L)
Vinho (variedade CK)	0,07
Vinho (variedade BDX)	0,13
Vinho (variedade BC)	0,08
Vinho de Colombo	<0,01

Tais valores estão também de acordo com a PORTARIA n. 685 do Ministério da Agricultura (1998), a qual estabelece como limite máximo de cobre em bebidas alcoólicas fermentadas (10 mg/kg). Além disso, os valores encontrados são

considerados normais para vinhos tintos brasileiros, segundo MIELE, RIZZON, ZANUZ (1994).

#### 5.11.16 Análise das Cinzas

Conforme demonstrado na TABELA 34, observa-se que todas as amostras estão de acordo com a legislação brasileira, superior a 1,5 g/L. Nota-se que o vinho referência apresentou um valor muito próximo ao limite estipulado, o que poderia ser justificado, segundo AMERINE; OUGH (1976), ao teor de açúcar adicionado ao produto final.

TABELA 34 - CONCENTRAÇÃO DE CINZAS (g/L) NOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (g/L)
Vinho (variedade CK)	2,300 ( $\pm$ 0,141)
Vinho (variedade BDX)	2,050 ( $\pm$ 0,212)
Vinho (variedade BC)	2,000 ( $\pm$ 0,000)
Vinho de Colombo	1,600 ( $\pm$ 0,141)

#### 5.11.17 Análise do Extrato Seco Reduzido e Relação Álcool/Extrato Seco Reduzido

Na TABELA 35 são apresentados os resultados da análise de extrato seco reduzido (ESR) dos vinhos e na TABELA 36 os resultados da relação álcool/ESR. Pode-se observar que não há diferenças significativas entre o vinho obtido pelas cepas selecionadas e a referência. A relação álcool/ESR demonstrou que nenhum vinho está acima do limite máximo de 4,8, permitido pela legislação. Ambas análises estão de acordo com os dados encontrados por MIELE, RIZZON, ZANUZ (1994). MANFROI; RIZZON (1996) encontraram valores de 19,2 a 21,9 g/L para extrato seco reduzido e 3,33 a 3,65 para relação álcool/ESR em vinhos da cultivar Cabernet-Sauvignon. Tais valores indicam que tanto o vinho de Colombo, como o vinhos com leveduras selecionadas extraíram uma grande quantidade de sólidos não voláteis, principalmente compostos fenólicos, característicos da cultivar Terci, além do

favorecimento do alto teor alcoólico que aumenta a extração de substâncias da película.

TABELA 35 – EXTRATO SECO REDUZIDO (g/L) DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA (g/L)
Vinho (variedade CK)	29,9333 ( $\pm$ 0,4041)
Vinho (variedade BDX)	33,5833 ( $\pm$ 1,3856)
Vinho (variedade BC)	27,1083 ( $\pm$ 0,5377)
Vinho de Colombo	29,1750 ( $\pm$ 1,2258)

TABELA 36 - RELAÇÃO ÁLCOOL / EXTRATO SECO REDUZIDO DOS VINHOS OBTIDOS NO LABORATÓRIO, UTILIZANDO DIFERENTES VARIEDADES DE *Saccharomyces cerevisiae* E DO VINHO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM COLOMBO

PRODUTO FINAL	MÉDIA
Vinho (variedade CK)	3,6330 ( $\pm$ 0,0491)
Vinho (variedade BDX)	3,2180 ( $\pm$ 0,1328)
Vinho (variedade BC)	3,9286 ( $\pm$ 0,0778)
Vinho de Colombo	4,2353 ( $\pm$ 0,1778)

## 6 CONCLUSÃO

Conforme resultados obtidos, pode-se verificar que o uso de leveduras selecionadas, nas condições testadas, favorece a qualidade físico-química dos vinhos obtidos, por reduzir a concentração de alguns compostos indesejáveis no produto final, como a acidez volátil, caracterizada principalmente pelo ácido acético, o éster acetato de etila, o metanol e o acetaldeído em relação ao vinho de Colombo.

A adição de leveduras proporcionou um rápido início de fermentação, um bom rendimento no teor alcoólico produzido, demonstrando suas habilidades em predominar nos mostos, sendo tolerantes ao anidrido sulfuroso adicionado e ao teor alcoólico elevado.

Os resultados obtidos serão repassados aos produtores de Colombo, para que os mesmos decidam sobre a utilização de leveduras selecionadas. Vale ressaltar que muitos deles já estão utilizando as leveduras testadas nesse trabalho em função dos resultados demonstrados através de uma degustação realizada durante uma das atividades do projeto de extensão. Os vinhos elaborados com as leveduras selecionadas obtiveram a preferência da maioria dos produtores de Colombo.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Sugere-se como trabalho posterior a seleção de cepas obtidas da própria uva utilizada na produção do vinho, uma vez que, segundo ARAUJO et al. (1998), há uma tendência na seleção de leveduras endógenas bem adaptadas para produção de vinhos em ambientes específicos, com características enológicas regionais, o que poderia vir a aumentar a aceitabilidade dos produtores em modificar seus processos.

