



**DANIELE RODRIGUES**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PRÁTICAS VITICULTURAIS SOBRE  
A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E A FORMAÇÃO DE COMPOSTOS  
DE AROMA EM CULTIVARES *Vitis vinifera***

**CAMPINAS**

**2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DANIELE RODRIGUES**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PRÁTICAS VITICULTURAIS SOBRE A  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E A FORMAÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA  
EM CULTIVARES *Vitis vinifera***

**Orientadora: Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy**

**Co-orientador: Prof. Dr. Roger Wagner**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELE RODRIGUES E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. HELENA TEIXEIRA GODOY**

Assinatura da Orientadora

---

**CAMPINAS**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

R618i Rodrigues, Daniele  
Influência de diferentes práticas vitícolas sobre a  
fermentação alcoólica e a formação de compostos de  
aroma em cultivares *Vitis vinifera* / Daniele Rodrigues. --  
Campinas, SP: [s.n], 2013.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.  
Coorientador: Roger Wagner.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Vitis vinifera*. 2. Nitrogênio. 3. Vinho e  
vinificação. 4. Compostos voláteis. I. Godoy, Helena  
Teixeira. II. Wagner, Roger. III. Universidade Estadual  
de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Influence of different viticultural practices in the alcoholic  
fermentation and the formation of aroma compounds in cultivars *Vitis vinifera*

Palavras-chave em inglês:

*Vitis vinifera*

Nitrogen

Wine and wine making

Volatile compounds

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Adriana Dillenburg Meinhart

Juliana Azevedo Lima Pallone

Sandra Valduga Dutra

Stanislau Bogusz Junior

Data da defesa: 02/08/2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy  
Orientadora

---

Dra. Adriana Dillenburg Meinhart  
Membro Titular  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

---

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone  
Membro Titular  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

---

Dra. Sandra Valduga Dutra  
Membro Titular  
Instituto Brasileiro do Vinho – IBRAVIN

---

Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior  
Membro Titular  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM



---

Prof. Dr. Claudio Luis Messias  
Membro Suplente  
Faculdade de Engenharia Agrícola – UNICAMP

---

Dra. Merenice Roberto Sobrinho  
Membro Suplente  
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI

---

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar  
Membro Suplente  
Universidade Estadual de São Paulo – ESALQ/USP





"Consulte não a seus medos, mas a suas esperanças e sonhos.  
Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não usado. Preocupa-se não  
com o que você tentou e falhou, mas com aquilo que ainda é possível a você fazer".

Papa João XXIII



Dedico este trabalho  
aos meus grandes amores,  
meus pais Nelson e Clélia,  
pelo imenso amor, companheirismo,  
oportunidade e credibilidade ao longo  
de minha formação acadêmica.



## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Ciência de Alimentos, por possibilitar a realização desse trabalho.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa, tanto no Brasil quanto na França.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Teixeira Godoy, orientadora e incentivadora deste trabalho, pela acolhida em seu laboratório, dedicação, apoio e amizade, minha sincera gratidão.

Ao Prof. Dr. Roger Wagner, co-orientador deste trabalho, pela orientação, dedicação, amizade e incentivo, mesmo estando longe conseguiu estar presente o tempo todo.

Aos Profs. Drs. Gilles de Revel e Jean-Christophe Barbe, pela acolhida em seus laboratórios no Instituto de Ciência da Uva e do Vinho, em Bordeaux (França), pela confiança, credibilidade, apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Marine Bely, por possibilitar a realização das microvinificações das uvas colhidas na França em seu laboratório.

À Profa. Dra. Stephanie Marchand, pela permissão das análises de aminoácidos dos mostos franceses em seu laboratório.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore, do Laboratório de Bioaromas, pela permissão da utilização de seu cromatógrafo à gás para a realização de alguns testes.

À banca examinadora, pelas valiosas correções, sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos fornecedores de uvas Rodrigo Veraldi (Campos do Jordão) e Mario Augusto Albuquerque (São Bento do Sapucaí) e aos Châteaux Cheval Blanc e Haut-Brion, por ceder gentilmente as amostras utilizadas no trabalho.

À EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) pelas vinificações das amostras de uvas colhidas no Brasil.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, Ana Cecília, Elede, Daniela Pane, Merenice, Romina, Carlos, Pollyane, Adriana, Cristiano, Francisco, Celma, Marla, Sabrina,



Janclei, Elenice, Daniela Neves, Tayse, Thaís, Maria Rosa, Leonardo, Daniela Ferreira, Gislaine, Ana Alice, Natalia, Renata, Marcela e Miriam, pelas horas de descontração, ajuda, amizade e que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Às amigas Vivian Bochi, Milene e Paula, em especial, do Laboratório de Análise de Alimentos, pelas divertidas horas de trabalho que se estendiam madrugada adentro, sempre com muita descontração e muito solvente! Obrigada pela amizade sincera, companheirismo, ajuda, paciência, compreensão e por compartilharem comigo os problemas, as alegrias e as bebedeiras, afinal ninguém é de ferro!

Aos amigos Stanislau, Carolina e Wellington, do Laboratório de Análise de Alimentos, pela ajuda com o cromatógrafo à gás, tudo o que eu sei hoje é um pouquinho do que cada um de vocês me ensinou.

Aos amigos Gustavo e Mariana, do Laboratório de Bioaromas, por dividirem o uso do cromatógrafo à gás do Laboratório de Bioaromas, pela amizade e pelo apoio.

Aos amigos Mateus e Juzinha, do Laboratório de Análise de Alimentos, pela ajuda com os tratamentos estatísticos dos meus dados.

Aos amigos Pati Schons, Dani gaúcha, Renata, Leandra, Eliza, Georgia, Márcio alemão, Camilo, Zé, Aninha Augusta, Edi Franciele, Vivi Toretto, Joyce, Ana Luíza, Fabiano e tantos outros, por tornarem minha vida em Campinas mais divertida.

Aos amigos do Instituto de Ciência da Uva e do Vinho (França) Julie, Guilherme, Maroula, Kleopatra, Marine, Guillaume, Sophie, Davide, Fety, Jullian, Mariette, Stephanie, Alexandra, Juliette, Marion, Maria e Gregory, pela acolhida, amizade, apoio e por todas as horas de descontração.

Aos amigos e técnicos do Instituto de Ciência da Uva e do Vinho (França), Laurent e Marie Claire, por todos os ensinamentos, ajuda, paciência e amizade.

À amiga Maria José, do Instituto de Ciência da Uva e do Vinho (França), pela amizade e pelos ensinamentos para a realização das microvinificações das amostras de uvas da França.

Às amigas Pawinee e Eujin, em especial, do Instituto de Ciência da Uva e do Vinho





(França), que me acolheram na França como uma família, pela amizade e pelo carinho.

À amiga Vivian Burin, também em especial, que foi como uma irmã para mim na França, com quem puder contar e confiar, pela amizade, ajuda, carinho e ombro amigo.

Ao meu namorado Rodolfo Costa, pelo apoio, amizade, carinho, por sempre tornar meus dias mais felizes e por ter me ajudado a descascar as uvas na França.

A todos os meus amigos e amigas, pelo apoio, compreensão, incentivo e palavras de carinho que não me deixaram cair no decorrer destes anos.

À minha família, pelo amor, carinho, apoio e incentivo durante todos esses anos, sem eles eu não teria conseguido.

À Deus, por sempre me conduzir por caminhos abençoados, obrigada!

Daniele Rodrigues



## ÍNDICE GERAL

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xxxI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxxv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxxix</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1:</b>	
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
1. A fermentação alcoólica nos vinhos.....	13
1.1. Fatores que influenciam a fermentação alcoólica.....	15
1.1.1. O metabolismo do nitrogênio.....	18
2. O <i>bouquet</i> dos vinhos.....	19
2.1. Compostos voláteis derivados da uva.....	20
2.2. Compostos voláteis derivados da fermentação do vinho.....	21
2.2.1. Os álcoois superiores.....	22
2.2.2. Os ésteres.....	23
2.3. Compostos voláteis <i>off-flavours</i> .....	29
2.3.1. As metoxipirazinas.....	29
2.3.1.1. Fatores que influenciam a presença de metoxipirazinas nas uvas e nos vinhos.....	31
2.3.1.1.1. Maturação das uvas na época da colheita.	31
2.3.1.1.2. Clima e solo.....	32
2.3.1.1.3. Práticas agronômicas.....	33
3. Referências Bibliográficas.....	36
<b>CAPÍTULO 2:</b>	
<b>Influência da adição de diferentes concentrações de nitrogênio no vinhedo sobre a fermentação alcoólica das cultivares <i>Merlot</i>, <i>Cabernet franc</i> e <i>Cabernet sauvignon</i>.....</b>	<b>45</b>



---

Resumo.....	47
Abstract.....	48
1. Introdução.....	49
2. Material e métodos.....	51
2.1. Descrição dos vinhedos e coleta das amostras.....	51
2.2. Reagentes e padrões.....	53
2.3. Preparo das amostras para as microvinificações.....	53
2.3.1. Separação das cascas das uvas.....	54
2.3.2. Extração das cascas das uvas.....	54
2.3.3. Concentração dos extratos das cascas das uvas.....	55
2.3.4 Determinação de açúcares nos extratos das cascas das uvas.....	55
2.4. Condições para as microvinificações.....	55
2.4.1. Preparo do meio de cultura sintético.....	56
2.4.2. Preparo do pré-inóculo.....	58
2.4.3. Microvinificações.....	59
2.5. Determinação dos parâmetros enológicos e dos compostos nitrogenados dos mostos.....	60
2.5.1. Determinação dos parâmetros enológicos dos mostos.....	60
2.5.2. Determinação dos aminoácidos totais dos mostos.....	60
2.6. Determinação dos parâmetros enológicos dos vinhos.....	61
2.7. Análise de dados.....	61
3. Resultados e discussão.....	62
3.1. Determinação de açúcares nos extratos das cascas das uvas.....	62
3.2. Determinação dos parâmetros enológicos e dos compostos nitrogenados dos mostos.....	63
3.3. Evolução das microvinificações.....	67
3.4. Determinação dos parâmetros enológicos dos vinhos.....	74
4. Conclusão.....	77
5. Referências Bibliográficas.....	77



**CAPÍTULO 3:**

<b>Influência da adição de diferentes concentrações de nitrogênio no vinhedo sobre a formação dos compostos de aroma nos vinhos das cultivares <i>Merlot</i>, <i>Cabernet franc</i> e <i>Cabernet sauvignon</i>.....</b>	<b>81</b>
Resumo.....	83
Abstract.....	84
1. Introdução.....	85
2. Material e Métodos.....	87
2.1. Descrição dos vinhedos e coleta das amostras.....	87
2.2. Reagentes e padrões.....	88
2.3. Preparo dos mostos e microvinificações.....	89
2.4. Determinação de nitrogênio assimilável dos mostos.....	89
2.5. Determinação de aminoácidos dos mostos.....	89
2.6. Determinação dos compostos voláteis dos vinhos.....	90
2.6.1. Determinação de álcoois, álcoois superiores e acetato de etila dos vinhos.....	91
2.6.2. Determinação de ésteres polares dos vinhos.....	91
2.6.3. Determinação de ésteres apolares dos vinhos.....	92
2.7. Análise dos dados.....	94
3. Resultados e discussão.....	94
3.1. Determinação das frações nitrogenadas dos mostos.....	94
3.2. Determinação dos compostos voláteis dos vinhos.....	104
3.3. Correlação entre os aminoácidos dos mostos e os compostos voláteis dos vinhos.....	114
4. Conclusão.....	117
5. Referências bibliográficas.....	117

**CAPÍTULO 4:**

<b>Influência da cobertura do vinhedo e da dupla poda no teor de metoxipirazinas em uvas e vinhos <i>Cabernet sauvignon</i> no estado de São Paulo.....</b>	<b>121</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>123</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>124</b>





---

1. Introdução.....	125
2. Material e Métodos.....	128
2.1. Descrição dos vinhedos.....	128
2.2. Tratamentos aplicados nos vinhedos.....	129
2.2.1. Cobertura do vinhedo.....	129
2.2.2. Dupla poda.....	130
2.3. Coleta das amostras.....	131
2.4. Vinificação.....	131
2.5. Metodologia analítica.....	132
2.5.1. Reagentes e padrões.....	132
2.5.2. Extração e análise de metoxipirazinas nos mostos.....	132
2.5.3. Extração e análise de metoxipirazinas nos vinhos.....	134
2.6. Determinação de sólidos solúveis totais e de pH dos mostos.....	136
2.7. Análise de dados.....	136
3. Resultados e discussão.....	136
3.1. Validação da metodologia de extração de metoxipirazinas dos mostos.....	136
3.2. Determinação de metoxipirazinas durante a maturação das uvas...	138
3.3. Determinação de metoxipirazinas dos vinhos.....	144
3.4. Determinação de sólidos solúveis totais e de pH dos mostos.....	146
4. Conclusão.....	149
5. Referências bibliográficas.....	149
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>157</b>



**LISTA DE FIGURAS**

## Capítulo 1:

- Figura 1.1. Processo de fermentação alcoólica realizada por leveduras da espécie *Saccharomyces sp* a partir de uma molécula de glicose (adaptada de Alberts *et al.*, 1999 e Jay, 2005).....14
- Figura 1.2. Reação de aminação para a formação de uma molécula de glutamina a partir de uma molécula  $\alpha$ -cetoglutarato (adaptada de Motta, 2011).....18
- Figura 1.3. Reação de transaminação para a formação de uma molécula de alanina partir de moléculas de ácido glutâmico e de ácido pirúvico (adaptada de Motta, 2011).....19
- Figura 1.4. Via sintética para a formação dos álcoois superiores e dos ésteres acetatos derivados dos aminoácidos (adaptada de Antalick, 2010a e Pineau, 2007).....23
- Figura 1.5. Via sintética para a formação dos ésteres etílicos derivados dos ácidos graxos (adaptada de Antalick, 2010a e Pineau, 2007).....25

## Capítulo 2:

- Figura 2.1. Curvas cinéticas de fermentação obtidas a partir das microvinificações das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* baseada na perda de peso das garrafas em relação ao tempo.....71

## Capítulo 3:

- Figura 3.1. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os aminoácidos analisados (B). Abreviações segundo a Tabela 3.3. Fator 1: Componente Principal 1 e Fator 2: Componente Principal 2.....102
- Figura 3.2. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os aminoácidos analisados



(B). Abreviações segundo a Tabela 3.3. Fator 2: Componente Principal 2 e Fator 3: Componente Principal 3.....103

Figura 3.3. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os compostos voláteis analisados (B). Abreviações segundo a Tabela 3.4. Fator 1: Componente Principal 1 e Fator 2: Componente Principal 2.....112

Figura 3.4. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os compostos voláteis analisados (B). Abreviações segundo a Tabela 3.4. Fator 2: Componente Principal 2 e Fator 3: Componente Principal 3.....113

#### Capítulo 4:

Figura 4.1. Concentração de metoxipirazinas em mostos de uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas em duas diferentes técnicas de manejo e colhidas em diferentes pontos de maturação (dias após o *véraison*). LOQ 1: 5 ng.L<sup>-1</sup> (MMP); LOQ 2: 2,5 ng.L<sup>-1</sup> (EMP, IPMP, SBMP e IBMP).....142

Figura 4.2. Concentração de IBMP em mostos de uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas em duas diferentes técnicas de manejo e colhidas em diferentes pontos de maturação (dias após o *véraison*), para as safras de 2009 (inverno) e de 2010 e 2011 (verão). CV CJ: Campos do Jordão Cobertura do Vinhedo; SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda; LOQ 1: 5 ng.L<sup>-1</sup> (MMP); LOQ 2: 2,5 ng.L<sup>-1</sup> (EMP, IPMP, SBMP e IBMP).....143

Figura 4.3. Teor de sólidos solúveis totais e pH em mostos de uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas em duas diferentes técnicas de manejo e colhidas em diferentes pontos de maturação (dias após o *véraison*), para as safras de 2009 (inverno) e de 2010 e 2011 (verão). CV CJ: Campos do Jordão Cobertura do Vinhedo; SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda.....147



**LISTA DE TABELAS**

## Capítulo 2:

Tabela 2.1. Identificação das cultivares <i>Merlot</i> , <i>Cabernet franc</i> e <i>Cabernet sauvignon</i> e as concentrações de nitrogênio recebidas para cada tratamento.....	52
Tabela 2.2. Composição química do meio de cultura sintético utilizado para as microvinificações das cultivares <i>Merlot</i> , <i>Cabernet franc</i> e <i>Cabernet sauvignon</i> .....	56
Tabela 2.3. Fatores anaeróbios utilizados para o preparo do meio de cultura sintético utilizado para as microvinificações das cultivares <i>Merlot</i> , <i>Cabernet franc</i> e <i>Cabernet sauvignon</i> .....	58
Tabela 2.4. Concentrações de glicose e frutose obtidas para os extratos das cascas das variedades <i>Merlot</i> (M), <i>Cabernet franc</i> (CF) e <i>Cabernet sauvignon</i> (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.....	62
Tabela 2.5. Parâmetros enológicos e compostos nitrogenados obtidos para os mostos das variedades <i>Merlot</i> (M), <i>Cabernet franc</i> (CF), e <i>Cabernet sauvignon</i> (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.....	65
Tabela 2.6. Evolução das microvinificações das variedades <i>Merlot</i> (M), <i>Cabernet franc</i> (CF) e <i>Cabernet sauvignon</i> (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo, baseada na perda de peso em função da biotransformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono.....	69
Tabela 2.7. Consumos total e diário de açúcares em relação ao tempo e às concentrações iniciais e finais de açúcares nas microvinificações das cultivares <i>Merlot</i> , <i>Cabernet franc</i> e <i>Cabernet sauvignon</i> , cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.....	73
Tabela 2.8. Concentrações dos parâmetros enológicos obtidos para os vinhos elaborados com as variedades <i>Merlot</i> , <i>Cabernet franc</i> e <i>Cabernet sauvignon</i> , cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.....	75





