

Produção de vinho branco e rosé a partir de castas tradicionais: monitorização da fermentação utilizando leveduras livres e imobilizadas

Luana Fernandes Dilelle

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientado por

Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho

Doutora Vanessa Marina Branco Paula

Professor Doutor Evandro Bona

Bragança

2026

Realizado no âmbito do Projeto “Minorsens – Valorización y caracterización de variedades minoritarias de vid por métodos clásicos y nuevas tecnologías em el espacio transfronterizo”.

Financiado por: Interreg - Poctep, España – Portugal, cofinanciado por la Unión Europea. O projeto visa identificar, recuperar e valorizar as castas minoritárias na região transfronteiriça entre Castela e Leão e o Norte de Portugal. O objetivo é produzir vinhos monovarietais com as variedades que demonstrem qualidades enológicas excepcionais, utilizando metodologias tradicionais e inovadoras para a sua caracterização, com base em novas tecnologias emergentes, como os nanosensores, implementados em dispositivos analíticos como o nariz e a língua eletrónica



MINORSENS

Dedicatória

Dedico este trabalho às quatro pessoas mais importantes da minha vida: minha avó **Maria Célia**, meu avô **Manoel**, minha mãe **Ana Paula** e meu pai **Leandro**. A vocês, dedico não apenas este trabalho, mas cada conquista da minha vida.

Agradecimentos

Ao finalizar esta etapa tão importante da minha vida, percebo que este trabalho representa muito mais do que uma dissertação. Ele carrega desafios, aprendizagens, crescimento pessoal e profissional, momentos de dúvidas, superação e também muitas pessoas que estiveram ao meu lado ao longo deste caminho.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha sincera gratidão à minha orientadora, à minha coorientadora e ao meu coorientador do Brasil, por toda a dedicação, disponibilidade, paciência e apoio ao longo deste percurso. Agradeço profundamente por todo o tempo que dedicaram a mim, pelos ensinamentos transmitidos, pela ajuda constante nas análises laboratoriais, pela procura de informações sempre que necessário e pelo empenho em contribuir para que este trabalho fosse cada vez melhor. Obrigada por acreditarem no meu potencial, por toda a orientação e, acima de tudo, pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada. Levarei comigo todos os conhecimentos e aprendizagens adquiridos ao longo deste processo.

À minha família, deixo o meu agradecimento mais especial. Obrigada por todo o amor, apoio incondicional e por nunca deixarem de acreditar em mim, mesmo quando a distância se fez presente. Agradeço por terem-me proporcionado a oportunidade única de atravessar fronteiras e vir para outro país realizar este mestrado, permitindo-me viver experiências que mudaram a minha vida, crescer enquanto profissional e, principalmente, enquanto pessoa. Cada conquista alcançada ao longo desta jornada também pertence a vocês.

Aos meus amigos, agradeço por terem sido uma rede de apoio essencial durante esta

caminhada. Obrigada pelas palavras de incentivo, pelas conversas nos momentos de ansiedade, pela ajuda, pela compreensão e por celebrarem comigo cada pequena conquista. A presença e o carinho de vocês tornaram esta jornada muito mais leve e especial.

Gostaria ainda de deixar um agradecimento muito especial a uma pessoa que esteve ao meu lado em cada etapa desta caminhada e que foi, sem dúvida, um dos meus maiores pilares ao longo deste percurso. Obrigada por toda a paciência, carinho, compreensão e apoio nos momentos em que o cansaço, a ansiedade e as inseguranças falaram mais alto. Obrigada por me acolher nos dias em que achei que não seria capaz de terminar este trabalho, por me lembrar da minha força quando eu própria deixei de a ver e por nunca me deixar desistir de mim mesma.

Agradeço por cada palavra de incentivo, por acreditar em mim até nos momentos em que eu mais duvidei das minhas capacidades, por toda a ajuda nas correções e por dedicar o seu tempo para tornar este percurso um pouco mais leve. Mais do que a ajuda prática, agradeço pela presença constante, pela calma nos dias difíceis e por estar ao meu lado em cada pequena conquista e desafio. Este trabalho também carrega um pouco do cuidado, do apoio e do amor que recebi ao longo desta jornada, e por isso a sua presença teve um significado muito especial para mim.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e fizeram parte desta fase tão importante da minha vida. Cada gesto, apoio e palavra de incentivo teve um significado especial e ficará para sempre guardado comigo.

Resumo

A valorização de castas tradicionais e a aplicação de estratégias fermentativas inovadoras constituem abordagens promissoras para a diferenciação dos vinhos. Este trabalho avaliou o impacto da utilização de *Torulaspora delbrueckii* em fermentação sequencial com *Saccharomyces cerevisiae*, em células livres e imobilizadas, na produção de vinhos branco e rosé de castas tradicionais. Foram estudadas três estratégias fermentativas: FI, com *S. cerevisiae* em células livres; FII, com *T. delbrueckii* seguida de *S. cerevisiae* em células livres; e FIII, com ambas as leveduras imobilizadas. A evolução fermentativa foi acompanhada por análises microbiológicas, metabólicas, físico-químicas e sensoriais. No vinho branco, todas as fermentações originaram vinhos secos, enquanto, no rosé, a FI originou vinho meio doce e as fermentações sequenciais produziram vinhos meio secos. No vinho rosé, a FI apresentou a maior produção de etanol ($90,37 \pm 3,28 \text{ g L}^{-1}$; $11,80 \pm 0,48\%$ (v/v)) e rendimento fermentativo (95,39% do rendimento teórico), enquanto a FIII apresentou a menor produção de etanol ($70,90 \pm 1,85 \text{ g L}^{-1}$), maior concentração residual de frutose ($12,77 \pm 1,05 \text{ g L}^{-1}$) e maior acidez volátil ($1,19 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$). A imobilização celular reduziu a libertação acumulada de CO_2 em aproximadamente 21% no vinho rosé e 9% no vinho branco, relativamente às células livres. Sensorialmente, as fermentações sequenciais apresentaram maior aceitação global do que a conduzida exclusivamente por *S. cerevisiae*. Os resultados demonstram que a utilização de *T. delbrueckii* em fermentação sequencial é uma estratégia promissora para a valorização enológica de castas tradicionais e obtenção de vinhos diferenciados.

Palavras-chave: *Torulaspora delbrueckii*; *Saccharomyces cerevisiae*; fermentação sequencial; células imobilizadas; vinho branco; vinho rosé; castas tradicionais.

Abstract

The valorization of traditional grape varieties and the application of innovative fermentation strategies constitute promising approaches for wine differentiation. This study evaluated the impact of using *Torulaspora delbrueckii* in sequential fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, using free and immobilized cells, on the production of white and rosé wines from traditional grape varieties. Three fermentation strategies were evaluated: FI, with free *S. cerevisiae*; FII, with free *T. delbrueckii* followed by free *S. cerevisiae*; and FIII, with both yeasts immobilized. Fermentation was monitored through microbiological, metabolic, physicochemical, and sensory analyses. In white wine, all fermentations produced dry wines, whereas, in rosé wine, FI produced a medium-sweet wine and the sequential fermentations produced medium-dry wines. In rosé wine, FI showed the highest ethanol production ($90.37 \pm 3.28 \text{ g L}^{-1}$; $11.80 \pm 0.48\%$ (v/v)) and fermentation yield (95.39% of the theoretical yield), whereas FIII showed the lowest ethanol production ($70.90 \pm 1.85 \text{ g L}^{-1}$), the highest residual fructose concentration ($12.77 \pm 1.05 \text{ g L}^{-1}$), and the highest volatile acidity ($1.19 \pm 0.21 \text{ g L}^{-1}$). Cell immobilization reduced cumulative CO₂ release by approximately 21% in rosé wine and 9% in white wine compared with free cells. Sensory evaluation showed that the sequential fermentations achieved greater overall acceptance than the fermentation conducted exclusively by *S. cerevisiae*. The results demonstrate that the use of *T. delbrueckii* in sequential fermentation is a promising strategy for the oenological valorization of traditional grape varieties and the production of differentiated wines.

Keywords: *Torulaspora delbrueckii*; *Saccharomyces cerevisiae*; sequential fermentation; immobilized cells; white wine; rosé wine; traditional grape varieties.

Conteúdo

Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xv
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivos Específicos	3
2 Fundamentação Teórica	5
2.1 História do Vinho	5
2.1.1 Produção, Classificação e Contextualização do Setor Vitivinícola . .	6
2.2 Importância das castas tradicionais na vitivinicultura portuguesa	8
2.3 Produção de Vinho e Fermentação	9
2.3.1 Fermentação Alcoólica	13
2.3.2 Fermentação Malolática	14
2.4 Microbiota do Vinho	14
2.4.1 Fermentações espontâneas e fermentações inoculadas	14
2.4.2 Importância microbiológica durante a fermentação	15
2.5 Leveduras de Interesse Enológico	16
2.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.5.2 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	17
2.6 Concentração de Inóculo em Fermentações Vínicas Sequenciais	18

2.7	Importância da Adição de Nutrientes Durante a Fermentação Alcoólica . .	20
2.8	Estratégias Fermentativas	22
2.8.1	Co-inoculação	22
2.8.2	Inoculação Sequencial	23
2.9	Imobilização Celular	24
2.10	Composição Físico-química do Vinho	25
3	Materiais e Métodos	29
3.1	Castas Tradicionais	31
3.2	Definição das Concentrações de Inóculo	31
3.3	Aquisição e Preparação das Amostras	32
3.4	Preparo dos Inóculos	34
3.4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
3.4.2	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	35
3.5	Fermentações	35
3.5.1	Fermentação I: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.5.2	Fermentação II: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Torulaspora delbrueckii</i>	36
3.5.3	Fermentação III: Imobilização da célula da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Torulaspora delbrueckii</i>	37
3.6	Caracterização do Processo Fermentativo	39
3.6.1	Monitoramento Gravimétrico da Fermentação	39
3.6.2	Contagem de Leveduras	40
3.6.3	Densidade Ótica	41
3.7	Perfil Metabólico Fermentativo	42
3.7.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	42
3.8	Análises Físico-Químicas	43
3.8.1	Determinação de pH	43
3.8.2	Determinação de Acidez Total	44
3.8.3	Determinação da Acidez Volátil	44

3.8.4	Determinação de SO ₂ Total	45
3.8.5	Determinação do Azoto Assimilável com Volume Reduzido (YAN) .	46
3.9	Análise Sensorial	46
3.10	Análise Estatística	47
4	Resultados e Discussão	49
4.1	Caracterização do Processo Fermentativo	49
4.1.1	Comparação de Estratégias de Inoculação com Células Livres . . .	49
4.1.2	Células Imobilizadas em Inoculação Sequencial	55
4.2	Produtos Resultantes da Fermentação	58
4.3	Análises Físico-Químicas	63
4.4	Classificação dos Vinhos Produzidos	68
4.5	Análise Sensorial	70
5	Conclusão	77
	Bibliografia	79

Lista de Tabelas

4.1	Perda de peso total nos vinhos rosé e branco nas fermentações FI e FII. . .	51
4.2	Crescimento microbiano nos vinhos rosés.	53
4.3	Crescimento microbiano nos vinhos brancos.	53
4.4	Perda de peso total nos vinhos rosé e branco submetidos às fermentações FII e FIII.	56
4.5	Perfil fermentativo do vinho rosé.	59
4.6	Perfil fermentativo do vinho branco.	59
4.7	Evolução dos parâmetros físico-químicos dos vinhos rosé.	64
4.8	Evolução dos parâmetros físico-químicos dos vinhos brancos.	65
4.9	Classificação dos vinhos segundo a relação entre açúcares residuais e acidez total.	69
4.10	Médias dos atributos sensoriais avaliados nas diferentes fermentações. . . .	71

Lista de Figuras

2.1	Processo de maturação das uvas.	10
2.2	Fluxograma de produção do vinho branco, tinto e rosé.	12
2.3	Balanco esquemático das formas químicas do SO ₂ presentes no vinho. . . .	27
3.1	Desenho Metodológico.	30
3.2	Uvas colhidas.	32
3.3	Uvas em estágio de fermentação.	33
3.4	Fermentações do vinho rosé em laboratório.	33
3.5	Fermentações do vinho branco em laboratório.	34
3.6	Formação de esferas de alginato de sódio por gotejamento.	38
3.7	Representação da paisagem diária dos frascos durante a fermentação. . . .	39
3.8	Placas de meio de levedura com colónias de leveduras crescidas.	41
4.1	Evolução do peso durante a fermentação dos vinhos rosé e branco nas fermentações FI (fermentação com <i>S. cerevisiae</i> em células livres) e FII (fermentação com <i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i> em células livres).	50
4.2	Evolução da densidade ótica ao longo das primeiras 24 horas de fermentação nos vinhos rosé e branco nas fermentações FI (fermentação com <i>S. cerevisiae</i> em células livres) e FII (fermentação com <i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i> células livres).	52

4.3	Evolução do peso durante a fermentação dos vinhos rosé e branco submetidos às fermentações sequenciais FII (fermentação com <i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i> células livres) e FIII (fermentação com <i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i> células imobilizadas).	55
4.4	Médias dos atributos sensoriais avaliados nas três fermentações.	72
4.5	Distribuição da preferência dos provadores entre as três fermentações avaliadas.	73
4.6	Características sensoriais atribuídas pelos provadores às três fermentações avaliadas.	74

Capítulo 1

Introdução

A fermentação alcoólica constitui uma das etapas mais importantes da produção vinícola, sendo responsável não apenas pela conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol e dióxido de carbono, mas também pela formação de numerosos compostos que influenciam diretamente as características sensoriais e a qualidade final do vinho [1]. Tradicionalmente, este processo é conduzido por *Saccharomyces cerevisiae*, levedura amplamente utilizada devido à sua elevada capacidade fermentativa, tolerância ao etanol e estabilidade tecnológica [2].

Nos últimos anos, a crescente procura por vinhos diferenciados e de maior complexidade sensorial tem estimulado o interesse pela utilização de leveduras não-*Saccharomyces* em processos fermentativos [3]. Entre estas, *Torulaspora delbrueckii* destaca-se pelo seu potencial enológico, sendo frequentemente associada à modulação aromática, redução da produção de etanol e aumento da complexidade sensorial dos vinhos [4]. A utilização desta levedura em co-inoculação ou inoculação sequencial com *S. cerevisiae* tem sido apontada como uma estratégia promissora para obtenção de vinhos com características diferenciadas e maior valor agregado [5].

Paralelamente, os sistemas de imobilização celular têm despertado crescente interesse na indústria enológica devido às suas potenciais vantagens tecnológicas e económicas [3].

A imobilização de leveduras pode favorecer a reutilização celular, aumentar a estabilidade operacional dos processos fermentativos e permitir maior controlo sobre o metabolismo microbiano. Contudo, a utilização de células imobilizadas pode também alterar significativamente a cinética fermentativa e a produção de metabólitos, sendo necessária uma avaliação aprofundada dos seus efeitos sobre a qualidade final dos vinhos [4]. Neste contexto, o estudo das interações entre leveduras não-*Saccharomyces*, sistemas de imobilização celular e diferentes matrizes vínicas torna-se particularmente relevante. Além dos efeitos sobre a fermentação alcoólica, estas estratégias podem influenciar parâmetros físico-químicos importantes, como pH, acidez, consumo de azoto assimilável, concentração de açúcares residuais e formação de compostos secundários, incluindo glicerol e etanol [6]. A valorização de castas tradicionais locais representa igualmente um importante desafio e oportunidade para a vitivinicultura contemporânea. O desenvolvimento de vinhos diferenciados a partir de variedades regionais pode contribuir para a preservação do património vitícola, fortalecimento da identidade regional e promoção da sustentabilidade económica e turística das regiões produtoras [7].

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da utilização de *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*, em forma livre e imobilizada, nas características microbiológicas e físico-químicas de vinhos rosé e branco produzidos a partir de castas tradicionais locais. Para atingir este objetivo, foram realizadas análises microbiológicas, metabólicas, físico-químicas e sensoriais ao longo do processo fermentativo. As análises microbiológicas incluíram a determinação do crescimento celular através da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), da densidade ótica e a monitorização da variação de massa. As análises metabólicas incluíram a quantificação de glucose, frutose, glicerol e etanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Adicionalmente, as análises físico-químicas envolveram a determinação de pH, acidez total, acidez volátil, dióxido de enxofre total (SO₂) e a determinação do consumo de azoto assimilável. E por fim, a análise sensorial, permitindo avaliar a evolução química e a qualidade final dos vinhos produzidos.

Com este estudo pretende-se contribuir para o desenvolvimento de estratégias enológicas inovadoras capazes de promover a diversificação e valorização da produção vinícola regional, bem como fornecer bases científicas para futuras investigações relacionadas com a aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* e tecnologias de imobilização celular na enologia. Por fim, este documento encontra-se organizado em diferentes secções, incluindo o enquadramento teórico e a revisão da literatura, os objetivos do estudo, a metodologia experimental adotada, os resultados obtidos e respetiva discussão, bem como as conclusões e perspetivas para trabalhos futuros.

1.1 Objetivos

Avaliar o potencial enológico de uvas tradicionais locais para a produção de vinhos, através do estudo do impacto da inoculação sequencial de *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*, em forma livre e imobilizada, no processo fermentativo e nas características físico-químicas e sensoriais do vinho. Dessa forma, pretende-se contribuir para uma compreensão integrada do valor das castas tradicionais na inovação e sustentabilidade da vitivinicultura regional, bem como fornecer bases científicas para futuras investigações e para a prática enológica.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da inoculação sequencial de leveduras na qualidade físico-química e sensorial dos vinhos produzidos;
- Avaliar o impacto da imobilização das células de levedura na cinética fermentativa e na qualidade do vinho final;
- Identificar e quantificar os principais compostos resultantes da fermentação alcoólica através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

- Realizar análises físico-químicas e microbiológicas aos vinhos produzidos, nomeadamente peso, densidade ótica, azoto assimilável, pH, acidez total, acidez volátil, dióxido de enxofre total e contagem de leveduras de modo a garantir o controlo e a otimização do processo fermentativo;
- Avaliar as características sensoriais dos vinhos produzidos, considerando atributos como aroma, sabor, corpo, equilíbrio e aceitação global;
- Analisar criticamente os resultados obtidos, apresentando conclusões fundamentadas e propondo recomendações para futuras investigações na área da viticultura e da enologia.

Capítulo 2

Fundamentação Teórica

2.1 História do Vinho

O vinho é uma das bebidas fermentadas mais antigas da humanidade, estando presente em diferentes civilizações ao longo da história, incluindo Romanos, gregos micênicos e povos do Antigo Egito. Para além do seu consumo alimentar, desempenhou funções sociais, culturais, religiosas e comerciais, integrando diversos aspetos do quotidiano destas sociedades. Inicialmente, o seu consumo esteve frequentemente associado às elites e a ocasiões especiais, como celebrações religiosas, cerimónias e eventos políticos. Ao longo dos séculos, a produção e o consumo expandiram-se progressivamente, tornando o vinho parte integrante de numerosas culturas e economias [8].

A produção de vinho constitui um processo complexo, influenciado por fatores vitícolas, tecnológicos, microbiológicos e ambientais. Entre estes fatores destacam-se as práticas de cultivo da videira, o estado de maturação das uvas, a preparação do mosto, a seleção de leveduras e o controlo das condições fermentativas. Neste contexto, as leveduras desempenham papel fundamental, uma vez que são responsáveis pela conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol, dióxido de carbono e metabolitos secundários que contribuem para as características físico-químicas e sensoriais do produto final [9].

2.1.1 Produção, Classificação e Contextualização do Setor Vitivinícola

Produção e consumo mundial

A Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) reportou que a produção mundial de vinho em 2025 foi estimada em aproximadamente 232 milhões de hectolitros, representando um aumento de cerca de 3% relativamente a 2024, ano que registou uma das menores produções globais desde 1961. Apesar desta recuperação moderada, a produção permaneceu abaixo da média histórica, refletindo a continuidade dos impactos associados às alterações climáticas, aos fenómenos meteorológicos extremos e à redução das áreas vitícolas em diversos países produtores [10].

Paralelamente, o consumo mundial continuou em declínio, atingindo aproximadamente 208 milhões de hectolitros, o valor mais baixo desde 1957. Entre os principais fatores associados a esta redução destacam-se as alterações nos hábitos de consumo, a diminuição do consumo de bebidas alcoólicas entre consumidores mais jovens, fatores económicos globais e o aumento da procura por bebidas com menor teor alcoólico ou alternativas sem álcool [11, 12].

No contexto europeu, a Itália manteve-se como principal produtor mundial de vinho em 2025, com produção estimada em cerca de 47,3 milhões de hectolitros, seguida pela França, com aproximadamente 35,9 milhões de hectolitros, e pela Espanha, com cerca de 29,4 milhões de hectolitros. Alguns dos principais países produtores enfrentaram reduções produtivas associadas a ondas de calor, secas prolongadas e eventos climáticos extremos, evidenciando a vulnerabilidade crescente do setor vitivinícola às alterações climáticas [11].

Em Portugal, a produção manteve-se relativamente estável, próxima de 6,7 milhões de hectolitros, mantendo o país entre os principais produtores europeus. Para além da relevância económica do setor, Portugal destaca-se pelo elevado consumo per capita e pela valorização das castas tradicionais e dos vinhos regionais, fatores que impulsionam a investigação em inovação enológica, sustentabilidade produtiva e diversificação do portefólio vínico nacional [12, 13].

No contexto brasileiro, embora a produção seja inferior à observada nos principais produtores mundiais, o setor vitivinícola tem demonstrado crescimento e diversificação nas últimas décadas. A produção concentra-se predominantemente na região Sul, especialmente no estado do Rio Grande do Sul, verificando-se simultaneamente maior valorização dos vinhos nacionais, particularmente dos espumantes e dos produtos de maior valor acrescentado [14, 15].

Além das alterações produtivas e das mudanças nos padrões de consumo, o setor vitivinícola enfrenta atualmente desafios relacionados com sustentabilidade, adaptação climática e inovação tecnológica. Neste cenário, estratégias fermentativas envolvendo leveduras não-*Saccharomyces* e sistemas de imobilização celular têm despertado crescente interesse, sobretudo pela possibilidade de modular o perfil sensorial, reduzir o teor alcoólico e aumentar a complexidade aromática dos vinhos. Estudos recentes demonstram que espécies como *Torulaspora delbrueckii* apresentam elevado potencial biotecnológico na produção de vinhos diferenciados e de maior valor acrescentado [16].

Legislação

O termo vinho pode ser interpretado sob diferentes perspectivas, incluindo aspetos culturais, económicos, sensoriais e legais. Contudo, no contexto técnico e científico, a sua definição é estabelecida por regulamentação específica que determina os critérios de produção, classificação e comercialização desta bebida. De acordo com o Regulamento (UE) N.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de dezembro de 2013, o vinho é definido como uma bebida produzida exclusivamente a partir da fermentação alcoólica total ou parcial de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mosto de uvas [17].

