

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL  
CÂMPUS BENTO GONÇALVES

METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO MÁLICO POR LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*  
*bayanus*

CAROLINE GONZATTI

Bento Gonçalves, Janeiro de 2020

CAROLINE GONZATTI

METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO MÁLICO POR LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*  
*bayanus*

Relatório apresentado junto ao Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof. Dr. Julio Meneguzzo

CAROLINE GONZATTI

METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO MÁLICO POR LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*  
*bayanus*

Relatório apresentado junto ao Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof. Dr. Julio Meneguzzo

---

Prof. Julio Meneguzzo (orientador) - IFRS

---

Prof<sup>a</sup>. Simone Bertazzo Rossato (coordenadora e membro de banca) - IFRS

---

Prof. Vinícius Casagrande Fornasier (membro de banca) - IFRS

Bento Gonçalves, Janeiro de 2020

## RESUMO

### METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO MÁLICO POR LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae bayanus*

Caroline Gonzatti<sup>1</sup>

A degradação do ácido málico é necessária para a estabilização microbiológica e para a melhora organoléptica dos vinhos tintos. Existem dois processos biológicos para diminuir essa acidez: a fermentação malolática, promovida pelas bactérias lácticas e a fermentação maloalcoólica, que ocorre através de leveduras. O objetivo desse trabalho é comparar duas leveduras comerciais que prometem o consumo de ácido málico e avaliar se esta degradação é suficiente para reduzir a acidez málica, com o intuito de estabilizar mais rapidamente um produto jovem, assim como facilitar possíveis inícios de fermentação malolática devido aos baixos níveis de ácido málico no vinho. O experimento foi realizado na Vinícola Quinta da Neve, na cidade de São Joaquim (SC). Foram vinificados 126 kg de uva, divididos em dois tratamentos com diferentes marcas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae bayanus* e três repetições cada. Durante o período de quinze dias no qual ocorreu o processo de fermentação, diariamente foi coletada e congelada uma amostra de cada repetição. Posteriormente, foram analisados pelo método WineScan, os seguintes compostos de cada uma das amostras: ácido málico, ácido láctico, acidez volátil, açúcares totais, acidez total, densidade, pH e etanol. Com os dados obtidos, fez-se uma análise estatística pelo método Anova e na constatação de diferenças significativas, aplicou-se o teste de Tukey 5%. Constatou-se a metabolização de 39,71% do ácido málico total do mosto no tratamento da levedura comercial Y, 4,25% a mais em relação a levedura comercial X. A levedura comercial Y também consumiu o valor significativo de 58,92% da acidez volátil total inicial do mosto, enquanto a levedura comercial X consumiu 36,35% do valor inicial. Embora exista diferença estatisticamente significativa na metabolização de ácido málico e ácido acético entre as leveduras comerciais testadas, para a indústria enológica não há diferença significativa entre estas leveduras.

**Palavras-chave:** ácido málico, fermentação maloalcoólica, processos biológicos, estabilização microbiológica.

<sup>1</sup> Aluna do IFRS BG, Curso Superior em Viticultura e Enologia, Av. Osvaldo Aranha, 540, 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: carolinegonzatti@gmail.com

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolização do ácido málico por levedura .....	13
Figura 2. Metabolização do ácido málico por levedura .....	14
Figura 3. Decomposição de ácido málico pelas leveduras durante a fermentação alcoólica ...	14
Figura 4. Ácido málico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) durante a fermentação alcoólica de Cabernet Sauvignon por duas leveduras comerciais.....	20
Figura 5. Acidez volátil ( $\text{meq.L}^{-1}$ ) durante a fermentação alcoólica de Cabernet Sauvignon por duas leveduras comerciais. ....	21
Figura 6. Acidez total ( $\text{meq.L}^{-1}$ ) durante a fermentação alcoólica de Cabernet Sauvignon por duas leveduras comerciais. ....	22

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
2.1    Acidez nos mostos e vinhos .....	8
2.1.1    Ácido Málico .....	9
2.1.2    Acidez Volátil, Ácido acético e análogos .....	10
2.2    Fermentação Alcoólica .....	11
2.3    Fermentação Maloalcoólica .....	11
2.4    Fermentação Malolática .....	14
3.0    WineScan .....	15
<b>MATERIAIS E MÉTODO .....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>27</b>

## INTRODUÇÃO

A diminuição da acidez málica é vista como um processo de afinamento de vinhos indispensável para a indústria enológica, pois o ácido málico é um substrato facilmente metabolizável por bactérias lácticas e algumas espécies de leveduras. Em regiões de clima frio, a concentração de ácido málico no mosto das uvas é maior, visto que a temperatura determina a taxa de respiração das plantas e, conseqüentemente, o consumo do ácido tartárico e ácido málico nas células da polpa das bagas.

A Serra Catarinense é caracterizada por um clima subtropical, com temperaturas médias entre 6,5°C e 21,3 °C durante o ano (EPAGRI/ CIRAM, 2011). As chuvas no período de maturação, além de baixas temperaturas, favorecem a acidez nos vinhos de todas as variedades em relação à outras regiões vitivinícolas do país. Após o período das fermentações, o vinho ainda apresenta altas concentrações de ácido málico e está apto para iniciar a fermentação malolática, porém, o outono e suas baixas temperaturas na Serra Catarinense, desfavorecem o meio para a multiplicação e desenvolvimento das bactérias lácticas, o que pode causar paradas ou arrastes na fermentação devido ao frio.

O objetivo desse trabalho é comparar duas leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae bayanus* quanto ao consumo de ácido málico e avaliar se esta degradação é suficiente para reduzir a acidez málica, com o intuito de estabilizar mais rapidamente um produto jovem, assim como favorecer possíveis inícios de fermentação malolática devido aos baixos níveis de ácido málico no vinho, evitando o uso de desacidificantes externos para a diminuição de ácido málico na indução da fermentação malolática em regiões frias.