Capítulo 3:

Tabela 3.1. Identificação das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* e as concentrações de nitrogênio recebidas para cada tratamento.....88

Tabela 3.2. Íons de monitoramento utilizados para a determinação dos ésteres apolares nos vinhos por HS-SPME-GC/MS.....93

Tabela 3.3. Concentrações dos compostos nitrogenados obtidos para os mostos das cultivares *Merlot* (M), *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.....96

Tabela 3.4. Concentrações dos compostos voláteis obtidos para os vinhos elaborados com as variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo .....106

Tabela 3.5. Correlações positivas encontradas entre os álcoois superiores e os aminoácidos nos vinhos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*....115

Tabela 3.6. Correlações positivas encontradas entre os álcoois superiores e os ésteres acetatos nos vinhos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*.....116

Capítulo 4:

Tabela 4.1. Parâmetros da validação para metoxipirazinas em mosto de *Cabernet sauvignon*. Valores referentes à linearidade e aos limites de detecção e quantificação do método analítico.....137

Tabela 4.2. Parâmetros da validação para metoxipirazinas em mosto de *Cabernet sauvignon*. Valores obtidos para a precisão e a exatidão do método analítico.....138

Tabela 4.3. Concentração de metoxipirazinas por HS-SPME-GC-MS durante a maturação de uvas *Cabernet sauvignon* submetidas a duas técnicas de manejo distintas.....139

Tabela 4.4. Concentração de metoxipirazinas em vinhos elaborados com *Cabernet sauvignon* que passaram por diferentes técnicas de manejo.....145



## RESUMO

O aroma dos vinhos é formado por compostos provenientes das uvas e por compostos formados durante a vinificação, caracterizando a identidade, a tipicidade e a qualidade do vinho. A fermentação alcoólica é o processo de maior importância para a formação desses compostos. Porém, a falta de nutrientes nos mostos, como o nitrogênio, pode resultar em uma fermentação lenta, com a formação insuficiente da biomassa e, conseqüentemente, a baixa síntese de compostos de aroma. A qualidade de certos vinhos também pode ser prejudicada pela presença de compostos indesejáveis, os *off-flavours*. Dentre esses compostos estão as metoxipirazinas que, em altas concentrações, são responsáveis pelo aroma herbáceo ou de pimentão verde em uvas *Cabernet sauvignon*, sendo incorporadas no vinho durante o processo de vinificação. Alguns parâmetros têm sido relacionados com as altas concentrações desses compostos, sendo o mais importante a maturação incompleta das uvas na época da colheita, que pode ser influenciada por fatores naturais como a umidade do ar, as precipitações pluviométricas e a temperatura. Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de suprir a falta de nitrogênio no mosto durante a vinificação e de diminuir a concentração de metoxipirazinas nas uvas e nos vinhos. Para isso, diferentes práticas de manejo foram aplicadas nos vinhedos. A pulverização de amônia no solo dos vinhedos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, foi testada para a obtenção de nitrogênio necessário para a fermentação alcoólica e a produção dos compostos de aromas. Para isso, os vinhedos foram divididos em parcelas e receberam diferentes concentrações de amônia (10, 60, 90, 120 e 180 kgN.Hectare<sup>-1</sup>). Na época da vindima, as uvas foram colhidas e analisadas quanto aos teores de nitrogênio assimilável e de aminoácidos, sendo em seguida vinificadas, e os vinhos analisados quanto aos teores de álcoois superiores e de ésteres. A dupla poda e a cobertura do vinhedo foram realizadas com a cultivar *Cabernet sauvignon* e testadas para a diminuição de metoxipirazinas na uva e no vinho. Amostras de uvas foram colhidas durante todo o período de maturação, com o intuito de acompanhar as concentrações de metoxipirazinas. Na época da vindima, as uvas foram colhidas e analisadas quanto aos seus teores de metoxipirazinas, sólidos solúveis totais e pH, sendo em seguida vinificadas, e os vinhos analisados quanto aos seus teores de metoxipirazinas. Os resultados mostraram que todas as técnicas de manejo aplicadas nos vinhedos foram eficientes e conseguiram atingir seus objetivos. Com relação à pulverização de amônia, os tratamentos que receberam maiores concentrações desse composto no solo apresentaram concentrações mais elevadas de nitrogênio assimilável (167,163 e 184 mg.L<sup>-1</sup>) e de aminoácidos (752, 921 e 998 mg.L<sup>-1</sup>) nos mostos, se comparados com os tratamentos controles (128,103 e 115 mg.L<sup>-1</sup> para nitrogênio assimilável e 534, 542 e 601 mg.L<sup>-1</sup> para aminoácidos), indicando que as plantas foram capazes de absorver esse composto do solo e utilizá-lo na produção de aminoácidos. A presença de elevadas concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos nos mostos influenciou e acelerou a fermentação alcoólica das variedades *Merlot* e *Cabernet sauvignon*, cujos tratamentos que apresentaram as maiores concentrações de nitrogênio assimilável tiveram seu tempo de fermentação reduzido de 9 para 7 dias. Adicionalmente, os vinhos elaborados com as uvas oriundas desses mesmos tratamentos apresentaram as maiores concentrações de álcoois superiores (190, 443 e



356 mg.L<sup>-1</sup>) e de ésteres (6505, 6440 e 6298 µg.L<sup>-1</sup>), indicando que a síntese desses compostos foi beneficiada pela presença das altas concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos. Sendo assim, conclui-se que a pulverização de amônia no solo foi satisfatória, pois forneceu nitrogênio suficiente para o desenvolvimento da fermentação alcoólica e para a produção de compostos aromáticos. Com relação às metoxipirazinas, os resultados mostraram que elas sofreram degradação ao longo do período de maturação, com valores para a concentração de IBMP (2-metoxi-3-isobutylmetoxipirazina) iniciando em 46 ng.L<sup>-1</sup> e finalizando abaixo 2,5 ng.L<sup>-1</sup>. A cobertura do vinhedo foi a técnica mais eficiente na redução de metoxipirazinas em safras colhidas no verão, apresentando uvas com concentração final máxima para a IBMP de 5,27 ng.L<sup>-1</sup>, sugerindo que a alta temperatura abaixo da cobertura favoreceu a degradação desses compostos. Porém, a dupla poda inverteu a época da colheita do verão para o inverno, época mais fria e de menor intensidade pluviométrica, contribuindo para o aumento do tempo para as bagas atingirem a maturação ideal e, indiretamente, favorecendo a degradação das metoxipirazinas durante este tempo, chegando a valores finais de concentração inferiores a 2,5 ng.L<sup>-1</sup>, tornando assim a dupla poda o tratamento mais eficaz para a redução das metoxipirazinas nas uvas e, conseqüentemente, no vinho.

Palavras-chaves: *Vitis vinifera*, nitrogênio, vinho e vinificação, compostos voláteis.



**ABSTRACT**

The aroma of the wine is made by compounds from grapes and compounds formed during the vinification, featuring the identity, typicality and quality of wine. Alcoholic fermentation is the process of greater importance for the formation of these compounds. However, the lack of nutrients in musts, such as nitrogen, can result in a slow fermentation, with the formation of biomass insufficient and the lower synthesis of aromatic compounds. The quality of certain wines may also be impaired by the presence of undesirable compounds, the *off-flavours*. Among these compounds are the methoxypyrazines that, in high concentrations, are responsible for the flavor herbaceous or green peppers in grapes *Cabernet Sauvignon*, being incorporated into the wine during the winemaking process. Some parameters have been related to high concentrations of these compounds, the most important is the unripe grapes at harvest time, which can be influenced by natural factors such as humidity, rainfalls and temperature. Given the above, this work has been developed in order to address the lack of nitrogen in musts during vinification and decrease the concentration of methoxypyrazines in grapes and wines. For this, different management practices were applied in the vineyards. Spraying ammonia into the soil vineyards of *Merlot*, *Cabernet franc* and *Cabernet Sauvignon* was tested to obtain nitrogen necessary for the fermentation and production of flavor compounds. For this, the vineyards were divided into plots and received different concentrations of ammonia (10, 60, 90, 120 and 180 kgN.Hectare<sup>-1</sup>). At the time of harvest, the grapes were harvested and analyzed for the levels of assimilable nitrogen and amino acids, after they were vinified and the wines were analyzed for the levels of higher alcohols and esters. The double pruning and coverage vineyard were conducted with the cultivar *Cabernet Sauvignon* and tested to decrease methoxypyrazines in grapes and wine. Samples were harvested during all the maturing period in order to monitor the concentrations of methoxypyrazines. At the time of harvest, the grapes were harvested and analyzed for their content of methoxypyrazines, soluble solids and pH, after they were vinified and the wines were analyzed for their content of methoxypyrazines. The results showed that all the management techniques applied in vineyards were efficient and to achieve their objectives. Regarding the addition of ammonia, the treatments that received higher concentrations of this compound in the soil showed higher concentrations of assimilable nitrogen (167, 163 and 184 mg.L<sup>-1</sup>) and amino acids (752, 921 and 998 mg L<sup>-1</sup>) in must, when compared to control treatments (128, 103 and 115 mg.L<sup>-1</sup> for assimilable nitrogen and 534, 542 and 601 mg.L<sup>-1</sup> for amino acids), indicating that the plants were able to absorb the compound of the soil and use it for the amino acid production. The presence of high concentrations of assimilable nitrogen and amino acids in musts influenced and accelerated the alcoholic fermentation of *Merlot* and *Cabernet Sauvignon*, the treatments that presented the highest concentrations of assimilable nitrogen had their fermentation time reduced from 9 to 7 days. Additionally, the wines produced with grapes coming from these same treatments had higher concentrations of higher alcohols (190, 443 and 356 mg L<sup>-1</sup>) and ester (6505, 6440 and 6298 µg.L<sup>-1</sup>), indicating that the synthesis of these compounds was benefited by the presence of high concentrations of assimilable nitrogen and amino acids. Therefore, it is concluded that the addition of ammonia in the soil was satisfactory, because it supplied sufficient nitrogen to the development of alcoholic fermentation and the production of





aromatic compounds. With respect to methoxypyrazines, the results showed that they undergo degradation during the maturation period, with values for the concentration of IBMP (2-methoxy-3-isobutylpyrazine) starting at 46 ng.L<sup>-1</sup> and ending below 2,5 ng.L<sup>-1</sup>. The coverage vineyard technique was more effective in reducing methoxypyrazines in crops harvested in summer, with grapes with a maximum final concentration of IBMP of 5,27 ng.L<sup>-1</sup>, suggesting that high temperature below de coverage favored the degradation of these compounds. However, double pruning reversed the harvest season from summer to winter, coldest and least rainfall intensity, contributing to the increase in time for the berries reach optimum ripeness and, indirectly favoring the degradation of methoxypyrazines during this time, reaching a final concentration values below 2,5 ng.L<sup>-1</sup>, thus making the double pruning the most effective treatment for reducing methoxypyrazines in grapes and wines.

Keywords: *Vitis vinifera*, nitrogen, wine and wine making, volatile compounds.



## INTRODUÇÃO GERAL

O aroma é um dos fatores de relevante importância na identidade, tipicidade e qualidade de um vinho. É formado por um grande número de compostos voláteis, pertencentes a grupos químicos heterogêneos, tais como: álcoois superiores, ésteres, monoterpenos, compostos sulfurados, norisoprenóides, etc. As concentrações desses compostos variam de  $\text{mg.L}^{-1}$  a  $\text{ng.L}^{-1}$ , ou em quantidades ainda menores (traços). De acordo com suas origens, podem ser classificados em primários (provenientes da uva e que permanecem nos vinhos), secundários (formados durante os processos de fermentação alcoólica e malolática) e terciários (formados durante o envelhecimento do vinho) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Jackson, 2008). Dentre os três, a produção dos compostos voláteis durante a fermentação é, sem dúvida, o fator de maior importância para o aroma final dos vinhos.

Embora a fermentação alcoólica pareça um processo simples, a transformação do açúcar em etanol e dióxido de carbono envolve diversas reações químicas em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica (Lima *et al.*, 2001). Dessa maneira, diversos problemas podem surgir durante este processo, resultando em vinhos com qualidades físico-químicas e sensoriais inferiores.

Uma experiência bastante comum durante a vinificação é o consumo lento e/ou incompleto dos açúcares pelas leveduras, provocando uma “fermentação presa”. As causas desse problema podem ser decorrentes de vários fatores, incluindo a limitação de nutrientes, a temperatura inadequada, o pH inapropriado, a falta de oxigênio, a presença de compostos tóxicos e a baixa tolerância ao etanol pelas leveduras (Santos *et al.*, 2008).

A presença de nitrogênio no mosto possui um importante efeito na velocidade de fermentação, já que os compostos nitrogenados aumentam a produção de biomassa e estimulam a velocidade da metabolização do açúcar, evitando assim uma fermentação mais lenta ou incompleta (Arias-Gil *et al.*, 2007). Os aminoácidos livres e a amônia constituem a maior parte do nitrogênio presente no meio para a vinificação, que é utilizado para garantir a qualidade das fermentações alcoólica e malolática (Lee e Schreiner, 2010). Sabe-se que a falta desses compostos nos mostos é devida, principalmente, à baixa concentração de compostos nitrogenados no solo e à maturação incompleta da uva na época da colheita (Arias-Gil *et al.*, 2007).

Frente ao problema da concentração insuficiente de nitrogênio no mosto, alguns viticultores adicionam sais de amônia diretamente ao mosto antes da fermentação (Arias-Gil *et al.*, 2007). A concentração de nitrogênio a ser adicionada ao mosto é de fundamental importância para a qualidade do produto final, já que vinhos com altas quantidades de nitrogênio possuem um maior risco de instabilidade microbiana e formação de amins biogênicas e etilcarbamato, compostos que depreciam a qualidade do vinho (Garde-Cerdán *et al.*, 2011). Sendo assim, a pulverização de nitrogênio diretamente no solo torna-se a opção mais segura e promissora para elevar a concentração deste composto nas uvas e, conseqüentemente, no mosto.

Durante os primeiros estágios da fermentação, os compostos nitrogenados são rapidamente acumulados pelas leveduras, satisfazendo a demanda para a síntese de aminoácidos necessários para a síntese de proteínas e o crescimento celular. A quantidade insuficiente de nitrogênio assimilável no mosto resulta em uma menor produtividade da biomassa e, conseqüentemente, uma menor velocidade da fermentação (Torrea *et al.*, 2011).

Adicionalmente aos benefícios do nitrogênio sobre o crescimento microbiano e a cinética da fermentação, este composto também pode regular o metabolismo das leveduras para a formação dos metabólitos voláteis e não voláteis do vinho, influenciando assim suas características físico-químicas e sensoriais (Garde-Cerdan e Ancin-Azpilicueta, 2008). Muitos dos compostos voláteis sintetizados pelas leveduras sofrem mudanças em resposta à concentração de nitrogênio presente no mosto. Dentre esses compostos, os mais importantes são os álcoois superiores, os ésteres acetatos e os éteres etílicos (Torrea *et al.*, 2011).

A formação dos álcoois superiores está ligada ao metabolismo dos aminoácidos. Através da reação de Ehrlich catabolisada pelas leveduras, os aminoácidos sofrem uma série de transformações, incluindo as reações de transaminação, descarboxilação e desidrogenação, resultando assim em moléculas de álcoois superiores (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Os ésteres acetatos, por sua vez, são produzidos pela condensação de um álcool superior e um Acetil-CoA, catalisada pela enzima acetil-transferase (Sumbly *et al.*, 2010). Já os ésteres etílicos são provenientes da reação do etanol com uma acil-CoA, catabolisada pela enzima etanol-O-acil sintase (Saerens *et al.*, 2008). Assim, fica evidente a importância da presença do nitrogênio nos mostos para a evolução da fermentação alcoólica e a formação do *bouquet* do vinho, caracterizado por um conjunto de compostos

aromáticos que são detectados pelo olfato durante seu consumo.

Quanto mais rica a composição aromática do vinho, melhores serão as características sensoriais e a qualidade do mesmo. No entanto, nem todos os compostos aromáticos presentes nos vinhos são desejados. A qualidade de certos vinhos pode ser prejudicada por aromas e sabores indesejáveis, chamados de defeitos organolépticos ou “*off-flavours*”. O *off-flavour* mais característico dos vinhos elaborados com uvas da cultivar *Cabernet Sauvignon*, bem como das cultivares *Cabernet franc*, *Sauvignon blanc*, *Merlot* e *Pinot noir*, é o aroma herbáceo ou de pimentão verde. Este aroma ocorre devido à presença de compostos, chamados metoxipirazinas, nas uvas, e que passam para o vinho durante a vinificação. Quando em baixas concentrações, a presença desses compostos é importante para a caracterização do *bouquet* do vinho, porém, em altas concentrações, seu aroma se sobressai diante dos outros compostos aromáticos presentes, fazendo com que o vinho perca sua qualidade (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2002).

Três metoxipirazinas são descritas como responsáveis por esses potentes aromas, 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-metoxi-3-secbutilpirazina (SBMP) e 2-metoxi-3-isobutilpirazina (IBMP), sendo esta a principal, representando cerca de 80% do total (Schmarr *et al.*, 2010). O limiar de percepção desses compostos pelo olfato humano é extremamente baixo, abrangendo uma faixa de concentração entre 1 a 10 ng.L<sup>-1</sup> quando presentes em água (Hartmann *et al.*, 2002) e entre 10 e 16 ng.L<sup>-1</sup> quando presentes em vinho tinto (Roujou de Boubée *et al.*, 2000). A grande maioria dos trabalhos científicos que analisam as metoxipirazinas em vinhos determinam concentrações acima do limiar de percepção do olfato humano.