De forma a assegurar a padronização dos processos produtivos, a qualidade e a autenticidade dos produtos vitivinícolas, diferentes organismos estabelecem normas e requisitos aplicáveis ao setor. Neste contexto, o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV) e a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) desempenham papel fundamental na definição de parâmetros relacionados com a produção, rotulagem, classificação e comercialização do vinho, atuando a nível nacional e internacional na regulamentação da indústria

vitivinícola [11, 18].

Classificação

Os vinhos podem ser classificados de acordo com diferentes critérios, incluindo cor, método de produção, composição e enquadramento legal. Relativamente à cor, classificam-se em tintos, geralmente produzidos a partir de uvas tintas com maceração das películas; brancos, obtidos a partir de uvas brancas ou tintas, normalmente sem contacto prolongado entre as películas e o mosto; e rosés, produzidos maioritariamente através da redução do período de maceração das películas das uvas tintas, permitindo extração limitada de compostos fenólicos e pigmentos [19].

Quanto ao método de produção, distinguem-se ainda os vinhos espumantes, obtidos através de uma segunda fermentação alcoólica responsável pela formação de dióxido de carbono, e os vinhos fortificados, produzidos através da interrupção da fermentação alcoólica mediante adição de aguardente vínica, originando produtos com maior teor alcoólico residual. Em Portugal, destaca-se também o vinho verde, uma categoria vitivinícola com denominação de origem própria, produzida na região demarcada dos Vinhos Verdes, que inclui vinhos brancos, tintos e rosés frequentemente caracterizados por elevada frescura, acidez e perfil aromático particular [20].

2.2 Importância das castas tradicionais na vitivinicultura portuguesa

Portugal apresenta um dos mais ricos patrimónios ampelográficos do mundo, com cerca de 250 castas autóctones oficialmente reconhecidas, resultado da diversidade edafoclimática e da longa tradição vitivinícola do país [21, 22]. Estas castas constituem um importante recurso genético, contribuindo para a identidade regional dos vinhos portugueses e para a produção de produtos com características sensoriais distintas, dificilmente reproduzíveis por variedades internacionais. Além do seu valor histórico e cultural, as

castas tradicionais desempenham um papel relevante na preservação da biodiversidade vitícola e na adaptação da viticultura às alterações climáticas, uma vez que muitas apresentam elevada adaptação às condições ambientais específicas das regiões onde evoluíram ao longo de séculos [23].

A crescente procura por vinhos diferenciados e com identidade territorial tem reforçado o interesse pela valorização das castas tradicionais, tanto por produtores como por consumidores. Neste contexto, a utilização de variedades autóctones constitui uma estratégia de diferenciação comercial, permitindo a obtenção de vinhos com perfis aromáticos e sensoriais próprios, associados ao conceito de *terroir*. Paralelamente, a preservação destas castas contribui para a conservação dos recursos genéticos da videira e para a sustentabilidade do setor vitivinícola, reduzindo a dependência de um número restrito de variedades amplamente cultivadas [22, 23].

As castas utilizadas no estudo são representativas da região de Trás-os-Montes, onde a diversidade varietal constitui um dos principais fatores de valorização da produção vitivinícola. A combinação destas variedades permitiu a obtenção de mostos destinados à produção de vinhos branco e rosé, possibilitando avaliar o efeito de diferentes estratégias fermentativas sem comprometer a tipicidade das matérias-primas utilizadas. Desta forma, o trabalho contribui não apenas para o estudo de novas abordagens fermentativas, mas também para a valorização enológica de castas tradicionais portuguesas, promovendo a produção de vinhos com maior valor acrescentado.

2.3 Produção de Vinho e Fermentação

A produção do vinho inicia-se durante o processo de maturação das uvas, etapa determinante para a composição química do mosto e para a qualidade final do produto. As etapas de maturação da uva estão esquematizadas na Figura 2.1. O teor de açúcares redutores e a concentração de ácidos orgânicos constituem indicadores frequentemente utilizados para avaliar o estado de maturação das uvas. Atualmente, a determinação de

compostos fenólicos, incluindo taninos e antocianinas, é também utilizada como ferramenta complementar para caracterização mais rigorosa da maturação [9].

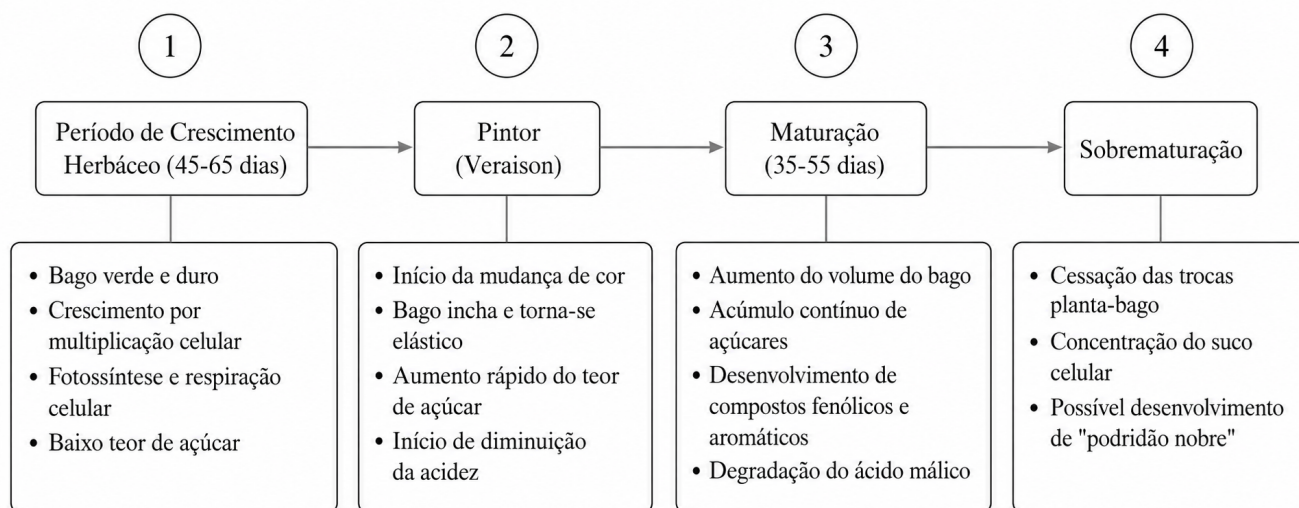


Figura 2.1: Processo de maturação das uvas.

(Adaptado de Borghezani, 2017 [24]).

Quando as uvas atingem o grau de maturação pretendido, inicia-se a vindima, geralmente realizada entre o final do verão e o início do outono, podendo ser efetuada manualmente ou mecanicamente. Após a colheita, as uvas devem ser acondicionadas e transportadas em condições adequadas, de modo a evitar o esmagamento precoce, a oxidação e o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Na receção, são registadas informações relativas à matéria-prima, como produtor, data, peso, estado de maturação e casta, procedendo-se posteriormente às análises do mosto [25].

Entre as análises frequentemente realizadas ao mosto incluem-se massa volúmica aparente, temperatura, teor alcoólico provável, pH e acidez total. O pH, a acidez total e a massa volúmica aparente constituem parâmetros relevantes para avaliar a qualidade tecnológica da matéria-prima e prever o comportamento fermentativo [26].

Na Figura 2.2 apresenta-se o fluxograma de fabrico dos vinhos branco, tinto e rosé.

As etapas gerais de produção dos vinhos tintos, brancos e rosés apresentam elevada semelhança, embora existam diferenças tecnológicas importantes. Após a receção da matéria-prima procede-se ao desengace e ao esmagamento das uvas. Nos vinhos brancos realiza-se geralmente a prensagem seguida de sedimentação para remoção de sólidos, enquanto nos vinhos rosés ocorre normalmente maceração limitada ou sangria para controlo da extração fenólica. Nos vinhos tintos, a fermentação ocorre habitualmente na presença das partes sólidas da uva, favorecendo a extração de compostos responsáveis pela cor, aroma e estrutura do vinho [27, 28].

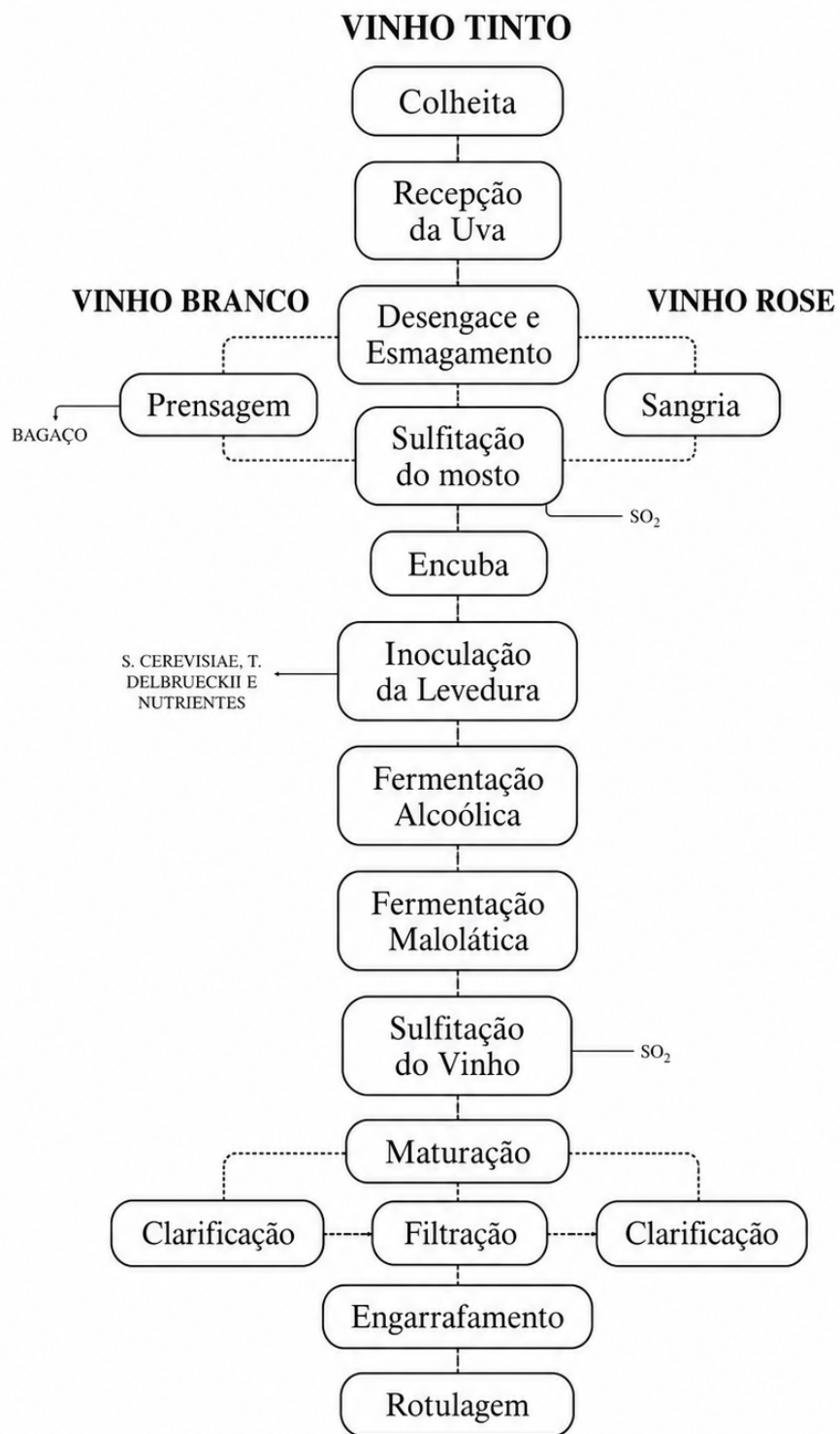


Figura 2.2: Fluxograma de produção do vinho branco, tinto e rosé.

Antes da fermentação realiza-se frequentemente a sulfitagem do mosto através da adição de dióxido de enxofre, com o objetivo de limitar o crescimento de microrganismos indesejáveis e reduzir fenómenos oxidativos [29, 30]. Posteriormente, o mosto é transferido para cubas de fermentação mantidas sob temperaturas controladas, adequadas ao tipo de vinho produzido. O controlo da temperatura é essencial para direcionar a atividade fermentativa das leveduras, preservar compostos aromáticos e evitar desvios fermentativos.

2.3.1 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica constitui uma das etapas centrais da produção de vinho, correspondendo ao processo metabólico através do qual as leveduras convertem os açúcares fermentescíveis presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono [31]. Este processo pode ocorrer espontaneamente, através da microbiota naturalmente presente nas uvas e no ambiente vinícola, ou através da inoculação de culturas selecionadas, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a espécie mais utilizada na produção industrial de vinho devido à sua elevada eficiência fermentativa [31, 32].

Durante a fermentação alcoólica ocorre também a formação de metabolitos secundários, incluindo álcoois superiores, ésteres, ácidos orgânicos e compostos voláteis, que contribuem significativamente para o perfil aromático e sensorial dos vinhos. A cinética fermentativa, o crescimento microbiano e a composição final do vinho são influenciados por diversos fatores, incluindo composição do mosto, temperatura, disponibilidade nutricional, oxigénio e espécies microbianas presentes durante a fermentação [31].

Em vinhos tintos, operações de remontagem ou homogeneização são frequentemente utilizadas para favorecer a extração de compostos fenólicos e assegurar a adequada distribuição celular durante a fermentação. Em vinhos brancos e rosés, a fermentação tende a ser conduzida com menor contacto com sólidos, procurando preservar frescura, leveza e compostos aromáticos frutados [32].

2.3.2 Fermentação Malolática

Após a fermentação alcoólica pode ocorrer a fermentação malolática, processo microbiológico conduzido principalmente por bactérias lácticas, incluindo espécies pertencentes aos gêneros *Oenococcus* e *Lactobacillus* [1]. Durante este processo ocorre a conversão do ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono, conduzindo à redução da acidez, aumento da estabilidade microbiológica e modificação das características sensoriais do vinho.

A fermentação malolática apresenta particular relevância na produção de vinhos tintos, contribuindo para maior suavidade sensorial, estabilidade microbiológica e equilíbrio organolético. Após a sua conclusão, é frequentemente realizada nova adição de SO₂ com o objetivo de reforçar a estabilidade microbiológica do vinho [33].

Após os processos fermentativos, o vinho pode ser submetido a etapas de maturação, clarificação, filtração e engarrafamento. Vinhos tintos são frequentemente maturados em barricas de carvalho, enquanto vinhos brancos e rosés são geralmente armazenados em cubas de aço inoxidável para preservação das características aromáticas. Posteriormente podem ser realizadas etapas de clarificação e filtração para remoção de partículas em suspensão e microrganismos potencialmente prejudiciais à estabilidade do vinho. Após correções finais dos parâmetros físico-químicos, o vinho é engarrafado e acondicionado em diferentes sistemas de vedação [1, 34–37].

2.4 Microbiota do Vinho

2.4.1 Fermentações espontâneas e fermentações inoculadas

A fermentação alcoólica pode ocorrer espontaneamente, através da microbiota naturalmente presente nas uvas, equipamentos e ambiente vinícola, ou através da inoculação deliberada de culturas selecionadas. A estratégia fermentativa utilizada influencia significativamente a cinética fermentativa, a estabilidade microbiológica, a produção de metabolitos secundários e as características sensoriais do vinho [31].

Nas fermentações espontâneas, o processo fermentativo é conduzido pela sucessão natural de diferentes populações microbianas presentes no ecossistema vínico. Durante as fases iniciais predominam frequentemente leveduras não-*Saccharomyces*, naturalmente presentes na superfície das uvas, incluindo espécies pertencentes aos géneros *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Candida* e *Torulaspora* [31, 38]. À medida que a fermentação progride, o aumento da concentração de etanol, a redução dos nutrientes disponíveis, a diminuição do oxigénio dissolvido e a acumulação de metabolitos inibitórios conduzem à seleção progressiva de espécies mais tolerantes, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, que tende a dominar as fases finais da fermentação [31].

As fermentações espontâneas encontram-se frequentemente associadas a maior diversidade microbiológica e metabólica, podendo contribuir para maior complexidade aromática e diferenciação sensorial dos vinhos produzidos. Contudo, apresentam menor previsibilidade operacional, elevada variabilidade entre lotes e maior suscetibilidade ao desenvolvimento de fermentações lentas, incompletas ou paradas, além de maior risco de proliferação de microrganismos deteriorativos [31].

Em contraste, as fermentações inoculadas utilizam culturas iniciadoras selecionadas adicionadas intencionalmente ao mosto, permitindo maior controlo microbiológico, maior reprodutibilidade do processo fermentativo e redução do risco de deterioração microbiológica. Atualmente, esta abordagem representa a estratégia predominante na indústria vitivinícola devido à maior previsibilidade operacional e consistência do produto final [31, 39].

2.4.2 Importância microbiológica durante a fermentação

A microbiologia desempenha papel central durante a fermentação alcoólica, uma vez que as interações entre diferentes populações microbianas influenciam diretamente a cinética fermentativa, o crescimento celular, a produção de metabolitos e as características finais do vinho [38].

Durante as fases iniciais da fermentação coexistem frequentemente múltiplas espécies

microbianas que competem pelos nutrientes disponíveis e pelo espaço ecológico. Simultaneamente, os microrganismos produzem metabolitos capazes de estimular ou inibir o crescimento de outras populações, modificando continuamente a dinâmica microbiana do sistema fermentativo. À medida que a fermentação progride, fatores como aumento da concentração de etanol, diminuição da disponibilidade nutricional, redução do oxigênio dissolvido e acumulação de compostos tóxicos conduzem à seleção progressiva de espécies mais adaptadas ao ambiente fermentativo [31].

As interações microbiológicas assumem particular relevância em fermentações mistas envolvendo espécies *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, uma vez que fenômenos de competição, cooperação metabólica, produção de compostos inibitórios e dominância microbiana podem alterar significativamente o desempenho fermentativo e a composição final do vinho [40].

2.5 Leveduras de Interesse Enológico

2.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae constitui a principal levedura utilizada mundialmente na produção de bebidas fermentadas, particularmente devido às suas características fisiológicas e metabólicas favoráveis aos processos industriais [31, 38]. Esta espécie apresenta elevada capacidade fermentativa, permitindo o consumo eficiente dos açúcares fermentescíveis presentes no mosto, elevada tolerância ao etanol, resistência a baixos valores de pH e boa adaptação às condições ambientais presentes durante a vinificação.

Adicionalmente, apresenta elevada capacidade de produção de etanol, reduzida tendência para formação excessiva de espuma e boa implantação em condições fermentativas controladas, características particularmente relevantes à escala industrial. Para além da produção de etanol e dióxido de carbono, *S. cerevisiae* participa na síntese de diversos metabolitos secundários, incluindo álcoois superiores, ésteres, compostos sulfurados e ácidos orgânicos, que influenciam diretamente as características aromáticas e sensoriais do

vinho [31].

Apesar da elevada importância tecnológica desta espécie, diferentes estirpes apresentam variações significativas relativamente à cinética fermentativa, produção de metabólitos e tolerância ao stress fermentativo, podendo contribuir positiva ou negativamente para a qualidade final do vinho [38].

2.5.2 *Torulaspora delbrueckii*

Nos últimos anos, leveduras não-*Saccharomyces* têm despertado crescente interesse na indústria enológica devido ao potencial para aumentar a diversidade metabólica e modular as características sensoriais dos vinhos. Entre estas espécies, *Torulaspora delbrueckii* destaca-se como uma das mais promissoras para aplicação em fermentações vínicas, apresentando elevado potencial biotecnológico e boa compatibilidade com *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações sequenciais [16, 41].

O interesse crescente nesta espécie deve-se à sua capacidade de influenciar positivamente a composição química e o perfil sensorial dos vinhos. A utilização de *T. delbrueckii* encontra-se frequentemente associada à redução da concentração de ácido acético e da acidez volátil, ao aumento da produção de glicerol e, em determinadas condições, à obtenção de vinhos com menor teor alcoólico [42, 43]. Adicionalmente, diversos estudos demonstram que esta levedura favorece a produção de compostos aromáticos, nomeadamente ésteres e outros metabólitos associados a aromas frutados e florais, contribuindo para aumentar a complexidade aromática e a qualidade sensorial dos vinhos [44, 45].

Comparativamente a outras espécies não-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* apresenta elevada compatibilidade com *S. cerevisiae*, permitindo beneficiar do metabolismo de ambas as espécies durante a fermentação. Em fermentações mistas, a sua utilização pode originar vinhos com perfis sensoriais mais equilibrados do que aqueles obtidos exclusivamente com *S. cerevisiae*, contribuindo para melhorar a qualidade organolética final [41]. Contudo, o impacto desta espécie na composição final do vinho depende fortemente da composição do mosto, da variedade de uva, das condições fermentativas e da estratégia de inoculação

adotada, persistindo resultados contraditórios relativamente ao seu efeito na produção de compostos aromáticos e no desempenho fermentativo [46].

Apesar das vantagens enológicas, *T. delbrueckii* apresenta algumas limitações que condicionam a sua utilização em fermentações puras. Esta espécie possui menor tolerância a elevadas concentrações de etanol e menor capacidade competitiva relativamente a *S. cerevisiae*, podendo não consumir totalmente os açúcares fermentescíveis quando utilizada isoladamente. Por este motivo, a inoculação sequencial de *S. cerevisiae* constitui a estratégia mais frequentemente utilizada, permitindo prolongar a atividade metabólica de *T. delbrueckii* nas fases iniciais da fermentação e assegurar posteriormente a conclusão da fermentação alcoólica, beneficiando simultaneamente das características tecnológicas de ambas as espécies [44, 47].

Neste contexto, a escolha de *T. delbrueckii* fundamentou-se no seu potencial para aumentar a complexidade aromática dos vinhos, modular a produção de metabolitos fermentativos e atuar de forma complementar a *S. cerevisiae* em inoculação sequencial. A combinação desta estratégia com a utilização de células livres e imobilizadas permitiu avaliar o efeito desta levedura em diferentes condições fermentativas, contribuindo para uma melhor compreensão da sua aplicação na produção de vinhos branco e rosé obtidos a partir de castas tradicionais.

2.6 Concentração de Inóculo em Fermentações Vínicas Sequenciais

A definição da concentração inicial de leveduras constitui uma etapa importante no delineamento experimental de fermentações vínicas, uma vez que a população inoculada pode influenciar a fase de latência, a velocidade de fermentação, a competição entre espécies, o consumo de nutrientes e a formação de metabolitos. Em fermentações envolvendo leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, esta definição torna-se ainda mais relevante, pois a proporção entre as espécies e o momento de inoculação podem modificar a

dinâmica fermentativa e a composição final do vinho.