Acompanhou-se a fermentação através de análises físico-químicas usuais, além das análises de ácido málico e láctico. O Experimento foi executado na Vinícola Quinta da Neve, na cidade de São Joaquim – SC, em março de 2018. As análises foram realizadas no Laboratório de Referência Enológica (LAREN) em Caxias do Sul. A variedade escolhida para o experimento foi a Cabernet Sauvignon a qual possui maturação tardia e na região da Serra Catarinense não atinge seu ápice da maturação, preservando maior concentração de ácido málico.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Acidez nos mostos e vinhos

Segundo LEPE (1997), constituem a acidez dos mostos o conjunto de ácidos orgânicos livres e combinados em forma de sais, sais ácidos e alguns ácidos minerais, entre outras substâncias de caráter ácido. No vinho, parte desses ácidos orgânicos originam-se de processos biossintéticos da videira, enquanto outra importante fração é formada em consequência do metabolismo microbiano das leveduras e bactérias que intervêm na fermentação alcoólica e em outros processos biológicos durante o envelhecimento.

Na degustação o sabor ácido do vinho é um dos quatro sabores elementares. Os três ácidos provenientes da uva, o ácido málico e cítrico, são os responsáveis pelo sabor ácido propriamente dito. Porém, o sabor ácido, por sua característica irritante e corrosiva, terá uma tonalidade de verdor se é o ácido málico que domina (FLANZY, 2003).

A acidez total dos mostos e vinhos considera todos os tipos de ácidos, por exemplo, ácidos inorgânicos como ácido fosfórico, ácidos orgânicos assim como aminoácidos. Mesmo com o uso de tecnologias, é difícil prever a acidez total do vinho baseada na acidez total do mosto. Parte dos ácidos originais da fruta podem ser consumidos pelas leveduras e especialmente por bactérias. Por outro lado, leveduras e bactérias produzem ácidos como succínico e lático (RIBÉREAU GAYON, 2006)

Segundo HIDALGO TOGORES (2006), a distribuição dos ácidos na baga de uva madura se encontra em função inversa às concentrações de açúcares. A área de maior concentração do ácido málico e tartárico na baga é na zona central que rodeia as sementes, na polpa a concentração é média e na película é baixa.

A composição ácida do mosto é expressa em pH, acidez total, ácido tartárico e ácido málico. O vinho apresenta um pH compreendido entre 2,5 e 4,5, dependendo da cultivar, grau de maturação da uva, espécie de levedura e das condições físico-químicas em que se desenvolveu a fermentação (OLIVIER, 1997).

O pH pode aumentar ou diminuir com a fermentação alcoólica, enquanto a acidez titulável quase sempre diminuirá. Isso porque o pH está relacionado à quantidade e força dos

ácidos presentes. Estes ácidos podem ser fortes ou fracos, mais ou menos dissociados, enquanto a acidez titulável não leva em conta sua força, expressando somente a soma dos ácidos livres. Estes, por sua vez, combinam-se com cátions metálicos, diminuindo sua concentração (OLIVIER, 1997).

Mesmo utilizando as últimas tecnologias, é difícil de prever a acidez total de um vinho com base na acidez inicial de um mosto do qual o ele é feito, por inúmeras razões (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

### **2.1.1 Ácido Málico**

Para RIBÉREAU GAYON (2006), a composição da acidez total dos mostos depende principalmente da geografia, condições de solo e clima, incluindo umidade e permeabilidade do solo, assim como padrões de chuva e acima de tudo, temperatura. A temperatura determina a taxa de respiração, por exemplo, a combustão do ácido tartárico e especialmente do ácido málico nas células da polpa da uva. A predominância do ácido málico no mosto de vinhedos de climas frios está diretamente relacionada com a temperatura, enquanto o ácido málico é consumido de forma mais expressiva em regiões mais quentes por combustão.

O ácido málico apresenta-se na uva sob a forma de ácido L(-)- málico, de forma molecular ( $\text{COOH-CHOH-CH}_2\text{/}_2\text{-COOH}$ ) e peso molecular igual a 134,09 gramas (OREGLIA, 1978). Como este afirma, considera-se um ácido frágil facilmente metabolizado. Está presente em grandes quantidades na uva verde, a qual dá sabor acre. É considerado o segundo ácido mais importante no mosto. Com o início da maturação da uva, a concentração de ácido málico começa a diminuir, até chegar a valores de 1,0 a 5,0  $\text{g.L}^{-1}$  no mosto (HIDALGO, 2011).

Conforme PEYNAUD (1982), o ácido málico é de importância no vinho, já que é mais facilmente atacado por microrganismos, em comparação com o tartárico ou o succínico.

Segundo LEPE (1997), um vinho rico em ácido málico é considerado biologicamente instável, por ser um substrato facilmente metabolizável por determinadas espécies microbianas, principalmente bactérias lácticas e algumas espécies de leveduras fermentativas.

Um método que é pouco conhecido ou ao menos é raramente utilizado para evitar uma acidez total desequilibrada, consiste em eliminar parcialmente ou completamente o ácido

málico através de meios químicos, usando uma mistura de tartarato de cálcio e carbonato de cálcio. Esse método precipita o dobro de sais de cálcio e tartromalato (RIBÉREAU GAYON, 2006).

A diminuição da acidez total em vinhos com abundante quantidade de ácido málico constitui um dos processos técnicos mais estudados na Enologia, considerando-se a diminuição da acidez málica um fenômeno indispensável para o afinamento de vinhos de regiões frias, onde a uva não matura o suficiente (LEPE, 1997).

### **2.1.2 Acidez Volátil, Ácido acético e análogos**

De acordo com RIBÉREAU GAYON (2006), a fermentação alcoólica geralmente leva a formação de 0,2 – 0,3 g.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (o mesmo que 4,08 – 6,12 meq.L<sup>-1</sup>) de acidez volátil nos vinhos. A presença de oxigênio sempre promove uma formação de ácido acético. Embora esse ácido seja formado tanto no começo quanto no final da fermentação alcoólica. Da mesma forma observa-se um aumento de 0,1 – 0,2 g.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (o mesmo que 2,04 - 4,08 meq.L<sup>-1</sup>) durante a fermentação malolática.

Conforme HIDALGO TOGORES (2011), na fermentação de mostos cortados com vinhos de acidez volátil elevada, supõe-se uma redução do nível de acidez através da assimilação do ácido acético e também do acetato de etilo, reduzindo-se ambos até a formação de etanal, favorecendo a fermentação alcoólica em relação a fermentação gliceropirúvica. O limite de acidez volátil dos cortes é de 0,6 g.L<sup>-1</sup>, obtendo vinhos com nível normal de ácido acético, sendo mais pobres em glicerina e mais ricos em 2,3 butanodiol e acetoína.