Altas concentrações de metoxipirazinas encontradas nos vinhos aponta a necessidade de investimentos na melhoria da qualidade da matéria prima, que resultaria em uvas com menores concentrações desses compostos e vinhos de melhor qualidade. O conhecimento de fatores ambientais e práticas de manejo que possam influenciar o conteúdo desses compostos em uvas, bem como o conhecimento sobre sua evolução durante o desenvolvimento das bagas, podem mostrar um caminho para o controle do aroma e da qualidade final do vinho.

Vários parâmetros têm sido relacionados com as altas concentrações de metoxipirazinas em vinhos, sendo o mais importante a maturação incompleta das uvas na época da colheita (Lacey *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Kotseridis *et al.*, 1999b). Sabe-se

que a concentração de metoxipirazinas decresce com o progresso da maturação (Lacey *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Roujou-de-Boubée *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2010). Portanto, vinhos produzidos com uvas mais maduras, tendem a possuir menores concentrações de IBMP, sendo que um atraso de até 15 dias na colheita pode diminuir significativamente os níveis desse composto (Kotseridis *et al.*, 1999b). Entretanto, na maioria das regiões vitícolas brasileiras, a colheita das uvas coincide com o período de maior intensidade pluviométrica, condição que afeta negativamente a qualidade dos vinhos finos. A ocorrência de dias chuvosos com forte nebulosidade prejudica não somente a maturação, mas também a sanidade das uvas. Neste sentido, várias iniciativas têm sido tomadas, com o propósito de identificar novas regiões vitícolas, ou mesmo melhorar as regiões já existentes, para que as condições climáticas sejam mais favoráveis à obtenção de melhores índices de maturação e qualidade da uva. A alteração do ciclo de produção da videira, do verão para o inverno, através da dupla poda possibilita colher uvas em períodos secos mais favoráveis à maturação, evitando-se assim os excessos de chuvas do verão (Amorim *et al.*, 2005; Regina *et al.*, 2006).

O clima também desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento e a maturação da uva. A temperatura de maturação das uvas tem uma grande influência na concentração de metoxipirazinas presentes nos vinhos. Trabalhos na literatura constataram que o amadurecimento das uvas em climas mais frios fez com que estas apresentassem um aroma herbáceo mais pronunciado do que aquelas que passaram pelo amadurecimento em regiões mais quentes (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2000; Falcão *et al.*, 2007; Ryona *et al.*, 2008). Desta forma, a maior exposição à radiação incidente, principalmente nas horas do dia com temperaturas mais amenas, ativa os processos metabólicos na fruta, resultando na elevação dos níveis de sólidos solúveis totais (°Brix) e reduzindo os teores de metoxipirazinas (Hashizume e Samuta, 1999). Neste sentido, o ato de cobrir o vinhedo com plástico transparente pode ser favorável, pois ao mesmo tempo em que permite a passagem parcial da luz solar pelo tecido, pode formar um efeito estufa, fazendo com que o calor fique retido, elevando ainda mais temperatura e, conseqüentemente, degradando as metoxipirazinas.

Portanto, algumas ações que visam a melhora da qualidade das cultivares são imprescindíveis, uma vez que elas podem complementar os investimentos que já vêm sendo aplicados na modernização das vinícolas e no desenvolvimento dos processos de vinificação.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALLEN, M. S.; LACEY, M. J.; BOYD, S. Methoxypyrazines in red wines: Occurrence of 2-methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 769-772, 1995.
- AMORIM, D. A.; FÁVERO A. C.; REGINA, M. A.. Produção extemporânea da videira cv. Sirah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 327 – 331, 2005.
- ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDA'N, T.; ANCI'N-AZPILICUETA, C. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1312-1318, 2007.
- FALCÃO, L.D. **Caracterização analítica e sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes altitudes de Santa Catarina**. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- HARTMANN P. J.; McNAIR H. M.; ZOECKLEIN, B. W. Measurement of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazine by Headspace Solid-Phase Microextraction in Spiked Model Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 285-288, 2002.
- HASHIZUME, K.; SAMUTA, T.; Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 194-198, 1999.
- JACKSON, R. Chemical Constituents of grapes. In: **Wine Science: principles and applications**. 3ª edição, London: Academic Press, p. 270 – 331, 2008.
- KOCH, A.; DOYLE, C. L.; MATTHEWS, M. A.; WILLIAMS, L. E.; EBELER, S. E. 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2190-2198, 2010.
- KOTSERIDIS, Y.; ANOCIBAR-BELOQUI, A.; BAYONOVE, CL.; BAUMES, R. L.; BERTRAND, A. Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 33, p. 19-23, 1999b.
- LACEY, M. J.; ALLEN, M. S.; HARRIS, R. L. N.; BROWN, W. V. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc and wines. **American Journal of Enology and Viticultural**, v. 42,

p. 109-112, 1991.

LEE, J.; SCHREINER, R. P. Free amino acid profiles from 'Pinot noir' grapes are influenced by vine N-status and sample preparation method. **Food Chemistry**, v. 119, p. 484-489, 2010.

LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos. Vol.3, 1º edição, São Paulo – SP. Editora Edgard Blucher, 593 p., 2001.

REGINA, M. A.; FRÁGUAS, J. C.; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, C. R.; AMORIM D. A.; MOTA, R. V.; FÁVERO, A. C. Implantação e manejo do vinhedo para produção de vinhos de qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.234, p. 16-31, set/out. 2006.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. *Traité d'Oenologie: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. Volume 2, 2ª edição, West Sussex : John Wiley and Sons, Ltd., 441 p., 2006.

ROUJOU DE BOUBÉE, D; VAN LEEUWEN, C.; DUBOURDIEU, D. Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red Bordeaux and Loire wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.4830-4834, 2000.

ROUJOU-DE-BOUBÉE, D.; CUMSILLE, A. M.; PONS, D.; DUBORDIEU, D. Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet sauvignon bunches and its extractability during vinification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 1-5, 2002.

RYONA, I.; PAN, B. S.; INTRIGLIOLO, D. S.; LAKSO, A. N.; SACKS, G. L. Effects of cluster light exposure on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Franc). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10838-10846, 2008.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VESTREPEN, K.J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.2, p.454-461, 2008.

SANTOS, J.; SOUSA, M. J.; CARDOSO, H.; INÀCIO, J.; SILVA, S.; SPENCER-MARTINS, I. Ethanol tolerance of sugar transport and the rectification of stuck wine



fermentations. **Microbiology**, v.154, p.422-430, 2008.

SCHMARR, H. G.; GANB, S.; KOSCHINSKI, S.; FISCHER, U.; RIEHLE, C.; KINNART, J.; POTOURIDIS, T.; KUTYREV, M. Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography–mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry and on-line liquid chromatography-multidimensional gas chromatography–mass spectrometry as potential loopholes. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6769-6777, 2010.

SUMBY, K. M.; GRBIN, P.R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, v.121, n.1, p.1-16, 2010.



## OBJETIVOS

### Objetivos Gerais

Avaliar a influência de diferentes práticas de manejo aplicadas em diferentes vinhedos sobre a fermentação alcoólica e a composição aromática dos vinhos elaborados. Para tanto, foi necessário dividir o trabalho em duas partes. A primeira parte objetivou verificar a influência da adição de amônia no solo com o intuito de suprir as necessidades de nitrogênio para a fermentação alcoólica e a formação dos álcoois e dos éteres em diferentes cultivares *Vitis vinifera*, como *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, oriundas da região de Bordeaux (França). A segunda parte objetivou investigar a influência da cobertura do vinhedo e da dupla poda sobre a diminuição de compostos *off-flavours*, especificamente as metoxipirazinias, em uvas e vinhos *Vitis vinifera* da cultivar *Cabernet sauvignon*, oriundas do estado de São Paulo (Brasil).

### Objetivos Específicos

#### Parte 1:

Avaliar a eficiência da pulverização de diferentes concentrações de amônia como fonte de nitrogênio para a fermentação alcoólica e a formação de compostos aromáticos em vinhedos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* localizados na região de Bordeaux, França.

Avaliar a influência da adição de amônia sobre os parâmetros enológicos e a concentração de aminoácidos dos mostos obtidos desses vinhedos.

Realizar a microvinificação das uvas coletadas nesses vinhedos, determinar os parâmetros enológicos dos vinhos elaborados e correlacionar com a adição de amônia.

Analisar os compostos voláteis, como os álcoois e os ésteres, nos vinhos elaborados a partir desses vinhedos e correlacionar o efeito da adição de amônia sobre esses compostos.

**Parte 2:**

Avaliar o teor de metoxipirazinas, sólidos solúveis totais e pH ao longo do período de maturação de uvas *Cabernet sauvignon* oriundas dos vinhedos submetidos as duas técnicas de manejo, cobertura do vinhedo e dupla poda, no estado de São Paulo.

Identificar e quantificar as metoxipirazinas nas uvas através da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas e validar a metodologia para as condições do laboratório utilizado.

Determinar a concentração de metoxipirazinas nos vinhos elaborados com essas amostras.

Correlacionar os teores de sólidos solúveis totais e de pH com as concentrações de metoxipirazinas obtidas em cada técnica de manejo.

**CAPÍTULO 1:**

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## Revisão Bibliográfica

### 1. A fermentação alcoólica nos vinhos

O vinho, assim como muitas outras bebidas fermentadas, deve sua formação e suas características às atividades fermentativas dos microrganismos. Bioquimicamente, a fermentação é um processo metabólico no qual carboidratos e compostos relacionados são parcialmente oxidados pelos microrganismos, resultando em liberação de energia, sem qualquer acceptor de elétrons externo. Os aceptores finais de elétrons são compostos orgânicos produzidos diretamente da quebra de carboidratos. Conseqüentemente, ocorre a oxidação incompleta do composto original, resultando em liberação de pequenas quantidades de energia durante o processo (Jay, 2005). Na fermentação alcoólica, a energia liberada durante a oxidação de açúcares fermentescíveis, principalmente glicose e frutose, por leveduras é utilizada para o crescimento microbiano e para a produção de álcool e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (Lima *et al.*, 2001).

Para a elaboração de um vinho, o mosto das uvas passa por duas fermentações, uma fermentação alcoólica seguida de uma fermentação malolática. Esta última é caracterizada pela ação de bactérias lácticas, que transformam o ácido málico, oriundo da primeira fermentação, em ácido láctico, provocando a redução na acidez do vinho devido ao ácido láctico ser menos agressivo ao paladar humano. Apesar da importância da fermentação malolática, é a fermentação alcoólica a causadora das reações mais importantes que ocorrem no processo de vinificação.

A transformação do açúcar em etanol e  $\text{CO}_2$  envolve diversas reações químicas em sequencia ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular dos microrganismos fermentativos, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (Lima *et al.*, 2001).

A Figura 1.1 ilustra, resumidamente, o processo de fermentação alcoólica realizada por leveduras da espécie *Saccharomyces sp* a partir de uma molécula de glicose.

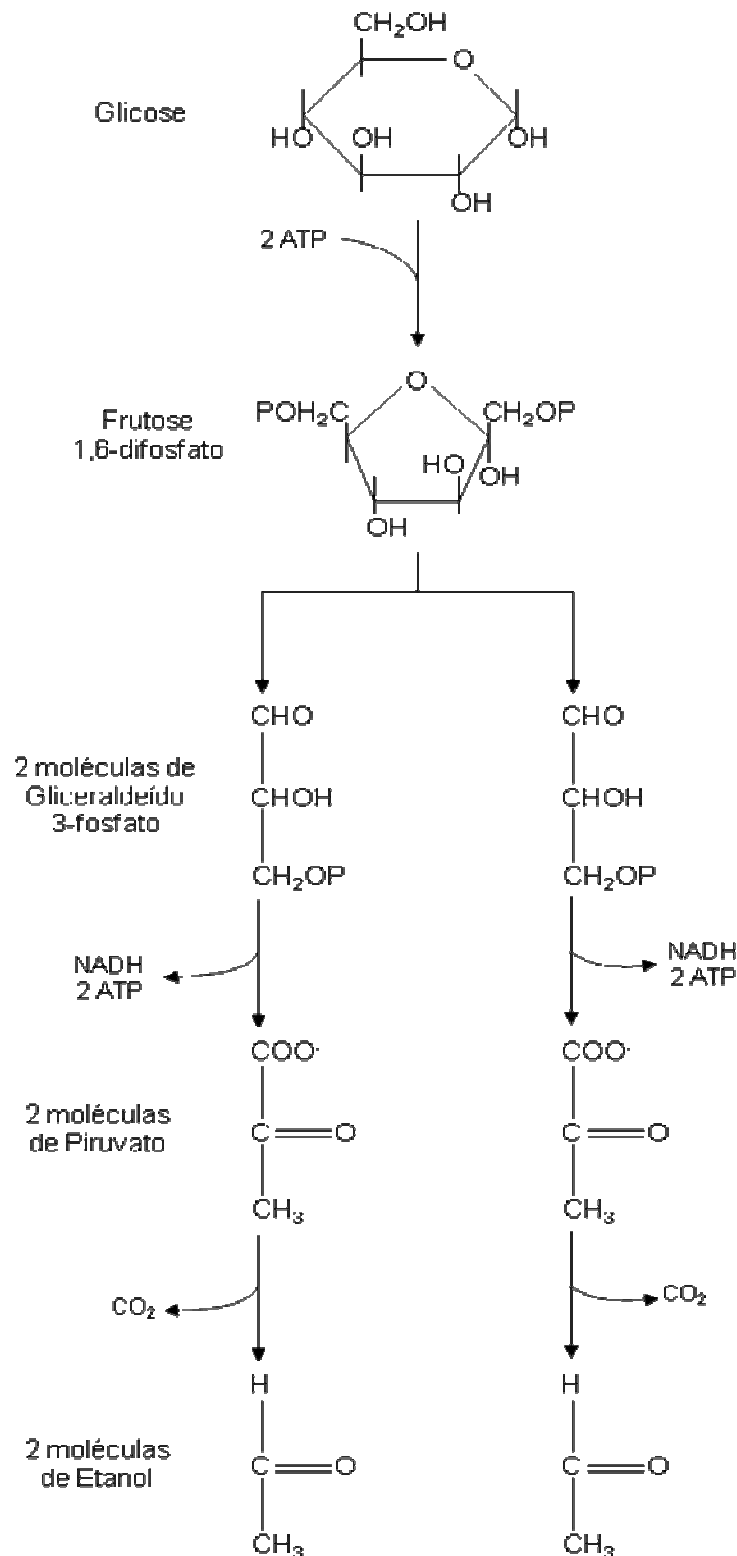


Figura 1.1. Processo de fermentação alcoólica realizada por leveduras da espécie *Saccharomyces sp* a partir de uma molécula de glicose (adaptada de Alberts *et al.*, 1999 e Jay, 2005).



O álcool produzido durante a fermentação é dependente da quantidade de açúcares presente no mosto. O processo se inicia por meio da atuação da exoenzima invertase, a qual, por meio de hidrólise, transforma o açúcar (sacarose) em glicose e frutose (monossacarídeos estruturais). Esses monossacarídeos serão absorvidos pela célula da levedura e transformados em ácido pirúvico que, por sua vez, será reduzido a álcool e CO<sub>2</sub>.

O objetivo primordial da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização de seus diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros) e biossintéticos, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e o CO<sub>2</sub> resultantes constituem, tão somente, produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (Alberts *et al.*, 1999). Entretanto, nesse processo de sobrevivência, as leveduras acabam desempenhando um papel determinante na qualidade olfativa do vinho, pois além do etanol, são capazes de sintetizar compostos voláteis responsáveis pela composição aromática do vinho.

Embora alguns compostos de aroma dos vinhos sejam provenientes das uvas, como os monoterpenos, os norisoprenóides e as metoxipirazinas, são os compostos voláteis formados durante a fermentação, tais como os álcoois superiores e os ésteres, os mais representativos e mais importantes constituintes do *bouquet* dos vinhos (Pineau, 2007).

A fermentação alcoólica deve ser acompanhada minuciosamente, pois diversos parâmetros podem afetar negativamente seu desenvolvimento, resultando em um vinho com características sensoriais indesejáveis e, conseqüentemente, rejeitado pelos consumidores.

### **1.1. Fatores que influenciam a fermentação alcoólica**

A fermentação alcoólica é um passo crucial para a produção do vinho, resultando na transformação de açúcares (glicose e frutose) em álcool e CO<sub>2</sub> pelas leveduras.

Um inconveniente bastante comum durante a vinificação é o consumo lento e/ou incompleto dos açúcares pelas leveduras, provocando uma “fermentação presa”. As causas desse problema podem ser devido a vários fatores, incluindo a limitação de

nutrientes, a temperatura inadequada, o pH inapropriado, a falta de oxigênio, a presença de compostos tóxicos e a baixa tolerância ao etanol pelas leveduras (Santos *et al.*, 2008).

A escolha da levedura é, sem dúvida, um dos fatores mais importantes durante a vinificação, pois são esses microrganismos que fornecerão um aparato enzimático completo necessário para a realização de todas as transformações metabólicas requeridas na fermentação. Embora as leveduras da espécie *Saccharomyces sp* não façam parte dos microrganismos naturalmente presentes nas uvas, elas se adaptam tão bem ao mosto das uvas que rapidamente dominam a fermentação, prevalecendo sobre os outros microrganismos até o final do processo fermentativo (Boulton *et al.*, 1995). Muitos parâmetros fisiológicos característicos dessa espécie são responsáveis por sua preferência e predominância, entre os quais podemos citar a rápida metabolização dos nutrientes presentes nos mostos e consequente produção de substâncias tóxicas aos outros microrganismos. Além disso, essa espécie é capaz de sobreviver em meios com altas concentrações de etanol e em altas temperaturas (Boulton *et al.*, 1995).