De acordo com as orientações da OIV para caracterização de leveduras vínicas do género *Saccharomyces*, os ensaios de microvinificação são conduzidos com culturas previamente preparadas até cerca de 10^8 UFC mL⁻¹, sendo a concentração celular no meio de fermentação ajustada para aproximadamente 10^6 células viáveis mL⁻¹. Este valor é utilizado para avaliar o vigor fermentativo e a cinética de fermentação em condições laboratoriais padronizadas [48]. Assim, a utilização de *S. cerevisiae* em concentrações próximas de 10^6 UFC mL⁻¹ encontra suporte em protocolos oficiais de avaliação enológica de leveduras.

A utilização de concentrações inferiores, na ordem de 10^5 UFC mL⁻¹, também é descrita em ensaios laboratoriais com *S. cerevisiae*. Estudos prévios demonstram que concentrações na faixa de 10^5 a 10^6 UFC mL⁻¹ são aplicáveis em estudos experimentais de fermentação vínica, permitindo avaliar o desempenho fermentativo e as interações microbianas em condições laboratoriais controladas [40, 49].

Para *T. delbrueckii*, a literatura aponta frequentemente para a utilização de concentrações superiores às de *S. cerevisiae*, especialmente em fermentações mistas ou sequenciais. Esta abordagem tem como objetivo favorecer a presença inicial das leveduras não-*Saccharomyces* e permitir que estas influenciem a composição química e sensorial dos vinhos antes da dominância fermentativa de *S. cerevisiae* [50].

A necessidade de utilizar populações mais elevadas de *T. delbrueckii* está associada ao menor vigor fermentativo e à menor taxa de crescimento desta espécie em comparação com *S. cerevisiae*. Assim, quando se pretende favorecer a sua participação no início da fermentação, torna-se recomendável utilizar populações próximas de 10^7 UFC mL⁻¹ [51].

O intervalo de 48 h antes da inoculação de *S. cerevisiae* nas fermentações sequenciais também encontra suporte na literatura. Diversos estudos utilizaram a inoculação de *S. cerevisiae* após 48 h de fermentação inicial com leveduras não-*Saccharomyces*, permitindo avaliar a contribuição metabólica inicial destas espécies antes da condução final da fermentação por *S. cerevisiae* [46, 52, 53].

Dessa forma, a utilização de *S. cerevisiae* em concentrações próximas de 10^5 e 10^6

UFC mL⁻¹, de *T. delbrueckii* em torno de 10⁷ UFC mL⁻¹ e de um intervalo de 48 h entre as inoculações sequenciais apresenta suporte em estudos prévios de microvinificação e fermentações vínicas mistas ou sequenciais. Estas condições permitem comparar a fermentação convencional conduzida por *S. cerevisiae* com estratégias sequenciais envolvendo *T. delbrueckii*, considerando o efeito da levedura não-*Saccharomyces* na fase inicial do processo fermentativo.

2.7 Importância da Adição de Nutrientes Durante a Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo microbiológico complexo e, para que ocorra de forma regular e completa, as leveduras necessitam de condições adequadas de crescimento, incluindo disponibilidade de fontes assimiláveis de azoto, vitaminas, minerais, lípidos e outros fatores de sobrevivência [54, 55]. Entre estes nutrientes, o azoto assimilável pelas leveduras, frequentemente referido como YAN (*Yeast Assimilable Nitrogen*), é considerado um dos fatores mais importantes para a atividade fermentativa, uma vez que influencia diretamente a multiplicação celular, a velocidade de fermentação, a tolerância ao etanol e a capacidade das leveduras completarem a degradação dos açúcares [56, 57].

O YAN é constituído principalmente por iões amónio e aminoácidos livres, com exceção da prolina, que não é facilmente assimilada pelas leveduras em condições fermentativas anaeróbias. A deficiência de azoto assimilável pode limitar a síntese de proteínas, enzimas e transportadores de açúcar, reduzindo a atividade metabólica das leveduras e favorecendo fermentações lentas, incompletas ou paradas [54, 55].

A suplementação nutricional do mosto é, portanto, uma prática enológica importante para reduzir o risco de fermentações lentas ou interrompidas. A adição de nutrientes pode fornecer azoto inorgânico, como fosfato diamónico, fontes orgânicas de azoto, vitaminas, minerais e derivados de levedura. Estes compostos contribuem para melhorar a viabilidade celular, favorecer a adaptação das leveduras ao meio fermentativo e manter uma atividade

metabólica mais estável ao longo da fermentação [55, 58].

Para além do efeito direto na velocidade e conclusão da fermentação, a nutrição das leveduras também influencia a composição química e sensorial dos vinhos. A disponibilidade de azoto pode afetar a formação de álcoois superiores, ésteres, ácidos orgânicos, compostos sulfurados e outros metabolitos secundários associados ao aroma e ao perfil sensorial do vinho [54, 59]. Quando a disponibilidade de nutrientes é insuficiente, podem ocorrer alterações indesejáveis, como aumento da produção de sulfureto de hidrogénio e desenvolvimento de aromas redutivos. Por outro lado, a adição excessiva ou desequilibrada de nutrientes também pode favorecer fermentações demasiado rápidas, desequilíbrios aromáticos ou maior disponibilidade de nutrientes residuais para microrganismos contaminantes [60].

Dessa forma, a adição de nutrientes deve ser realizada de forma controlada, considerando a composição inicial do mosto, a estirpe de levedura utilizada, o tipo de vinho pretendido e a estratégia fermentativa adotada. Em fermentações conduzidas com *Saccharomyces cerevisiae*, a suplementação pode ser decisiva para garantir uma fermentação completa e evitar paragens fermentativas. Em estratégias que envolvem leveduras não-*Saccharomyces*, como *Torulaspora delbrueckii*, a gestão nutricional torna-se ainda mais relevante, pois diferentes espécies apresentam necessidades metabólicas distintas e podem competir pelos nutrientes disponíveis no mosto durante fermentações sequenciais ou mistas [54, 61].

Nas fermentações realizadas, a adição de nutriente ao mosto teve como objetivo fornecer condições adequadas para o desenvolvimento das leveduras e reduzir possíveis limitações nutricionais durante a fermentação alcoólica. A suplementação nutricional contribuiu para padronizar as condições iniciais dos ensaios, permitindo que as diferenças observadas no crescimento microbiano e nos parâmetros físico-químicos fossem interpretadas principalmente em função da estratégia fermentativa utilizada, e não apenas como consequência de limitações nutricionais do mosto.

2.8 Estratégias Fermentativas

A crescente utilização de leveduras não-*Saccharomyces* na indústria enológica impulsionou o desenvolvimento de diferentes estratégias fermentativas destinadas a modular a composição química, microbiológica e sensorial do vinho. Tradicionalmente, a fermentação alcoólica era conduzida predominantemente utilizando culturas puras de *Saccharomyces cerevisiae*, devido à elevada robustez fermentativa desta espécie, elevada tolerância ao etanol e capacidade de completar eficientemente o consumo dos açúcares fermentescíveis [38].

Contudo, o crescente interesse pelo potencial metabólico de leveduras não-*Saccharomyces* conduziu ao desenvolvimento de fermentações mistas, nas quais diferentes espécies microbianas são utilizadas simultaneamente ou em diferentes momentos do processo fermentativo. Estas estratégias permitem explorar características metabólicas complementares entre espécies, possibilitando maior modulação da composição química e sensorial dos vinhos produzidos. A escolha da estratégia fermentativa influencia significativamente a dinâmica microbiana, a disponibilidade nutricional, a cinética fermentativa, a produção de metabolitos secundários e as características finais do vinho [46].

2.8.1 Co-inoculação

A co-inoculação corresponde à inoculação simultânea de duas ou mais espécies microbianas no mosto, permitindo que estas coexistam desde as fases iniciais da fermentação. Esta estratégia apresenta vantagens operacionais associadas à simplificação do processo fermentativo e à redução do número de intervenções necessárias durante a vinificação. Adicionalmente, a presença simultânea de diferentes espécies pode favorecer interações metabólicas positivas, contribuindo para aumento da complexidade aromática, diversificação metabólica e modulação do perfil sensorial do vinho [46].

No entanto, a coexistência simultânea de diferentes populações microbianas promove frequentemente competição intensa pelos nutrientes disponíveis, particularmente fontes de azoto assimilável, vitaminas, oligoelementos e açúcares fermentescíveis. Adicionalmente,

algumas espécies podem produzir compostos inibitórios, incluindo ácidos orgânicos, etanol ou proteínas antimicrobianas, capazes de reduzir o crescimento de outras populações microbianas. Em fermentações envolvendo *S. cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces*, a elevada capacidade fermentativa e competitividade de *S. cerevisiae* conduz frequentemente à dominância precoce desta espécie, limitando a persistência celular e a atividade metabólica das restantes leveduras [38].

2.8.2 Inoculação Sequencial

Na inoculação sequencial, diferentes espécies microbianas são adicionadas ao mosto em momentos distintos da fermentação, permitindo controlar parcialmente a sucessão microbiana ao longo do processo fermentativo. Esta estratégia é frequentemente utilizada em fermentações envolvendo leveduras não-*Saccharomyces*, uma vez que permite prolongar a atividade metabólica destas espécies antes da inoculação posterior de *S. cerevisiae*. Consequentemente, torna-se possível potenciar a expressão das características metabólicas específicas destas leveduras, favorecendo a produção de compostos aromáticos, a modulação do perfil sensorial e a diversificação metabólica [46].

Diversos estudos demonstram que a inoculação sequencial pode contribuir para redução da concentração de ácido acético, diminuição do teor alcoólico, aumento da produção de glicerol, redução da acidez volátil e melhoria da complexidade aromática dos vinhos produzidos. No caso particular de *T. delbrueckii*, a inoculação sequencial apresenta particular relevância devido à menor competitividade desta espécie relativamente a *S. cerevisiae* em determinadas condições fermentativas. A inoculação inicial de *T. delbrueckii* seguida da inoculação posterior de *S. cerevisiae* permite frequentemente aumentar a persistência celular das leveduras não-*Saccharomyces* e prolongar a sua atividade metabólica durante a fermentação [62].

Apesar das vantagens descritas, a inoculação sequencial continua associada a desafios relacionados com manutenção da viabilidade celular, estabilidade fermentativa, reprodutibilidade microbiológica e controlo das interações entre diferentes populações microbianas.

Neste contexto, estratégias complementares, incluindo a utilização de células imobilizadas, têm despertado interesse crescente devido ao potencial para otimizar o controle fermentativo e aumentar a estabilidade operacional dos processos fermentativos [63].

2.9 Imobilização Celular

A imobilização celular consiste no confinamento físico de células viáveis, mantendo a sua atividade metabólica e catalítica, sendo a encapsulação em matrizes poliméricas, como o alginato de cálcio, utilizado neste estudo, uma das técnicas mais amplamente aplicadas em processos fermentativos. Esta estratégia tem sido amplamente utilizada em processos biotecnológicos e enológicos devido ao seu potencial para aumentar a estabilidade operacional, facilitar a reutilização celular e melhorar o controle dos processos fermentativos [3].

Na indústria vitivinícola, a imobilização de leveduras, particularmente de *Saccharomyces cerevisiae*, constitui uma alternativa à utilização de células livres, apresentando vantagens operacionais, tecnológicas e económicas. Entre os principais benefícios destacam-se a elevada concentração celular, o aumento da produtividade fermentativa, a redução do tempo de processamento, a facilidade de separação da biomassa após a fermentação e a possibilidade de reutilização das células em múltiplos ciclos fermentativos, contribuindo para reduzir custos operacionais e aumentar a sustentabilidade do processo [3, 4, 64, 65]. Adicionalmente, a imobilização pode favorecer a estabilidade fermentativa e influenciar positivamente o perfil sensorial dos vinhos, promovendo a formação de compostos aromáticos desejáveis. O crescente interesse pela aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* imobilizadas resulta ainda do seu potencial para modular o perfil sensorial, reduzir o teor alcoólico e otimizar fermentações mistas [4, 63, 66].

Apesar destas vantagens, a imobilização celular pode induzir condições de *stress* fisiológico que afetam o metabolismo das leveduras. As principais limitações estão associadas às resistências à transferência de massa entre o meio fermentativo e o interior da matriz de encapsulação, reduzindo a difusão de açúcares, azoto assimilável e outros nutrientes, bem

como a remoção de metabolitos produzidos durante a fermentação. Como consequência, podem estabelecer-se gradientes de concentração de nutrientes e etanol no interior das esferas, comprometendo a atividade metabólica, a velocidade fermentativa e o consumo de açúcares [64, 65]. A magnitude destes efeitos depende de fatores como o material utilizado para a imobilização, o diâmetro das esferas, a densidade celular e as condições operacionais da fermentação. Além disso, materiais como o alginato de cálcio podem apresentar limitações relacionadas com a estabilidade mecânica, a libertação de células da matriz e a heterogeneidade metabólica no interior dos suportes [5, 63].

No contexto deste trabalho, a utilização de células imobilizadas permitiu comparar estratégias fermentativas conduzidas com células livres e imobilizadas de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*. A compreensão das limitações associadas à transferência de massa e ao *stress* fisiológico constitui uma base importante para interpretar possíveis diferenças na cinética fermentativa, no consumo de açúcares, na produção de metabolitos e nas características físico-químicas e sensoriais dos vinhos produzidos.

2.10 Composição Físico-química do Vinho

A composição físico-química do vinho apresenta elevada complexidade, sendo constituída por uma grande diversidade de moléculas que interagem entre si e influenciam diretamente a estabilidade, a qualidade e as características sensoriais da bebida [67]. A água representa aproximadamente 85% do volume total do vinho e desempenha papel fundamental nas reações químicas associadas ao desenvolvimento da videira, aos processos fermentativos, ao armazenamento e ao estabelecimento das propriedades físicas, químicas e sensoriais da bebida [68].

O etanol é o principal álcool presente no vinho, sendo produzido durante a fermentação alcoólica conduzida por leveduras, que utilizam os açúcares como fonte de carbono e energia, convertendo-os em etanol e dióxido de carbono (CO_2) [31]. O CO_2 constitui um dos principais produtos da fermentação alcoólica e pode contribuir para a estabilidade microbiológica, a dissolução de compostos voláteis, as características sensoriais e, em

vinhos tintos, a extração de compostos fenólicos [67].

O glicerol é outro composto relevante formado durante a fermentação alcoólica, sendo considerado, depois da água e do etanol, um dos constituintes quantitativamente mais importantes do vinho. A sua produção está associada ao metabolismo das leveduras, especialmente como resposta ao equilíbrio redox celular e a condições de stress osmótico durante a fermentação. Embora não apresente aroma marcante, o glicerol contribui para características sensoriais importantes, como corpo, viscosidade, maciez e ligeira percepção de doçura, influenciando a sensação de volume e equilíbrio em boca [68–70].

Os aldeídos presentes no vinho encontram-se associados a processos oxidativos e às condições de vinificação. Em vinhos brancos, concentrações superiores a 100 mg L^{-1} podem indicar excessiva exposição ao oxigénio ou fenómenos de oxidação. Nos vinhos tintos, devido à presença de compostos fenólicos, nomeadamente taninos e antocianinas, as concentrações tendem a ser inferiores, geralmente abaixo de 50 mg L^{-1} . Em concentrações adequadas, estes compostos contribuem para características sensoriais relevantes. O acetaldeído, derivado principalmente da oxidação do etanol, participa em reações que influenciam a cor e o aroma dos vinhos tintos [71, 72].

Os compostos fenólicos podem ter origem nas uvas, no metabolismo microbiano ou na madeira utilizada durante os processos de fermentação e envelhecimento. A sua concentração depende de fatores como casta, região de produção, características do solo, condições climáticas e práticas de vinificação. Estes compostos encontram-se geralmente em concentrações mais elevadas em vinhos tintos relativamente aos vinhos brancos e classificam-se em dois grupos principais: flavonoides e não flavonoides [71, 73].

A acidez do vinho pode ser dividida em acidez volátil, fixa e total. A acidez volátil está principalmente associada à presença de ácidos orgânicos voláteis, particularmente ácido acético, sendo concentrações elevadas frequentemente indicativas de atividade microbiana indesejada. A acidez fixa corresponde aos ácidos orgânicos não voláteis, incluindo ácido tartárico e ácido málico, naturalmente presentes nas uvas. Estes compostos contribuem para a manutenção do pH do vinho em valores geralmente baixos, favorecendo a estabilidade química e microbiológica e o equilíbrio dos compostos fenólicos [62, 73].

Os açúcares redutores correspondem aos açúcares que permanecem após a fermentação alcoólica, contribuindo para a percepção de doçura do vinho [74]. O extrato seco está associado à estrutura e ao corpo do vinho, podendo também ser utilizado como indicador da qualidade da matéria-prima, do processo de produção e da origem das uvas [75].

O dióxido de enxofre (SO_2) desempenha funções antimicrobianas e antioxidantes, sendo frequentemente adicionado durante diferentes etapas do processo de vinificação. Este composto atua através da inibição de enzimas envolvidas em reações oxidativas responsáveis pelo escurecimento do vinho [76]. O SO_2 pode ligar-se a diferentes moléculas, incluindo aldeídos, cetonas, açúcares, taninos e proteínas, reduzindo a sua fração livre. A fração livre é constituída por SO_2 molecular, iões sulfito (SO_3^{2-}) e iões bissulfito (HSO_3^-), espécies que permanecem em equilíbrio químico. Em valores de pH mais baixos, o equilíbrio desloca-se favorecendo a formação de SO_2 molecular, que corresponde à forma com maior atividade antimicrobiana [77].

Na Figura 2.3 estão esquematizadas as diferentes formas químicas do SO_2 presentes no vinho, nas suas formas livre e combinada.

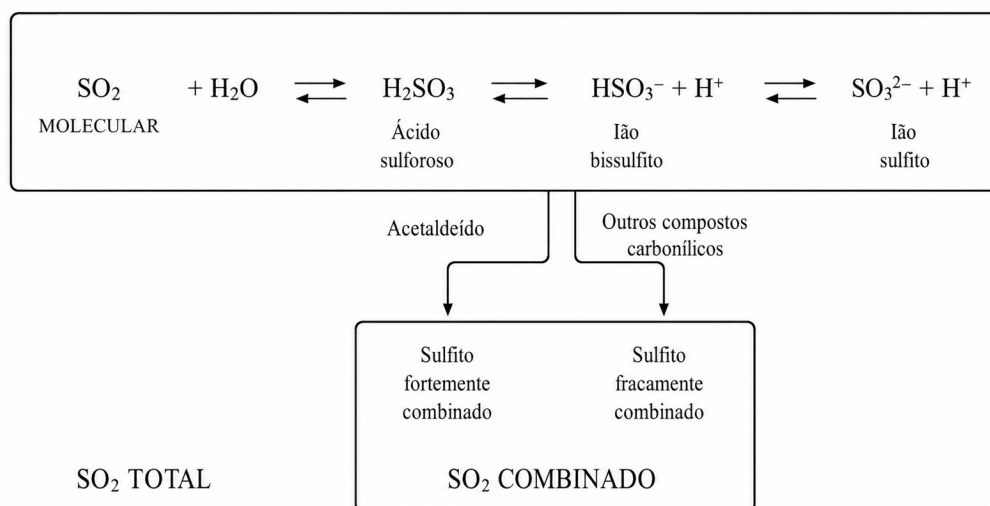


Figura 2.3: Balanço esquemático das formas químicas do SO_2 presentes no vinho.

(Adaptado de Weibel, 2024 [78]).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados e a metodologia experimental adotada para a realização do estudo. Inicialmente são descritas as castas tradicionais utilizadas, bem como os procedimentos de aquisição e preparação das amostras. Posteriormente, é detalhada a fundamentação das concentrações de inóculo empregadas durante as fermentações e as diferentes estratégias fermentativas avaliadas.

Além disso, são apresentados os métodos utilizados para monitorização do crescimento microbiano, perfil metabólico e evolução físico-química dos vinhos produzidos. Para facilitar a compreensão da sequência experimental adotada ao longo do estudo, o delineamento geral encontra-se representado esquematicamente na Figura 3.1.

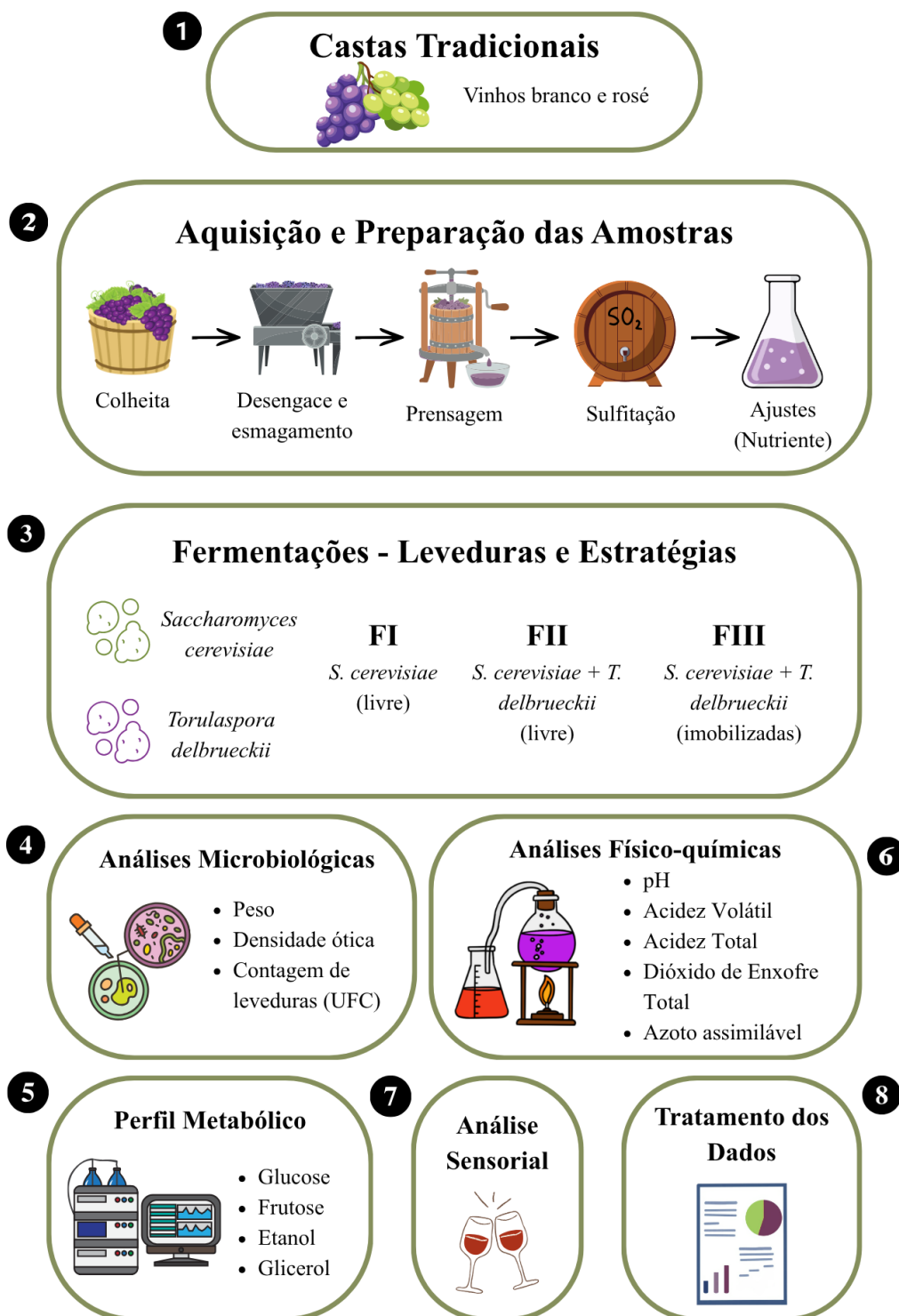


Figura 3.1: Desenho Metodológico.