Já para RIBÉREAU GAYON (2006), as leveduras consomem grandes quantidades de ácido acético secretado no mosto durante a fermentação dos primeiros 50 -100 gramas de açúcar. Também podem assimilar o ácido acético adicionado ao mosto no início da fermentação alcoólica. O mecanismo dessa assimilação ainda não é claro. Ele sugere que o ácido acético se reduz a acetaldeído o que favorece a fermentação alcoólica ao invés da fermentação gliceropirúvica. As leveduras parecem utilizar o ácido acético formado no início da fermentação alcoólica via acetil CoA para produção de lipídios.

## 2.2 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica consiste na transformação do açúcar em álcool ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), como produtos principais, além de pequenas quantidades de uma vasta gama de produtos secundários (OLIVER, 1977).

Segundo ÁVILA (2002), sendo a glicose mais densa que o etanol, os enólogos podem seguir o progresso de uma fermentação pela medida de densidade do mosto. A densidade do mosto diminui progressivamente até entre 0,991 e 0,996  $\text{g.cm}^3$ . A fermentação alcoólica pode ser dividida em quatro fases: latência, exponencial, estacionária e morte das leveduras. Como consequência da influência sobre o crescimento e o processo fermentativo das leveduras, a temperatura influi na velocidade de fermentação, rendimento em etanol, no metabolismo de produtos secundários e na acumulação de receptores de dióxido de enxofre.

A fermentação realizada a baixas temperaturas apresenta um sensível melhoramento nas características sensoriais do vinho. Produz-se maior rendimento de álcool, aromas mais agradáveis e pronunciados e paladar fino, vinhos mais ricos em dióxido de carbono, melhor coloração, menor conteúdo de glicerina e menor formação de ácidos voláteis (GOROGLIO, 1981).

## 2.3 Fermentação Maloalcoólica

Segundo USSEGLIO-TOMASSET (1978), o ácido málico diminui no mosto durante a fermentação alcoólica e de acordo com a espécie de levedura, pode se observar uma diminuição de 10 a 25% da quantidade inicial. Essa degradação do ácido málico ocorre em maior quantidade em pH baixos e é nula em pH 5. Algumas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* podem degradar mais de 40% do ácido málico inicial, porém o gênero *Schizosaccharomyces* pode degradar até 90% da quantidade inicial. A desvantagem desta última está nas características organolépticas desfavoráveis, desenvolvimento lento e baixa tolerância ao álcool.

De acordo com DELFINI (2010), a fermentação maloalcoólica transforma o ácido málico em etanol e dióxido de carbono. Segundo ele, cerca de 0,13% de etanol são formados teoricamente a partir de 3  $\text{g.L}^{-1}$  de ácido málico. Já para USSEGLIO-TOMASSET (1978), 5,36  $\text{g.L}^{-1}$  de ácido málico causam um aumento de 0,23% na graduação alcoólica final.

PEYNAUD (1982) considera que o consumo do ácido málico durante a fermentação maloalcoólica é devido à separação dos átomos de hidrogênio e posterior descarboxilação do ácido oxalacético a etanal, que atua como acceptor de hidrogênio e se transforma em álcool.

Segundo ZAMBONELLI (2003), a capacidade de provocar fermentação maloalcoólica é possível na *Saccharomyces cerevisiae* pelo transporte do ácido málico por parte da célula realizada somente por difusão passiva. Esta capacidade está presente em todas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mas com diferente intensidade, que pode ser um objeto de estudo e posterior seleção. Já a fermentação maloalcoólica pode dar-se através de um *Schizosaccharomyces* que possui um sistema enzimático de transporte de ácido L-málico.

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* provoca uma diminuição do L-málico que se expressa em diferentes percentuais, não sendo constantes. Esta diminuição pode ser superior a 50% quando a concentração do composto é inferior a 2 g.L<sup>-1</sup> (ZAMBONELLI, 2003).

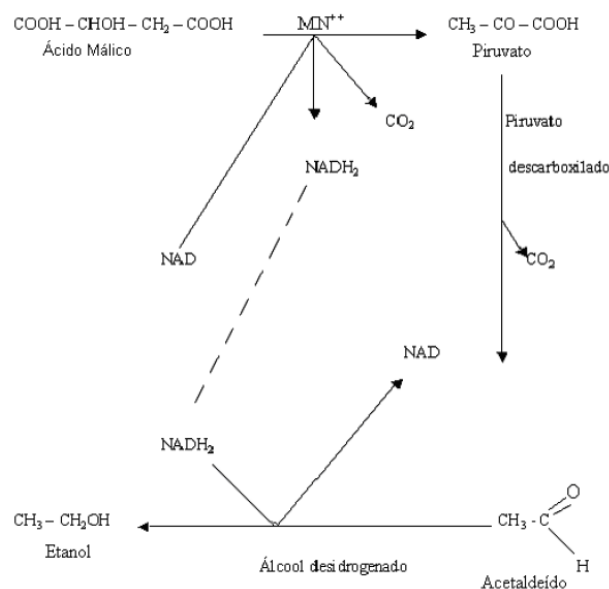
Segundo ZAMBONELLI (2003), a cepa de *Saccharomyces cerevisiae bayanus* criotolerantes possui a capacidade de sintetizar o ácido málico assim como fermentá-lo. A capacidade de síntese varia de acordo com a função da cepa, a concentração do composto e a temperatura de fermentação: atinge níveis máximos na temperatura ótima ou subótima (de 18 a 26 ° C) e com uma presença inicial de 1-2 g.L<sup>-1</sup>. Acima de 3 gramas, a ação começa a enfraquecer e, se o composto tiver uma concentração superior a 3,5 - 4,0 g.L<sup>-1</sup>, há uma inversão de comportamento com a fermentação maloalcoólica. E resumo, essas leveduras tendem a produzir vinhos com acidez málica constante de 2 – 3 g.L<sup>-1</sup>. A ação sobre o ácido málico é de interesse verdadeiramente notável: a disponibilidade de cepas que causam uma diminuição previsível do ácido málico ou que, ao contrário, o sintetizam, pode resolver muitos problemas relacionados a excessos ou defeitos de acidez nos vinhos.

Conforme CARRAU (1978), para as células que possuem carboxilase, como as leveduras, pode-se formular a seguinte hipótese: o ácido pirúvico provindo do ácido málico seria descarboxilado em acetaldeído e o acetaldeído formado seria reduzido a álcool.