Sugere-se o doseamento individual dos ácidos orgânicos mais importantes para observar a concentração dos principais ácidos presentes, bem como o doseamento de outros compostos importantes, como, por exemplo, os terpenos, que vão influenciar no aroma dos vinhos e que podem ser relacionados com uma análise sensorial; e os compostos fenólicos, como o resveratrol, o qual apresenta atividade antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Analisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1976.
- Analytical methods: flame atomic absorption spectrometry**. Mulgrave Victoria: Varian AustraliaPly Ltda., 1989, p. 19 e 23.
- AOAC. Metals and other elements. In: **Official methods of analysis of AOAC international**. 17 ed. Gaithersburg, 2000. p. 15-20.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Ed. Edgarg Blücher Ltda, 1983. v. 5. p. 1-43.
- ARAUJO, S. et al. Yeasts isolated from fermenting juice extracted from white-wine grape varieties in Zulia state, Venezuela. **Ver. Fac. Agron.**, v. 15, p. 249-255, 1998.
- ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 1968.
- BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S. Yeast stress response and fermentation efficiency. How to survive the making of wine: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 27-51, 2000.
- BELY, M., SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, p. 246-252, 1990.
- BENASSI, M. T. **Metodologia analítica para avaliação de parâmetros físico-químicos e sensoriais de qualidade em vinhos Riesling Itálico nacionais**. Campinas, 1997. 150 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.
- BONFIM, T. M. et al. Qualidade do vinho produzido no município de Colombo na safra 2001. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2002.
- BRASIL. **Decreto n. 99.066, de 08 de março de 1990**. Regulamenta a Lei n. 7.678 de 08 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/ddiv>> Acesso em: 04 jun 2002.
- BRASIL. **Lei n. 7.678, de 08 de novembro de 1988**. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/ddiv>> Acesso em: 04 jun. 2002.

BRASIL. Portaria n. 076, de 27 de novembro de 1986. Estabelece métodos oficiais de análises para destilados alcoólicos, destilados retificados e alcoólicos por mistura. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 dez. 1986. Seção I.

BRASIL. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova as normas referentes a "Completação dos padrões de identidade e qualidade do vinho". **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 out. 1988.

BRASIL. Portaria n. 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o regulamento técnico referente aos "Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos" e seu anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 set 1998.

BRUETSCHY, A. et al. **Elaboración de vinos: seguridad, calidad, métodos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 2000.

CAMARGO, U. A. **Revista do vinho**, v. 2, n. 11, p. 22, 1989.

CARRAU, J. L. A biotecnologia e a elaboração de vinhos jovens. **Revista do vinho**, v. 2, n. 9, p. 27-33, 1988.

CATALUÑA, E. **Uvas e vinhos**. Rio de Janeiro: Ed. Globo, 1984.

CHOCIAI, M. B. et al. **Elaboração de vinhos**. Curitiba: Imprensa Universitária da UFPR, 2000.

CIANI, M.; PEPE, V. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 573-578, 2002.

COMI, G.; CROATTINI, I. The oenological characteristics of commercial dry yeasts. **Journal of Wine Research**, v. 8, n. 2, p. 81-86, 1997.

COPAT, L. A produção de uvas no Brasil e a problemática do vinho comum. **Revista do vinho**, v. 2, n. 19, p. 27-33, 1988.

COSTA, R. M. **Elaboração e controle de qualidade de vinho tinto suave de mesa da região de Santa Felicidade**. Curitiba, 1993. 146 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química), Universidade Federal do Paraná.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5-6, p. 577-588, 2001.

EGLI, C. M. et al. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 779-789, 1998.

EMBRAPA UVA E VINHO, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA. **Revista do vinho**, p. 26-28, jul/ago, 1987.

ESCHENBRUCH, R. Sulfite and Sulfide formation during winemaking – a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 25, n. 3, p. 157-161, 1974.

**Farmacopéia Brasileira**. 3. ed. São Paulo: Ed. Andrei, 1977.

FLEET, G. Growth of yeasts during wine fermentations. **Journal of Wine Research**, v. 3, p. 211-223, 1990.

FLEET, G. Spoilage yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p.1-44, 1992.

FRAILE, P. et al. Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of rosé wines: evolution during fermentation. **Journal of Agricultural Chemistry**, v. 48, p. 1789-1798, 2000.

FRESCHI, P. G. et al. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 10, p. 1987-1993, 2001.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 727-728, 1985.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Occurrence and growth of yeasts species during the fermentation of dome Australians wines. **Food Technol. Aust.**, v. 38, p. 22-25, 1986.

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

HENICK-KLING, T. et al. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 865-876, 1998.

JOSHI, V. K.; PANDEY, A. **Biotechnology: food fermentation**. New Delhi: Educational Publishers & Distributors, 1999. v. 2. p. 647-744.

KRAUS, J. K.; SCOOP, R.; CHEN, S. L. Effect of rehydratation on dry wine yeast activity. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 32, p. 133-134, 1981.

LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97-129, 2000.

LAWRENCE, J. F. et al. Comparison of three liquid chromatographic methods with FDA optimized Monier-Williams method for determination of total sulfite in foods. **Journal of Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, n. 1, p. 77-79, 1990.

- LONA, A. A. Fermentação malolática. **Revista do vinho**, v. 4, n. 22, p. 24-25, 1991.
- LONA, A. A. Qualidade, o item básico do bom vinho. **Revista do vinho**, v. 7, n. 38, p. 18-19, 1993.
- LOPES, C. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia: a study at different fermentation scales. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 608-615, 2002.
- MANFROI, V.; RIZZON, L. A. Influência do tempo de maceração e do número de recalques nas características físico-químicas e minerais do vinho Cabernet Sauvignon. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 60-65, 1996.
- MASNEUF, I., AIGLE, M.; DUBOURDIEU, D. Development of a polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 239-244, 1996.
- MAURICIO, J. C. et al. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 155-160, 1997.
- MENEGUZZO, J. Sistemas de vinificação para vinhos tintos: sistema clássico. **Revista do vinho**, v. 4, n. 19, p. 28-29, 1990.
- MIELE, A.; RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C. Avaliação nacional de vinhos - Safra 1993. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 161-169, 1994.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Dados sobre a produção de vinho no estado do Paraná de 1999 a 2002**. Curitiba, 27 ago. 2003. 2f.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Dados sobre produção, área, rendimento, importações e exportações no Brasil de 1991 a 2000**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 25 jun. 2002.
- PACHECO, A. O. **Iniciação à enologia**. 2ed. São Paulo: Senac Editora, 1999.
- PATO, O. **O vinho, sua preparação e conservação**. 6ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1978.
- PRETORIUS, I. S. Gene technology in winemaking: new approaches to an ancient art. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 66, n. 1, p. 27-47, 2001.
- PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PRETORIUS, I. S.; VAN DER WESTHUIZEN, T. J.; AUGUSTYN, O. P. H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, n. 2, p. 61-74, 1999.

PROTAS, J. F. S.; MELLO, L. M. R. A vitivinicultura brasileira: o panorama mercadológico e suas perspectivas. In: III SEMINÁRIO ESTADUAL DE FRUTICULTURA: TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE VIDEIRAS, 2003, Palmas-PR. **Anais**, Palmas-PR, 2003. p. 15-21.

QUEROL, A. et al. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2848-2953, 1992.

QUEROL, A.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T. A study on microbiological and enological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvested in the region of Alicante (Spain). **Journal Food Science**, v. 55, p. 1603-1606, 1990.

RIZZON, L. A. et al. Diferenciação analítica entre vinhos rosados e tintos da microrregião homogênea vinicultora de Caxias do Sul (MRH 311). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 6-12, 1992.

ROMANO, P. et al. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 118, p. 213-218, 1994.

ROMANO, P. et al. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 126-130, 1992.

ROMANO, P. et al. Improvement of a wine *Saccharomyces cerevisiae* strain by a breeding program. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 830-835, 1985.

SANGORRÍN, M. et al. The use of killer biotyping in an ecological survey of yeast in an old Patagonian winery. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 115-120, 2002.

SCHREIER, P. Flavor composition of wines: a review. **CRC Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 12, p. 59-111, 1979.

SECRETARIA ESTADUAL DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ. **Uva 00/01.doc**. Dados referentes à plantação de uva no estado do Paraná. Curitiba, 27 out. 2003. Arquivo (97 KB). Word for Windows 6.0.

SECRETARIA ESTADUAL DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ. **Uva 01/02.doc**. Dados referentes à plantação de uva no estado do Paraná. Curitiba, 27 out. 2003. Arquivo (100 KB). Word for Windows 6.0.

SECRETARIA MUNICIPAL DE AGRICULTURA, ABASTECIMENTO E MEIO AMBIENTE DE COLOMBO. **Dados sobre a plantação de uva no município de Colombo.** Curitiba, 2002. 1f.

UVAFERM. **Scheda tecnica Uvaferm CK, Uvaferm BDX e Uvaferm BC.** Disponível em <<http://www.esseco.it/prodotti.cfm?classe=LIEVITI#>> Acesso em: 08 mar 2003.

VAN VUUREN, H.J.J; JACOBS,C.J. Killer yeasts in the wine industry: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 2, p. 119-128, 1992.

VILANOVA, M. et al. Use of PGU1 recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 876-883, 2000.

VOGT, E. et al. **El vino: obtención, elaboración y análisis.** Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1984.

WALTER, F. G. **The manufacture of compressed yeast.** London: Chapman & Hall Ltda., 1953.

WARNER, C. R. et al. Reevaluation of Monier-Williams method for determining sulfite in food. **Association Official Analytical Chemists.**, v. 69, n. 1, p. 3-5, 1986.

ZAGORC, T. et al. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 441-451, 2001.

ZOECKLEIN, B. W. et al. **Análisis y producción de vino.** Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.