3.1 Castas Tradicionais

As castas são variedades de uvas utilizadas na produção de vinho, sendo responsáveis por grande parte das características do vinho produzido, como aroma, sabor, cor e composição química.

As castas tintas utilizadas são majoritariamente constituídas por Bastardo, Mourisco Tinto, Cornifesto, Tinta Bairrada, Tinta Amarela, Alvarelhão, Malvasia Preta e Jaen, para além de outras castas não identificadas. Relativamente às castas brancas, estas incluem Esgana Cão, Formosa, Síria, D. Branca (Douradinha), Gouveio, Folgasão e Chaselas Salsa, bem como outras castas não identificadas.

3.2 Definição das Concentrações de Inóculo

As concentrações de inóculo utilizadas nas fermentações foram definidas com base em protocolos de microvinificação e em estudos prévios envolvendo fermentações mistas e sequenciais com leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, conforme descrito na Secção 2.6.

Nas fermentações conduzidas com *S. cerevisiae* foram avaliadas duas concentrações iniciais de inoculação, correspondentes a aproximadamente 10^5 e 10^6 UFC mL⁻¹. Esta etapa teve como objetivo verificar se diferentes níveis desta levedura influenciariam o comportamento fermentativo nas condições experimentais utilizadas.

Nas fermentações sequenciais, *T. delbrueckii* foi inoculada inicialmente na concentração aproximada de 10^7 UFC mL⁻¹, tanto na forma livre quanto na forma imobilizada. Após 48 h de fermentação inicial, procedeu-se à inoculação de *S. cerevisiae*, permitindo a atuação prévia de *T. delbrueckii* antes da condução principal da fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*.

Embora as fermentações com *S. cerevisiae* tenham sido inicialmente conduzidas com duas concentrações de inoculação, a análise dos resultados não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre estas condições para os parâmetros avaliados. Dessa

forma, considerou-se que as duas concentrações representavam a mesma estratégia fermentativa convencional, diferindo apenas na concentração inicial de inoculação. Assim, os respetivos resultados foram agrupados e tratados como quadruplicatas, com o objetivo de aumentar a robustez estatística, reduzir o efeito de variações pontuais entre unidades experimentais e melhorar a representatividade dos dados obtidos.

3.3 Aquisição e Preparação das Amostras

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança, localizado na cidade de Bragança, Portugal. As amostras de mosto utilizadas nos ensaios foram colhidas em meados de setembro de 2025 e cedidas por um produtor da região de Trás-os-Montes.

A colheita das uvas, a receção, o desengace e esmagamento foram realizados conforme a Secção 2.3. A Figura 3.2 e a Figura 3.3 ilustram parte das etapas realizadas durante a vindima.



Figura 3.2: Uvas colhidas.



Figura 3.3: Uvas em estágio de fermentação.

Nos ensaios laboratoriais, os mostos provenientes de uvas brancas foram utilizados para a produção de vinho branco, enquanto os mostos provenientes de uvas tintas foram conduzidos para a produção de vinho rosé. As fermentações experimentais realizadas com os mostos rosé e branco encontram-se representadas nas Figura 3.4 e Figura 3.5, respetivamente, sendo os procedimentos detalhados na secção seguinte.



Figura 3.4: Fermentações do vinho rosé em laboratório.



Figura 3.5: Fermentações do vinho branco em laboratório.

3.4 Preparo dos Inóculos

3.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

As fermentações foram conduzidas utilizando a levedura comercial Lalvin QA23[®] (*Saccharomyces cerevisiae*), produzida pela Lallemmand Oenology [79]. De acordo com as recomendações do fabricante, esta levedura é indicada para inoculação em doses na faixa de 20 a 40 g hL⁻¹, tendo sido adotada, a concentração de 30 g hL⁻¹.

Para a ativação, a levedura seca ativa foi previamente reidratada em mosto, utilizando-se aproximadamente dez vezes o seu peso em volume de mosto, à temperatura de 38 °C, com agitação suave durante o período de reidratação. Após a reativação, o inóculo foi homogeneizado e calculado o volume de inóculo necessário para atingir a concentração inicial desejada no mosto.

3.4.2 *Torulaspora delbrueckii*

As fermentações sequenciais foram conduzidas utilizando a levedura comercial LEVEL² BIODIVA™ (*Torulaspora delbrueckii*), produzida pela Lallemend Oenology [80]. Esta levedura corresponde a uma cultura pura de *T. delbrueckii*, recomendada para utilização em inoculação sequencial com uma levedura compatível de *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de favorecer a complexidade aromática e a expressão em boca dos vinhos. De acordo com as recomendações do fabricante, a LEVEL² BIODIVA™ deve ser inoculada na dose de 25 g hL⁻¹. Para a sua ativação, a levedura seca ativa foi reidratada em mosto, utilizando-se aproximadamente dez vezes o seu peso em volume de água, à temperatura de 30 °C com agitação suave durante o período de reidratação.

Após a reativação, o inóculo foi homogeneizado e calculado o volume de inóculo necessário para atingir a concentração inicial desejada no mosto.

3.5 Fermentações

3.5.1 Fermentação I: *Saccharomyces cerevisiae*

As fermentações laboratoriais foram conduzidas com base na metodologia descrita por Pinu et al. [81].

Todos os erlenmeyers, rolhas plásticas, respiros de vidro, água destilada e demais materiais utilizados durante a preparação, pesagens e medições foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. A transferência do mosto para os erlenmeyers foi realizada em condições assépticas, com auxílio de proveta esterilizada, de modo a minimizar o risco de contaminação microbiológica durante a montagem dos ensaios.

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 200 mL de mosto. Foram adicionados nutriente enológico na concentração de 45 g hL⁻¹ e dióxido de enxofre (SO₂, solução a 6%) na concentração final de 80 mg L⁻¹. Posteriormente, procedeu-se à inoculação da levedura *S. cerevisiae*.

Em seguida, os erlenmeyers foram vedados com rolhas plásticas acopladas a respiros de vidro contendo água destilada estéril. Este sistema permitiu a libertação do dióxido de carbono (CO₂) produzido durante a fermentação alcoólica, ao mesmo tempo que limitou a entrada de oxigénio e de microrganismos contaminantes no interior dos frascos.

As fermentações foram conduzidas em incubadora orbital, à temperatura de 25 °C e agitação de 100 rpm, durante 5 dias. As condições de temperatura e agitação foram mantidas constantes ao longo do período experimental, com o objetivo de garantir homogeneidade do meio fermentativo e favorecer o desenvolvimento das leveduras.

Durante o processo fermentativo, os frascos foram pesados diariamente, a fim de acompanhar a atividade fermentativa. Além disso, foram realizadas recolhas periódicas de amostras para análises microbiológicas e posteriores análises físico-químicas dos vinhos obtidos.

3.5.2 Fermentação II: *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*

A segunda estratégia fermentativa foi conduzida de acordo com o procedimento descrito na Secção 3.5.1, com algumas modificações relacionadas ao volume de mosto, à espécie de levedura inicialmente inoculada e ao tempo total de fermentação baseadas em Kuchen et al. [82].

Nesta condição, foram utilizados erlenmeyers contendo 230 mL de mosto. A fermentação foi iniciada pela inoculação de *Torulaspora delbrueckii* e após 48 h de fermentação, procedeu-se à inoculação sequencial de *Saccharomyces cerevisiae*.

As fermentações foram mantidas em incubadora orbital a 25 °C e 100 rpm, durante um período total de 7 dias. Tal como descrito anteriormente os frascos foram pesados diariamente e realizadas recolhas periódicas de amostras para análises posteriores.

3.5.3 Fermentação III: Imobilização da célula da *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*

A terceira estratégia fermentativa foi conduzida de acordo com o procedimento geral descrito na Secção 3.5.1, com modificações relacionadas à imobilização celular, à forma de inoculação das leveduras e à condução sequencial da fermentação baseadas em Canonico et al. [45].

Para a imobilização celular, foi utilizada uma solução de alginato de sódio a 4% (m/v), preparada em água destilada e posteriormente esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Após arrefecimento da solução, a levedura previamente reativada conforme a Secção 3.4 foi incorporada ao alginato sob condições assépticas, de modo a garantir a distribuição homogênea das células na matriz polimérica.

A formação das esferas de alginato foi realizada por gotejamento da mistura de alginato e levedura em solução estéril de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,18 M, sob agitação contínua conforme ilustrado na Figura 3.6. O contacto entre o alginato de sódio e o CaCl_2 promoveu a gelificação iónica e a formação das esferas, nas quais as células permaneceram retidas. Após a formação, as esferas foram mantidas na solução de CaCl_2 durante 30 minutos a 4 °C, com o objetivo de favorecer o endurecimento e a estabilização da matriz. Antes da inoculação, as esferas foram lavadas três vezes com água destilada estéril para remover o excesso de CaCl_2 . As esferas destinadas à inoculação no segundo momento experimental foram armazenadas sob refrigeração, em solução estéril de CaCl_2 a 0,18 M, até à sua utilização.

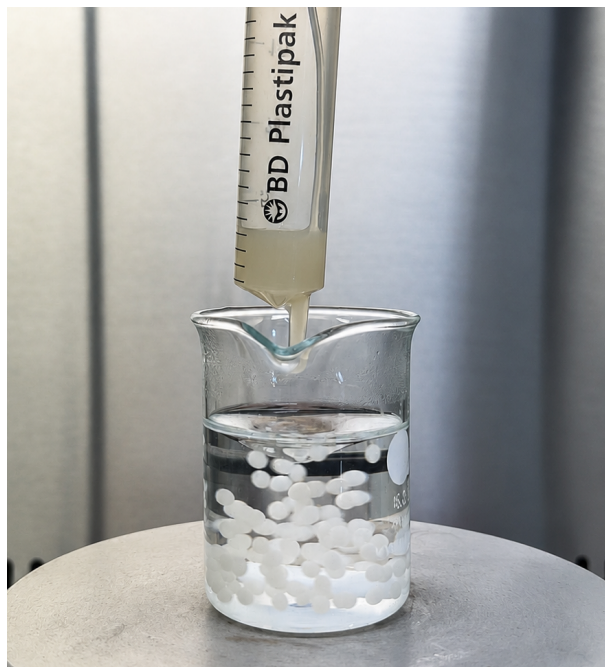


Figura 3.6: Formação de esferas de alginato de sódio por gotejamento.

A condução da fermentação foi realizada tal como descrito na Secção 3.5.1. A inoculação inicial foi realizada com células imobilizadas de *Torulaspora delbrueckii*. Após 48 h de fermentação, procedeu-se à inoculação sequencial de *Saccharomyces cerevisiae*, igualmente imobilizada em esferas de alginato. As fermentações foram conduzidas em incubadora orbital a 25 °C e 100 rpm, durante um período total de 7 dias.

Durante o processo fermentativo, os frascos foram pesados diariamente e foram recolhidas amostras para posteriores análises físico-químicas dos vinhos obtidos. Nesta condição experimental, devido à utilização de células imobilizadas em alginato, a monitorização microbiológica por densidade ótica e contagem de UFC mL⁻¹ não foi realizada da mesma forma que nas fermentações com células livres, sendo a evolução fermentativa acompanhada principalmente pela perda de massa e pelas análises físico-químicas finais.

3.6 Caracterização do Processo Fermentativo

3.6.1 Monitoramento Gravimétrico da Fermentação

A evolução da fermentação foi monitorizada por análise gravimétrica diária, utilizando a perda de massa dos frascos como indicador indireto da atividade fermentativa. Para este efeito, os erlenmeyers contendo o meio fermentativo foram pesados diariamente antes da abertura do sistema. Em seguida, foi retirada uma alíquota destinada às análises subsequentes, e os frascos foram novamente pesados para registrar a massa remanescente após a amostragem [83].

A diminuição da massa ao longo do tempo foi atribuída principalmente à liberação de dióxido de carbono (CO_2) durante a fermentação alcoólica, bem como à remoção controlada das amostras. Dessa forma, a pesagem diária permitiu acompanhar indiretamente a atividade metabólica das leveduras e construir o perfil temporal de perda de massa das diferentes fermentações, conforme apresentado na Figura 3.7.



Figura 3.7: Representação da pesagem diária dos frascos durante a fermentação.

3.6.2 Contagem de Leveduras

A quantificação de leveduras viáveis ao longo da fermentação foi realizada pelo método de contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Para este efeito, as amostras recolhidas durante o processo fermentativo foram submetidas a diluições seriadas em condições assépticas e posteriormente inoculadas em meio de cultura *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD), utilizando o método de gota (*drop plate method*) [84].

Neste procedimento, foram depositadas gotas de 20 μL de cada diluição sobre a superfície do meio de cultura previamente solidificado. Após a absorção das gotas pelo meio, as placas foram incubadas em estufa a 25 °C. Findo o período de incubação, foram seleccionadas as diluições que apresentaram colónias isoladas e contáveis, permitindo a determinação da concentração de células viáveis nas amostras.

As contagens microbiológicas foram inicialmente expressas em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC mL^{-1}) e calculadas de acordo com a Equação 3.1.

$$\frac{UFC}{\text{mL}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colónias} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume inoculado}} \quad (3.1)$$

Para a análise de crescimento, os valores de concentração celular foram posteriormente transformados em logaritmo natural, sendo expressos como $\ln(\text{UFC mL}^{-1})$. Esta transformação foi utilizada para permitir a linearização da fase exponencial de crescimento e o cálculo da taxa específica de crescimento microbiano (μ_c). A taxa específica de crescimento microbiano foi determinada a partir da variação do logaritmo natural da concentração celular em função do tempo, considerando a fase exponencial de crescimento, de acordo com a Equação 3.2:

$$\mu_c = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (3.2)$$

em que μ_c representa a taxa específica de crescimento (h^{-1}), X_1 e X_2 correspondem as concentrações em UFC mL^{-1} nos tempos t_1 e t_2 , respetivamente.

O tempo de duplicação celular (t_d) foi calculado a partir da taxa específica de crescimento, conforme a Equação 3.3:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_c} \quad (3.3)$$

em que t_d representa o tempo necessário para a duplicação da população celular, expresso em horas.

Este método permitiu acompanhar a evolução das populações viáveis de leveduras durante o processo fermentativo, contribuindo para a avaliação do crescimento microbiano e da atividade fermentativa nas diferentes condições experimentais. A Figura 3.8 apresenta as placas após o período de incubação, evidenciando as colônias desenvolvidas utilizadas para a determinação da concentração celular.

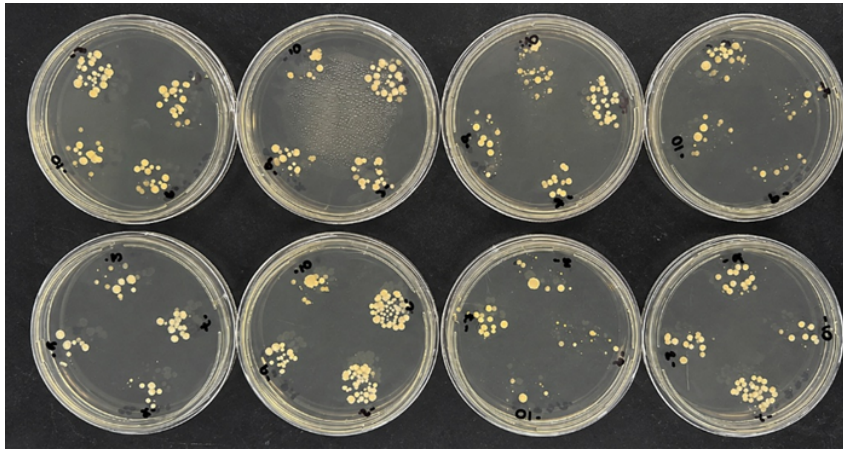


Figura 3.8: Placas de meio de levedura com colônias de leveduras crescidas.

3.6.3 Densidade Ótica

A densidade ótica (DO) foi determinada por espectrofotometria, por meio da leitura da absorbância das suspensões celulares a 640 nm (DO_{640}) [85]. Este parâmetro foi utilizado como indicador indireto da concentração de biomassa, uma vez que o aumento da turbidez do meio está associado ao crescimento celular das leveduras.

Antes da leitura, as amostras foram homogeneizadas para garantir a distribuição uniforme das células. Quando necessário, foram realizadas diluições, de modo que os valores de absorbância permanecessem dentro da faixa linear de leitura do espectrofotômetro. A leitura foi realizada utilizando o mosto como branco.

A relação entre a densidade ótica e a concentração celular é aproximadamente linear dentro de determinados intervalos de concentração, permitindo acompanhar a evolução da biomassa ao longo do processo fermentativo. Dessa forma, a DO_{640} foi utilizada como ferramenta complementar à contagem de unidades formadoras de colônias, contribuindo para a monitorização da cinética de crescimento das leveduras durante a fermentação alcoólica.

Para a análise de crescimento, os valores de DO_{640} obtidos ao longo do tempo foram transformados em logaritmo natural, sendo expressos como $\ln(DO_{640})$.

A fase lag foi estimada a partir das curvas de crescimento obtidas por $\ln(DO_{640})$ em função do tempo, considerando o intervalo anterior ao início da fase exponencial. Os resultados foram expressos em horas.

3.7 Perfil Metabólico Fermentativo

3.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A determinação de compostos como glucose, frutose, glicerol e etanol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC), conforme metodologia adaptada de Castellari et al. [86] e recomendações da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) [87].

As amostras foram previamente diluídas e filtradas utilizando filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ e posteriormente injetadas no sistema cromatográfico, equipado com coluna adequada para a separação de compostos polares.

A detecção foi realizada utilizando um detetor de índice de refração (RID). A quantificação foi efetuada através de curvas de calibração construídas a partir de soluções padrão

contendo os compostos de interesse (glucose, frutose, etanol e glicerol) em diferentes concentrações, analisadas nas mesmas condições aplicadas às amostras.

A quantificação foi realizada através da integração da área dos picos cromatográficos e posterior comparação com as respectivas curvas padrão, garantindo que as respostas obtidas para as amostras permanecessem dentro do intervalo linear estabelecido. Os resultados foram expressos em g L^{-1} .

O rendimento fermentativo foi calculado pela razão entre o etanol produzido e o total de glucose e frutose consumidas, conforme a Equação 3.4:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Etanol produzido } (\text{g L}^{-1})}{\text{Glucose consumida } (\text{g L}^{-1}) + \text{Frutose consumida } (\text{g L}^{-1})} \quad (3.4)$$

em que $Y_{P/S}$ representa o rendimento fermentativo, expresso em g de etanol por g de açúcar consumido. Adicionalmente, calculou-se o rendimento relativo ao teórico, considerando o valor estequiométrico de 0,511 g de etanol por g de açúcar consumido, conforme a Equação 3.5:

$$\eta(\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100 \quad (3.5)$$

3.8 Análises Físico-Químicas

3.8.1 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando um pHmetro equipado com eletrodo de vidro, conforme descrito pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) [88].

Antes das medições, o equipamento foi calibrado com soluções tampão padrão de pH 4,00 e 7,00 à temperatura ambiente. As amostras de vinho foram previamente homogeneizadas e analisadas diretamente, mantendo-se o eletrodo imerso na amostra até à estabilização da leitura.

3.8.2 Determinação de Acidez Total

A acidez total foi determinada pelo método de titulação ácido-base, baseado na metodologia descrita pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) [88]. Este método baseia-se na neutralização dos ácidos presentes no vinho por uma solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH).

Uma alíquota da amostra de vinho foi transferida para um erlenmeyer e posteriormente titulada com solução padronizada de NaOH (0,1 N), sob agitação constante. O ponto final da titulação foi determinado potenciometricamente, em pH próximo de 7,0, indicando a neutralização dos ácidos orgânicos presentes na amostra.

Os resultados foram expressos em gramas de ácido tartárico por litro (g L^{-1}), uma vez que este representa o principal ácido orgânico presente no vinho. A acidez total foi calculada de acordo com a Equação 3.6.

$$AT(\text{g L}^{-1}) = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times 75 \times 1000}{V_{amostra}} \quad (3.6)$$

em que V_{NaOH} corresponde ao volume de hidróxido de sódio consumido durante a titulação; N_{NaOH} corresponde à normalidade da solução de hidróxido de sódio e $V_{amostra}$ corresponde ao volume da amostra analisada.

3.8.3 Determinação da Acidez Volátil

A acidez volátil foi determinada de acordo com o método descrito pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) [88], baseado na separação dos ácidos voláteis por destilação seguida de titulação. Este parâmetro corresponde principalmente ao teor de ácido acético presente no vinho, podendo incluir pequenas quantidades de outros ácidos voláteis.

Uma alíquota da amostra de vinho foi submetida à destilação, de forma a separar os compostos voláteis da fração não volátil. O destilado obtido foi posteriormente titulado com solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,05 N, determinado o ponto de

viragem com auxílio de solução de fenolftaleína a 1% como indicador. O volume de titulante consumido encontra-se diretamente relacionado com a concentração de ácidos voláteis presentes na amostra.

Os resultados foram expressos em gramas de ácido acético por litro (g L^{-1}), por este representar o principal constituinte da acidez volátil do vinho. A acidez volátil foi calculada de acordo com a Equação 3.7.

$$AV(\text{g L}^{-1}) = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times 60 \times 1000}{V_{amostra}} \quad (3.7)$$

em que V_{NaOH} corresponde ao volume de hidróxido de sódio consumido durante a titulação; N_{NaOH} corresponde à normalidade da solução de hidróxido de sódio e $V_{amostra}$ corresponde ao volume da amostra analisada.

3.8.4 Determinação de SO_2 Total

A determinação do teor de dióxido de enxofre total (SO_2) foi realizada pelo método de titulação com iodo (método de Ripper), de acordo com a metodologia oficial descrita pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) [88].

Para a determinação do SO_2 total, a amostra foi submetida à acidificação, permitindo a libertação do SO_2 ligado. Em seguida, realizou-se a titulação com solução padrão de iodo (I_2) a 0,02 N, na presença do indicador de amido cozido a 1%. O ponto final da titulação foi identificado pelo aparecimento de uma coloração azul persistente, resultante da formação do complexo iodo-amido.