Em um primeiro estágio, segundo LEPE (2004), o ácido málico é transformado em ácido pirúvico (figura 1), em presenças de íons de Manganês, graças à enzima málica. Posteriormente, o ácido pirúvico integra-se nas reações da fermentação alcoólica, ocorrendo em primeiro lugar uma descarboxilação a acetaldeído e após uma redução a álcool.

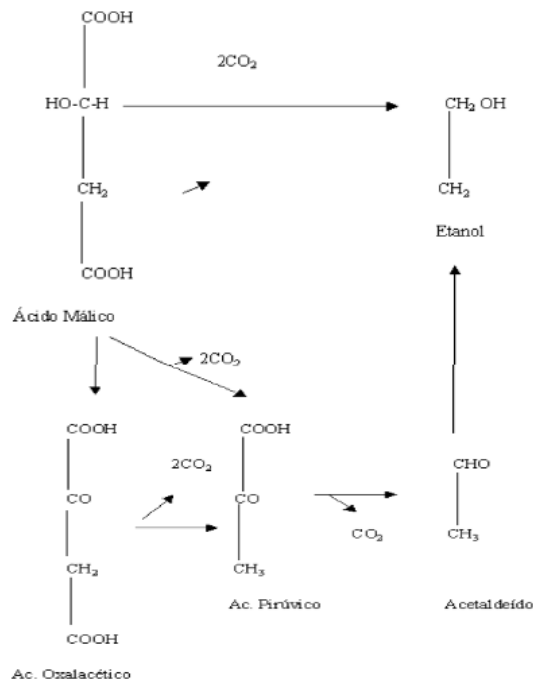
Na figura 2, ZAMBONELLI (2003), ilustra a hipótese de Mayer e Temperli (1963) sobre a formação do etanol a partir do ácido málico por dupla descarboxilação direta.

Para RIBÉREAU GAYON (2006), a *Saccharomyces cerevisiae* degrada parcialmente o ácido málico (10–25%) durante a fermentação alcoólica. Diferentes cepas degradam quantidades variadas desse ácido e a degradação é mais significativa quando o pH é baixo. A fermentação alcoólica é a principal via de degradação do ácido málico. O ácido pirúvico resultante dessa transformação é descarboxilado em etanal, que é então reduzido a etanol. A enzima málica é responsável pela transformação do ácido málico em ácido pirúvico (Figura 3). Essa descarboxilação oxidativa requer  $\text{NAD}^+$ . Esta fermentação malo-alcoólica reduz significativamente a acidez do vinho, mais do que a fermentação malolática.



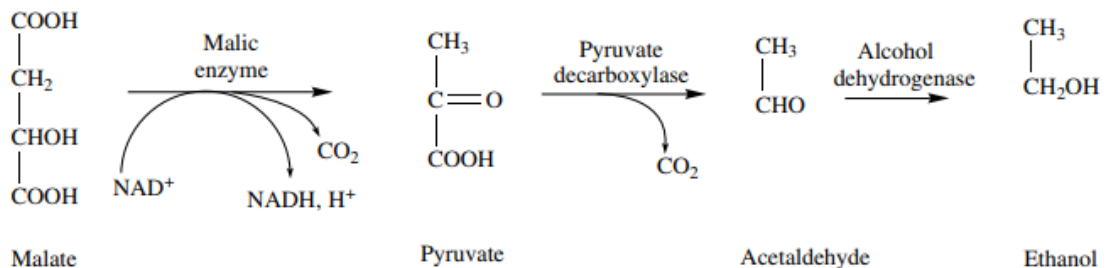
**Figura 1. Metabolização do ácido málico por levedura**

FONTE: LEPE (2004).



**Figura 2. Metabolização do ácido málico por levedura**

FONTE: ZAMBONELLI (2003).



**Figura 3. Decomposição de ácido málico pelas leveduras durante a fermentação alcoólica**

FONTE: RIBERÉAU-GAYON (2006).

## 2.4 Fermentação Malolática

A fermentação malolática é o processo metabólico de descarboxilação do ácido L-málico em ácido L-Lático e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). É realizada por bactérias lácticas, presentes naturalmente em vinhos, e outras bebidas alcoólicas que apresentem alto teor de ácido málico. (ÁVILA, 2002).

De acordo com RIBÉREAU GAYON (2006), a atividade malolática da estirpe *Oenococcus oeni* é ideal a um pH entre 3,0 e 3,2 e cerca de 60% de sua atividade máxima ocorre em pH 3,8. A faixa usual de pH dos vinhos, portanto, corresponde bem com a atividade máxima dessa célula bacteriana. No entanto, a taxa de fermentação malolática depende não somente da atividade, mas também da quantidade de células; em valores usuais do vinho o pH afeta ambas as variáveis e da mesma forma. A faixa ótima de temperatura da *Oenococcus oeni* é limitada e varia entre 20 a 23°C. Quando a graduação alcoólica está entre 13 – 14% vol. a temperatura ótima diminui assim como o crescimento celular. A temperatura ideal para o crescimento das bactérias lácticas (principalmente *O. oeni*) e para degradação de ácido málico no vinho é por volta dos 20°C. Sugere-se manter os vinhos a 20°C para a fermentação malolática, evitando resfriamentos bruscos após a fermentação alcoólica. Se a temperatura da vinícola diminuir, o vinho deve ser aquecido. Quando a temperatura for menor que 18°C, o início da fermentação malolática é retardado e sua duração é mais longa. Embora a fermentação malolática possa continuar entre os 10 e 15°C, esse resfriamento bloqueia a multiplicação da biomassa bacteriana, mas não a elimina, apenas diminui a taxa de atividade celular, podendo degradar todo o ácido málico presente em dias, semanas ou até mesmo meses.

### **3.0 WineScan**

O WineScan foi lançado em 1999, tornando-se uma importante opção para as análises de rotina para vinícolas e laboratórios especializados em todo mundo, sendo capaz de realizar análises exatas e rápidas com mais de 30 parâmetros físico-químicos de suma importância para o controle da qualidade. Já no ano de 2011 foi lançado um novo modelo com a opção de analisar SO<sub>2</sub> livre e total. Com o WineScan™, pode-se analisar diversos tipos de amostras, incluindo mosto, mosto durante o processo de fermentação e vinho acabado. Adequado para uso na plataforma de pesagem ou no laboratório, o WineScan fornece resultados analíticos exatos para uma ampla gama de parâmetros (FOSS – ANALYTICAL, 2019).