A concentração de açúcar presente no mosto também é capaz de determinar o progresso da fermentação, pois trata-se da principal fonte de energia que será utilizada pelas leveduras ao longo de suas atividades metabólicas. Um mosto pobre em açúcares fermentescíveis resultará em uma fermentação incompleta. Além disso, a concentração de açúcar vai determinar o teor alcoólico final do vinho elaborado (Lima *et al.*, 2001).

Alguns parâmetros da fermentação alcoólica são facilmente controlados, como o pH e a temperatura. Entretanto, os maiores problemas de uma fermentação ruim provêm da ação das leveduras. Se a “fermentação presa” é uma resposta da levedura para as condições adversas, um reajuste nas condições do mosto pode corrigir tal problema (Bisson e Butzke, 2000). Ao longo das últimas duas décadas, os produtores de vinho vêm buscando produzir uvas com qualidades elevadas, com o intuito de obter a melhor matéria-prima para a elaboração de vinhos finos. Como consequência, tem-se uvas com grandes potenciais enológicos, dotadas de elevadas concentrações de açúcares para a realização de uma fermentação completa e satisfatória, além de possuírem também teores de fenóis e acidez ideais para a elaboração de um ótimo vinho.

Entretanto, os viticultores não buscam somente a melhoria nos aspectos físico-químicos dos vinhos, mas também uma melhoria nas características sensoriais. O aroma dos vinhos depende dos compostos de aroma naturalmente presentes nas uvas e, principalmente, dos compostos aromáticos formados durante a vinificação. Dessa

maneira, uma “fermentação presa” resultará em vinhos com qualidades físico-químicas e sensoriais inferiores.

A produção dos compostos de aroma por leveduras durante a vinificação pode ser significativamente afetada por práticas aplicadas ao mosto como a clarificação, a aeração, a escolha das cepas utilizadas, a temperatura da fermentação e a adição de nutrientes (Hernández-Orte *et al.*, 2005).

A presença de nitrogênio no mosto também possui um importante efeito na velocidade de fermentação, já que os compostos nitrogenados aumentam a produção de biomassa e estimulam a velocidade da metabolização do açúcar, evitando assim uma fermentação mais lenta ou incompleta (Arias-Gil *et al.*, 2007). Os aminoácidos livres e a amônia constituem a maior parte do nitrogênio presente no meio para a vinificação, que é utilizado para garantir a qualidade das fermentações alcoólica e malolática (Lee e Schreiner, 2010). Além disso, esses compostos passam por uma série de biotransformações, resultando em álcoois, aldeídos, ésteres e ácidos, compostos estes que contribuem significativamente para o aroma do vinho (Garde-Cerdán *et al.*, 2011).

Uma alternativa para a correção da falta de nitrogênio durante a vinificação é a adição de sais de amônia diretamente ao mosto antes da fermentação (Arias-Gil *et al.*, 2007). A escolha da concentração ideal de nitrogênio a ser adicionada no mosto é de fundamental importância para a qualidade do produto final, já que vinhos com altas quantidades de resíduos de nitrogênio possuem um maior risco de instabilidade microbiana e formação de aminas biogênicas e etilcarbamato, que são compostos que depreciam a qualidade do vinho (Garde-Cerdán *et al.*, 2011). Já que a baixa concentração de compostos nitrogenados no solo e a maturação incompleta da uva na época da colheita (Arias-Gil *et al.*, 2007) também podem levar a falta de nitrogênio durante a vinificação, outra alternativa seria a de fertilizar o solo com compostos nitrogenados, geralmente como sais de amônia (Arias-Gil *et al.*, 2007). Esta segunda opção é mais segura e promissora para melhorar a concentração deste composto nas uvas e, conseqüentemente, no mosto.

### 1.1.1. O metabolismo do nitrogênio

Na natureza, os íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  são as formas predominantes de nitrogênio mineral disponível às plantas. Nos solos a concentração de  $\text{NH}_4^+$  é baixa, devido sua rápida oxidação para  $\text{NO}_3^-$  (Alfaia, 2006). Esses compostos são absorvidos pelas raízes das videiras e utilizados na formação de compostos nitrogenados, entre eles os aminoácidos. Os aminoácidos são formados a partir de íons amônio e  $\alpha$ -cetoácidos, oriundos da fragmentação de açúcares (Motta, 2011). A Figura 1.2 mostra a reação pela qual um  $\alpha$ -cetoácido combina-se ao íon amônio para formar um aminoácido, através da reação de aminação.

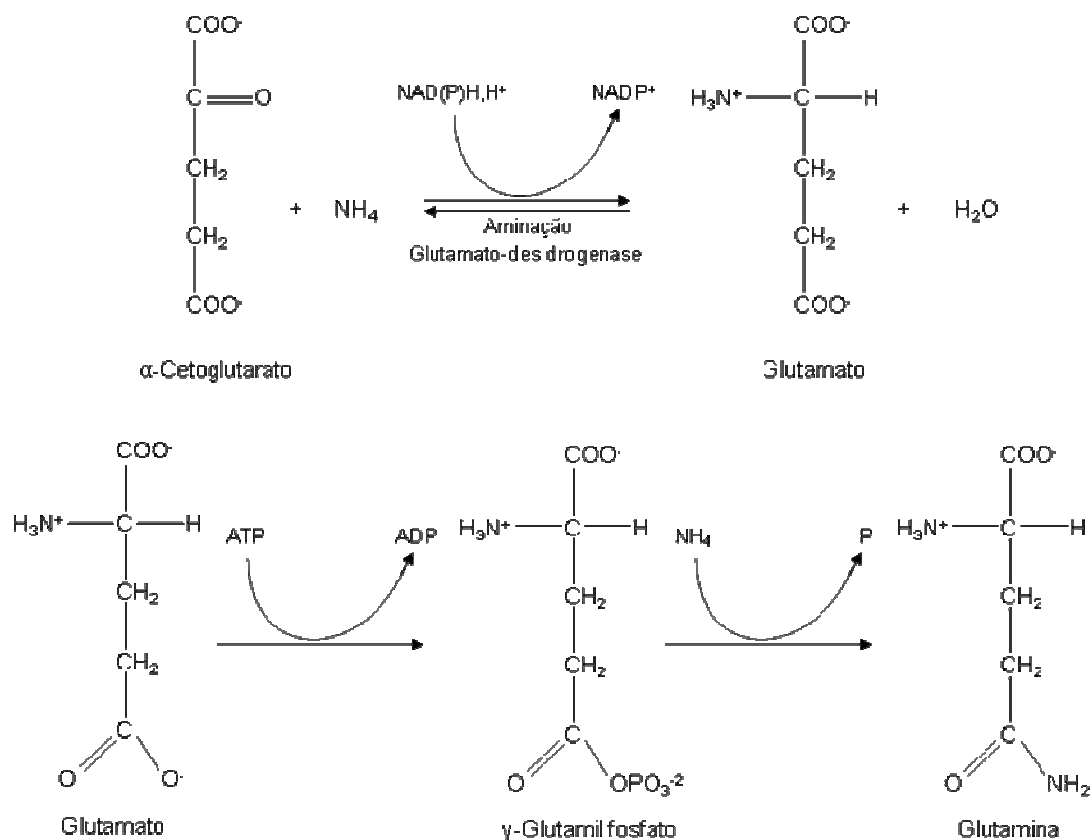


Figura 1.2. Reação de aminação para a formação de uma molécula de glutamina a partir de uma molécula  $\alpha$ -cetoglutarato (adaptada de Motta, 2011).

Nesta figura, o  $\alpha$ -cetoglutarato, na presença do íon amônio, passa pelo processo de aminação para incorporar o íon amônio em sua molécula, formando assim uma molécula de glutamato e uma molécula de água ( $H_2O$ ). Em seguida, a glutamina vai ser sintetizada a partir do glutamato em uma reação que envolve o consumo de energia.

Além da reação de aminação, os aminoácidos também podem ser formados através da transaminação. Neste tipo de reação ocorre a transferência de um grupamento amina ( $NH_2$ ) de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido, formando outro aminoácido (Motta, 2011). Um exemplo dessa reação é a formação da alanina pela transferência do grupamento amina do ácido glutâmico para o ácido pirúvico (Figura 1.3).

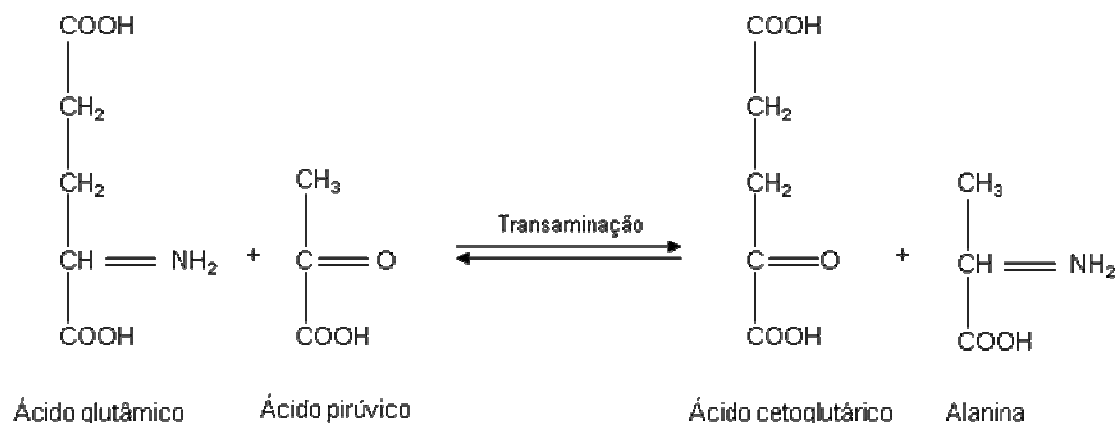


Figura 1.3. Reação de transaminação para a formação de uma molécula de alanina partir de moléculas de ácido glutâmico e de ácido pirúvico (adaptada de Motta, 2011).

## 2. O bouquet dos vinhos

O aroma é um dos fatores de relevada importância na identidade, tipicidade e qualidade de um vinho. É formado por um grande número de compostos voláteis, pertencentes a grupos químicos heterogêneos, tais como: álcoois superiores, ésteres, monoterpenos, compostos sulfurados, norisoprenóides, etc. As concentrações desses compostos variam de  $mg.L^{-1}$  a  $ng.L^{-1}$ , ou em quantidades ainda menores (traços). De acordo com suas origens, podem ser classificados em primários (provenientes da uva e que permanecem nos vinhos), secundários (formados durante os processos de

fermentação alcoólica e malolática) e terciários (formados durante o envelhecimento do vinho) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Jackson, 2008).

A composição e intensidade desses compostos dependem de vários fatores entre eles as características do solo, clima, altitude do vinhedo, a variedade e grau de maturação da uva, técnicas enológicas, leveduras utilizadas no processo de vinificação, etc. (Spilmann *et al.*, 2004; Dubourdieu *et al.*, 2006; Esti e Tamborra, 2006; Gómez-Miguez *et al.*, 2007; Falcão *et al.*, 2007).

Certos compostos, mesmo presentes em quantidade traços podem desempenhar um importante papel no aroma final de um vinho, enquanto outros, muito mais abundantes, podem ter uma pequena contribuição (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A participação de cada um dos componentes no aroma final de um vinho depende da correlação entre a composição química e o limiar de percepção de cada um desses compostos, pois a maioria dos compostos voláteis encontra-se abaixo ou muito próximo ao limiar sensorial individual (Falqué *et al.*, 2000).

Entretanto, nem todos os compostos aromáticos são desejáveis nos vinhos. A qualidade de certos vinhos pode ser prejudicada por odores e sabores indesejáveis, chamados de defeitos organolépticos ou “*off-flavours*”. Um dos exemplos mais comuns de compostos *off-flavours* são as metoxipirazinas, compostos naturalmente presentes nas uvas que são transferidos ao vinho durante o processo de vinificação (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2002).

## **2.1. Compostos voláteis derivados da uva**

A maior parte dos aromas presentes na uva encontra-se sob a forma de precursores, isto é, ligados a açúcares ou aminoácidos que, se por um lado os protegem da oxidação, por outro limitam a sua volatilidade e impedem a sua percepção olfativa. A fim de tornarem olfativamente ativos, os compostos aromáticos devem ser libertados da ligação com o resíduo glicosídico ou aminoacídico. A hidrólise bioquímica mediada por leveduras dotadas das necessárias atividades enzimáticas, é a via mais rápida para obter vinhos que expressem de modo notório os aromas primários da uva (Triulzi e Scotti, 2009).

Alguns exemplos de compostos voláteis derivados da uva são os monoterpenos,

particularmente o linalol, o citronelol, o  $\alpha$ -terpineol, o geraniol e o nerol, responsáveis pelo aroma floral característico nas uvas e vinhos das variedades *Moscato*, *Gewürztraminer* e *Riesling* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Skinkis *et al.*, 2008). Uma parcela significativa de terpenos (aproximadamente 90 compostos) está presente em uvas como glicosídeos não voláteis, que podem ser hidrolisados (enzimaticamente ou quimicamente) à formas livres durante a fermentação e o envelhecimento. A concentração de monoterpênos livres em bagas de uvas varia geralmente de 0 a quantidades superiores a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  (Marais, 1983).

Em contraste aos vinhos intensamente florais como o *Moscato*, os aromas vegetais característicos das variedades *Sauvignon blanc* e *Cabernet sauvignon* são atribuídos geralmente ao composto 2-metil-3-metoxipirazina (IBMP). A concentração desse composto em vinhos é, geralmente, inferior a 40  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Contudo, estas concentrações estão bem acima do limite de detecção olfativo de 10 a 16  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  determinado em vinhos tintos (Roujou de Boubée, 2000).

As uvas da variedade *Cabernet sauvignon* também possuem precursores glicosídicos de componentes C13-norisoprenóides, fontes importantes de aromas varietais nos vinhos (Willians *et al.*, 1992). Norisoprenóides são geralmente encontrados como compostos do metabolismo secundário, que se originam da ação da enzima  $\beta$ -glicosidase presente em algumas leveduras (Naiker, 2001; Triulzi e Scotti, 2009). Os principais representantes desses componentes são a  $\beta$ -damascenona, a  $\beta$ -ionona e a  $\alpha$ -ionona, com aromas descritos como florais e frutados. Geralmente, a  $\beta$ -damascenona é encontrada nos vinhos tintos em concentrações de 1 a 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ou seja, abaixo do seu limite de detecção de 7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Pineau, 2007). Entretanto, este composto, juntamente com a  $\beta$ -ionona e a  $\alpha$ -ionona, participa sinergicamente dos aromas frutados do vinho tinto. Escudero *et al.* (2007) detectaram que a  $\beta$ -damascenona também apresentou interações perceptivas com os ésteres na formação do aroma dos vinhos.

## 2.2. Compostos voláteis derivados da fermentação do vinho

Quantitativamente, os compostos voláteis formados durante a fermentação representam os componentes mais importantes do aroma de vinhos jovens. Contudo, em muitos casos, suas concentrações estão bem abaixo do limiar de percepção humano,

tendo assim pouco impacto no aroma final dos vinhos (Pineau, 2007).

O etanol é o constituinte majoritário do vinho. Esse composto é produzido através do catabolismo das hexoses (glicose e frutose) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação. A concentração final do etanol no vinho é dependente da concentração inicial de açúcar nas uvas, bem como das técnicas empregadas na vinificação (Dubourdieu *et al.*, 2006). Geralmente, a porcentagem de etanol dosada nos vinhos varia entre 11 e 13%.

Dentre os compostos voláteis derivados da fermentação do vinho, os alcoóis superiores e os ésteres são, sem dúvida, os mais importantes para a formação da complexa composição aromática do vinho.

### **2.2.1. Os alcoóis superiores**

Os alcoóis formados por mais de dois átomos de carbono em sua molécula são denominados alcoóis superiores. Esta classe é principalmente representada pelos compostos 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, propanol, 2-metilpropanol, butanol, pentanol e 2-feniletanol. Seus teores médios totais nos vinhos variam entre 140 e 420 mg.L<sup>-1</sup> (Boulton *et al.*, 1996). Com exceção do 2-metilbutanol e do 2-feniletanol, os alcoóis superiores ocorrem tipicamente em concentrações abaixo de seus limites de detecção olfativa (Étievant, 1991). Quando os níveis de alcoóis superiores são detectados acima do limiar de 400 mg.L<sup>-1</sup>, geralmente apresentam impacto negativo no aroma (Vilanova *et al.*, 2012).

A formação dos alcoóis superiores está ligada ao metabolismo dos aminoácidos. Através da reação de Ehrlich catabolizada pelas leveduras, os aminoácidos sofrem uma série de transformações, incluindo as reações de transaminação, descarboxilação e desidrogenação, resultando assim em moléculas de alcoóis superiores. Esses, por sua vez, são precursores para a formação dos ésteres acetatos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Um esquema simplificado para a formação dos alcoóis superiores está representado na Figura 1.4.