Os resultados foram expressos em mg L^{-1} e calculados de acordo com a Equação 3.8.

$$SO_2(\text{mg L}^{-1}) = \frac{V_{I_2} \times N_{I_2} \times 32 \times 1000}{V_{amostra}} \quad (3.8)$$

em que V_{I_2} corresponde ao volume de iodo consumido durante a titulação; N_{I_2} corresponde à normalidade da solução de iodo utilizada e $V_{amostra}$ corresponde ao volume da amostra analisada.

3.8.5 Determinação do Azoto Assimilável com Volume Reduzido (YAN)

O azoto assimilável pelas leveduras (*Yeast Assimilable Nitrogen* – YAN) foi determinado através de um método de volume reduzido, permitindo uma análise rápida e eficiente dos compostos azotados disponíveis para as leveduras [89].

A determinação baseou-se no ajuste do pH da amostra para 8,1 utilizando soluções de NaOH 0,1 N e 0,05 N. Posteriormente, foi adicionado formaldeído a 37%, previamente ajustado para pH 8,1. Após um período de repouso de 5 minutos, a amostra foi titulada com NaOH 0,05 N até atingir novamente pH 8,1.

Os resultados foram expressos em mg N L^{-1} . O YAN total foi calculado de acordo com a Equação 3.9.

$$YAN \left(\frac{\text{mg N}}{L} \right) = V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times 100 \times 14 \quad (3.9)$$

em que V_{NaOH} corresponde ao volume de hidróxido de sódio gasto na titulação e N_{NaOH} corresponde ao número de mols (normalidade) da solução de hidróxido de sódio.

3.9 Análise Sensorial

A aceitação sensorial dos vinhos foi avaliada utilizando uma escala hedónica estruturada de 9 pontos, conforme metodologia descrita por Kemp et al. [90], com a participação de 42 provadores não treinados constituídos por estudantes da instituição. Embora esse número permita a realização de uma avaliação preliminar da aceitação dos produtos, o painel de 42 consumidores é inferior ao tamanho amostral geralmente recomendado para testes hedónicos de aceitação, os quais normalmente envolvem entre 50 e 100 consumidores para proporcionar maior poder estatístico e melhor representatividade dos resultados, constituindo, assim, uma limitação deste estudo [91].

Cada provador avaliou as amostras de forma sequencial, atribuindo uma nota para os atributos aparência, aroma, sabor, acidez e aceitação global das três fermentações estudadas e respondendo a questões relacionadas com as preferências sensoriais (cheiro

agradável, sabor suave, caráter refrescante, doce, ácido, frutado, equilibrado e intenso), além de indicar a preferência entre as amostras avaliadas. Entre a avaliação das diferentes amostras, foi disponibilizada água filtrada e bolacha água e sal para neutralização do palato.

Os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva, sendo expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Para comparação entre os tratamentos (fermentação com *S. cerevisiae*, inoculação sequencial livre e inoculação sequencial imobilizada), foi aplicado teste estatístico descrito na Secção a seguir.

3.10 Análise Estatística

Os resultados provenientes das análises físico-químicas, perfil metabólico, microbiológicas e sensoriais foram submetidos à análise estatística com o objetivo de avaliar possíveis diferenças entre as amostras estudadas.

Inicialmente, foi realizada a análise de variância (ANOVA), utilizada para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Posteriormente, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de significância, com a finalidade de identificar especificamente entre quais amostras ocorreram essas diferenças.

Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças para valores de $p < 0,05$, indicando baixa probabilidade de que as variações observadas tenham ocorrido ao acaso. Por outro lado, valores de $p > 0,05$ indicaram ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras avaliadas.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Caracterização do Processo Fermentativo

4.1.1 Comparação de Estratégias de Inoculação com Células Livres

Cinética de Produção de CO_2

A atividade fermentativa das fermentações FI e FII foi acompanhada através da monitorização da perda de peso dos frascos ao longo do processo fermentativo, utilizada como indicador indireto da produção de dióxido de carbono (CO_2) durante a fermentação alcoólica. A diminuição do peso resulta da libertação de CO_2 para o exterior, sendo frequentemente utilizada para avaliar a evolução da atividade fermentativa. A evolução do peso durante a fermentação está representada na Figura 4.1.

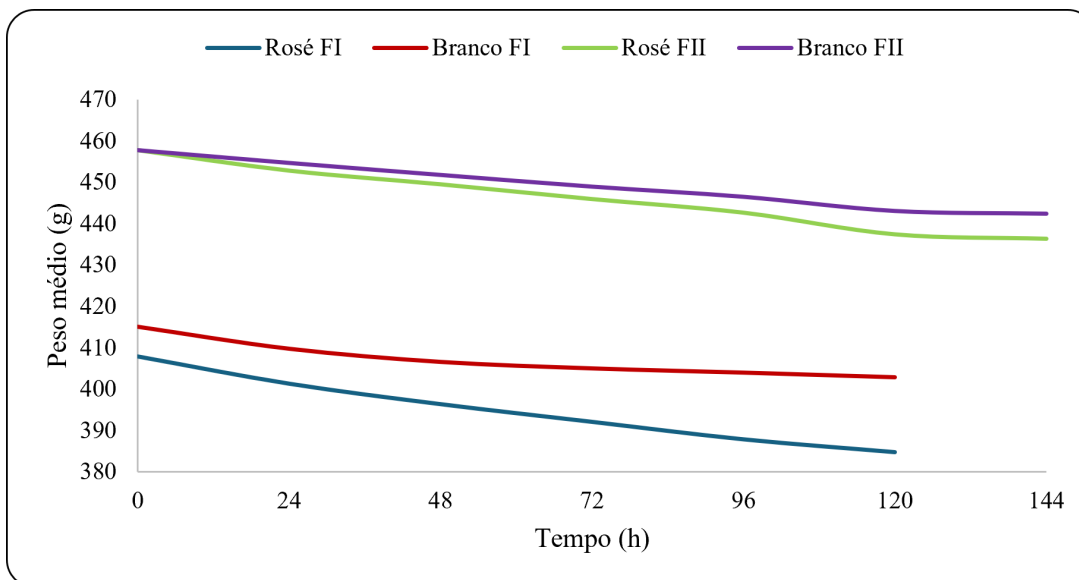


Figura 4.1: Evolução do peso durante a fermentação dos vinhos rosé e branco nas fermentações FI (fermentação com *S. cerevisiae* em células livres) e FII (fermentação com *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* em células livres).

Em ambos os vinhos, observou-se um aumento progressivo da perda de peso ao longo da fermentação, refletindo a produção contínua de CO_2 pelas leveduras durante a conversão dos açúcares em etanol.

Os valores finais de perda de peso encontram-se apresentados na Tabela 4.1. No vinho rosé, a fermentação FII registou uma perda de peso significativamente superior à observada na FI ($21,43 \pm 2,00$ g e $15,69 \pm 1,48$ g, respetivamente; $p < 0,05$), indicando uma maior libertação acumulada de CO_2 ao longo da fermentação. Resultados semelhantes foram descritos por Taillandier et al. [53], que verificaram que as interações entre *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* podem influenciar a dinâmica fermentativa em fermentações sequenciais, embora a magnitude desse efeito dependa das condições do mosto e da estratégia de inoculação utilizada.

Por outro lado, no vinho branco, embora a fermentação FII tenha apresentado uma perda de peso média superior à da FI ($15,27 \pm 0,31$ g e $12,30 \pm 2,82$ g, respetivamente), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as estratégias fermentativas ($p > 0,05$). Este resultado sugere que o efeito da inoculação sequencial foi

dependente da matriz vínica utilizada. Segundo Taillandier et al. [53], fatores como a composição do mosto, a disponibilidade de nutrientes e as interações entre espécies de leveduras podem influenciar significativamente o comportamento fermentativo em culturas mistas. De forma semelhante, Renault et al. [92] referem que os efeitos da utilização de leveduras não-*Saccharomyces* na cinética fermentativa variam em função das características do meio fermentativo e das estirpes envolvidas.

Tabela 4.1: Perda de peso total nos vinhos rosé e branco nas fermentações FI e FII.

Perda de peso (g)	FI	FII
Vinho Rosé	$15,69 \pm 1,48^b$	$21,43 \pm 2,00^a$
Vinho Branco	$12,30 \pm 2,82^a$	$15,27 \pm 0,31^a$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as estratégias fermentativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Avaliação da Densidade Celular e Parâmetros Cinéticos de Crescimento

A evolução da densidade celular durante a fermentação encontra-se apresentada na Figura 4.2. De forma geral, observou-se um aumento da densidade ótica durante as fases iniciais da fermentação, correspondente à fase exponencial de crescimento das leveduras, seguido por uma tendência de estabilização à medida que o processo fermentativo progrediu.

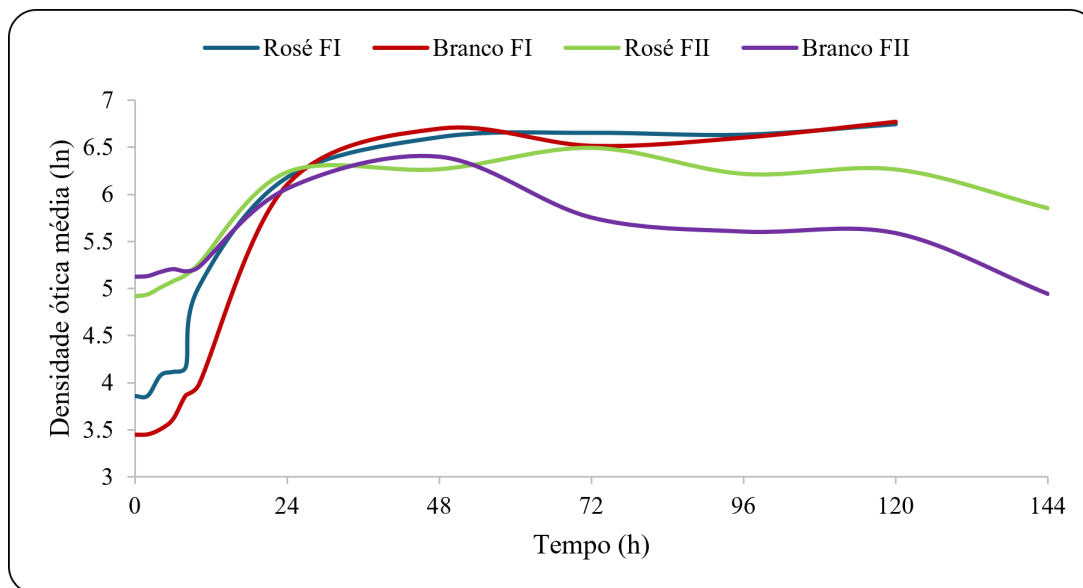


Figura 4.2: Evolução da densidade ótica ao longo das primeiras 24 horas de fermentação nos vinhos rosé e branco nas fermentações FI (fermentação com *S. cerevisiae* em células livres) e FII (fermentação com *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* células livres).

Em ambas as matrizes vínicas, verificou-se um aumento acentuado da densidade celular das leveduras durante as primeiras 24 horas, período que coincidiu com a fase de maior liberação de CO_2 . Este comportamento indica uma rápida adaptação das leveduras ao mosto e uma elevada atividade metabólica nas fases iniciais da fermentação.

Após este período, os perfis de densidade celular diferiram entre as estratégias de inoculação. Na FI, conduzida exclusivamente por *S. cerevisiae*, observou-se uma multiplicação celular mais rápida durante a fase exponencial, seguida de estabilização da densidade ótica. Na FII, a evolução da densidade celular refletiu a presença inicial de *T. delbrueckii* e a posterior inoculação de *S. cerevisiae*. Contudo, a interpretação destes resultados deve ser feita com cautela, uma vez que a densidade ótica estima a biomassa celular total em suspensão e não permite distinguir individualmente a contribuição de cada espécie.

Os parâmetros cinéticos calculados a partir da fase exponencial de crescimento encontram-se apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3.

Tabela 4.2: Crescimento microbiano nos vinhos rosés.

Parâmetro	FI	FII
Taxa de crescimento μ_c (h^{-1})	$0,300 \pm 0,006^a$	$0,216 \pm 0,004^b$
Tempo de duplicação t_d (h)	$2,31 \pm 0,05^b$	$3,21 \pm 0,06^a$
Biomassa final $\ln(\text{DO})$	$6,75 \pm 0,18^a$	$5,85 \pm 0,32^b$

Tabela 4.3: Crescimento microbiano nos vinhos brancos.

Parâmetro	FI	FII
Taxa de crescimento, μ_c (h^{-1})	$0,21 \pm 0,03^a$	$0,22 \pm 0,02^a$
Tempo de duplicação, t_d (h)	$3,35 \pm 0,50^a$	$3,25 \pm 0,26^a$
Biomassa final $\ln(\text{DO})$	$6,77 \pm 0,11^a$	$4,94 \pm 0,89^b$

No vinho rosé, a biomassa celular estimada por densidade ótica apresentou uma taxa específica de crescimento (μ_c) significativamente superior na fermentação FI relativamente à FII ($0,300 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ e $0,216 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$, respetivamente; $p < 0,05$). Consequentemente, o tempo de duplicação foi significativamente inferior em FI ($2,31 \pm 0,05 \text{ h}$) quando comparado com FII ($3,21 \pm 0,06 \text{ h}$), indicando uma acumulação mais rápida de biomassa durante a fase exponencial de crescimento.

A biomassa final estimada por $\ln(\text{DO})$ foi igualmente superior em FI ($6,75 \pm 0,18$) relativamente a FII ($5,85 \pm 0,32$), demonstrando uma maior acumulação de biomassa celular ao longo da fermentação.

No vinho branco, não foram observadas diferenças significativas entre FI e FII relativamente à taxa específica de crescimento e ao tempo de duplicação ($p > 0,05$), indicando que a velocidade de acumulação de biomassa durante a fase exponencial foi semelhante entre ambas as condições experimentais.

Contudo, a biomassa final estimada por $\ln(\text{DO})$ foi significativamente superior em FI

($6,77 \pm 0,11$) comparativamente a FII ($4,94 \pm 0,89$), sugerindo que, apesar das velocidades iniciais de crescimento semelhantes, a acumulação global de biomassa ao longo da fermentação foi superior na condição inoculada apenas com *S. cerevisiae*.

A Figura 4.2 corrobora estes resultados, evidenciando uma fase exponencial mais pronunciada no vinho rosé submetido à fermentação FI. Estes dados sugerem que a presença inicial de *Torulaspora delbrueckii* influenciou a dinâmica de acumulação de biomassa, resultando em menores valores de μ_c e biomassa final nesta condição.

Apesar disso, os resultados obtidos para a biomassa celular não acompanharam diretamente os resultados de perda de peso. De facto, embora a FII tenha apresentado uma maior libertação acumulada de CO₂ no vinho rosé, a biomassa final estimada por densidade ótica foi inferior à observada em FI.

Este comportamento demonstra que a acumulação de biomassa celular e a atividade fermentativa representam parâmetros distintos do processo fermentativo. Enquanto a densidade ótica fornece uma estimativa indireta da biomassa celular em suspensão, a perda de peso está associada à atividade metabólica fermentativa e à produção de CO₂ [93].

Os resultados observados estão de acordo com a literatura, que descreve *Saccharomyces cerevisiae* como uma espécie caracterizada por elevada capacidade de adaptação ao mosto, rápido crescimento e forte competitividade durante a fermentação alcoólica [94, 95]. Estas características poderão justificar os valores superiores de μ_c e biomassa final observados na FI, particularmente no vinho rosé.

Por outro lado, *Torulaspora delbrueckii* apresenta geralmente taxas de crescimento inferiores às de *S. cerevisiae* e menor competitividade em ambientes fermentativos, apesar do seu reconhecido interesse enológico na modulação do perfil aromático dos vinhos [92].

Segundo Taillandier et al. [53], as interações entre *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* em fermentações sequenciais dependem fortemente da disponibilidade de nutrientes e das condições do meio, podendo influenciar a dinâmica de crescimento e a acumulação de biomassa observadas ao longo da fermentação.

4.1.2 Células Imobilizadas em Inoculação Sequencial

Cinética de Produção de CO₂

A comparação entre FII e FIII permitiu avaliar a influência da imobilização celular sobre a evolução fermentativa dos vinhos branco e rosé. Uma vez que a FIII (fermentação com *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* células imobilizadas) foi conduzida com células imobilizadas, os parâmetros clássicos de crescimento microbiano, como contagem de células livres em UFC mL⁻¹ e densidade ótica, não foram utilizados para comparação direta.

A evolução do peso dos frascos durante a fermentação encontra-se representada na Figura 4.3.

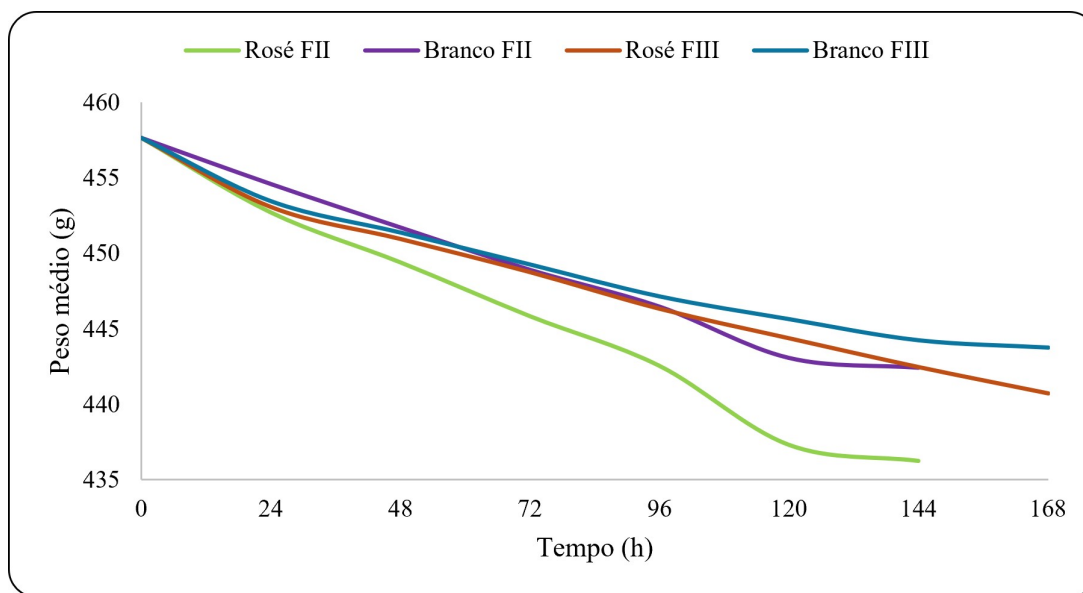


Figura 4.3: Evolução do peso durante a fermentação dos vinhos rosé e branco submetidos às fermentações sequenciais FII (fermentação com *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* células livres) e FIII (fermentação com *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* células imobilizadas).

A perda de peso total ao final da fermentação está apresentada na Tabela 4.4 com a análise estatística calculada de acordo com a Secção 3.10.

Tabela 4.4: Perda de peso total nos vinhos rosé e branco submetidos às fermentações FII e FIII.

Vinho	FII	FIII
Rosé	$21,43 \pm 2,00^a$	$16,94 \pm 0,90^b$
Branco	$15,27 \pm 0,31^a$	$13,92 \pm 0,97^b$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as estratégias fermentativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em ambos os vinhos, as leveduras em células livres (FII) originaram perdas de peso significativamente superiores às observadas para as leveduras imobilizadas (FIII) ($p < 0,05$), evidenciando diferenças na quantidade acumulada de CO_2 libertada durante a fermentação.

No vinho rosé, a perda de peso foi de $21,43 \pm 2,00$ g em FII e de $16,94 \pm 0,90$ g em FIII. No vinho branco, os valores observados foram de $15,27 \pm 0,31$ g e $13,92 \pm 0,97$ g, respetivamente.

A diferença entre as duas estratégias foi mais pronunciada no vinho rosé, onde a utilização de células imobilizadas esteve associada a uma redução de aproximadamente 21% da perda de peso total relativamente à condição com células livres. No vinho branco, observou-se igualmente uma redução da perda de peso em FIII, embora menos acentuada, correspondendo a cerca de 9%.

Estes resultados sugerem que a imobilização celular influenciou a atividade metabólica das leveduras e, consequentemente, a quantidade de CO_2 produzida ao longo da fermentação. A menor perda de peso observada em FIII indica uma menor libertação acumulada de CO_2 relativamente à condição com células livres.

De acordo com Genisheva et al. [64], sistemas de imobilização celular podem apresentar limitações de transferência de massa associadas à difusão de açúcares para o interior da matriz de imobilização e à remoção dos metabolitos produzidos para o meio envolvente. Estas limitações podem afetar a disponibilidade de substratos para as células e

condicionar a sua atividade metabólica, influenciando a cinética fermentativa.

Resultados semelhantes foram descritos por Kourkoutas et al. [65], que referem que o comportamento fermentativo de células imobilizadas depende fortemente do material utilizado como suporte e das condições operacionais do processo. Segundo estes autores, embora a imobilização celular apresente vantagens tecnológicas importantes, podem ocorrer alterações na cinética fermentativa quando comparada com sistemas de células livres.

A diferença observada entre os vinhos rosé e branco sugere ainda que a resposta das leveduras à imobilização poderá depender das características da matriz vínica. Fatores como a composição do mosto, a disponibilidade de nutrientes, a concentração de açúcares e a presença de compostos fenólicos podem influenciar a atividade metabólica das células e a sua interação com a matriz de imobilização.

Apesar da menor perda de peso observada em FIII, a evolução apresentada na Figura 4.3 demonstra que as leveduras imobilizadas permaneceram metabolicamente ativas ao longo de todo o processo fermentativo. A diminuição contínua da massa observada confirma a capacidade destas células para metabolizar os açúcares presentes no mosto e produzir CO₂, demonstrando a viabilidade da estratégia de imobilização utilizada.

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com os descritos por Canonico et al. [45], que demonstraram que leveduras não-*Saccharomyces* imobilizadas podem conduzir fermentações completas quando utilizadas em inoculação sequencial com *S. cerevisiae*. Estes autores verificaram que o desempenho fermentativo depende não apenas da espécie utilizada, mas também das características do suporte de imobilização e das condições do meio fermentativo.

A utilização da perda de peso como indicador indireto da atividade fermentativa encontra-se amplamente descrita na literatura. Mecca et al. [96] monitorizaram fermentações conduzidas por *T. delbrueckii* através da medição da perda de massa dos recipientes, utilizando este parâmetro para acompanhar a produção de CO₂ ao longo do processo fermentativo.

Embora as leveduras imobilizadas tenham originado uma menor libertação acumulada

de CO_2 nas condições avaliadas neste estudo, a imobilização celular continua a apresentar vantagens relevantes para aplicações enológicas. Entre estas destacam-se a possibilidade de recuperação e reutilização da biomassa, a facilidade de separação das células após a fermentação, a redução dos custos associados à reinoculação e a maior estabilidade operacional em processos fermentativos sucessivos [64, 97].