Para o WineScan™ é possível incorporar uma unidade de análise de vinho via Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e uma unidade opcional de coloração VIS. Os novos modelos também possuem a opção para uma unidade de SO<sub>2</sub>. Ela consiste em uma cubeta para gases em que o SO<sub>2</sub> evaporado é medido com uso da tecnologia FTIR (FOSS – ANALYTICAL, 2019).

A espectroscopia no infravermelho próximo somada a métodos de calibração multivariada, em função da alta eficiência, rapidez, simplicidade e baixo custo, vem sendo utilizada na determinação de analitos em alimentos, indústria de fármacos e produtos de origem agrícola (SAURINA, 2010).

Os métodos espectroscópicos, espectrofotométricos e separativos são considerados os mais simples e, por isso, amplamente utilizados para a caracterização das amostras de vinho. A espectroscopia de infravermelho associada a transformada de Fourier (FTIR) permite uma análise rápida e reprodutível de vários parâmetros simultaneamente de uma amostra, com necessidade de preparação da amostra mínima ou mesmo nenhuma (VERSARI, 2010).

O uso de FTIR na área da enologia é um método muito promissor e começa a ser bastante utilizado na determinação destes vários parâmetros físicos e químicos. As principais vantagens desta técnica são a rapidez, a precisão, elevado grau de autonomia, boa resolução média; permitindo uma rápida análise de vários parâmetros simultaneamente, com um gasto de amostra e reagente mínimo (MOREIRA; BARROS, 2002).

No entanto este equipamento (WineScan) necessita de calibrações específicas para cada parâmetro em análise. Depois de implementadas as retas de calibração, estas necessitam de verificações periódicas para assegurar a fiabilidade dos resultados (CORREIA, 2011).

## MATERIAIS E MÉTODO

O Experimento foi executado na Vinícola Quinta da Neve, na cidade de São Joaquim – SC. As análises foram realizadas no Laboratório de Referência Enológica (LAREN) em Caxias do Sul. A variedade escolhida para o experimento foi a Cabernet Sauvignon visto que possui maturação tardia e na região da Serra Catarinense não atinge seu ápice da maturação, preservando maior concentração de ácido málico.

No recebimento da uva, realizaram-se análises de densidade, temperatura e graus Brix. A uva foi pesada e desengaçada em um recipiente, onde adicionou-se 50 mg.L<sup>-1</sup> de dióxido de enxofre, homogeneizou-se e fez-se a divisão do mosto igualmente entre 6 recipientes, ficando com 21 kg de mosto em cada. Com o intuito de verificar a metabolização do ácido málico durante a fermentação alcoólica, utilizaram-se duas leveduras seca ativas, sendo uma delas capaz de degradar em até 30%, segundo o fabricante, o ácido málico presente no mosto. Observou-se a curva de fermentação dessas leveduras através de análises de densidade, temperatura, acidez total, pH, ácido málico, ácido láctico, acidez volátil, açúcares totais, glicose, frutose e etanol.

O delineamento experimental realizado foi inteiramente casualizado, composto de dois tratamentos e três repetições na fase da fermentação alcoólica. O tratamento um foi realizado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* da marca comercial X que não indica metabolização do ácido málico durante a fermentação alcoólica em sua ficha técnica. Já o tratamento dois foi feito com a levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* da marca comercial Y que cita em sua ficha técnica metabolização de até 30% de ácido málico durante a fermentação alcoólica.

A aclimação das leveduras seguiu as indicações dos fabricantes. Utilizou-se a dose de 20 g.hL<sup>-1</sup> de LSA para cada tratamento. Dobrou-se o pé de cuba de cada tratamento até 6 L de volume final e distribuiu-se 2L de pé de cuba para cada repetição. A inoculação foi realizada no dia 23 de março, mesmo dia do recebimento e desengace. Considera-se assim, o dia 24 como o primeiro dia de fermentação. Os recipientes ficaram na sala de tanques da vinícola e a temperatura foi mantida entre 18 e 22 °C com o auxílio de aquecedores devido ao frio que ocorreu nas semanas do experimento.

Foram coletadas amostras do mosto sulfitado e amostras diárias ao longo da fermentação. As coletas sempre ocorreram às 16:00 da tarde, na segunda remontagem do dia. Foram feitas duas remontagens diárias durante os 15 dias para assegurar a homogeneidade das amostras. A técnica consistiu em retirar o líquido dos recipientes de fermentação para um balde higienizado com soda e peracético e retorná-lo para as cascas nos mesmos. Acompanhou-se através de análises de temperatura e densidade o andamento da fermentação, que durou 15 dias. Todas as amostras foram coletadas e congeladas para serem enviadas e analisadas no LAREN em Caxias do Sul. As amostras foram analisadas pela WineScan, exceto para Brix e densidade, as quais seguiram os métodos clássicos, sendo utilizado mostímetro Brix a 20°C, densímetro a 20°C.

Não houve uma testemunha ou controle no trabalho e dessa forma os dados obtidos não geram uma real comparação e quando significativos estatisticamente são de baixa confiabilidade. Os tratamentos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e na constatação de diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os softwares utilizados foram 'Statistix 8', 'Past 217' e 'Minitab'.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação alcoólica durou um período de 15 dias. não ocorreu arrastes ou paradas de fermentação. A densidade inicial do mosto era de 1,078 g.cm<sup>3</sup> e 19° Brix. Na tabela 1, encontram-se as análises do mosto e análises finais de fermentação dos dois tratamentos. Observou-se diferença estatística para os valores de acidez volátil, acidez total e ácido málico.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos dos vinhos Cabernet Sauvignon ao final da fermentação alcoólica pelas leveduras comerciais X e Y.

	Acidez Volátil (meq.L <sup>-1</sup> )	pH	Acidez Total (meq.L <sup>-1</sup> )	Ácido Málico (meq.L <sup>-1</sup> )	Glicose (meq.L <sup>-1</sup> )	Frutose (meq.L <sup>-1</sup> )	Açúcares Totais (meq.L <sup>-1</sup> )	Etanol (%v/v)
Levedura X	3,78 A	3,40	84,15 A	3,04 A	0,11	0,98	1,09	11,91
Levedura Y	2,44 a	3,46	81,63 a	2,84 a	0,09	1,01	1,11	11,87
Mosto	5,94	3,68	43,4	4,71	72,17	67,55	160,2	0

\*Médias acompanhadas de letras são significativamente diferentes pelo teste de Tukey 5% de significância.