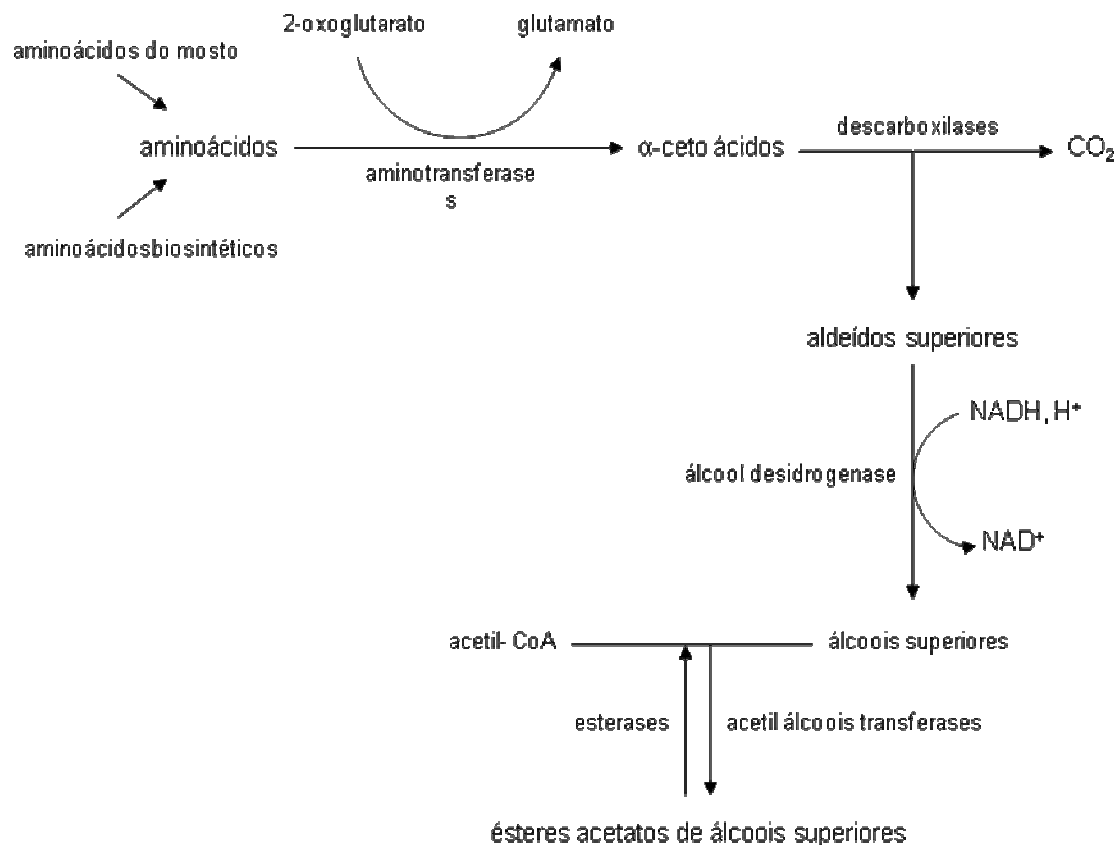


Figura 1.4. Via sintética para a formação dos álcoois superiores e dos ésteres acetatos derivados dos aminoácidos (adaptada de Antalick, 2010a e Pineau, 2007).

### 2.2.2. Os ésteres

Os ésteres representam um dos principais grupos de compostos aromáticos dos vinhos. Eles são considerados como a principal família responsável pelo aroma frutado dos vinhos jovens, em particular os ésteres etílicos de ácidos graxos e os acetatos dos álcoois superiores.

Apesar da presença em níveis bem inferiores aos limites de percepção pelo olfato humano, os ésteres atuam em conjunto, em sinergia, e constituem assim o aroma frutado dos vinhos tintos (Escudero *et al.*, 2007).

De um ponto de vista qualitativo, todos os vinhos são compostos basicamente pelos mesmos ésteres, entretanto suas concentrações variam de um vinho para o outro (López *et al.*, 2004). São essas variações de concentrações que vão caracterizar os

diferentes *bouquets* entre os vinhos.

No vinho, os ésteres podem ser classificados em diferentes categorias de acordo com suas origens: ésteres etílicos de ácidos graxos, ésteres acetatos de álcoois superiores, ésteres de ácidos fixos, ésteres etílicos hidroxilados e cinamatos.

#### *Ésteres etílicos de ácidos graxos:*

Essa classe é composta, principalmente, pelos ésteres etílicos oriundos dos ácidos butírico, hexanóico, octanóico, decanóico e dodecanóico, ou seja, ácidos com números pares de átomos de carbono formando uma grande cadeia (Antalick, 2010a).

Individualmente, esses compostos possuem aromas frutados variados, com limiares de percepção olfativa também variados e relativamente elevados. Nos vinhos tintos, eles são capazes de participar do aroma frutado mesmo quando presentes em concentrações inferiores aos seus limites de percepção. Trata-se de compostos que atuam de forma sinérgica sobre a tipicidade da nota frutada dos vinhos. Estudos demonstraram que algumas moléculas, como a  $\beta$ -ionona e a  $\beta$ -damascenona, intensificaram claramente o aroma frutado desses ésteres (Escudero et al., 2007; Pineau, 2007). Dessa maneira, os ésteres etílicos de ácidos graxos demonstram possuir um papel central na percepção da nota frutada dos vinhos tintos.

Os ésteres etílicos de ácidos graxos são produzidos durante a fermentação alcoólica através do metabolismo das leveduras, cujas sínteses são catalisadas pela enzima *O*-acylsintase (Saerens et al., 2006; Saerens et al., 2008). A Figura 1.5 ilustra a via sintética para a formação dos ésteres etílicos a partir dos ácidos graxos.

A síntese desses ésteres é dependente da espécie de levedura (contendo seus aparatos enzimáticos próprios) e da composição do meio fermentativo. Adicionalmente, estudos já demonstraram que o principal fator limitante para a síntese desses ésteres é a disponibilidade de seus ácidos graxos precursores no meio (Saerens et al., 2006; Saerens et al., 2008; Sumbly et al., 2010). Esses ácidos graxos precursores podem estar naturalmente presentes no mosto ou serem originados durante o metabolismo das leveduras (Saerens et al., 2008).

Outros fatores que possuem um papel fundamental na produção dos ésteres

etílicos de ácidos graxos são a temperatura da fermentação, a composição nutritiva do meio fermentativo (fontes de nitrogênio), o nível de oxigênio, o teor em ácidos graxos insaturados e em esteróis (Sumbly *et al.*, 2010).

Um grande problema encontrado por esses compostos é a hidrólise dos mesmos durante o envelhecimento do vinho. Entretanto, alguns compostos antioxidantes, como o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), presentes nos vinhos podem limitar esta hidrólise e preservar o aroma frutado nos vinhos envelhecidos (Garde-Cerdán e Ancín-Azpilicueta, 2007).

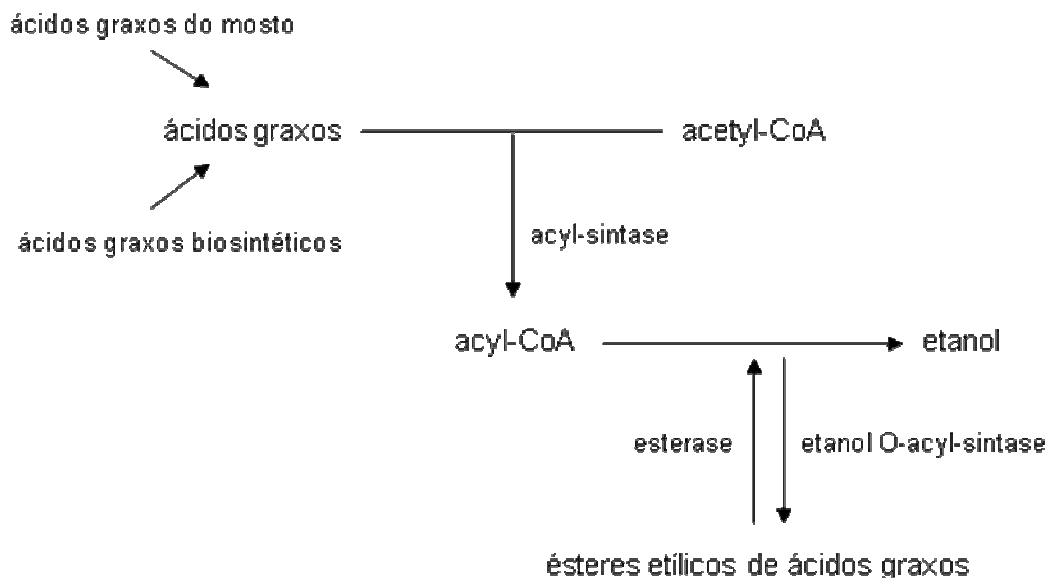


Figura 1.5. Via sintética para a formação dos ésteres etílicos derivados dos ácidos graxos (adaptada de Antalick, 2010a e Pineau, 2007).

Alguns ésteres etílicos são derivados dos ácidos isobutírico, 2-metilbutírico, isovalérico e fenilacético. Trata-se dos ésteres isobutirato de etila, 2-metilbutirato de etila, isovalerato de etila e fenilacetato de etila (Antalick, 2010a). O impacto desses compostos no aroma dos vinhos foi, por muito tempo, considerado como insignificante (Étievant, 1991). Somente no final dos anos 90, através as análises desses compostos pela técnica de olfatométrica, foi revelado que esses compostos possuem um forte poder odorante (Guth, 1997a; Guth, 1997b; Kotseridis e Baumes, 2000; Ferreira *et al.*, 2001; Aznar *et al.*, 2001). Dentre esses 4 compostos, o isobutirato de etila, o 2-metilbutirato de etila e o isovalerato de etila possuem um aroma frutado de morango e kiwi, com algumas nuances de solvente e queijo, já o fenilacetato de etila possui um aroma mais floral e de oliva. Com

relação aos seus teores encontrados nos vinhos e seus limiares de percepção, esses ésteres não são diretamente percebidos nos vinhos, mas podem participar ativamente da nota frutada dos vinhos através dos efeitos sinérgicos. (Escudero *et al.*, 2007; Pineau, 2007). Esses 4 compostos são considerados como bons marcadores do aroma de envelhecimento. Apesar das leveduras sintetizarem uma pequena quantidade desses compostos durante a fermentação, suas concentrações nos vinhos são principalmente oriundas da esterificação de seus ácidos correspondentes com o etanol durante o envelhecimento do vinho (Ferreira *et al.*, 2001, Diaz-Maroto *et al.*, 2005).

A síntese desses compostos durante a fermentação alcoólica não está bem descrita na literatura. Entretanto, sugere-se que eles são formados a partir da mesma via de formação dos álcoois superiores, ou seja, pela reação de Ehrlich (Diaz-Maroto *et al.*, 2005).

#### *Ésteres acetatos de álcoois superiores:*

Correspondem aos ésteres formados a partir do ácido acético e dos álcoois superiores. São representados principalmente pelos acetatos de propila, de isobutila, de isoamila, de 2-metilbutila, de hexila, de octila e de 2-feniletila (Antalick, 2010a). Possuem aromas mais intensos que os ésteres de ácidos graxos, podendo mascarar o aroma varietal do vinho quando presentes em altas concentrações. Os descritores de aromas obtidos para esses compostos incluem, principalmente, notas frutadas, além de apresentarem também algumas notas de solvente (Pineau, 2007).

Os ésteres acetatos de álcoois superiores são produzidos em grandes concentrações pelas leveduras durante a fermentação alcoólica. São formados a partir de moléculas de acetil-CoA e de álcoois superiores correspondentes, por intermédio das atividades da enzima álcool acetiltransferase produzida pela *Saccharomyces cerevisiae*. (Sumbly *et al.*, 2010). A via sintética para a formação dos ésteres acetatos derivados dos álcoois superiores, que, por sua vez, são derivados dos aminoácidos, também pode ser visualizada na Figura 1.4.

A síntese desses compostos depende, principalmente, do tipo de levedura e da composição nutricional do meio. Entretanto, já foi observado na literatura que a síntese dos ésteres acetatos é estimulada por altos teores de precursores (álcoois superiores) e

baixas temperaturas, porém é inibida pela presença do oxigênio e pelos ácidos graxos insaturados (Sumbly *et al.*, 2010).

#### *Ésteres etílicos de ácidos fixos:*

Os ésteres formados durante o envelhecimento do vinho através da esterificação dos principais ácidos orgânicos das uvas (ácido tartárico, ácido málico e ácido cítrico) possuem um papel limitado nas qualidades organolépticas dos vinhos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Entretanto, outros ésteres, como o succinato de monoetila, o succinato de dietila e principalmente o lactato de etila, podem participar ativamente das propriedades sensoriais do vinho. Esses compostos estão presentes nos vinhos em concentrações elevadas, como, por exemplo, o lactato de etila, que pode atingir concentrações de até centenas de  $\text{mg.L}^{-1}$ . As leveduras são capazes de sintetizá-lo durante a fermentação alcoólica a partir do ácido D-láctico, proveniente do catabolismo do pirurato. Contudo, a síntese mais intensa do lactato de etila ocorre durante a fermentação malolática, através da esterificação química do ácido L-láctico e do etanol (Boido *et al.*, 2009). Esse composto contribui para o aroma lácteo do vinho, com um odor descrito como cremoso e ligeiramente frutado. Seu limiar de percepção está em torno de  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  no vinho (Boido *et al.*, 2000).

Os succinatos de mono e dietila também são ésteres presentes em quantidades significantes nos vinhos. Esses compostos podem ser formados pela atividade das leveduras na fermentação alcoólica ou pela ação das bactérias lácticas durante a fermentação malolática. Entretanto, sua maior formação acontece durante o envelhecimento do vinho através da esterificação do ácido succínico. O succinato de monoetila é encontrado nos vinhos em concentrações de algumas dezenas de  $\text{mg.L}^{-1}$ , enquanto o succinato de dietila está presente em concentrações inferiores, atingindo algumas  $\text{mg.L}^{-1}$ . No entanto, a pouca volatilidade desses compostos, aliada aos seus limiares de percepção elevados ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ), impede que eles causem grandes impactos no aroma dos vinhos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

*Ésteres etílicos hidroxilados:*

Esses compostos são representados, principalmente, pelo 3-hidroxi-butirato de etila e pelo 6-hidroxi-hexanoato de etila, encontrados nos vinhos em proporções bastante variadas (Antalick, 2010a). O 3-hidroxi-butirato de etila possui um aroma frutado tendendo para o morango e é encontrado em uma faixa de concentração compreendendo de 0,1 a 1 mg.L<sup>-1</sup>. Seu limite de percepção olfativo é relativamente elevado, aproximadamente 1,8 mg.L<sup>-1</sup> (Pineau, 2007) e, portanto, causa pouco impacto sobre a composição aromática do vinho. Entretanto, da mesma maneira que ocorre com os outros éteres, ele pode participar conjuntamente com os outros aromas para caracterizar o aroma frutado. Sua origem no vinho jamais foi estudada, entretanto sua presença é mais constante em vinhos tintos que em vinhos brancos (Pineau, 2007).

Com relação ao 6-hidroxi-hexanoato de etila, sua presença nos vinhos está na ordem de alguns µg.L<sup>-1</sup>. Seu aroma, descrito como frutado, possui um limiar de percepção olfativa de 1,2 mg.L<sup>-1</sup>. Portanto, trata-se de mais um composto presente no vinho em concentrações bem inferiores aos limites de percepção, excluindo novamente a participação direta desse composto no aroma dos vinhos (Antalick, 2010a).

A origem desses dois compostos não está bem definida, entretanto, sua ausência nos mostos e nos vinhos brancos indica que eles estão presentes unicamente nos vinhos tintos, sendo originados na fermentação através de precursores presentes nas cascas das uvas tintas (Pineau, 2007).

*Cinamatos:*

O cinamato de etila e o dihidrocinamato de etila fazem parte dos raros ésteres de origem varietal, juntamente com a família dos antranilatos e vanilatos (Loscos *et al.*, 2007).

Seus descritores de aroma incluem cereja, figo, morango e frutas vermelhas. Apesar desses compostos possuírem um limite de percepção olfativa extremamente baixo, aproximadamente 1,5 µg.L<sup>-1</sup>, são encontrados nos vinhos em concentrações ainda abaixo desse limite. Entretanto, eles podem contribuir, sinergicamente, com os outros

ésteres para o aroma frutados dos vinhos (Pineau, 2007).

A via de formação dos cinamatos ainda não está bem definida. Tesnières *et al.* (1991) sugerem que o cinamato de etila poderia derivar do ácido shiquímico proveniente da síntese de aminoácidos como a fenilalanina ou a tirosina. Mais recentemente, Ugliano e Moio (2008) propuseram a formação destes compostos a partir de reações durante a fermentação alcoólica a partir de seus precursores varietais.

### 2.3. Compostos voláteis *off-flavours*

O aroma da uva é composto por um grande número de compostos voláteis, que inclui álcoois, ésteres, ácidos, terpenos, norisoprenóides, tióis e compostos carbonílicos (Canuti *et al.*, 2009). Estes compostos estão predominantemente localizados na casca da uva, e muitos estão tipicamente ligados à açúcares ou aminoácidos no vacúolo das células epiteliais. A casca contém mais da metade do total de compostos voláteis presentes na uva. Na vinificação, os compostos aromáticos são liberados durante o esmagamento físico e às subseqüentes hidrólises química e enzimática (Lund e Bohlmann, 2006; Preston *et al.*, 2008).

Porém, nem todos os compostos de aroma presentes na uva são apreciados no vinho. A qualidade de certos vinhos pode ser prejudicada por odores e sabores indesejáveis, chamados de defeitos organolépticos ou “*off-flavours*”. O *off-flavour* mais característico dos vinhos elaborados com uvas da cultivar *Cabernet Sauvignon*, bem como das cultivares *Cabernet franc*, *Sauvignon blanc*, *Merlot* e *Pinot noir*, é o aroma herbáceo ou de pimentão verde. Este aroma ocorre devido à presença de compostos, chamados metoxipirazinas, nas uvas, e que passam para o vinho durante a vinificação.

#### 2.3.1. As metoxipirazinas

As metoxipirazinas são compostos heterocíclicos nitrogenados que, dependendo de sua origem, podem ser classificados em três categorias: formados por tratamento térmico, formados por ação dos microrganismos ou estarem naturalmente presente nas plantas (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2002). A última categoria é a mais importante em

enologia, pois as metoxipirazinas naturalmente presentes nas uvas serão transferidas para o vinho durante o processo de vinificação.

Três metoxipirazinas são descritas como responsáveis pelo potente aroma caracterizado como herbáceo ou vegetal: 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-metoxi-3-secbutilpirazina (SBMP) e 2-metoxi-3-isobutilpirazina (IBMP), estando a última em maior quantidade, representando cerca de 80% do total (Schmarr *et al.*, 2010). Estas metoxipirazinas estão presentes em cultivares *V. viníferas* como *Cabernet sauvignon*, *Semillon*, *Sauvignon blanc*, *Merlot* e *Pinot noir*.