Globalmente, os resultados demonstram que tanto as leveduras em células livres como as leveduras imobilizadas foram capazes de conduzir a fermentação alcoólica em ambas as matrizes vínicas. No entanto, nas condições estudadas, as leveduras imobilizadas originaram uma menor libertação acumulada de CO_2 quando comparadas com as células livres, sugerindo que a otimização das condições de imobilização poderá contribuir para potenciar o desempenho desta tecnologia sem comprometer as vantagens tecnológicas associadas à sua utilização.

4.2 Produtos Resultantes da Fermentação

Os produtos resultantes da fermentação foram avaliados a partir das concentrações de glucose, frutose, glicerol e etanol determinadas por HPLC. A produção de glicerol e etanol foi calculada pela diferença entre a concentração final e inicial. Por fim, foram calculados o rendimento fermentativo ($Y_{P/S}$) e o rendimento relativo ao teórico. Todos esses dados estão apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.6, com os cálculos estatísticos efetuados conforme a Secção 3.10.

Tabela 4.5: Perfil fermentativo do vinho rosé.

Parâmetro	FI	FII	FIII
Teor Residual de Glucose (g L^{-1})	$3,78 \pm 0,29^a$	$3,42 \pm 0,67^a$	$1,98 \pm 0,10^b$
Teor Residual de Frutose (g L^{-1})	$12,06 \pm 0,13^a$	$5,50 \pm 0,49^b$	$12,77 \pm 1,05^a$
Teor de Glicerol Produzido (g L^{-1})	$14,33 \pm 1,42^a$	$14,24 \pm 2,96^a$	$8,17 \pm 0,39^b$
Teor de Etanol Produzido (g L^{-1})	$90,37 \pm 3,28^a$	$82,11 \pm 1,88^b$	$70,90 \pm 1,85^c$
Álcool (% v/v)	$11,80 \pm 0,48^a$	$10,74 \pm 0,25^b$	$9,53 \pm 0,23^c$
Rendimento Fermentativo $Y_{P/S}$ (g g^{-1})	$0,487 \pm 0,015^a$	$0,427 \pm 0,023^b$	$0,401 \pm 0,014^b$
Rendimento relativo ao teórico (%)	$95,39 \pm 2,85^a$	$83,64 \pm 4,50^b$	$78,49 \pm 2,73^b$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as estratégias fermentativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4.6: Perfil fermentativo do vinho branco.

Parâmetro	FI	FII	FIII
Teor Residual de Glucose (g L^{-1})	$1,48 \pm 0,09^a$	$1,44 \pm 0,12^a$	$1,68 \pm 0,19^a$
Teor Residual de Frutose (g L^{-1})	$0,65 \pm 0,01^b$	$2,11 \pm 0,21^a$	$0,92 \pm 0,19^b$
Teor de Glicerol Produzido (g L^{-1})	$14,17 \pm 0,38^b$	$16,50 \pm 0,37^a$	$10,23 \pm 0,64^c$
Teor de Etanol Produzido (g L^{-1})	$60,55 \pm 1,96^b$	$65,73 \pm 1,11^a$	$60,26 \pm 2,49^b$
Álcool (% v/v)	$8,04 \pm 0,22^b$	$8,64 \pm 0,15^a$	$8,09 \pm 0,32^b$
Rendimento Fermentativo $Y_{P/S}$ (g g^{-1})	$0,446 \pm 0,020^a$	$0,447 \pm 0,016^a$	$0,458 \pm 0,015^a$
Rendimento relativo ao teórico (%)	$87,21 \pm 3,84^a$	$87,38 \pm 3,22^a$	$89,56 \pm 3,01^a$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as estratégias fermentativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Vinho Rosé

No vinho rosé, observaram-se diferenças significativas entre as estratégias de inoculação relativamente ao consumo de açúcares e à formação dos principais metabolitos fermentativos. As leveduras presentes na FI originaram a maior produção de etanol ($90,37 \pm 3,28 \text{ g L}^{-1}$), correspondente a um teor alcoólico de $11,80 \pm 0,48\%$ (v/v), enquanto os valores obtidos em FII e FIII foram significativamente inferiores. De igual modo, a FI apresentou o maior rendimento fermentativo ($0,487 \pm 0,015 \text{ g g}^{-1}$), correspondente a 95,39% do rendimento teórico.

Embora as leveduras presentes na FII tenham consumido uma maior fração da frutose disponível, evidenciada pela menor concentração residual deste açúcar ($5,50 \pm 0,49 \text{ g L}^{-1}$), este comportamento não se traduziu numa maior produção de etanol. Pelo contrário, a produção alcoólica e o rendimento fermentativo foram inferiores aos observados na FI. Estes resultados sugerem que parte do carbono assimilado poderá ter sido direcionada para vias metabólicas alternativas à produção de etanol.

A menor concentração residual de frutose observada em FII é particularmente relevante, uma vez que este açúcar constitui frequentemente a principal fração residual em fermentações vínicas incompletas. Embora *Saccharomyces cerevisiae* apresente geralmente preferência metabólica pela glucose, a presença de *Torulaspora delbrueckii* poderá ter contribuído para uma utilização mais equilibrada dos açúcares disponíveis, reduzindo a acumulação final de frutose. Contudo, este maior consumo não se refletiu num aumento proporcional da produção de etanol, reforçando a hipótese de uma redistribuição do fluxo metabólico do carbono.

As leveduras presentes na FIII apresentaram o comportamento mais distinto, originando simultaneamente a menor produção de etanol ($70,90 \pm 1,85 \text{ g L}^{-1}$), a menor produção de glicerol ($8,17 \pm 0,39 \text{ g L}^{-1}$) e a maior concentração residual de frutose ($12,77 \pm 1,05 \text{ g L}^{-1}$). Estes resultados indicam uma menor conversão dos açúcares fermentescíveis em produtos finais da fermentação nas condições de imobilização utilizadas.

A produção de glicerol observada nas estratégias FI e FII reforça esta interpretação.

O glicerol constitui um dos principais metabolitos secundários da fermentação alcoólica e desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio redox celular. Segundo Ciani e Ferraro [98] e Jolly et al. [95], a presença de leveduras não-*Saccharomyces* pode influenciar a síntese deste composto e alterar a distribuição do carbono consumido entre os diferentes produtos metabólicos.

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com a literatura, que descreve *T. delbrueckii* como uma espécie capaz de modular o metabolismo fermentativo quando utilizada em inoculação sequencial com *S. cerevisiae*. Renault et al. [92] e Belda et al. [99] referem que a presença desta levedura pode alterar a produção de etanol, glicerol e outros metabolitos fermentativos, embora o efeito observado dependa fortemente da estirpe utilizada, da composição do mosto e das condições fermentativas.

Vinho branco

No vinho branco, o comportamento observado diferiu substancialmente do registado no vinho rosé. As leveduras presentes na FII originaram a maior produção de glicerol ($16,50 \pm 0,37 \text{ g L}^{-1}$) e etanol ($65,73 \pm 1,11 \text{ g L}^{-1}$), correspondendo também ao maior teor alcoólico final ($8,64 \pm 0,15\% \text{ v/v}$).

Curiosamente, apesar da maior produção de etanol, as leveduras presentes na FII apresentaram igualmente a maior concentração residual de frutose ($2,11 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$). Em contraste, as leveduras presentes na FI e FIII consumiram quantidades superiores deste açúcar, apresentando concentrações residuais inferiores a 1 g L^{-1} . Este resultado demonstra que a intensidade do consumo de um determinado açúcar não se relaciona necessariamente de forma direta com a produção final de etanol.

Ao contrário do observado no vinho rosé, os rendimentos fermentativos não diferiram significativamente entre as três estratégias, variando entre $0,446$ e $0,458 \text{ g g}^{-1}$, correspondendo a rendimentos relativos compreendidos entre 87% e 90% do valor teórico. Estes resultados indicam que a eficiência global de conversão dos açúcares em etanol foi semelhante entre as diferentes condições estudadas.

A maior produção simultânea de etanol e glicerol observada em FII sugere que, nesta

matriz, a interação entre *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* favoreceu a atividade fermentativa global das leveduras. Este comportamento demonstra que os efeitos da inoculação sequencial dependem fortemente das características físico-químicas do mosto.

Diversos autores referem que fatores como a disponibilidade de azoto assimilável, a composição dos açúcares, o pH e a concentração de compostos fenólicos influenciam as interações entre espécies de leveduras durante a fermentação [95, 99]. Esta dependência da matriz poderá explicar porque a estratégia FII apresentou um comportamento menos favorável no vinho rosé e mais vantajoso no vinho branco.

Efeito da imobilização celular

A comparação entre FII e FIII permitiu avaliar especificamente o efeito da imobilização celular sobre o perfil fermentativo.

Em ambas as matrizes vínicas, as leveduras imobilizadas originaram menores produções de etanol e glicerol do que as observadas para as leveduras em células livres. Este efeito foi particularmente evidente no vinho rosé, onde se verificou simultaneamente uma menor produção de metabolitos fermentativos e uma maior concentração residual de frutose.

Estas diferenças poderão estar relacionadas com limitações de transferência de massa frequentemente descritas para sistemas de imobilização celular. Segundo Genisheva et al. [64] e Kourkoutas et al. [65], a difusão de açúcares para o interior da matriz de imobilização e a remoção dos metabolitos produzidos podem condicionar a atividade metabólica das células, influenciando a produtividade fermentativa.

Apesar disso, as leveduras imobilizadas mantiveram atividade fermentativa em ambas as matrizes, como demonstrado pela produção de etanol e pelo consumo de açúcares observados. Estes resultados estão de acordo com Canonico et al. [4], que demonstraram a viabilidade da utilização de leveduras não-*Saccharomyces* imobilizadas em fermentações sequenciais, embora salientando a importância da otimização do sistema de imobilização.

Embora as leveduras imobilizadas tenham originado menores concentrações de etanol e glicerol nas condições avaliadas, a imobilização celular continua a apresentar vantagens

tecnológicas relevantes para a indústria vinícola. Entre estas destacam-se a possibilidade de recuperação e reutilização da biomassa, a simplificação das operações de separação celular após a fermentação e a maior estabilidade operacional em processos fermentativos repetidos [64, 97].

Em todas as condições avaliadas, os valores de $Y_{P/S}$ foram inferiores ao valor teórico máximo de $0,511 \text{ g g}^{-1}$ previsto para a conversão dos açúcares em etanol. Este comportamento é esperado em fermentações biológicas, uma vez que parte do carbono consumido é utilizada para a formação de biomassa celular e para a síntese de metabolitos secundários, incluindo glicerol, ácidos orgânicos e compostos aromáticos. Consequentemente, os rendimentos observados entre 78,49% e 95,39% do valor teórico encontram-se dentro da gama normalmente reportada para fermentações vínicas conduzidas por leveduras dos géneros *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*.

De forma global, os resultados demonstram que a resposta metabólica das leveduras foi fortemente influenciada pela matriz vínica e pela estratégia de inoculação utilizada. No vinho rosé, as leveduras presentes na FI apresentaram maior capacidade de conversão dos açúcares em etanol, enquanto no vinho branco as leveduras presentes na FII originaram as maiores produções de etanol e glicerol. A imobilização celular revelou-se uma estratégia tecnologicamente viável, embora os resultados sugiram que as condições utilizadas poderão ser otimizadas para melhorar o desempenho fermentativo das leveduras.

4.3 Análises Físico-Químicas

A fermentação alcoólica conduzida por diferentes espécies e estratégias de inoculação pode influenciar significativamente a composição físico-química do vinho. Para além da conversão dos açúcares em etanol e dióxido de carbono, as leveduras participam em diversos processos metabólicos que afetam o equilíbrio ácido-base, a utilização de nutrientes e a formação de compostos com impacto na estabilidade e qualidade do produto final. Assim, a avaliação dos parâmetros físico-químicos constitui uma ferramenta importante para compreender o efeito das diferentes estratégias fermentativas nas características finais dos

vinhos.

Entre os parâmetros mais relevantes, destacam-se o pH, a acidez total e a acidez volátil, uma vez que influenciam diretamente a estabilidade microbiológica, a estabilidade da cor e as propriedades sensoriais dos vinhos. O dióxido de enxofre (SO₂) desempenha igualmente um papel fundamental na proteção antioxidante e antimicrobiana, enquanto o teor de azoto residual fornece informação sobre a utilização dos nutrientes pelas leveduras ao longo da fermentação. A análise conjunta destes parâmetros permite avaliar não só a qualidade final dos vinhos, mas também identificar possíveis alterações metabólicas associadas à utilização de diferentes espécies de leveduras ou à aplicação de tecnologias como a imobilização celular.

Os resultados obtidos para os vinhos rosé e branco encontram-se apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8, respetivamente.

Tabela 4.7: Evolução dos parâmetros físico-químicos dos vinhos rosé.

Parâmetro	FI	FII	FIII
pH	3,10 ± 0,02 ^b	3,43 ± 0,05 ^a	3,40 ± 0,02 ^a
Acidez Total (g L ⁻¹)	5,34 ± 0,32 ^a	5,49 ± 0,32 ^a	4,95 ± 0,30 ^a
Acidez Volátil (g L ⁻¹)	0,49 ± 0,15 ^b	0,53 ± 0,14 ^b	1,19 ± 0,21 ^a
SO ₂ total final (mg L ⁻¹)	12,16 ± 1,28 ^a	12,22 ± 2,39 ^a	16,00 ± 2,45 ^a
Azoto residual (mg N L ⁻¹)	57,23 ± 8,81 ^a	31,33 ± 0,35 ^b	32,55 ± 3,68 ^b

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as estratégias fermentativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4.8: Evolução dos parâmetros físico-químicos dos vinhos brancos.

Parâmetro	FI	FII	FIII
pH	$2,73 \pm 0,01^c$	$3,03 \pm 0,01^b$	$3,09 \pm 0,01^a$
Acidez Total (g L^{-1})	$4,95 \pm 0,06^a$	$5,32 \pm 0,35^a$	$6,49 \pm 1,32^a$
Acidez Volátil (g L^{-1})	$0,53 \pm 0,08^b$	$0,59 \pm 0,03^b$	$0,76 \pm 0,03^a$
SO ₂ total final (mg L^{-1})	$13,44 \pm 1,28^a$	$13,44 \pm 2,45^a$	$12,16 \pm 2,45^a$
Azoto residual (mg N L^{-1})	$17,50 \pm 2,42^{ab}$	$9,98 \pm 0,67^b$	$20,13 \pm 7,48^a$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as estratégias fermentativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As estratégias de inoculação influenciaram significativamente o pH dos vinhos em ambas as matrizes.

No vinho rosé, os vinhos obtidos por inoculação sequencial (FII e FIII) apresentaram valores de pH significativamente superiores aos observados na FI, aumentando de $3,10 \pm 0,02$ para $3,43 \pm 0,05$ e $3,40 \pm 0,02$, respetivamente. Tendência semelhante foi observada no vinho branco, onde o pH aumentou de $2,73 \pm 0,01$ em FI para $3,03 \pm 0,01$ e $3,09 \pm 0,01$ em FII e FIII, respetivamente. Embora as diferenças observadas entre FII e FIII tenham sido relativamente reduzidas, os resultados sugerem que a presença inicial de *Torulaspora delbrueckii* influenciou o equilíbrio ácido-base dos vinhos.

Diferentes espécies de leveduras apresentam capacidades distintas de metabolização de ácidos orgânicos e de assimilação de nutrientes, podendo originar alterações significativas no pH final do vinho [95]. Importa salientar que o valor de pH observado no vinho branco da FI (2,73) é particularmente baixo quando comparado com os intervalos normalmente reportados para vinhos brancos secos, geralmente compreendidos entre 3,0 e 3,5 [68]. Assim, o aumento observado em FII e FIII aproximou os vinhos de valores mais frequentemente encontrados em condições enológicas normais.

Relativamente à acidez total, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as estratégias fermentativas em nenhuma das matrizes. Os valores variaram entre 4,95 e 5,49 g L⁻¹ no vinho rosé e entre 4,95 e 6,49 g L⁻¹ no vinho branco, encontrando-se dentro das gamas habitualmente reportadas para vinhos tranquilos.

Estes resultados indicam que as alterações observadas no pH não foram acompanhadas por modificações relevantes da acidez titulável. Tal comportamento evidencia que a relação entre pH e acidez total não é necessariamente direta, uma vez que o pH depende não apenas da quantidade total de ácidos presentes, mas também da sua força de dissociação e do equilíbrio químico estabelecido na matriz vínica.

A acidez volátil foi o parâmetro que apresentou maior sensibilidade à estratégia fermentativa.

Nos vinhos produzidos com células livres (FI e FII), os valores variaram entre 0,49 e 0,59 g L⁻¹, encontrando-se dentro da gama normalmente reportada para fermentações alcoólicas conduzidas em condições adequadas [100]. Por outro lado, a utilização de células imobilizadas (FIII) originou aumentos significativos da acidez volátil em ambas as matrizes. Este efeito foi particularmente evidente no vinho rosé, onde foi registado um valor de $1,19 \pm 0,21$ g L⁻¹, sugerindo uma maior produção de ácidos voláteis durante a fermentação. Embora não seja necessariamente indicativo de deterioração do vinho, este valor poderá refletir alterações metabólicas associadas à utilização de células imobilizadas ou um maior stress das leveduras durante o processo fermentativo.

Embora este valor permaneça dentro dos limites regulamentares estabelecidos pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), encontra-se próximo dos níveis a partir dos quais podem surgir defeitos sensoriais associados à presença excessiva de ácido acético. Este resultado sugere que as condições de imobilização utilizadas poderão ter induzido alterações no metabolismo fermentativo das leveduras.

Segundo Genisheva et al. [64] e Kourkoutas et al. [65], limitações na transferência de massa em sistemas de imobilização podem influenciar a difusão de nutrientes e a remoção de metabolitos, afetando o desempenho metabólico das células e favorecendo a produção de determinados compostos secundários, incluindo ácidos orgânicos voláteis.

Relativamente ao SO₂ total final, não foram observadas diferenças significativas entre as estratégias fermentativas.

Os valores variaram entre 12,16 e 16,00 mg L⁻¹ no vinho rosé e entre 12,16 e 13,44 mg L⁻¹ no vinho branco. Todos os vinhos apresentaram concentrações muito inferiores aos limites máximos estabelecidos pela legislação europeia para vinhos tranquilos (entre 150 e 200 mg L⁻¹), indicando que as diferentes estratégias fermentativas não influenciaram significativamente este parâmetro. Contudo, a eficácia antimicrobiana e antioxidante do SO₂ depende fortemente do pH, uma vez que a fração molecular biologicamente ativa diminui à medida que o pH aumenta [68].

Assim, apesar dos teores totais semelhantes, os vinhos produzidos em FI poderão apresentar uma maior proporção de SO₂ molecular e, conseqüentemente, uma proteção microbiológica superior à observada nos vinhos obtidos por inoculação sequencial.

O teor de azoto residual foi igualmente influenciado pelas estratégias fermentativas, sobretudo no vinho rosé.

Nesta matriz, os vinhos produzidos em FI apresentaram concentrações significativamente superiores às observadas em FII e FIII. Este resultado sugere uma utilização mais intensa dos compostos azotados disponíveis pelas populações de leveduras presentes nas fermentações sequenciais.

No vinho branco observou-se uma tendência semelhante, embora menos evidente, com menores concentrações residuais de azoto em FII. Estudos anteriores demonstraram que fermentações sequenciais envolvendo *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* podem alterar os padrões de assimilação de azoto devido às interações entre as espécies e à competição por nutrientes essenciais [96].

Adicionalmente, Mecca et al. [96] verificaram que a disponibilidade de nutrientes influencia significativamente a atividade metabólica de *T. delbrueckii*, bem como a produção de metabolitos de interesse enológico.

Globalmente, os resultados demonstram que as estratégias de inoculação influenciaram principalmente o pH, a acidez volátil e a utilização dos nutrientes azotados, enquanto a acidez total e os teores finais de SO₂ permaneceram relativamente estáveis.

Entre os parâmetros avaliados, a acidez volátil observada em FIII, particularmente no vinho rosé, constitui o resultado mais relevante do ponto de vista tecnológico e enológico, sugerindo que as condições de imobilização utilizadas poderão necessitar de otimização para minimizar a formação de ácidos voláteis sem comprometer as vantagens associadas à utilização de células imobilizadas.

4.4 Classificação dos Vinhos Produzidos

A classificação dos vinhos quanto ao grau de doçura foi efetuada de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) [101], considerando o teor residual de açúcares, expresso como a soma das concentrações de glucose e frutose, e a sua relação com a acidez total.

Segundo a OIV, os vinhos são classificados como secos quando apresentam um teor de açúcares residuais igual ou inferior a 4 g L^{-1} , ou até 9 g L^{-1} quando a diferença entre os açúcares residuais e a acidez total não excede 2 g L^{-1} .

Os vinhos são classificados como meio seco quando apresentam teores de açúcares superiores aos limites definidos para vinhos secos e até 12 g L^{-1} , ou até 18 g L^{-1} quando a diferença entre os açúcares residuais e a acidez total não excede 10 g L^{-1} .

Valores superiores correspondem às categorias meio doce ou doce, dependendo da concentração final de açúcares residuais. Para esta classificação, foram utilizados os teores finais de glucose e frutose determinados por HPLC (Secção 4.2) e os valores de acidez total apresentados na Secção 4.3.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Classificação dos vinhos segundo a relação entre açúcares residuais e acidez total.

Vinho	Fermentação	Glucose + frutose (g L ⁻¹)	AT (g L ⁻¹)	Classificação
Rosé	FI	15,84	5,34	Meio doce
Rosé	FII	8,92	5,49	Meio seco
Rosé	FIII	14,75	4,95	Meio seco
Branco	FI	2,13	4,95	Seco
Branco	FII	3,55	5,32	Seco
Branco	FIII	2,60	6,49	Seco

A aplicação dos critérios da OIV demonstrou que todas as fermentações realizadas no vinho branco originaram vinhos classificados como secos. Os teores residuais de glucose e frutose variaram entre 2,13 e 3,55 g L⁻¹, permanecendo abaixo do limite de 4 g L⁻¹ estabelecido para esta categoria.

Estes resultados indicam que as leveduras presentes nas diferentes estratégias fermentativas consumiram a maior parte dos açúcares fermentescíveis, independentemente da modalidade de inoculação utilizada.

Em contraste, os vinhos rosé apresentaram classificações distintas em função da estratégia fermentativa. O vinho obtido na FI foi classificado como meio doce, enquanto os vinhos produzidos em FII e FIII foram classificados como meio seco. A classificação atribuída à FI resultou da combinação entre o teor residual de açúcares e a acidez total, que excedeu os limites definidos para a categoria de vinho meio seco.

Por sua vez, os vinhos produzidos em FII e FIII apresentaram valores compatíveis com a classificação de vinho meio seco, apesar das diferenças observadas nos teores residuais de açúcares. Estes resultados evidenciam que a resposta fermentativa foi dependente da matriz vínica. Enquanto no vinho branco as leveduras reduziram os açúcares residuais para níveis compatíveis com a classificação de vinho seco em todas as condições estudadas,

no vinho rosé permaneceram concentrações mais elevadas de glucose e frutose após a fermentação.