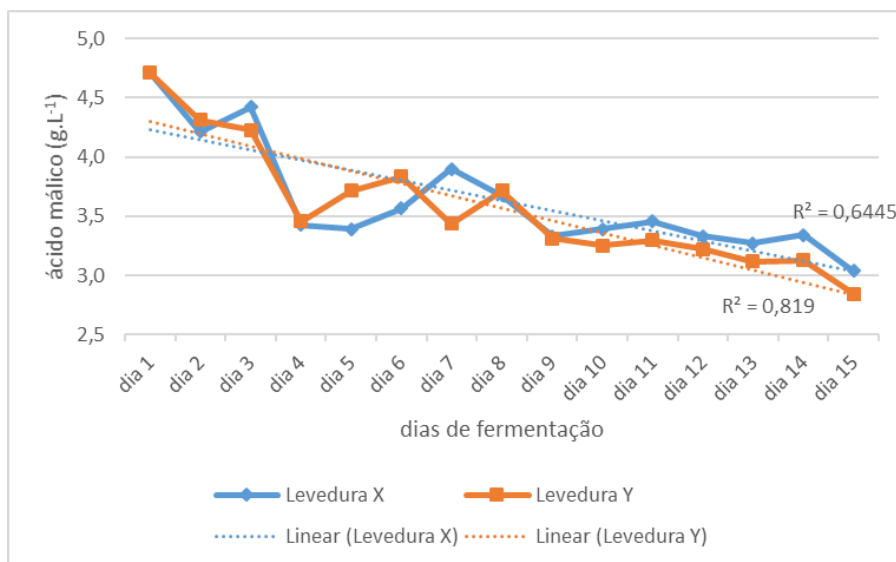
O objetivo principal do trabalho era avaliar a metabolização do ácido málico por duas leveduras comerciais. Houve diferença na metabolização do ácido málico, acidez volátil e acidez total entre os tratamentos, sendo significativa entre eles.

Pode-se afirmar que ocorreu uma fermentação maloalcoólica no trabalho pois todas as análises de ácido láctico mantiveram-se zeradas durante toda a fermentação alcoólica; sugerindo total ação de leveduras sobre o ácido málico ao invés de bactérias lácticas.

A concentração inicial de ácido málico no mosto foi de 4,71 g.L<sup>-1</sup>. Durante toda a fermentação houve uma metabolização desse ácido por ambas as leveduras. Houve um aumento da concentração de ácido málico durante algumas etapas da fermentação e isto pode ser explicado pela maceração que ocorreu até o último dia de fermentação, extraindo os ácidos mais próximos da semente da uva.

A levedura X metabolizou cerca de 35,46% de ácido málico, desconsiderando possíveis extrações de málico do bagaço durante a fermentação. Já a levedura Y chegou a 39,71% de consumo desse ácido. Houve uma diferença significativa entre as duas leveduras de 4,25% de consumo a mais de ácido málico pela levedura Y em relação a levedura X.

Mesmo ocorrendo metabolização do ácido málico em ambos os tratamentos, para a indústria enológica a diferença entre as duas leveduras comerciais testadas é muito baixa e insignificativa para influenciar na escolha da uma marca em relação a outra. O gráfico abaixo ilustra a metabolização do ácido málico durante o período de 15 dias da fermentação.

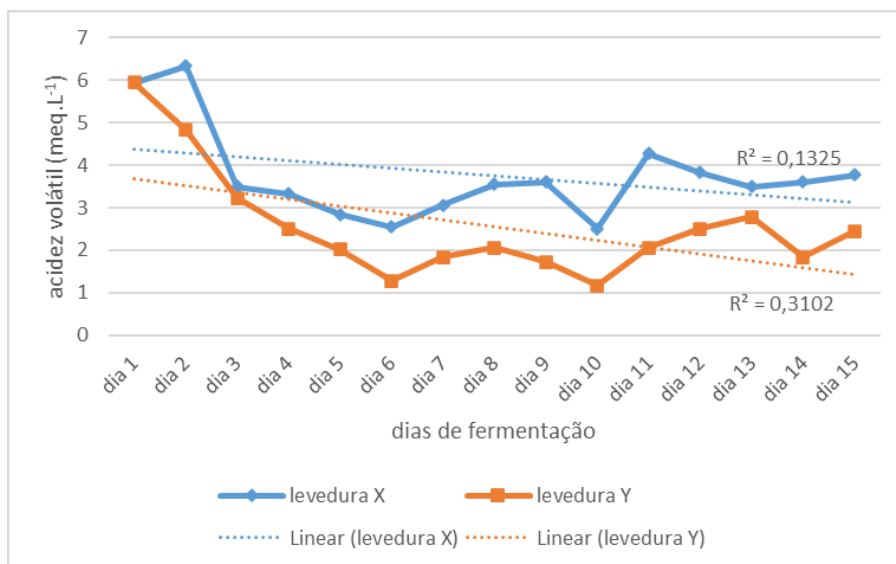


**Figura 4. Ácido málico (g.L<sup>-1</sup>) durante a fermentação alcoólica de Cabernet Sauvignon por duas leveduras comerciais.**

A acidez volátil também apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. A concentração inicial de acidez volátil no mosto era de 5,94 meq.L<sup>-1</sup>. No primeiro dia de fermentação houve um aumento significativo da volátil para 6,34 meq.L<sup>-1</sup> no mosto das repetições do tratamento com a levedura comercial X, enquanto no tratamento com a levedura comercial Y houve uma metabolização desse ácido (diminuição para 4,83 meq.L<sup>-1</sup> de Acidez Volátil). Esse aumento da acidez volátil nas repetições da levedura comercial X no primeiro dia de fermentação, pode ser explicado pela baixa atividade / população de leveduras no meio, onde bactérias acéticas foram favorecidas devido à baixa fermentação e disponibilidade de oxigênio através da remontagem no turno da manhã para homogeneização do mosto. A sugestão de baixa atividade / população de leveduras pode ser explicada pelos valores de açúcares totais do meio, onde inicialmente o mosto continha 160,02 g.L<sup>-1</sup> de açúcares totais e no primeiro dia de fermentação a levedura X metabolizou 18,14 g.L<sup>-1</sup> enquanto a levedura Y metabolizou 23,03 g.L<sup>-1</sup>, demonstrando maior atividade metabólica da levedura Y em relação à levedura X. O tratamento com a levedura Y mostrou-se mais eficiente para a diminuição da concentração de acético em relação a levedura X. Os valores finais de acidez volátil foram de 3,78 meq.L<sup>-1</sup> para as repetições da levedura X e 2,44 meq.L<sup>-1</sup> para as repetições da levedura Y, diferença de 22,5%