Segundo Roujou-de-Boubée *et al.* (2002), a síntese de IBMP ocorre desde a formação da baga até 2 a 3 semanas que antecedem o *véraison*, época da mudança de coloração das bagas do verde para o tinto, e, do *véraison* até a maturação completa, o ciclo de IBMP inverte, e sua degradação passa a ser maior que sua síntese. Esta metoxipirazina está presente principalmente nas cascas (72%), sendo encontrada também nas sementes (23,8%) e na polpa (ao redor de 4%).

O par de nitrogênios presente nas metoxipirazinas determina as propriedades ácido básicas da molécula. Em seus estudos, Sala (2004) verificou que, em pHs extremamente baixos, as metoxipirazinas encontram-se no seu estado protonado e são menos voláteis. Porém, ao aumentar o pH para neutro ou básico, as metoxipirazinas deixaram de estar ionizadas e passaram a ser mais voláteis e mais solúveis em solventes orgânicos.

O limiar de percepção das metoxipirazinas pelo olfato humano é extremamente baixo, abrangendo uma faixa de concentração entre 1 e 10 ng.L<sup>-1</sup>, quando presentes em água (Hartmann *et al.*, 2002). Em solução modelo de vinho, este limiar de percepção aumenta para aproximadamente 15 ng.L<sup>-1</sup> (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2000). A grande maioria dos trabalhos científicos que analisam as metoxipirazinas em vinhos relata que estes compostos geralmente estão presentes em concentrações acima do limiar de percepção do olfato humano. Em estudos realizados com vinhos *Cabernet sauvignon*, *Cabernet franc*, *Sauvignon blanc* e *Merlot*, foram encontradas concentrações de metoxipirazinas que variaram entre 1,7 e 56 ng.L<sup>-1</sup> (Allen *et al.*, 1994; Kotseridis *et al.*, 1999; Sala *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2007).

Altas concentrações de metoxipirazinas encontradas nos vinhos demonstra a necessidade de investimentos na melhoria da qualidade da matéria prima, pois resultaria em uvas com menores concentrações de metoxipirazinas e vinhos de melhor qualidade.



O conhecimento de fatores ambientais e práticas de manejo que possam influenciar o conteúdo desses compostos em uvas, bem como o conhecimento sobre sua evolução durante o desenvolvimento das bagas, podem mostrar um caminho para o controle do aroma e da qualidade final do vinho.

### **2.3.1.1. Fatores que influenciam a presença de metoxipirazinas nas uvas e nos vinhos**

#### **2.3.1.1.1. Maturação das uvas na época da colheita**

Devido à dificuldade de remoção das metoxipirazinas do vinho, é importante entender como as condições ambientais e fisiológicas influenciam sua concentração na uva. Vários parâmetros têm sido relacionados com altas concentrações de metoxipirazinas em vinhos, sendo, o mais importante, a maturação incompleta das uvas na época da colheita, ocasionada por fatores edafoclimáticos (Lacey *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Kotseridis *et al.*, 1999b). Diversos trabalhos constataram que a concentração das metoxipirazinas decresce com o progresso da maturação (Lacey *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Roujou-de-Boubée, 2002; Koch *et al.*, 2010). Portanto, vinhos produzidos com uvas mais maduras, tendem a possuir menores concentrações de IBMP, sendo que um atraso de 15 dias na colheita pode diminuir significativamente os níveis desse composto (Kotseridis *et al.*, 1999b).

A uva colhida no seu estado ideal de maturação é essencial para garantir sua qualidade. Tradicionalmente, utiliza-se o teor sólidos solúveis totais (expresso em °Brix) para determinar o ponto ótimo da colheita das uvas. Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), esse ponto acontece quando a uva atinge 20 °Brix, significando que ela possui aproximadamente 200 g.L<sup>-1</sup> de açúcares que, após a fermentação, resultará em um vinho com o teor alcoólico ideal. Porém, o ponto ótimo da colheita também pode ser determinado avaliando-se a composição e a concentração dos compostos voláteis na fruta durante a maturação. Em estudo realizado por Roujou-de-Boubée *et al.* (2000), foi constatado que a IBMP pode ser usada como parâmetro para avaliar a maturação completa da uva.

### 2.3.1.1.2. Clima e solo

O clima e o solo desempenham um papel fundamental para o desenvolvimento e a maturação da uva. Estudos constataram que a concentração de metoxipirazinas, além de ser influenciada pela maturação incompleta da uva no período de vindima, também pode ser influenciada pelo solo e pelo clima da região em que o vinhedo está localizado (Falcão *et al.*, 2007).

A temperatura de maturação das uvas tem uma grande influência na concentração de metoxipirazinas presentes nos vinhos. Geralmente, vinhos elaborados com uvas originadas de vinhedos localizados em regiões mais frias, apresentam concentrações mais elevadas de metoxipirazinas e, conseqüentemente, um aroma herbáceo mais pronunciado (Lacey *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1994). Roujou-de-Boubée *et al.* (2000) confirmaram essa teoria quando detectaram as menores concentrações de metoxipirazinas para as safras obtidas em anos mais quentes.

Falcão *et al.* (2007), ao avaliar vinhedos localizados em diferentes altitudes no estado de Santa Catarina, verificou que os vinhedos situados em altitudes mais elevadas apresentaram, tanto durante o inverno quanto no verão, temperaturas mais baixas quando comparados com os vinhedos situados em menores altitudes. Isso resultou na diferença sensorial dos vinhos elaborados com essas safras, pois as uvas cultivadas em maiores altitudes resultaram em vinhos com aroma herbáceo, enquanto que as uvas cultivadas em menores altitudes resultaram em vinhos com aroma de frutas vermelhas. Esse resultado está de acordo com os resultados já obtidos por Allen *et al.* (1994) e Lacey *et al.* (1991).

O tipo de solo exerce um grande efeito na concentração de metoxipirazinas em vinhos elaborados com as variedades *Merlot*, *Cabernet sauvignon* e *Cabernet franc*, devido ao seu efeito no crescimento vegetativo. Para a *Cabernet sauvignon*, os solos saibrosos e bem drenados originam menores concentrações de metoxipirazinas do que os solos argilosos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

As diferenças existentes na disponibilidade de água e na drenagem do solo, bem como a umidade relativa do ar, podem determinar o vigor do vinhedo e, indiretamente, a quantidade de metoxipirazinas nas uvas. Vinhos produzidos com uvas de vinhedos irrigados possuem maiores níveis de metoxipirazinas e maior potencial de aroma herbáceo quando comparado com vinhos de vinhedos não irrigados (Sala, 2004). Os altos

níveis de umidade no ar nos meses que antecedem o *véraison*, contribuíram para a presença de maiores quantidades de IBMP no final da maturação das uvas de acordo com Noble *et al.* (1995).

Portanto, os fatores ambientais possuem uma grande influência sobre os níveis de metoxipirazinas nas uvas e nos vinhos, seja ela positiva, como no caso da alta temperatura, ou negativa, como no caso da alta umidade. A utilização de práticas agronômicas nos vinhedos tem sido vista como um auxílio aos produtores, pois ajudam a diminuir as concentrações de metoxipirazinas nas uvas, melhorando assim a qualidade do vinho.

### **2.3.1.1.3. Práticas agronômicas**

Na maioria das regiões vitícolas brasileiras, a colheita das uvas coincide com o período de maior intensidade pluviométrica, condição que afeta negativamente a qualidade dos vinhos finos. A ocorrência de dias chuvosos com forte nebulosidade prejudica não somente a maturação, mas também a sanidade das uvas. Neste sentido, várias iniciativas têm sido tomadas atualmente no Brasil, com o propósito de identificar novas regiões vitícolas, ou mesmo melhorar as regiões já existentes, para que as condições ecológicas sejam mais favoráveis à obtenção de melhores índices de maturação e qualidade da uva, contribuindo com menores índices de precipitação pluviométrica no período que antecede a colheita e uma amplitude térmica ideal que permita o bom desenvolvimento das bagas, com uma ótima síntese de açúcares, o decréscimo da acidez e o aumento dos teores de polifenóis (Regina *et al.*, 2010).

#### *Dupla poda:*

Na maioria das regiões vitícolas do mundo, a poda de frutificação é realizada anualmente, no final do inverno, quando o clima é frio e a planta está em repouso vegetativo, objetivando que a brotação coincida com o aumento da temperatura, que se inicia na primavera (Regina *et al.*, 2006).

Ao contrário das regiões temperadas, as tropicais caracterizam-se por apresentar

temperaturas sempre elevadas, não havendo frio suficiente para paralisar a atividade vegetativa da videira. Sendo assim, é possível a produção de até duas safras por ano (Fávero, 2007). No entanto, a colheita das uvas em regiões tropicais é realizada em uma época com elevada intensidade pluviométrica. Dessa forma, a elevada incidência de doenças fúngicas, aliada à baixa radiação solar, ao excesso de água no solo e a outros fatores climáticos, impedem que a uva atinja a completa maturação, comprometendo a qualidade dos vinhos (Regina *et al.*, 2006).

Diante desse problema, a alteração do ciclo de produção da videira, do verão para o inverno, através da dupla poda possibilita colher uvas em períodos secos mais favoráveis à maturação, evitando-se assim os excessos de chuvas do verão. (Amorim *et al.*, 2005; Regina *et al.*, 2006). Com esta técnica, as videiras são podadas no período de fevereiro a março e as uvas são colhidas no inverno, época em que o solo seco, associado aos dias ensolarados e as noites frescas, permitem a colheita de uvas no ponto ideal da maturação, dando origem a vinhos de alta qualidade (Amorim *et al.* (2005). Esta técnica vem sendo implantada com grande êxito por produtores de uva de mesa em todo o Brasil. Mota *et al.* (2006), Amorim *et al.* (2005), Favero *et al.* (2008) e Abrahão *et al.* (2002) utilizaram esta técnica e aumentaram a viabilidade de produção da videira Syrah e Niágara rosada na região sul de Minas Gerais. Souza e Fochesato (2007) e Anzanello *et al.* (2010) utilizaram a dupla poda no Rio Grande do Sul para alterar o ciclo vegetativo das cultivares Niagara Branca e Niagara Rosada. Mais recentemente, Hernandez *et al.* (2011) beneficiou-se desta técnica para melhorar a qualidade de Niagara Rosada na cidade de Louveira, no estado de São Paulo. Em todos esses trabalhos foi possível obter resultados satisfatórios com relação à técnica de dupla poda, permitindo a colheita em épocas mais secas do ano, garantido a maturação completa e o aumento na qualidade das uvas, melhores preços e menores ataques de doenças fúngicas. Entretanto, nenhum trabalho foi relatado na literatura utilizando esta técnica para variedades *V. vinifera*.

Como os altos teores de metoxipirazinas em vinhos têm sido relacionados à falta de maturação das uvas na época da colheita, entre outros fatores, esta técnica permite que as uvas sejam colhidas na época ideal, pois altera o ciclo da videira para épocas mais secas.

*Cobertura do vinhedo:*

Como já relatado, o clima exerce um papel extremamente importante para o desenvolvimento e a maturação da uva. Trabalhos na literatura constataram que o amadurecimento das uvas em climas mais frios faz com que estas apresentem um aroma herbáceo mais pronunciado do que aquelas que passam pelo amadurecimento em regiões mais quentes (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2000; Falcão *et al.*, 2007; Ryona *et al.*, 2008). Desta forma, a maior exposição à radiação incidente, principalmente nas horas do dia com temperaturas mais amenas, ativa os processos metabólicos na fruta, resultando na elevação dos níveis de sólidos solúveis totais (°Brix) e reduzindo os teores de metoxipirazinas (Hashizume e Samuta, 1999). A exposição à luz parece ter dois efeitos opostos na concentração de metoxipirazinas em uvas, pois promovem a formação biológica de metoxipirazinas durante o desenvolvimento das bagas, e a foto decomposição durante a maturação (Hashizume e Samuta, 1999).

Neste sentido, o ato de cobrir o vinhedo com plástico transparente pode ser favorável, pois ao mesmo tempo em que permite a passagem parcial da luz solar pelo plástico, pode formar um efeito estufa, fazendo com que o calor fique retido, elevando ainda mais temperatura e, conseqüentemente, degradando as metoxipirazinas. Não existem ainda, na literatura consultada, trabalhos que avaliaram os níveis desses compostos em vinhedos cobertos.

Diversos trabalhos estudaram formas isoladas de manejo como, por exemplo, a incidência da luz solar (Sala, 2004; Ryona *et al.*, 2008), a influência da irrigação (Sala *et al.*, 2005) e as diferentes temperaturas de maturação da uva (Falcão *et al.*, 2007), porém nenhum destes trabalhos realizou diferentes formas de manejo no mesmo vinhedo ou em vinhedos próximos uns aos outros, a fim de comparar e avaliar a melhor técnica agrônômica para diminuir as concentrações de metoxipirazinas.

### 3. Referências Bibliográficas

- ABRAHÃO, E.; ALVARENGA, A.A.; FRÁGUAS, J.C.; REGINA, M.A.; SILVA, V.J. Potencialidades do município de Lavras-MG, para produção extemporânea de uvas 'Niagara Rosada' para mesa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.4, p.865-868, 2002.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre – RS. Editora Artmed, 757 p., 1999.
- ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v.36, n.2, p.135-140, 2006.
- ALLEN, M. S. ; LACEY, M. J.; BOYD, S. Determination of methoxypyrazines in Red Wine by Stable Isotope dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1734-1738, 1994.
- ALLEN, M. S.; LACEY, M. J.; BOYD, S. Methoxypyrazines in red wines: Occurrence of 2-methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 769-772, 1995.
- AMORIM, D. A.; FÁVERO A. C.; REGINA, M. A.. Produção extemporânea da videira cv. Sirah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 327 – 331, 2005.
- ANTALICK, G. Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique : Rôle particulier des esters. Tese de Doutorado, Universidade de Bordeaux 2, França, 2010a.
- ANTALICK, G; PERELLO, M. C.; REVEL, G. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 121, p. 1236-1245, 2010b.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P.V.D.; COELHO, P.F. Uso de poda seca e da poda verde para obtenção de duas safras por ciclo vegetativo em três cultivares de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.1, p.196-203, 2010.
- ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDA'N, T.; ANCI'N-AZPILICUETA, C. Influence of addition of

- ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1312-1318, 2007.
- AZNAR, M.; LOPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Identification and Quantification of Impact Odorants of Aged Red Wines from Rioja. GC-Olfactometry, Quantitative GC-MS, and Odor Evaluation of HPLC Fractions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, n.6, p.2924-2929, 2001.
- BERGQVIST, J.; DOKOOZLIAN, N.; EBISUDA, N. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 1, p. 1-7, 2001.
- BISSON, L. F.; BUTZKE, C. E. Diagnosis and rectifications of stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.51, p.168-177, 2000.
- BOIDO, E.; MEDINA, K.; FARINA, L.; CARRAU, F.; VERSINI, G.; DELLACASSA, E. The Effect of Bacterial Strain and Aging on the Secondary Volatile Metabolites Produced during Malolactic Fermentation of Tannat Red Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.14, p.6271-6278, 2009.
- BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. Principles and Practices of Winemaking. New York – USA. Editora Chapman and Hall, 604 p., 1995.
- CANUTI, V.; CONVERSANO, M.; CALZI, M. L.; HEYMANN, H.; MATTHEWS, M. A.; EBERLER, S. E. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3012-3022, 2009.
- CHAPMAN, D. M.; THORNGATE, J. H.; MATTHEWS, M. A.; GUINARD, J. X.; EBELER, S. E. Yield Effects on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine concentration in Cabernet Sauvignon Using a Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5431-5435, 2004.
- DIAZ-MAROTO, M. C.; SCHNEIDER, R.; BAUMES, R. Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.9, p.3503-3509, 2005.