A diferença observada entre as duas matrizes poderá estar relacionada com fatores intrínsecos do mosto, incluindo a composição inicial em açúcares, a disponibilidade de nutrientes, a composição fenólica e outros fatores que influenciam a atividade metabólica das leveduras e a eficiência da fermentação alcoólica [35].

A comparação entre FI e FII no vinho rosé demonstra que a inoculação sequencial esteve associada a uma redução do teor residual de açúcares, suficiente para alterar a classificação do vinho de meio doce para meio seco. No entanto, esta alteração deve ser interpretada como o resultado do comportamento global das populações de leveduras presentes durante a fermentação e não como consequência direta da atividade de uma espécie específica.

Por outro lado, a utilização de células imobilizadas (FIII) originou um teor residual de açúcares superior ao observado em FII, embora insuficiente para alterar a classificação final do vinho. Este resultado está de acordo com os dados apresentados anteriormente, que evidenciaram uma menor conversão dos açúcares fermentescíveis em produtos finais da fermentação nas condições de imobilização utilizadas.

De forma global, a classificação dos vinhos demonstra que as estratégias fermentativas tiveram um impacto mais pronunciado no vinho rosé do que no vinho branco. Enquanto todas as fermentações do vinho branco originaram vinhos secos, as diferenças observadas no vinho rosé conduziram à obtenção de vinhos classificados como meio seco ou meio doce.

Estes resultados evidenciam que as estratégias de inoculação influenciaram o teor residual de açúcares e, conseqüentemente, a classificação comercial dos vinhos produzidos.

4.5 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada conforme a Secção 3.9 e os resultados foram tratados estatisticamente conforme a Secção 3.10.

Embora os vinhos branco e rosé tenham apresentado diferenças em alguns parâmetros e na classificação quanto ao teor de açúcares e acidez, a análise sensorial foi realizada considerando conjuntamente os dois tipos de vinho. Esta abordagem foi adotada com o objetivo de aumentar o número de respostas por tratamento fermentativo e permitir uma avaliação sensorial global do efeito das estratégias de fermentação. Assim, os resultados sensoriais foram interpretados entre as fermentações FI, FII e FIII, sem considerar o tipo de vinho como fator independente na análise.

Os resultados obtidos para os atributos sensoriais encontram-se apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Médias dos atributos sensoriais avaliados nas diferentes fermentações.

Atributo	FI	FII	FIII
Aparência	4,40 $\pm$ 2,10 ^b	5,74 $\pm$ 2,14 ^a	5,95 $\pm$ 2,06 ^a
Aroma	4,62 $\pm$ 2,35 ^a	5,71 $\pm$ 2,21 ^a	5,76 $\pm$ 2,16 ^a
Sabor	3,24 $\pm$ 1,92 ^b	4,90 $\pm$ 2,53 ^a	5,07 $\pm$ 2,39 ^a
Acidez	3,76 $\pm$ 2,14 ^a	4,38 $\pm$ 2,38 ^a	4,57 $\pm$ 2,31 ^a
Aceitação global	3,97 $\pm$ 1,96 ^b	5,17 $\pm$ 2,30 ^a	5,31 $\pm$ 2,26 ^a

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as estratégias fermentativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

De forma geral, verificou-se que as fermentações FII (células livres) e FIII (células imobilizadas) obtiveram pontuações superiores à monoinoculação (FI) em todos os parâmetros avaliados.

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas nos atributos de aparência, sabor e aceitação global. Nestes parâmetros, a FI registou médias significativamente inferiores, enquanto as estratégias FII e FIII não apresentaram diferenças entre si, sugerindo que a introdução de *T. delbrueckii*, independentemente do seu estado de imobilização, aumentou a aceitação sensorial observada dos vinhos. No que concerne ao aroma e à

acidez, embora as pontuações tenham sido numericamente superiores para a FII e FIII, as diferenças não foram estatisticamente relevantes. Esta ausência de significância pode ser atribuída à variabilidade intrínseca de um painel de consumidores não treinados, que tende a expressar preferências globais em detrimento de uma discriminação técnica exata de atributos específicos. Em painéis de consumidores ou provadores não treinados, a escala hedônica reflete sobretudo a aceitação e a preferência global, podendo apresentar maior variabilidade individual na percepção de atributos específicos, como o aroma e a acidez. Ainda assim, a utilização de escalas hedônicas de nove pontos é amplamente empregada em estudos de aceitação sensorial de alimentos e bebidas, incluindo vinhos, por permitir avaliar, de forma simples e comparável, o grau de preferência dos provadores [102, 103].

A Figura 4.4 apresenta graficamente as médias atribuídas pelos provadores aos diferentes atributos sensoriais avaliados.

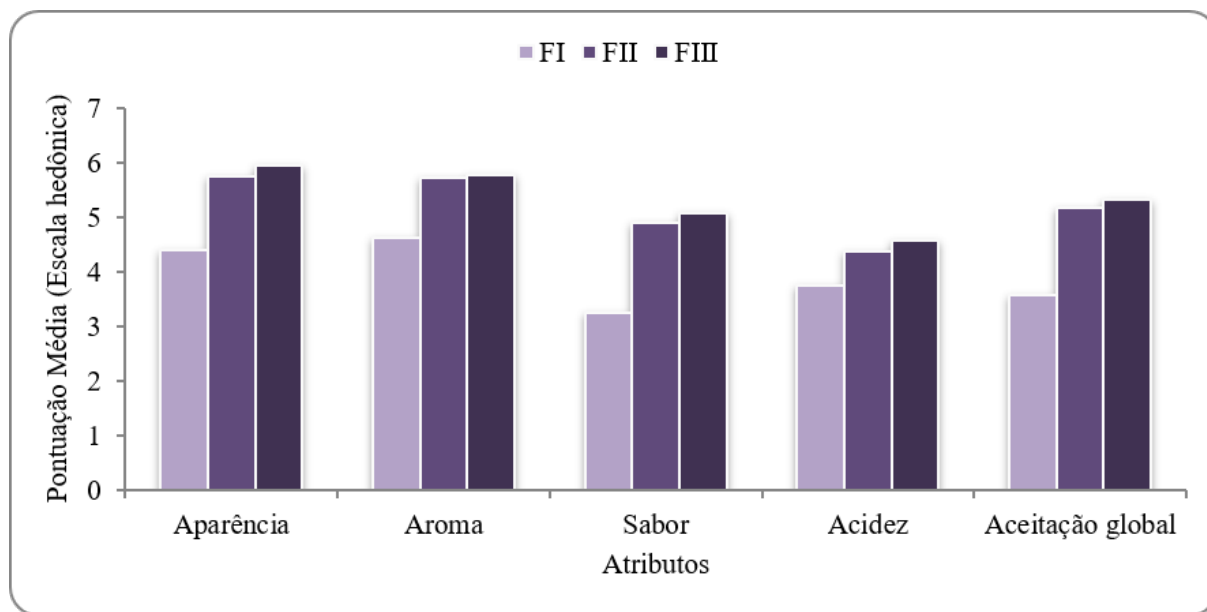


Figura 4.4: Médias dos atributos sensoriais avaliados nas três fermentações.

A aceitação global é um dos indicadores mais relevantes, pois sintetiza a harmonia visual, olfativa e gustativa do produto. A menor aceitação da FI pode estar associada a um menor equilíbrio ou a uma complexidade aromática reduzida, em comparação com as estratégias sequenciais, que, segundo a literatura, potenciam a diferenciação sensorial

dos vinhos. Esta tendência foi corroborada pelos dados de preferência direta (Figura 4.5), em que a FIII foi eleita como a amostra favorita por 50,0% dos participantes, seguida pela FII (40,5%) e, por último, pela FI (apenas 9,5%). Qualitativamente, a análise dos termos descritivos (Figura 4.6) ajuda a explicar estes resultados: enquanto a FIII foi frequentemente associada a conceitos como “cheiro agradável”, “frutado” e “equilibrado”, a FI foi predominantemente descrita como “ácida”. A percepção de uma acidez elevada, sem o devido suporte aromático, pode justificar a menor preferência pela monoinoculação (FI). Assim, os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, que descreve o potencial desta espécie de contribuir para maior complexidade e diferenciação sensorial dos vinhos quando utilizada em associação com *S. cerevisiae* [100, 104].

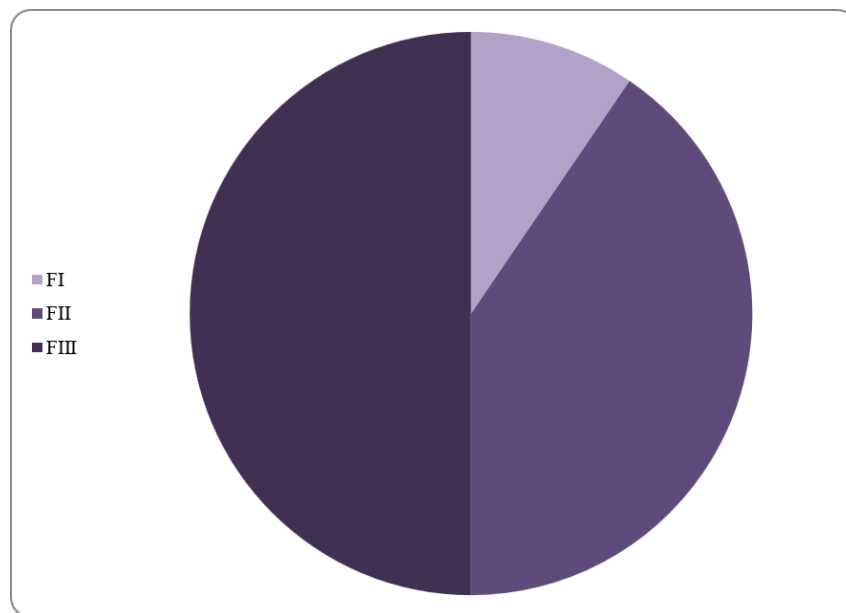


Figura 4.5: Distribuição da preferência dos provadores entre as três fermentações avaliadas.

A análise das características sensoriais atribuídas pelos participantes (Figura 4.6) também permitiu observar diferenças qualitativas entre as fermentações. A FIII foi frequentemente associada aos termos “cheiro agradável”, “frutado” e “equilibrado”, indicando uma percepção sensorial mais harmoniosa. A FII também apresentou elevada associação com “cheiro agradável” e “sabor suave”, enquanto a FI foi predominantemente associada ao

atributo “ácido”. Esta maior associação da FI à acidez pode ajudar a explicar a sua menor aceitação global, uma vez que a percepção de acidez elevada, quando não acompanhada por equilíbrio aromático e gustativo, pode reduzir a preferência do consumidor.

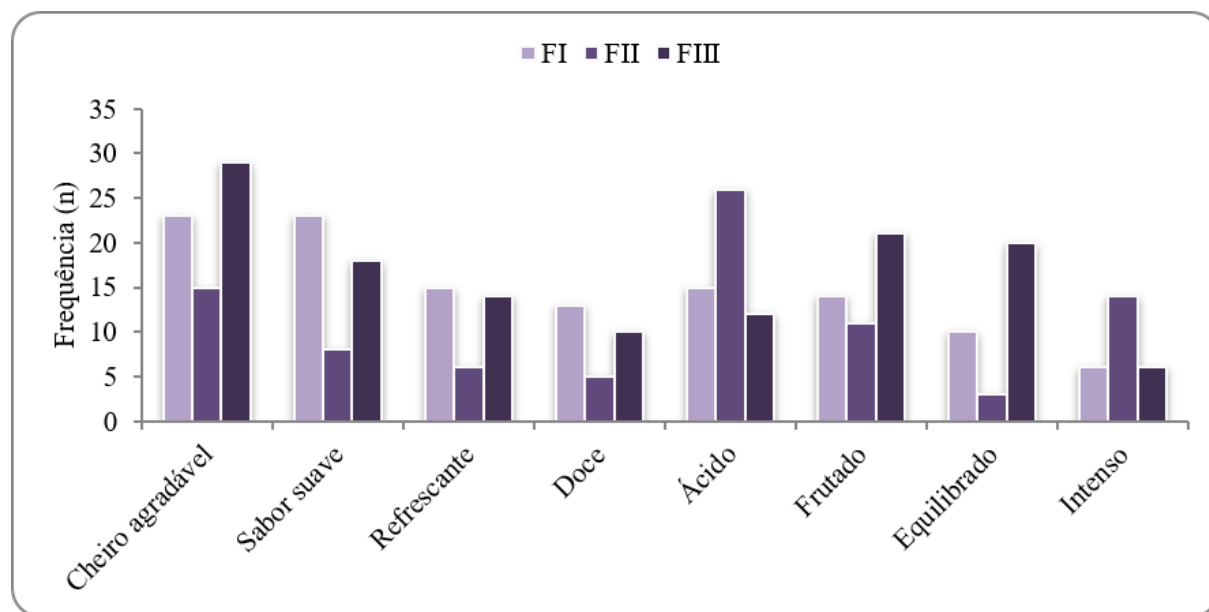


Figura 4.6: Características sensoriais atribuídas pelos provadores às três fermentações avaliadas.

Os resultados obtidos são coerentes com estudos que destacam o papel de *T. delbrueckii* na melhoria ou diferenciação do perfil sensorial de vinhos. Loira et al. [100] demonstraram que fermentações sequenciais com *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* podem influenciar a formação de compostos aromáticos e modificar a composição final dos vinhos. De forma semelhante, Zhang et al. [104] observaram que a cofermentação envolvendo *T. delbrueckii* pode originar perfis físico-químicos e aromáticos distintos, dependendo da combinação de estirpes utilizada. Além disso, Sgouros et al. [105] referem que esta espécie pode contribuir para a modulação da acidez total e volátil, o que é relevante para a percepção de frescura, equilíbrio e qualidade sensorial dos vinhos.

Embora a FIII tenha apresentado os valores numéricos mais elevados e a maior frequência de preferência, a ausência de distinção estatística face à FII obriga a interpretar estes resultados apenas como uma tendência positiva associada à imobilização celular.

A imobilização celular tem sido descrita como uma estratégia capaz de favorecer maior estabilidade operacional, elevada concentração celular, reutilização de biomassa e maior controle do processo fermentativo conforme descrito na Secção 2.9. Contudo, esta interpretação deve ser apresentada como uma tendência, e não como uma conclusão absoluta, uma vez que FII e FIII não diferiram estatisticamente entre si nos atributos avaliados.

Assim, os resultados indicam que as fermentações sequenciais com *T. delbrueckii*, tanto na forma livre quanto na imobilizada, apresentaram maior aceitação sensorial em comparação à fermentação conduzida apenas com *S. cerevisiae*. As fermentações FII e FIII resultaram em vinhos com maior aceitação global, melhor avaliação de sabor e aparência e maior frequência de preferência pelos provadores. Estes resultados sugerem que o uso de *T. delbrueckii* pode representar uma estratégia promissora para melhorar a aceitação sensorial de vinhos branco e rosé produzidos a partir de castas tradicionais. No entanto, a avaliação foi realizada com provadores não treinados e com análise conjunta dos dois tipos de vinho, o que deve ser considerado como uma limitação do estudo. Trabalhos futuros poderão incluir painéis treinados, maior número de provadores, avaliação separada por tipo de vinho e análise instrumental dos compostos voláteis, de forma a relacionar diretamente os resultados sensoriais com a composição aromática dos vinhos.

Capítulo 5

Conclusão

O presente estudo permitiu avaliar o potencial enológico de castas tradicionais na produção de vinhos branco e rosé utilizando diferentes estratégias fermentativas com *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*, em células livres e imobilizadas.

Os resultados demonstraram que as estratégias fermentativas influenciaram a cinética da fermentação, a composição físico-química e a aceitação sensorial dos vinhos, embora o efeito observado tenha sido dependente da matriz vínica.

Relativamente à cinética fermentativa, a comparação entre estratégias de inoculação evidenciou diferenças significativas na atividade metabólica das leveduras. No vinho rosé, a fermentação FI apresentou uma taxa de crescimento superior e um tempo de duplicação inferior aos observados na FII ($0,300 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ e $0,216 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$, respetivamente), o que se traduziu em maior acumulação de biomassa ao longo do processo. A imobilização celular (FIII), por sua vez, resultou em menor libertação acumulada de CO_2 em relação às células livres (FII), com reduções de aproximadamente 21% no vinho rosé e 9% no vinho branco, sugerindo uma redução da atividade fermentativa associada às limitações inerentes à transferência de massa neste sistema.

No vinho rosé, a fermentação conduzida exclusivamente por *Saccharomyces cerevisiae* apresentou a maior produção de etanol ($90,37 \pm 3,28 \text{ g L}^{-1}$, correspondente a $11,80 \pm 0,48\%$ (v/v)) e o maior rendimento fermentativo (95,39% do rendimento teórico), enquanto a utilização de células imobilizadas resultou na menor produção de etanol

(70,90 ± 1,85 g L⁻¹) e na maior concentração residual de frutose (12,77 ± 1,05 g L⁻¹).

A inoculação sequencial promoveu alterações na composição dos vinhos, contribuindo para que todos os vinhos brancos fossem classificados como secos, enquanto os vinhos rosé passaram de meio doce (FI) para meio seco (FII e FIII).

A acidez volátil foi o parâmetro mais afetado pela imobilização celular, atingindo 1,19 ± 0,21 g L⁻¹ no vinho rosé, indicando a necessidade de otimização desta estratégia.

Apesar disso, as fermentações sequenciais apresentaram maior aceitação sensorial global, evidenciando o potencial de *T. delbrueckii* para melhorar a qualidade sensorial dos vinhos produzidos com castas tradicionais.

Os resultados obtidos demonstram que a utilização desta levedura não convencional, associada à inoculação sequencial, constitui uma estratégia promissora para a diversificação e valorização da produção vitivinícola, embora estudos futuros sejam necessários para otimizar a utilização de células imobilizadas e aprofundar a compreensão dos seus efeitos na composição química e sensorial dos vinhos.

Bibliografia

- [1] R. S. Jackson, *Vineyard practice*, 5th ed. Elsevier, 2020, pp. 151–330, doi: 10.1016/b978-0-12-816118-0.00004-0.
- [2] F. Comitini, A. Agarbati, L. Canonico, and M. Ciani, “Yeast interactions and molecular mechanisms in wine fermentation: A comprehensive review”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 14, p. 7754, 2021, doi: 10.3390/ijms22147754.
- [3] S. S. T. H. Shah, I. Naeem, A. Naeem, N. K. Bhutta, and F. Noor, “Immobilization techniques for beverage production using yeast cell systems: challenges, types, and future perspectives – a mini review”, *Food and Health*, vol. 6, no. 4, p. 19, 2024, doi: 10.53388/FH2024019.
- [4] L. Canonico, L. Moretti, A. Agarbati, F. Comitini, and M. Ciani, “Free and immobilized cells of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in sparkling wine: Innovative application in secondary bottle fermentation”, *Foods*, vol. 14, no. 17, p. 3007, 2025, doi: 10.3390/foods14173007.
- [5] E. Fernández-Fernández, J. M. Rodríguez-Nogales, J. Vila-Crespo, and E. Falqué-López, “Application of immobilized yeasts for improved production of sparkling wines”, *Fermentation*, vol. 8, no. 10, p. 559, 2022, doi: 10.3390/fermentation8100559.
- [6] D. Del-Bosque, J. Vila-Crespo, V. Ruipérez, E. Fernández-Fernández, and J. M.

- Rodríguez-Nogales, “Integrated enzymatic–yeast biostrategy to obtain reduced-alcohol wine”, *Food Research International*, vol. 231, p. 118699, 2026, doi: 10.1016/j.foodres.2026.118699.
- [7] A. A. Duarte, O. T. K. Vu, A. Bressan, M. A. B. Solis, F. Roedder, B. Carrillo, A. Guedes, N. P. Nayak, M. Zifaro, D. Borer, A. V. Miranda, M. Ángel Zurita Fajardo, C. E. V. Pinaya, M. R. D. Castro, and S. Piramanayagam, “Sustainable wine and food products as precursors of sustainable wine tourism: a qualitative cross-national analysis”, *Current Issues in Tourism*, pp. 1–22, 2025, doi: 10.1080/13683500.2025.2563045.
- [8] J. Harding, J. Robinson, and T. Q. Thomas, *The Oxford companion to wine*. Oxford University Press, 2023, doi: 10.1093/acref/9780198871316.001.0001.
- [9] A. G. Reynolds, *Viticultural and vineyard management practices and their effects on grape and wine quality*. Elsevier, 2022, pp. 443–539, doi: 10.1016/B978-0-08-102067-8.00012-9.
- [10] International Organisation of Vine and Wine, “World wine production outlook 2025”, https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_2025_World_Wine_Production_Outlook.pdf, International Organisation of Vine and Wine, Dijon, Tech. Rep., 2025, acedido em 8 de fevereiro de 2026.
- [11] —, “International standards and guidelines for vine and wine sector”, <https://www.oiv.int/what-we-do/standards>, International Organisation of Vine and Wine (OIV), Paris, Tech. Rep., 2025, acedido em 8 de fevereiro de 2026.
- [12] —, “State of the world wine sector in 2025”, https://www.oiv.int/sites/default/files/2026-05/OIV-State_of_the_World_Wine_Sector_in_2025_0.pdf, International Organisation of Vine and Wine, Tech. Rep., 2025, acedido em 8 de fevereiro de 2026.

- [13] R. Gaudencio, “Portugal é o país do mundo que consome mais vinho per capita”, <https://www.publico.pt/2023/05/12/sociedade/noticia/portugal-pais-mundo-consome-vinho-capita-2049435>, Jornal Público, Tech. Rep., 2023, acedido em 8 de fevereiro de 2026.
- [14] D. A. Würz and A. F. Brighenti, “Analysis of brazilian wine competitiveness”, *BIO Web of Conferences*, vol. 12, p. 03015, 2019, doi: 10.1051/bioconf/20191203015.
- [15] V. Zanella, “Brazilian sparkling wine exports exceed 930 kl in 2021”, <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/68396017/brazilian-sparkling-wine-exports-exceed-930-kl-in-2021>, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Tech. Rep., 2022, acedido em 04 de abril de 2026.
- [16] A. Balmaseda, A. Martín-García, M. Ángel Leal, N. Rozès, A. Bordons, and C. Reguant, “Non-Saccharomyces as a tool for modulating wine quality and stimulating malolactic fermentation”, *IVES Technical Reviews*, vol. 59, no. 1, pp. 1–15, 2021, doi: 10.20870/IVES-TR.2021.4661.
- [17] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, “Regulamento (ue) nº1308/2013”, <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2013/1308/oj>, União Europeia, Bruxelas, Tech. Rep., 2013, acedido em 15 de agosto de 2025.
- [18] Instituto da Vinha e do Vinho, “Estatística: setor vitivinícola”, <https://www.ivv.gov.pt/np4/estatistica/>, 2024, acedido em 23 de janeiro de 2026.
- [19] Wines of Portugal, “Estilos de vinhos”, <https://www.winesofportugal.com/>, 2025, acedido em 19 de agosto de 2025.
- [20] Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, “Caderno de especificações do “vinho verde” PDO”, https://www.ivv.gov.pt/np4/%7B%24clientServletPath%7D/?fileName=DO_Vinho_Verde___Cad._Especif._CVRVV_1901.pdf&newsId=8617, 2024, acedido em 12 de janeiro de 2026.