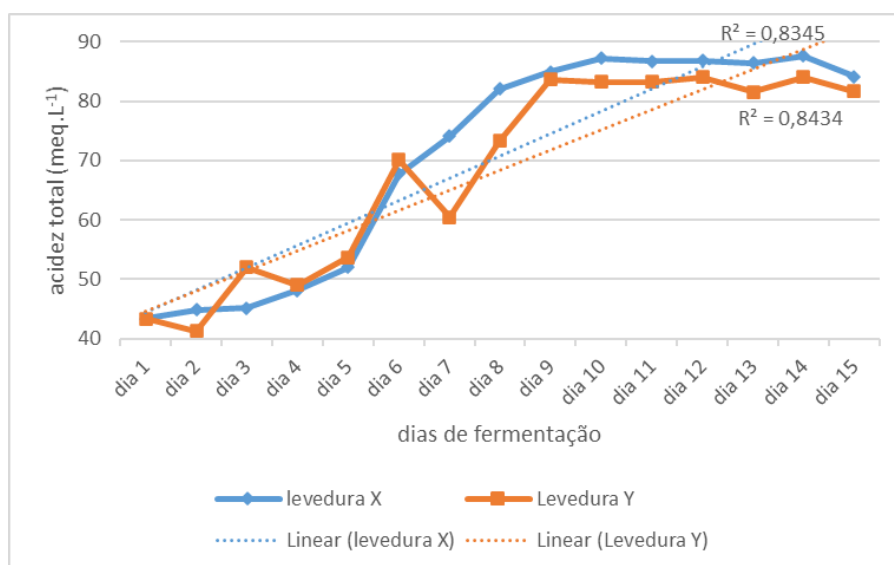
a mais de metabolização da levedura Y em relação à X sobre a acidez volátil inicial; diferença significativa pela ANOVA e Teste de Tukey 5%.

**Figura 5. Acidez volátil (meq.L<sup>-1</sup>) durante a fermentação alcoólica de Cabernet Sauvignon por duas**



**leveduras comerciais.**

A acidez total inicial do mosto era de 43,4 meq.L<sup>-1</sup>. Durante a fermentação alcoólica houve um aumento da acidez total, onde a levedura comercial X finalizou a fermentação com 86,33 meq.L<sup>-1</sup> e a levedura comercial Y com 81,36 meq.L<sup>-1</sup>, sendo essa diferença significativa entre as leveduras. Não houve formação de ácido láctico durante a fermentação alcoólica. A elevação da acidez em partes pode ser explicada pela extração dos ácidos da polpa e sementes durante todo o processo fermentativo. Segundo HIDALGO TOGORES (2006), a área de maior concentração dos ácidos na baga é na zona central que rodeia as sementes, na polpa a concentração é média e na película é baixa. Mesmo assim, pode-se considerar erro de análise do WineScan visto que este equipamento necessita de constantes calibrações e esse aumento da acidez total não pode ser explicado pela formação de ácidos durante a fermentação ou pela extração deles na maceração.



**Figura 6. Acidez total (meq.L<sup>-1</sup>) durante a fermentação alcoólica de Cabernet Sauvignon por duas leveduras comerciais.**

O metabolismo do ácido málico produz álcool. Neste experimento estima-se a formação 0,072% v/v de álcool para o consumo de 1,67 g.L<sup>-1</sup> de ácido málico pela levedura comercial X e 0,081% v/v de álcool para o consumo de 1,87 g.L<sup>-1</sup> de ácido málico pela levedura comercial Y.

A formação de álcool através do ácido málico não pode ser explicada pela diferença entre os resultados obtidos na análise de etanol, porém sabe-se que esta metabolização ocorreu pois não houve formação de ácido láctico durante a fermentação. Os valores finais de fermentação foram de 11,91% v/v para a levedura X e 11,87 % v/v para a levedura Y, considerados estatisticamente iguais.

O pH diminuiu durante a fermentação alcoólica o que pode ser explicado pela formação de ácidos durante a fermentação e extração dos ácidos tartárico e málico do entorno das sementes na maceração. O pH inicial do mosto era de 3,68. Durante os primeiros seis dias de fermentação houve uma diminuição do pH, após esse período, ocorreu um aumento até o final da fermentação. O pH final da levedura X foi de 3,40 enquanto da levedura Y foi de 3,46, considerados estatisticamente iguais. A faixa final de pH dos dois tratamentos é favorável para uma possível fermentação malolática pois manteve-se abaixo de 3,8, quando as bactérias lácticas ainda possuem atividade máxima de 60% em relação a pH 3,0 / 3,2.

Embora o LAREN tenha calibrado o equipamento WineScan antes do início das análises, pode-se duvidar dos resultados obtidos neste trabalho, visto que, por exemplo, a acidez total dobra ao final da fermentação em relação a concentração inicial do mosto e este resultado não pode ser explicado somente pela extração dos ácidos durante a maceração e / ou formação de ácidos na fermentação alcoólica.

Podem ocorrer falhas nas análises pelo WineScan quando o equipamento não é calibrado ou se houver uma má calibração com o uso de soluções vencidas. No caso deste trabalho o método escolhido para a análise não produz dados com confiabilidade alta como as análises sugeridas pela Organização Internacional da Uva e do Vinho.

Devido à falta de volume dos tratamentos para amostragem e para um bom acompanhamento de fermentação malolática pós fermentação maloalcoólica, não foi possível acompanhar este processo que era inicialmente um dos objetivos do trabalho.

## CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados obtidos e as condições experimentais conclui-se que houve fermentação maloalcoólica no experimento realizado, pois não ocorreu formação de ácido láctico em nenhum momento da fermentação, o que sugere total atividade metabólica das leveduras sobre o ácido málico. A levedura Y destacou-se na metabolização da acidez málica e também da acidez volátil do mosto, consumindo os valores significativos de 22,5% a mais da acidez volátil total inicial e 4,25% a mais de ácido málico total inicial quando comparada com a levedura X. Não houve diferença significativa para as análises de pH, glicose, frutose e açúcares totais, assim como para a análise de álcool.