- ESTI, M., TAMBORRA, P. Influence of winemaking techniques on aroma precursors. **Analytica Chimica Acta**, n. 563, p. 173-179, 2006.
- FALCÃO, L. D. **Caracterização analítica e sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes altitudes de Santa Catarina**. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- FAVERO, A.C.; AMORIM, D.A.; MOTA, R.V.; SOARES, A.M.; REGINA, M.A. Viabilidade de produção da videira ‘Syrah’, em ciclo de outono-inverno, na região de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n.3, p.685-690, 2008.
- GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J.; GÓMEZ-MÍGUEZ, M; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: effects of grape maturity and soil type. **Journal of Food Engineering**, n. 9, p. 758–764, 2007.
- FALQUÉ, E.; FERNÁNDEZ, E.; DUBOURDIEU, D. Differentiation of white wines by their aromatic index. **Talanta**, n. 54, v. 2, p. 271 – 281, 2000.
- DUBOURDIEU, D.; TOMINAGA, T.; MASNEUF, I.; DES GACHONS, C. P. ; MURAT, M. L. The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation : The Example of Sauvignon blanc. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 1, n. 57, p. 81 -88, 2006.
- ESCUADERO, A.; CAMPO, E.; FARINA, L.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, n.11, p. 4501-4510, 2007.
- ÉTIEVANT, P. X. (1991). Wine. Volatile Compounds in Foods and Beverage. H. Maarse. New York – USA. Editora Marcel Dekker, p. 483-586, 1991.
- GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of SO<sub>2</sub> on the formation and evolution of volatile compounds in wines. **Food Control**, v.18, n.12, p.1501-1506, 2007.
- GARDE-CERDÁN, T.; MARTÍNEZ-GIL, A. M.; LORENZO, C.; LARA, J. F.; PARDO, F.; SALINAS, M. R. Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. **Food Chemistry**, v. 124, P. 106-116, 2011.
- FÁVERO, A. C. **Viabilidade de produção de videira “Syrah” em ciclos de verão e**



- inverno no sul de Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2007.
- FERREIRA, V.; AZNAR, M.; LOPEZ, M.; CACHO, J. Quantitative Gas Chromatography-Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract. Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.49, n.10, p.4818-4824, 2001.
- GUTH, H. Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.45, n.8, p.3022-3026, 1997a.
- GUTH, H. Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.45, n.8, p.3027-3032, 1997b.
- HARTMANN P. J.; McNAIR H. M.; ZOECKLEIN, B. W. Measurement of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazine by Headspace Solid-Phase Microextraction in Spiked Model Wines. ***American Journal of Enology and Viticulture***, v. 53, p. 285-288, 2002.
- HASHIZUME, K.; SAMUTA, T.; Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. ***American Journal of Enology and Viticulture***, v. 50, p. 194-198, 1999.
- HERNÁNDEZ-ORTE, P.; IBARZ, M. J.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. ***Food Chemistry***, v. 89, p. 163-174, 2005.
- HERNANDES, J. L.; JÚNIOR, M. J. P.; BLAIN, G. C. Fenologia e produção da videira “Niagara Rosada” conduzida em manjedoura na forma de Y sob telado plástico durante as safras de inverno e verão. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. p. 499-504, 2011.
- HUNTER, J. J.; VISSER, J. H. The effect of partial defoliation on quality characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes. II. Skin color, skin sugar, and wine quality. ***American Journal of Enology and Viticulture***, v. 42, n. I, p. 13-8. 1991.
- JACKSON, R. Chemical Constituents of grapes. In: ***Wine Science: principles and applications***. 3ª edição, London: Academic Press, p. 270 – 331, 2008.
- JACKSON, I.; LOMBARD, P. B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: a review. ***American Journal of Enology and***

- Viticulture**, v. 44, n. 4, p. 409-430, 1993.
- JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª edição, Porto Alegre – RS. Editora Artmed, 711 p., 2005.
- KOCH, A.; DOYLE, C. L.; MATTHEWS, M. A.; WILLIAMS, L. E.; EBELER, S. E. 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2190-2198, 2010.
- KOTSERIDIS, Y.; BAUMES, R. L.; BERTRAND, A.; SKOUROUMOUNIS, J. K. Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using stable isotope dilution assay. **Journal of Chromatography A**, v. 841, p. 229-237, 1999.
- KOTSERIDIS, Y.; ANOCIBAR-BELOQUI, A.; BAYONOVE, CL.; BAUMES, R. L.; BERTRAND, A. Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 33, p. 19-23, 1999b.
- KOTSERIDIS, Y.; BAUMES, R. Identification of Impact Odorants in Bordeaux Red Grape Juice, in the Commercial Yeast Used for Its Fermentation, and in the Produced Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.2, p.400-406, 2000.
- LACEY, M. J.; ALLEN, M. S.; HARRIS, R. L. N.; BROWN, W. V. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc and wines. **American Journal of Enology and Viticultural**, v. 42, p. 109-112, 1991.
- LEE, J.; SCHREINER, R. P. Free amino acid profiles from 'Pinot noir' grapes are influenced by vine N-status and sample preparation method. **Food Chemistry**, v. 119, p. 484-489, 2010.
- LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos*. Vol.3, 1º edição, São Paulo – SP. Editora Edgard Blucher, 593 p., 2001.
- LÓPEZ, R.; EZPELETA, E.; SÁNCHEZ, I.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. **Food Chemistry**, v.88, n.1, p.95-103, 2004.
- LOSCOS, N.; HERNANDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Release and

- Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.16, p.6674-6684, 2007.
- LUND, S. T.; BOHLMANN, J. The Molecular Basis for Wine Grape Quality: A Volatile Subject. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 804-805, 2006.
- MARAIS, J. Terpenes in the aroma of grapes and wine: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 4, p. 49 -58, 1983.
- MOTA, R.V.; REGINA, M.A.; AMORIN, D.A.; FÁVERO, A.C. Fatores que afetam a maturação e a qualidade da uva para vinificação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.234, p.56- 64, 2006.
- MOTTA, V. T., Bioquímica. 2ª edição. Rio de Janeiro – RJ. Editora MedBook, 488 p., 2011.
- NAIKER, M.  $\beta$ -damascenone-yielding precursor(s) from Cabernet sauvignon grapes. **South Pacific Journal of Nature Science**, v.19, p.11-17, 2001.
- NOBLE, A. C.; ELLIOTFISK, D. L.; ALLEN, M. S. Vegetative Flavor and Methoxypyrazines in Cabernet sauvignon. **Fruit Flavors**, v. 596, p. 226-234, 1995.
- PINEAU, B. Contribution à l'étude de l'arôme fruité spécifique des vins rouges de *Vitis vinifera* L. cv. Merlot noir et Cabernet-Sauvignon. Tese de Doutorado, Universidade de Bordeaux 2, França, 2007.
- PRESTON, L. D.; BLOCK, D. E.; HEYMANN, H.; SOLEAS. G.; NOBLE, A. C.; EBELER, S. E. Defining Vegetal Aromas in Cabernet Sauvignon Using Sensory and Chemical Evaluations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 59, p. 137-145, 2008.
- REGINA, M. A.; FRÁGUAS, J. C.; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, C. R.; AMORIM D. A.; MOTA, R. V.; FÁVERO, A. C. Implantação e manejo do vinhedo para produção de vinhos de qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.234, p. 16-31, set/out. 2006.
- REGINA, M. A.; CARMO, E. L.; FONSECA, A. R.; PURGATTO, E.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M.; RIBEIRO, A. P.; MOTA, R. V. Influência da altitude na qualidade das uvas “Chardonnay” e “Pinot Noir” em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 143-150, 2010.

- RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. *Traité d'Oenologie: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. Volume 2, 2<sup>a</sup> edição, West Sussex : John Wiley and Sons, Ltd., 441 p., 2006.
- ROUJOU DE BOUBÉE, D.; VAN LEEUWEN, C.; DUBOURDIEU, D. Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red Bordeaux and Loire wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.4830-4834, 2000.
- ROUJOU-DE-BOUBÉE, D.; CUMSILLE, A. M.; PONS, D.; DUBORDIEU, D. Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet sauvignon bunches and its extractability during vinification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 1-5, 2002.
- RYONA, I.; PAN, B. S.; INTRIGLIOLO, D. S.; LAKSO, A. N.; SACKS, G. L. Effects of cluster light exposure on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Franc). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10838-10846, 2008.
- SAERENS, S. M. G.; VERSTREPEN, K.J.; VAN LAERE, S.D.M.; VOET, A.R.D.; VAN DIJCK, P.; DELVAUX, F.R.; THEVELEIN, M. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.7, p.4446-4456, 2006.
- SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K.J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.2, p.454-461, 2008.
- SALA, C.; MESTRES, M.; MARTI, M. P.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 1-6, 2002.
- SALA, C. C. **3-alkil-2-metoxipirazines en Mostos i Vins: Determinación Analítica i Estudi de la Influència D'Alguns Factors Vitivinícoles**. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, Terragona, Espanha, 2004.
- SALA, C.; BUSTO, O.; GUASCH, J.; ZAMORA, F. Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet

- Sauvignon: influence of irrigation and plantation density. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1131-1136, 2005.
- SANTOS, J.; SOUSA, M. J.; CARDOSO, H.; INÁCIO, J.; SILVA, S.; SPENCER-MARTINS, I. Ethanol tolerance of sugar transport and the rectification of stuck wine fermentations. **Microbiology**, v.154, p.422-430, 2008.
- SCHMARR, H. G.; GANB, S.; KOSCHINSKI, S.; FISCHER, U.; RIEHLE, C.; KINNART, J.; POTOURIDIS, T.; KUTYREV, M. Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography–mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry and on-line liquid chromatography-multidimensional gas chromatography–mass spectrometry as potential loopholes. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6769-6777, 2010.
- SKINKS, P. A.; BORDELON, B. P.; WOOD, K. V. Comparison of Monoterpene Constituents in Traminette, Gewürztraminer, and Riesling Winegrapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 4, n. 59, 2008.
- SOUZA, P. V. D.; FOCESATO, M. L. Emprego da poda verde para obtenção de duas safras por ciclo vegetativo em 'Niagara Branca'. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.611-616, 2007.
- SPILLMAN, P. J.; SEFTON, M. A.; GAWEL, R. The contribution of volatile compounds derived during oak barrel maturation to the aroma of a Chardonnay and Cabernet Sauvignon wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, n. 10, p. 227-235, 2004.
- SUMBY, K. M.; GRBIN, P.R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, v.121, n.1, p.1-16, 2010.
- TESNIÈRES, C.; NICOL, M.Z.; ROMIEN, C.; FLANZY, C. Effect of increasing exogenous ethanol on the anaerobic metabolism of grape berries. **Science des Aliments**, v.11, p.111-124, 1991.
- TRIULZE, G.; SCOTTI, B. Técnicas enológicas de valorização aromática de vinhos. **Enartis Portugal**, edição julho/agosto/setembro, p. 26-29, 2009.

UGLIANO, M.; MOIO, L. Free and hydrolytically released volatile compounds of *Vitis vinifera* L. cv. Fiano grapes as odour-active constituents of Fiano wine. **Analytica Chimica Acta**, v.621, n.1, p.79-85, 2008.

VILANOVA, M.; SIEBERT, T. E.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. **Food Chemistry**, v.33, n.1, p.124-131, 2012.

WILLIAMS, P. J.; SEFTON, M. A.; FRANCIS, L. I. Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor. In *Flavour Precursors, Thermal and Enzymatic Conversions*; Teranish, R.; Takeoka, G. R.; Günterm, M. ACS Symposium Series 490; American Chemical Society: Washington – DC, p. 74-86, 1992.

## **CAPÍTULO 2:**

**Influência da adição de diferentes concentrações de nitrogênio no vinhedo sobre a fermentação alcoólica das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon***

**Rodrigues, Daniele<sup>1</sup>; Bely, Marina<sup>3</sup>; Barbe, Jean-Christophe<sup>3</sup>; Revel, Gilles<sup>3</sup>; Wagner, Roger<sup>2</sup>; Godoy, Helena Teixeira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>: Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

<sup>2</sup>: Faculdade e Farmácia e Bioquímica – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>3</sup>: Faculté d'Œnologie – Institut des Sciences de la Vigne et du Vin – Université Victor Segalen Bordeaux II, France.

*Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico*

*Applied and Environmental Microbiology (ISSN 1098-5336)*





## Influência da adição de diferentes concentrações de nitrogênio no vinhedo sobre a fermentação alcoólica das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*

Rodrigues, D.; Bely, M.; Barbe, J. C.; Revel, G.; Wagner, R.; Godoy, H. T.

### RESUMO

Um acontecimento bastante comum durante a vinificação é o consumo lento e/ou incompleto dos açúcares pelas leveduras, provocando uma “fermentação presa”, causada principalmente pela quantidade insuficiente de nitrogênio no mosto. A presença desse composto no mosto possui um importante efeito na velocidade de fermentação, já que os compostos nitrogenados aumentam a produção de biomassa e estimulam a velocidade da metabolização do açúcar, evitando assim uma fermentação mais lenta ou incompleta. Com o intuito de suprir a falta do nitrogênio no mosto para a fermentação, este trabalho teve como objetivo pulverizar diferentes concentrações de amônia no solo das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* com o intuito de avaliar a eficiência da técnica de manejo e a influência do nitrogênio sobre a fermentação alcoólica dos vinhos elaborados. Para isso, os vinhedos foram divididos em parcelas, sendo algumas mantidas em sua forma natural (controles) e outras pulverizadas com diferentes concentrações de amônia no solo (10, 60, 90, 120 e 180 kgN.Hectare<sup>-1</sup>). Na época da vindima, as uvas foram colhidas e vinificadas, e os vinhos foram analisados quanto aos parâmetros enológicos (pH, graduação alcoólica, açúcares e acidez total e volátil). Os resultados mostraram que as concentrações de nitrogênio assimilável obtidas para os mostos não tiveram uma resposta linear em relação às concentrações de amônia pulverizadas no solo. Entretanto, algumas parcelas que foram pulverizadas com amônia se destacaram, apresentando concentrações mais elevadas de nitrogênio assimilável (167, 163 e 184 mg.L<sup>-1</sup>, para as três cultivares, respectivamente) quando comparados com os tratamentos controles (128, 103 e 115 mg.L<sup>-1</sup>), mostrando a eficiência da técnica de manejo. Além disso, esses mesmos tratamentos apresentaram elevadas concentrações de aminoácidos nos mostos (752, 921 e 998 mg.L<sup>-1</sup>), resultando em uma correlação positiva (0,97; 0,95 e 0,99) entre as concentrações de nitrogênio assimilável e as concentrações de aminoácidos, indicando que a síntese de aminoácidos foi diretamente proporcional à quantidade de nitrogênio assimilada pelas videiras. A presença de elevadas concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos nos mostos não teve influência na fermentação da varietal *Cabernet franc*, porém influenciou e acelerou a fermentação alcoólica das variedades *Merlot* e *Cabernet sauvignon*, cujos tratamentos que apresentaram as maiores concentrações desses compostos nos mostos tiveram seu tempo de fermentação reduzido de 9 para 7 dias. Os parâmetros enológicos dos vinhos (pH, acidez total, acidez volátil, etanol e açúcares) não apresentaram grandes diferenças entre os tratamentos e entre as três cultivares analisadas, porém foram encontradas correlações positivas entre as concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos sobre os teores de etanol (0,88 e 0,95, respectivamente) e correlações negativas entre as concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos sobre a acidez volátil (-0,99 e -0,99, respectivamente) para as variedades *Merlot* e *Cabernet sauvignon*.

Palavras-chaves: amônia, nitrogênio assimilável, aminoácidos, vinificação, *Vitis vinifera*.

**ABSTRACT**

A fairly common occurrence during the vinification is the consumption slow and/or incomplete of sugars by yeast, causing a "stuck fermentation", mainly caused by the insufficient amount of nitrogen in the must. The presence of this compound in the musts has an important effect on the speed of fermentation, because the nitrogen compounds increase biomass production and stimulate the rate of metabolism of sugar, thereby preventing fermentation slow or incomplete. In order to address the lack of nitrogen in the must to the fermentation, this study aimed to spray different concentrations of ammonia in the soil of *Merlot*, *Cabernet Franc* and *Cabernet Sauvignon* in order to evaluate the efficiency of the management technique and the influence of nitrogen in the alcoholic fermentation in wines produced. For this, the vineyards were divided into plots, some kept in its natural form (controls) and other sprayed with different concentrations of ammonia in the soil (10, 60, 90, 120 and 180 kgN.Hectare<sup>-1</sup>). At the time of harvest, the grapes were harvested and vinified, and the wines were analyzed for enological parameters (pH, alcohol content, sugars and total and volatile acidity). The results showed that concentrations of assimilable nitrogen obtained for musts did not have a linear response to the concentrations of ammonia sprayed in the soil. However, some plots that were sprayed with ammonia were highlighted, with higher concentrations of assimilable nitrogen (167, 163 and 184 mg.L<sup>-1</sup> for all three cultivars, respectively) when compared to control treatments (128, 103 and 115 mg.L<sup>-1</sup>), showing the efficiency of the management technique. In addition, these same treatments showed high concentrations of amino acids in musts (752, 921 and 998 mg L<sup>-1</sup>), resulting in a positive correlation (0,97; 0,95 and 0,99) between the concentrations of assimilable nitrogen and amino acid concentrations, indicating that the synthesis of amino acids was directly proportional to the amount of nitrogen assimilated by vines. The presence of high concentrations of assimilable nitrogen and amino acids in the musts had no influence on the fermentation of *Cabernet franc*, but influenced and accelerated the fermentation of varieties *Merlot* and *Cabernet Sauvignon*, the treatments with the highest concentrations of these compounds in musts had their fermentation time reduced from 9 to 7 days. Enological parameters of wines (pH, total acidity, volatile acidity, ethanol and sugars) showed no significant differences between treatments and between the three cultivars analyzed, but positive correlations were found between the concentrations of assimilable nitrogen and amino acids on the levels of ethanol (0.88 and 0.95, respectively) and negative correlations between concentrations of assimilable nitrogen and amino acids on the volatile acidity (-0.99 and -0.99, respectively) for *Merlot* and *Cabernet sauvignon*.

Keywords: ammonia, assimilable nitrogen, amino acids, vinification, *Vitis vinifera*.

## 1. Introdução

O vinho, assim como muitas outras bebidas fermentadas, deve sua formação e suas características às atividades fermentativas dos microrganismos.

Para a elaboração de um vinho, o mosto das uvas passa por duas fermentações, incluindo uma fermentação alcoólica e, em seguida, uma fermentação malolática. A fermentação alcoólica é um processo metabólico no qual alguns açúcares fermentescíveis, principalmente glicose e frutose, são transformados em álcool e dióxido de carbono por ação de leveduras, que objetivam única e exclusivamente gerar energia para sua sobrevivência (Jay, 2005; Lima *et al.*, 2001). Já a fermentação malolática é caracterizada pela ação de bactérias lácticas, que transformam o ácido málico (ácido dicarboxílico), oriundo da primeira fermentação, em ácido láctico (ácido monocarboxílico), provocando uma redução sensorial e quantitativa na acidez do vinho, devido ao ácido láctico ser menos agressivo ao paladar humano e devido as bactérias lácticas também consumirem os ácidos pirúvico, cítrico e oxoglutárico presentes no vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Apesar da importância da fermentação malolática, é a fermentação alcoólica a responsável pelas reações mais importantes que ocorrem no processo de vinificação.

Embora a fermentação alcoólica pareça um processo simples, a transformação do açúcar em etanol e dióxido de carbono envolve diversas reações químicas em sequencia ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica (Lima *et al.*, 2001). Dessa maneira, diversos problemas podem surgir durante este processo, resultando em vinhos com qualidades físico-químicas e sensoriais inferiores.