- [21] Instituto da Vinha e do Vinho, “Castas”, <https://www.ivv.gov.pt/np4/castas.html>, 2024, acedido em 10 de julho de 2026.
- [22] ViniPortugal, “Portuguese grape varieties”, <https://winesofportugal.com/en/grape-varieties/>, 2024, acedido em 10 de julho de 2026.
- [23] International Organisation of Vine and Wine (OIV), “State of the world vine and wine sector in 2023”, <https://www.oiv.int/>, 2024, acedido em 10 de julho de 2026.
- [24] M. Borghezán, “Formação e maturação da uva e os efeitos sobre os vinhos: Revisão”, *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, vol. 32, no. 2, pp. 126–141, 2017, doi: 10.1051/ctv/20173202126.
- [25] M. Christmann and M. Freund, *Advances in grape processing equipment*. Elsevier, 2022, pp. 661–704, doi: 10.1016/B978-0-08-102067-8.00007-5.
- [26] B. W. Zoecklein and B. H. Gump, *Practical methods of evaluating grape quality and quality potential*. Elsevier, 2022, pp. 135–185, doi: 10.1016/B978-0-08-102067-8.00003-8.
- [27] A. Razungles, *1 - Extraction technologies and wine quality*, 2nd ed. Woodhead Publishing, 2022, pp. 3–41, doi: 10.1016/B978-0-08-102065-4.00009-2.
- [28] E. F. M. Ribeiro, “Controlo microbiológico na produção de vinhos: estudo de caso numa adega da região demarcada do dão”, Dissertação de Mestrado, Politécnico de Coimbra, 2023, acedido em 15 de janeiro de 2026. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/10400.26/49501>
- [29] X. Feng, Y. Dong, Y. Feng, A. Zhang, Z. Huang, S. Wang, and D. Niu, “Recent advances in physical-chemical methods as alternatives to SO₂ for winemaking: Principles, challenges and perspectives”, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 97, p. 103839, 2024, doi: 10.1016/j.ifset.2024.103839.

- [30] F. Tedesco, G. Siesto, R. Pietrafesa, P. Romano, R. Salvia, C. Scieuzo, P. Falabella, and A. Capece, “Chemical methods for microbiological control of winemaking: An overview of current and future applications”, *Beverages*, vol. 8, no. 3, p. 58, 2022, doi: 10.3390/beverages8030058.
- [31] L. Monnin, T. Nidelet, J. Noble, and V. Galeote, “Insights into intraspecific diversity of central carbon metabolites in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation”, *Food Microbiology*, vol. 121, p. 104513, 2024, doi: 10.1016/j.fm.2024.104513.
- [32] G. Specht, *2 - Improving yeast and fermentation management*, 2nd ed. Woodhead Publishing, 2022, pp. 43–75, doi: 10.1016/B978-0-08-102065-4.00007-9.
- [33] A. Lonvaud-Funel, *4 - Malolactic fermentation and its effects on wine quality and safety*, 2nd ed. Woodhead Publishing, 2022, pp. 105–139, doi: 10.1016/B978-0-08-102065-4.00008-0.
- [34] W. J. du Toit and J. L. Aleixandre-Tudo, *9 - Microoxygenation: Effect on wine composition and quality*, 2nd ed. Woodhead Publishing, 2022, pp. 303–330, doi: 10.1016/B978-0-08-102065-4.00012-2.
- [35] R. S. Jackson, *Fermentation*, 5th ed. Elsevier, 2020, pp. 461–572, doi: 10.1016/B978-0-12-816118-0.00007-6.
- [36] B. Kemp, M. Marangon, A. Curioni, E. Waters, and R. Marchal, *8 - New directions in stabilization, clarification, and fining*, 2nd ed. Woodhead Publishing, 2022, pp. 245–301, doi: 10.1016/B978-0-08-102065-4.00002-X.
- [37] J. Goode, *10 - Alternatives to cork in wine bottle closures*, 2nd ed. Woodhead Publishing, 2022, pp. 331–345, doi: 10.1016/B978-0-08-102065-4.00033-X.
- [38] V. Jiranek, “The prospect of superior yeast for winemaking: recent successes through bioprospecting”, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 90, p. 103200, 2024, doi: 10.1016/j.copbio.2024.103200.

- [39] C. Aires, R. Maioto, A. Inês, A. A. Dias, P. Rodrigues, C. Egas, and A. Sampaio, “Microbiome and microbiota within wineries: A review”, *Microorganisms*, vol. 13, no. 3, p. 538, 2025, doi: 10.3390/microorganisms13030538.
- [40] B. Bagheri, F. F. Bauer, and M. E. Setati, “The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, p. 1988, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01988.
- [41] N. Villar, F. Pérez-Nevado, A. I. Andrés, J. García-Parra, M. Ramírez, M. E. Valdés, and D. Moreno, “Influence of yeast inoculum (*Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*) on the production of rosé wines from high hydrostatic pressure-treated musts”, *European Food Research and Technology*, vol. 251, no. 3, pp. 467–482, 2025, doi: 10.1007/s00217-024-04646-1.
- [42] Y. Wang, X. Y. Qi, Y. Fu, Q. Zhang, X. H. Wang, M. Y. Cui, Y. Y. Ma, and X. L. Gao, “Effects of *Torulaspora delbrueckii* co-fermented with *Saccharomyces cerevisiae* on physicochemical and aromatic profiles of blueberry fermented beverage”, *Food Chemistry*, vol. 409, p. 135284, 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135284.
- [43] J. M. Muñoz-Redondo, B. Puertas, E. Cantos-Villar, M. J. Jiménez-Hierro, M. Carbú, C. Garrido, M. J. Ruiz-Moreno, and J. M. Moreno-Rojas, “Impact of sequential inoculation with the Non-*Saccharomyces t. delbrueckii* and *m. pulcherrima* combined with *Saccharomyces cerevisiae* strains on chemicals and sensory profile of rosé wines”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 69, no. 5, pp. 1598–1609, 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.0c06970.
- [44] I. Belda, J. Ruiz, B. Beisert, E. Navascués, D. Marquina, F. Calderón, D. Rauhut, S. Benito, and A. Santos, “Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-sh and 4-msp) release in wine sequential fermentations”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 257, pp. 183–191, 2017, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028.

- [45] L. Canonico, F. Comitini, L. Oro, and M. Ciani, “Sequential fermentation with selected immobilized Non-Saccharomyces yeast for reduction of ethanol content in wine”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 278, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00278.
- [46] L. Granchi, F. Patrignani, A. Bianco, G. Braschi, M. Budroni, L. Canonico, A. Capece, A. Cauzzi, M. Ciani, F. Chinnici, V. Civa, L. Cocolin, P. Domizio, V. Englezos, N. Francesca, C. Gerardi, F. Grieco, R. Lanciotti, S. Mangani, C. Montanini, V. Naselli, G. Perpetuini, R. Pietrafesa, A. Racioppo, G. Siesto, R. Tofalo, A. Bevilacqua, and P. Romano, “Comparison between *Metschnikowia pulcherrima* and *Torulaspora delbrueckii* used in sequential wine fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 16, p. 1590561, 2025, doi: 10.3389/fmicb.2025.1590561.
- [47] R. Binati, W. J. F. Lemos Junior, D. Slaghenaufl, M. Ugliano, and S. Torriani, “Contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine volatile and sensory diversity: A review”, *Foods*, vol. 8, no. 11, p. 559, 2019, doi: 10.3390/foods8110559.
- [48] International Organisation of Vine and Wine, “Guidelines for the characterization of wine yeasts of the genus *Saccharomyces* isolated from vitivinicultural environments: Resolution OIV-OENO 370-2012”, <https://www.oiv.int/public/medias/1429/oiv-oeno-370-2012-en.pdf>, International Organisation of Vine and Wine, Tech. Rep., 2012, acedido em 09 de maio de 2026.
- [49] S. Orlić, S. Redžepović, A. Jeromel, S. Herjavec, and L. Iacumin, “Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from kutjevo wine growing area at the laboratory scale”, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, vol. 70, no. 4, pp. 95–99, 2005.
- [50] L. Li, C. Yuan, L. Zhang, R. Chu, Q. Yu, J. Cai, T. Yang, and M. Zhang, “The impact of simultaneous inoculation with *Torulaspora delbrueckii* and *Hanseniaspora uvarum* combined with *Saccharomyces cerevisiae* on chemical and sensory quality

- of Sauvignon blanc wines”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 15, p. 1413650, 2024, doi: 10.3389/fmicb.2024.1413650.
- [51] M. Ramírez and R. Velázquez, “The yeast *Torulaspora delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking”, *Fermentation*, vol. 4, no. 4, p. 94, 2018, doi: 10.3390/fermentation4040094.
- [52] M. Azzolini, E. Tosi, M. Lorenzini, F. Finato, and G. Zapparoli, “Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 31, pp. 277–293, 2015, doi: 10.1007/s11274-014-1774-1.
- [53] P. Taillandier, Q. P. Lai, A. Julien-Ortiz, and C. Brandam, “Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, pp. 1959–1967, 2014, doi: 10.1007/s11274-014-1618-z.
- [54] S.-J. Bell and P. A. Henschke, “Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine”, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 11, no. 3, pp. 242–295, 2005, doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x.
- [55] L. F. Bisson, “Stuck and sluggish fermentations”, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 50, no. 1, pp. 107–119, 1999, doi: 10.5344/ajev.1999.50.1.107.
- [56] M. Bely, J.-M. Sablayrolles, and P. Barre, “Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions”, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 70, no. 4, pp. 246–252, 1990, doi: 10.1016/0922-338X(90)90057-4.
- [57] C. Varela, F. Pizarro, and E. Agosin, “Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 6, pp. 3392–3400, 2004, doi: 10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004.

- [58] P. Maisonnave, I. Sanchez, V. Moine, S. Dequin, and V. Galeote, “Stuck fermentation: Development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 163, no. 2–3, pp. 239–247, 2013, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.004.
- [59] M. Ugliano, P. A. Henschke, M. J. Herderich, and I. S. Pretorius, “Nitrogen management is critical for wine flavour and style”, https://fenix.isa.ulisboa.pt/downloadFile/563022967865357/AWRI_nitrogen_management_report_22.pdf, Tech. Rep. 6, 2007, acedido em 25 de abril de 2026.
- [60] Australian Wine Research Institute, “Yeast assimilable nitrogen (YAN)”, https://www.awri.com.au/information_services/information-packs/information-pack-yeast-assimilable-nitrogen/, 2024, acedido em 28 de março de 2026.
- [61] A. Gobert, R. Tourdot-Maréchal, C. Sparrow, C. Morge, and H. Alexandre, “Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation”, *Food Microbiology*, vol. 63, pp. 71–79, 2017, doi: 10.1016/j.fm.2016.10.009.
- [62] V. Gerbi and C. D. Paolis, “The effects of climate change on wine composition and winemaking processes”, *Italian Journal of Food Science*, vol. 37, no. 1, pp. 246–260, 2025, doi: 10.15586/ijfs.v37i1.2775.
- [63] J. Moreno-García, T. García-Martínez, J. C. Mauricio, and J. Moreno, “Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: Actual trends and future perspectives”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, p. 241, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00241.
- [64] Z. Genisheva, J. M. Oliveira, and J. A. Teixeira, “Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking”, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 40, no. 1, pp. 33–47, 2014, doi: 10.1016/j.tifs.2014.07.009.

- [65] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I. M. Banat, R. Marchant, and A. A. Koutinas, “Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review”, *Food Microbiology*, vol. 21, no. 4, pp. 377–397, 2004, doi: 10.1016/j.fm.2003.10.005.
- [66] Z. Genisheva, A. Mota, S. I. Mussatto, J. M. Oliveira, and J. A. Teixeira, “Integrated continuous winemaking process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells”, *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 1, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1016/j.procbio.2013.10.005.
- [67] A. Morata, *White wine technology*. Academic Press, 2022, doi: 10.1016/C2020-0-00376-2.
- [68] R. S. Jackson, *Chemical constituents of grapes and wine*, 5th ed. Elsevier, 2020, pp. 375–459, doi: 10.1016/b978-0-12-816118-0.00006-4.
- [69] B. A. Prior, T. H. Toh, N. Jolly, C. Baccari, and R. K. Mortimer, “Impact of yeast breeding for elevated glycerol production on fermentative activity and metabolite formation in chardonnay wine”, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 1999, doi: 10.21548/21-2-2218.
- [70] F. Remize, J.-L. Roustan, J.-M. Sablayrolles, P. Barre, and S. Dequin, “Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 1, pp. 143–149, 1999, doi: 10.1128/AEM.65.1.143-149.1999.
- [71] A. Escudero, E. Bueno-Aventín, I. Ontañón, P. Fernández-Zurbano, and V. Ferreira, “The role of polyphenols in oxygen consumption and in the accumulation of acetaldehyde and strecker aldehydes during wine oxidation”, *Food Chemistry*, vol. 466, p. 142242, 2025, doi: 10.1016/j.foodchem.2024.142242.

- [72] D. Zhang, Z. Wei, Y. Han, Y. Duan, B. Shi, and W. Ma, “A review on wine flavour profiles altered by bottle aging”, *Molecules*, vol. 28, no. 18, p. 6522, 2023, doi: 10.3390/molecules28186522.
- [73] C. A. N. Alves, A. C. T. C. T. Biasoto, G. D. S. Nunes, H. O. do Nascimento, R. F. do Nascimento, I. G. Oliveira, P. C. de Souza Leão, and L. B. de Vasconcelos, “Exploring the impact of elevated pH and short maceration on the deterioration of red wines: physical and chemical perspectives”, *OENO One*, vol. 59, no. 1, 2025, doi: 10.20870/oeno-one.2025.59.1.8111.
- [74] G. A. Cojocar and A. O. Antoce, “Sensory evaluation of sweet wines produced by stopping fermentation with octanoic and decanoic acids”, *Beverages*, vol. 11, no. 2, p. 34, 2025, doi: 10.3390/beverages11020034.
- [75] M. A. Paissoni, G. Motta, S. Giacosa, L. Rolle, V. Gerbi, and S. R. Segade, “Mouth-feel subqualities in wines: A current insight on sensory descriptors and physical-chemical markers”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 22, no. 4, pp. 3328–3365, 2023, doi: 10.1111/1541-4337.13184.
- [76] M. Noviello, C. Antonino, G. Gambacorta, V. M. Paradiso, and F. Caponio, “Use of vine-shoots stilbene extract to the reduction of SO₂ in red and rosé italian wine: Effect on phenolic, volatile, and sensory profiles”, *Heliyon*, vol. 10, no. 14, p. e34310, 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e34310.
- [77] M. T. Lisanti, G. Blaiotta, C. Nioi, and L. Moio, “Alternative methods to SO₂ for microbiological stabilization of wine”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 18, no. 2, pp. 455–479, 2019, doi: 10.1111/1541-4337.12422.
- [78] M. I. Weibel, “Química del dióxido de azufre en el vino”, <https://t-d-i.es/quimica-del-dioxido-de-azufre-en-el-vino/>, 2023, acedido em 30 de maio de 2026.
- [79] Lallemend Oenology, “Lalvin QA23™ technical data sheet”, <https://products.lallemendwine.com/storage/files/wine-yeasts/>

- 145-technical-datasheet-au-1719984296.pdf, Lallemand Oenology, Tech. Rep., 2023, acedido em 5 de março de 2026.
- [80] —, “LEVEL2 BIODIVA™ technical data sheet”, <https://products.lallemandwine.com/storage/files/wine-yeasts/170-technical-datasheet-br-1724404019.pdf>, Lallemand Oenology, Tech. Rep., 2024, acedido em 5 de março de 2026.
- [81] F. R. Pinu, L. Stuart, T. Topal, A. Albright, D. Martin, and C. Grose, “The effect of yeast inoculation methods on the metabolite composition of Sauvignon blanc wines”, *Fermentation*, vol. 9, no. 8, p. 759, 2023, doi: 10.3390/fermentation9080759.
- [82] B. Kuchen, É. Y. Ocampo, L. P. Pedrozo, Y. P. Maturano, G. J. E. Scaglia, and F. Vazquez, “Modelling sequential co-inoculation of a non-conventional biocontrol yeast and *Saccharomyces cerevisiae* in wine”, *OENO One*, vol. 59, no. 4, p. 9412, 2025, doi: 10.20870/oeno-one.2025.59.4.9412.
- [83] T. Horváth, S. Kun, L. Sipos, and D. T. Pham, “Automated monitoring of alcoholic fermentation: trends and challenges”, *Journal of Food Science and Technology*, vol. 63, no. 2, pp. 224–237, 2026, doi: 10.1007/s13197-025-06528-0.
- [84] F. Coppola, B. Testa, R. Cozzolino, J. Karaulli, G. Pannella, M. D. Renzo, C. Matarazzo, M. Succi, and M. Iorizzo, “Effects of inoculation timing and mixed fermentation with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and sensory properties of falanghina wine”, *European Food Research and Technology*, vol. 251, no. 7, pp. 1699–1717, 2025, doi: 10.1007/s00217-025-04730-0.
- [85] F. Bianchi, M. Avesani, M. Lorenzini, G. Zapparoli, and B. Simonato, “Fermentation performances and aroma contributions of selected Non-*Saccharomyces* yeasts for cherry wine production”, *Foods*, vol. 13, no. 15, p. 2455, 2024, doi: 10.3390/foods13152455.

- [86] M. Castellari, A. Versari, U. Spinabelli, S. Galassi, and A. Amati, “An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 23, no. 13, pp. 2047–2056, 2000, doi: 10.1081/JLC-100100472.
- [87] International Organisation of Vine and Wine, “Dosage of sugars by HPLC (Type-II)”, <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-1-sugars/dosage-of-sugars-by-hplc-%28type-ii%29>, International Organisation of Vine and Wine, Tech. Rep., 2024, acedido em 5 de março de 2026.
- [88] —, “Compendium of international methods of analysis of wines and musts”, https://www.oiv.int/sites/default/files/publication/2024-06/Compendium%20MA%20Wines%202024%20EN%20complet_0.pdf, International Organisation of Vine and Wine, Tech. Rep., 2024, acedido em 5 de março de 2026.
- [89] J. Li, M. Yuan, N. Meng, H. Li, J. Sun, and B. Sun, “Influence of nitrogen status on fermentation performances of Non-Saccharomyces yeasts: a review”, *Food Science and Human Wellness*, vol. 13, no. 2, pp. 556–567, 2024, doi: 10.26599/FSHW.2022.9250050.
- [90] S. E. Kemp, T. Hollowood, and J. Hort, *Sensory Evaluation: A Practical Handbook*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009, doi: 10.1002/9781118688076.
- [91] N. Mammasse and P. Schlich, “Adequate number of consumers in a liking test. insights from resampling in seven studies”, *Food Quality and Preference*, vol. 31, pp. 124–128, 2014, doi: 10.1016/j.foodqual.2012.01.009.
- [92] P. Renault, J. Coulon, G. de Revel, J.-C. Barbe, and M. Bely, “Increase of fruity aroma during mixed T. delbrueckii/S. cerevisiae wine fermentation is linked to specific esters enhancement”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 207, pp. 40–48, 2015, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037.

- [93] M. Bely, P. Stoeckle, I. Masneuf-Pomarède, and D. Dubourdieu, “Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 122, no. 3, pp. 312–320, 2008, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023.
- [94] G. H. Fleet, “Wine yeasts for the future”, *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 7, pp. 979–995, 2008, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x.
- [95] N. P. Jolly, C. Varela, and I. S. Pretorius, “Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered”, *FEMS Yeast Research*, vol. 14, no. 2, pp. 215–237, 2014, doi: 10.1111/1567-1364.12111.
- [96] D. Mecca, S. Benito, B. Beisert, S. Brezina, S. Fritsch, H. Semmler, and D. Rauhut, “Influence of nutrient supplementation on *Torulaspora delbrueckii* wine fermentation aroma”, *Fermentation*, vol. 6, no. 1, p. 35, 2020, doi: 10.3390/fermentation6010035.
- [97] P. J. Verbelen, D. P. De Schutter, F. Delvaux, K. J. Verstrepen, and F. R. Delvaux, “Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications”, *Biotechnology Letters*, vol. 28, no. 19, pp. 1515–1525, 2006, doi: 10.1007/s10529-006-9132-5.
- [98] M. Ciani and L. Ferraro, “Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines”, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 85, no. 2, pp. 247–254, 1998, doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00485.x.
- [99] I. Belda, J. Ruiz, A. Alastruey-Izquierdo, E. Navascués, D. Marquina, and A. Santos, “Unraveling the enzymatic basis of wine “flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 12, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00012.
- [100] I. Loira, R. Vejarano, M. A. Bañuelos, A. Morata, W. Tesfaye, C. Uthurry, A. Villa,

- I. Cintora, and J. A. Suárez-Lepe, “Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality”, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 59, pp. 915–922, 2014, doi: 10.1016/j.lwt.2014.06.019.
- [101] International Organisation of Vine and Wine, “International standard for the labelling of wines”, https://www.oiv.int/sites/default/files/publication/2024-03/OIV-%20Wine%20labelling%20Standard%20EN_2024%20final%20.pdf, International Organisation of Vine and Wine, Tech. Rep., 2024, acedido em 18 de fevereiro de 2026.
- [102] N. D. M. Villanueva, A. J. Petenate, and M. A. A. P. D. Silva, “Performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps”, *Food Quality and Preference*, 2009, doi: 10.1016/j.foodqual.2008.06.003.
- [103] M. A. Cliff, M. C. King, and J. Schlosser, “Influence of wine education on wine hedonic and confidence ratings by millennial consumers of different ethnicities”, *Beverages*, vol. 2, no. 4, p. 32, 2016, doi: <https://doi.org/10.3390/beverages2040032>.
- [104] B.-Q. Zhang, Y. Luan, C.-Q. Duan, and G.-L. Yan, “Use of *Torulaspora delbrueckii* co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* strains with different aromatic characteristic to improve the diversity of red wine aroma profile”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, p. 606, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00606.
- [105] G. Sgouros, A. Mallouchos, D. Dourou, G. Banilas, I. Chalvantzi, Y. Kourkoutas, and A. Nisiotou, “*Torulaspora delbrueckii* may help manage total and volatile acidity of santorini-assyrtiko wine in view of global warming”, *Foods*, vol. 12, no. 1, p. 191, 2023, doi: 10.3390/foods12010191.