No ponto de vista enológico, a diferença metabólica do ácido málico é muito baixa e consequentemente não influencia na escolha entre as leveduras testadas para o emprego em vinificações a nível industrial. Ambas leveduras testadas irão metabolizar uma parcial quantidade do ácido málico do mosto e favorecer um início da fermentação malolática devido as positivas condições finais do meio pós fermentativo para bactérias lácticas. Na Serra Catarinense, a fermentação maloalcoólica pode ser empregada como tratamento auxiliar inicial à estabilização málica dos vinhos, favorecendo a antecipação do início da malolática e evitando problemas no processo com o início das baixas temperaturas do outono.

Não foi possível realizar o acompanhamento da fermentação malolática após a fermentação maloalcoólica devido ao volume final dos tratamentos após a retirada de amostras durante a fermentação alcoólica. O baixo volume de vinho acabou sofrendo elevação na acidez volátil devido às dificuldades de armazenamento do mesmo e embora tenha iniciado a fermentação malolática, consideraram-se inválidas as amostras devido à alta contaminação de bactérias acéticas.

Pelo fato de não haver um controle ou testemunha no trabalho, os dados obtidos não geram uma real comparação ou quando significativos são de baixa confiabilidade. Pode-se também desconfiar de possíveis falhas nos resultados obtidos através do WineScan mesmo com a calibração do laboratório LAREN antes do início das análises. Um exemplo da possível existência de falhas no trabalho pelo método analítico empregado são os valores de acidez total inicial e final, onde houve um aumento próximo a 100% em relação ao valor inicial, não

podendo essa diferença ser explicada pela formação de ácidos ou extração dos mesmos do bagaço durante a fermentação alcoólica.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como sugestão para trabalhos futuros, recomenda-se uma maceração a frio antes da inoculação das leveduras, controlando um possível início de fermentação através do emprego de baixas temperaturas e de dióxido de enxofre. A finalidade deste procedimento serve para evitar a extração de compostos analisados durante a fermentação alcoólica, permitindo maior confiabilidade na homogeneidade do mosto.

A inclusão de um tratamento testemunha é de importante valor estatístico, sendo assim, concorda-se com uma repetição de leveduras indígenas para cada tratamento empregado.

Outro importante fator a ser considerado é o cuidado com as remontagens dos tratamentos principalmente no final da fermentação, para evitar desnecessárias oxigenações do mosto e conseqüentemente favorecer a formação de ácido acético, principalmente se houver o acompanhamento da acidez volátil no experimento.

Sugere-se também realizar o acompanhamento da fermentação malolática após uma fermentação maloalcoólica, calculando o volume das amostras a serem retiradas durante a fermentação alcoólica com o intuito de sobrar um volume considerável e mais fácil de controlar quanto a oxigenação pelo espaço vazio dos recipientes durante a malolática.

Quanto às análises físico-químicas, sugere-se utilizar métodos analíticos sugeridos pela OIV, além do equipamento WineScan caso seja de interesse do pesquisador utilizá-lo.

## BIBLIOGRAFIA

ÁVILA, Larissa Dias de. **Enologia II. Polígrafo didático do Curso Superior Tecnologia em Viticultura e Enologia**. Bento Gonçalves: CEFET-BG, 2002, 31 p.

CARRAU, J. L. **Novos Enfoques em Microbiologia Enológica**. Coordenado por Juan Luis Carrau e Rita M. Callegari Basso, Caxias do Sul, Universidade de Caxias do Sul. 1978, 107 p.

CORREIA, C.A.C. **Espectroscopia de infravermelho na análise de mostos e vinhos**. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade, 2011.

DELFINI, Claudio; FORMICA, Joseph V. **Wine microbiology: science and technology**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 490 p.

EPAGRI/ CIRAM, IMNET, Prefeituras Municipais, IDBF - 2011. **Recordes de Frio em SC**. Disponível em <[http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=140&Itemid=364](http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=140&Itemid=364)> Acesso 07/10/19 às 19:05.

EPAGRI/ CIRAM, IMNET - 2011. **Recordes de Calor em SC**. Disponível em <[http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=139&Itemid=365](http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=139&Itemid=365)> Acesso 07/10/19 às 19:19.

FOSS ANALYTICAL, 2019. Disponível em: <https://www.fossanalytics.com/pt-br/products/winescan> Acesso em: 11/03/2020

HIDALGO TOGORES, José. **Tratado de Enología I**. Mundi – Prensa Libros, 2ª Edición, 2011. 1822 p.

LEPE, J. A. S. **Levaduras Vínicas Funcionalidad y Uso en Bodega**. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1997. 269 p.

LEPE, J. A. S. **Microbiologia Enológica: Fundamentos de Vinificación**. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 3º edición, 2004. 716 p.

MOREIRA, J. L.; MARCOS, A. M.; BARROS, P. (2002). **Análise de vinhos portugueses por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 17, 27-33.

OLIVIER, M. N. **Evolução da acidez na fermentação alcoólica das uvas tintas Cabernet Sauvignon e Isabel e da branca Trebbiano**. Santa Maria, UFSM, 1997.

OREGLIA, F. **Enología Teórico-Práctica**. Buenos Aires:Ediciones Instituto Salesiano de Artes Graficas, 1978, 731p.

PEYNAUD, E. **Conhecer e trabalhar o vinho**. LTC – Editora Portuguesa de Livros Técnicos e Científicos, Lisboa, 1982. 346 p.

RIBERÉAU-GAYON, Pascal. **Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications**. John Wiley & Sons, England, 2nd ed. 2006. 497 p.

RIBERÉAU-GAYON, Pascal. **Handbook of Enology Volume 2 The Microbiology of Wine and Vinifications**. John Wiley & Sons, England, 2nd ed. 2006. 441 p.

SAURINA, J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. **Trends in Analytical Chemistry**. v.29, p.234-245, 2010.

USSEGLIO-TOMASSET, Luciano. **Chimica enologica con richiami di chimica generale chimica organica e chimica fisica**. Brescia: AEB, 1978. 309 p.

VERSARI, A. P.; SCAZZINA, F.; DEL RIO, D. (2010). **Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy**. *Food Control*, 21, 786–789.

ZAMBONELLI, C. **Microbiologia e Biotecnologia dei Vini, I Processi Biologici e le Tecnologie della Vinificazione**. Bologna, 3° edizione, Edagricole, 2003, 275 p.