Um fato bastante comum durante a vinificação é o consumo lento e/ou incompleto dos açúcares pelas leveduras, provocando uma “fermentação presa”. As causas desse problema podem ser devidas a vários fatores, incluindo a limitação de nutrientes, a temperatura inadequada, o pH inapropriado, a presença de compostos tóxicos e a baixa tolerância ao etanol pelas leveduras (Santos *et al.*, 2008).

A escolha da levedura é, sem dúvida, um dos fatores mais importantes durante a vinificação, pois são esses microrganismos que fornecerão um aparato enzimático completo necessário para a realização de todas as transformações metabólicas requeridas na fermentação. Embora as leveduras da espécie *Saccharomyces sp* não façam parte dos microrganismos naturalmente presentes nas uvas, elas se adaptam tão

bem ao mosto das uvas que rapidamente dominam a fermentação, prevalecendo sobre os outros microrganismos até o final do processo fermentativo (Boulton *et al.*, 1995). Muitos parâmetros fisiológicos característicos dessa espécie são responsáveis por sua preferência e predominância, entre os quais pode-se citar a rápida metabolização dos nutrientes presentes nos mostos e consequente produção de substâncias tóxicas aos outros microrganismos. Além disso, essa espécie é capaz de sobreviver em meios com altas concentrações de etanol e em altas temperaturas (Boulton *et al.*, 1995).

A concentração de açúcar presente no mosto também é capaz de determinar o progresso da fermentação, pois trata-se da principal fonte de energia que será utilizadas pelas leveduras ao longo de suas atividades metabólicas. Um mosto pobre em açúcares fermentescíveis resultará em uma fermentação incompleta. Além disso, a concentração de açúcar vai determinar o teor alcoólico final do vinho elaborado (Lima *et al.*, 2001).

A presença de nitrogênio no mosto possui um importante efeito na velocidade de fermentação, já que os compostos nitrogenados aumentam a produção de biomassa e estimulam a velocidade da metabolização do açúcar, evitando assim uma fermentação mais lenta ou incompleta (Arias-Gil *et al.*, 2007). Os aminoácidos livres e a amônia constituem a maior parte do nitrogênio presente no meio para a vinificação, que é utilizado para garantir a qualidade das fermentações alcoólica e malolática (Lee e Schreiner, 2010). Sabe-se que a principal falta desse composto nos mostos é devida, principalmente, à baixa concentração de compostos nitrogenados no solo e à maturação incompleta da uva na época da colheita (Arias-Gil *et al.*, 2007).

Alguns parâmetros da fermentação alcoólica são facilmente controlados pelo homem, como o pH e a temperatura. Entretanto, os maiores problemas de uma fermentação ruim provêm da ação das leveduras. Se a “fermentação presa” é uma resposta da levedura para as condições adversas, um reajuste nas condições do mosto pode corrigir tal problema (Bisson e Butzke, 2000). Ao longo das últimas duas décadas, os produtores de vinho vêm buscando produzir uvas com qualidades elevadas, com o intuito de obter a melhor matéria-prima para a elaboração de vinhos finos. Como consequência, tem-se uvas com grandes potenciais enológicos, dotadas de elevadas concentrações de açúcares para a realização de uma fermentação completa e satisfatória, além de possuírem também teores de fenóis e acidez ideais para a elaboração de um ótimo vinho.

Frente ao problema da concentração insuficiente de nitrogênio no mosto, alguns

viticultores adicionam sais de amônia diretamente ao mosto antes da fermentação (Arias-Gil *et al.*, 2007). Entretanto, a escolha da melhor concentração de nitrogênio a ser adicionada no mosto é de fundamental importância para a boa qualidade do produto final, já que vinhos com altas quantidades de resíduos de nitrogênio possuem um maior risco de instabilidade microbiana, com a possível formação de aminas biogênicas e etilcarbamato, que são compostos que depreciam a qualidade do vinho (Garde-Cerdán *et al.*, 2011). Sendo assim, a pulverização de nitrogênio diretamente no solo torna-se a opção mais segura e promissora para melhorar a concentração deste composto nas uvas e, conseqüentemente, no mosto.

Diante desse desafio, este trabalho objetivou realizar a pulverização de diferentes concentrações de amônia em vinhedos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, localizados na região de Bordeaux, França, e microvinificar as uvas coletadas nesses vinhedos, com o intuito de verificar a eficiência da técnica de manejo e a influência do nitrogênio sobre a evolução da fermentação alcoólica e a qualidade, através dos parâmetros enológicos, dos vinhos elaborados.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Descrição dos vinhedos e coleta das amostras**

Para avaliar a influência da adição de nitrogênio no vinhedo sobre a fermentação alcoólica de *Vitis vinifera*, foram selecionadas 3 variedades de uvas oriundas de duas diferentes propriedades localizadas na região de Bordeaux, França. As amostras de *Cabernet sauvignon* foram colhidas no Château Haut Brion, localizado na cidade de Pessac, e as amostras de *Cabernet franc* e *Merlot* foram colhidas no Château Cheval Blanc, na cidade de Saint Emilion. Em ambos os Châteaux, o tipo de suporte e condução das videiras é do tipo espaldeira.

Pessac está localizado na altitude de 56 metros, latitude de 44° 48'00"N e longitude 00° 37'00"W. Saint Emilion possui altitude de 107 metros, latitude de 44° 53'00"N e longitude 00° 39'00"W. As duas cidades estão localizadas a uma distância de 53 Km e pertencem à região de Bordeaux, caracterizada pelo clima temperado do tipo oceânico,

com invernos suaves (temperatura média de 6°C) e verões quentes (temperatura média de 25°C). A umidade relativa do ar está em torno de 80% e o solo é do tipo arenoso misturado a cascalho, com consistência macia e de fácil drenagem.

Para este estudo, os vinhedos foram divididos em parcelas (n=3), as quais foram aleatoriamente pulverizadas com diferentes concentrações de amônia (sulfato de amônia) no solo. Para as cultivares *Merlot* e *Cabernet franc*, as concentrações variaram entre 10 e 180 quilogramas de nitrogênio por hectare e para a cultivar *Cabernet sauvignon*, entre 10 e 120 quilogramas de nitrogênio por hectare (Tabela 2.1).

Para avaliar a eficiência do tratamento, parcelas foram mantidas sem pulverização com nitrogênio (tratamentos controles). Para todas as outras parcelas, a amônia foi pulverizada duas vezes ao longo do ciclo vegetativo, no momento em que as videiras apresentaram o início da brotação e o no início da floração, com intervalo de aproximadamente 1 mês. Cerca de 5 Kg de uvas foram colhidas por toda a extensão de cada tratamento, no período de maturação completa (determinada pela concentração de açúcar: 198 g.L<sup>-1</sup> para *Merlot*, 188 g.L<sup>-1</sup> para *Cabernet franc* e 191 g.L<sup>-1</sup> para *Cabernet sauvignon*), entre os meses de agosto e setembro de 2011, e congeladas a uma temperatura de -25°C até serem analisadas e microvinificadas.

Tabela 2.1. Identificação das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* e as concentrações de nitrogênio recebidas para cada tratamento.

<i>Merlot</i>		<i>Cabernet franc</i>		<i>Cabernet sauvignon</i>	
Tratamento	Concentração de Nitrogênio*	Tratamento	Concentração de Nitrogênio*	Tratamento	Concentração de Nitrogênio*
Mc**	0	CFc**	0	CSc**	0
M10	10	CF10	10	CS10	10
M90	90	CF90	90	CS60	60
M120	120	CF120	120	CS120	120
M180	180	CF180	180		

\*: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>. \*\*:c: tratamento controle.

## 2.2. Reagentes e padrões

Todos os aminoácidos e as vitaminas utilizados neste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, França). Ácido tartárico, ácido cítrico, ácido (L)málico, méso-inosito, iodeto de potássio, dióxido de enxofre, Tween 80, ergosterol, oleato de sódio, ácido propiônico, dimetilsulfoxida,  $\beta$ -ciclodextrina, o-phtaldialdeído, ácido iodoacético e norvalina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, França). Fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de amônia, sulfato de manganês monohidratado, sulfato de zinco heptahidratado, sulfato de cobre pentahidratado, cloreto de cobalto hexahidratado, molibdato de amônia tetra hidratado, ácido bórico, fosfato de sódio, hidróxido de potássio, glicose e frutose foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Etanol, acetonitrila e metanol (grau HPCL) foram adquiridos da VWR-Prolabo (Fontenay-sous-bois, França).

## 2.3. Preparo das amostras para as microvinificações

As diferentes parcelas (n=3) dos vinhedos utilizados neste trabalho tiveram suas uvas microvinificadas separadamente, em duplicata, com o intuito de avaliar a concentração ideal de nitrogênio que melhor favorecesse a fermentação alcoólica.

Levando-se em consideração a diferença existente na composição química dos mostos das três cultivares estudadas, optou-se por utilizar somente as cascas das uvas para a microvinificação. Em estudo realizado por Pineau (2007) sobre a fermentação alcoólica das cultivares *Merlot* e *Cabernet sauvignon* para a produção de compostos aromáticos, verificou-se que os vinhos produzidos apenas com as cascas das uvas possuíam um aroma mais intenso e frutado quando comparados com os vinhos produzidos com as bagas inteiras. Além disso, as cascas das uvas são mais afetadas do que aspulpas pelas técnicas de cultivo e condições de maturação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Sendo assim, um meio de cultura sintético, simulando o mosto natural das uvas, foi elaborado. Dessa maneira, o meio fermentativo foi padronizado para todas as cultivares e, com isso, foi possível avaliar a influência do nitrogênio sobre a fermentação alcoólica, sem que os compostos presentes nos mostos naturais pudessem interferir nos resultados.

Portanto, antes de serem submetidas ao processo fermentativo, as uvas passaram por um pré-tratamento, incluindo a separação das cascas, a extração dos compostos químicos tais como açúcares, ácidos, compostos fenólicos e compostos aromáticos, a concentração dos extratos e a determinação das concentrações de glicose e frutose presentes nos extratos. As etapas referentes ao pré-tratamento estão detalhadas a seguir.

O preparo das amostras para as microvinificações, bem como as microvinificações, foram realizadas de acordo com Pineau (2007).

### **2.3.1. Separação das cascas das uvas**

Para a separação das cascas das uvas, as bagas foram descongeladas lentamente em água corrente, com temperatura de aproximadamente 20°C, permitindo a lavagem das mesmas. Em seguida as cascas foram separadas manualmente das polpas e das sementes pressionando-se as bagas entre os dedos polegar e indicador. As cascas foram brevemente lavadas em água corrente, secas e armazenadas no congelador. Os mostos, contendo as polpas e as sementes, foram igualmente congelados para posterior análise.

### **2.3.2. Extração das cascas das uvas**

A extração dos compostos químicos presentes nas cascas das uvas foi realizada com solução hidroalcoólica (1:1). Foi utilizado um total de 150 g de cascas para cada parcela dos vinhedos. As cascas foram colocadas em Erlenmeyers com volume de 500 mL e adicionadas de 150 mL da solução hidroalcoólica. As extrações foram realizadas durante 1 semana em temperatura ambiente com agitação constante de 215 rpm e no escuro, com o intuito de evitar a incidência luminosa e a possível degradação dos compostos presentes,

Posteriormente, os extratos obtidos foram filtrados em papel filtro e armazenados no congelador para próximas etapas.



### 2.3.3. Concentração dos extratos das cascas das uvas

Após o processo de extração dos compostos químicos presentes nas cascas das uvas, um total de 100 mL de cada extrato foi concentrado em rotaevaporador com a temperatura do banho-maria mantida constante a 20°C, com o intuito de eliminar todo o etanol presente. Os extratos finais concentrados apresentaram-se como um xarope e foram utilizados para as microvinificações.

### 2.3.4. Determinação de açúcares nos extratos das cascas das uvas

A determinação das concentrações de glicose e frutose presentes nos extratos foi realizada com o intuito de padronizar a quantidade de açúcar presente em todas as microvinificações. Para a análise, os extratos obtidos das cascas das uvas foram centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos em temperatura de 22 °C, e os sobrenadantes foram injetados diretamente no cromatógrafo a líquido.

A determinação da concentração dos açúcares foi realizada de acordo com a metodologia validada e utilizada no Laboratório de Química Analítica, do Instituto de Ciências da Uva e do Vinho (ISVV), na cidade de Bordeaux, França. As análises foram realizadas utilizando-se um Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Waters modelo 515 equipado com um detector de índice de refração Waters modelo 1530. A separação dos açúcares foi realizada em uma coluna de sílica fundida dotada de grupamentos NH<sub>2</sub> (250 mm x 4,6 mm d.i, 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel utilizada era constituída por água e acetonitrila (2:8), que se manteve em vazão constante de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> durante todo o processo de separação. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

## 2.4. Condições para as microvinificações

As microvinificações consistiram na adição dos extratos concentrados das cascas das uvas em um meio de cultura sintético que simulava o mosto natural das uvas, sendo, em seguida, inoculados com cepas levedurianas de *Saccharomyces sp* para a realização da

fermentação alcoólica. As etapas referentes às microvinificações estão detalhadas logo abaixo.

#### 2.4.1. Preparo do meio de cultura sintético

O meio de cultura sintético utilizado neste trabalho foi elaborado com o objetivo de atingir a máxima semelhança com os mostos naturais das uvas. Para isso, uma ampla diversidade de compostos químicos foi utilizada, incluindo macronutrientes, oligoelementos, aminoácidos e vitaminas, listados na Tabela 2.2. Os compostos foram diluídos em água deionizada (Milli-Q) e homogeneizados com o auxílio de uma barra e um agitador magnéticos.

Tabela 2.2. Composição química do meio de cultura sintético utilizado para as microvinificações das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*.

Compostos	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
<i>Macronutrientes</i>	
Ácido tântrico	3000
Acido cítrico	300
Ácido (L-)málico	300
Fosfato de potássio	2000
Sulfato de magnésio	200
Sulfato de amônia	300
Méso-inositol	300
<i>Oligoelementos</i>	
Sulfato de manganês monohidratado	0,004
Sulfato de zinco heptahidratado	0,004
Sulfato de cobre pentahidratado	0,001
Iodeto de potássio	0,001
Cloreto de cobalto hexahidratado	0,0004
Molibdato de amônia tetra hidratado	0,001
Ácido bórico	0,001

Continuação da Tabela 2.2.

<i>Aminoácidos</i>	
Tirosina	1,4
Triptofano	13,7
Isoleucina	2,5
Acido aspártico	3,4
Acido glutâmico	9,2
Arginina	28,6
Leucina	3,7
Treonina	5,8
Glicina	1,4
Glutamina	38,6
Alanina	11,1
Valina	3,4
Metionina	2,4
Fenilalanina	2,9
Serina	6
Histidina	2,5
Lisina	1,3
Cisteína	1,0
Prolina	46,8
<i>Vitaminas</i>	
Biotina	0,00004
Tiamina	0,001
Piridoxina	0,001
Ácido nicotínico	0,001
Ácido pantotênico	0,001
Ácido para-aminobenzóico	0,001

Após a adição e a homogeneização de todos os compostos, ajustou-se o pH do meio de cultura sintético para 3,3 como o auxílio de uma solução de hidróxido de potássio ( $10 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e filtrou-se o mesmo através de uma membrana com espessura de  $0,45 \mu\text{m}$ .

Por último, o meio de cultura sintético foi adicionado de fatores anaeróbios (Tabela 2.3), com a finalidade de evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis durante a fermentação e favorecer o crescimento das leveduras inoculadas.

Tabela 2.3. Fatores anaeróbios utilizados para o preparo do meio de cultura sintético utilizado para as microvinificações das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*.

Compostos	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
Tween 80	0,0005
Ergosterol	0,015
Oleato de sódio	0,005

#### 2.4.2. Preparo do pré-inóculo

A função do pré-inóculo consistiu na inoculação da levedura *Saccharomyces sp* (cepas industriais) no meio de cultura sintético com 24 horas de antecedência da realização das microvinificações. Dessa maneira, as leveduras tiveram tempo para se adaptar àquele microambiente e se multiplicarem, tornando-se aptas a realizar as transformações metabólicas requeridas durante a fermentação alcoólica. O meio para o crescimento do pré-inóculo deve se assemelhar ao máximo com o meio em que os microrganismos serão inoculados, com a finalidade de evitar o estresse e a possível morte dos microrganismos devido às mudanças no microambiente. Portanto, utilizou-se o meio de cultura sintético que simulava o mosto natural das uvas para o preparo dos pré-inóculos. Quantidades de 12 mL do meio de cultura sintético foram diluídas na proporção 1:1 com água deionizada (Milli-Q) e colocadas em erlenmeyers com volume de 125 mL. Em seguida, adicionou-se glicose e frutose, também na proporção 1:1, na concentração final de 190 g.L<sup>-1</sup> e ajustou-se o pH dos meios para 3,3 com uma solução de hidróxido de potássio (10 mol.L<sup>-1</sup>). Por último, os meios foram filtrados através de membranas com espessura de 0,45 µm e inoculados com 400 mg da levedura *Saccharomyces sp* (FX 10 para vinhos tintos). Os Erlenmeyers foram mantidos em temperatura ambiente sob agitação constante de 300 rpm por 24 horas. A quantidade de cepas levedurianas obtidas em cada erlenmeyer foi medida no equipamento Counter-Cell (Beckman-Coulter modelo Z1) e foi suficiente para inocular, em média, 8 garrafas de microvinificações.

### 2.4.3. Microvinificações

Todas as amostras foram microvinificadas separadamente, em duplicata. As microvinificações foram realizadas em garrafa âmbar com volume final de 150 mL, tampadas com rolhas de silicone dotadas de um orifício que permitiu a troca de gases entre o interior e o exterior das garrafas. Cada garrafa recebeu um volume final de 100 mL, composto pelo extrato concentrado das cascas das uvas, pelo meio de cultura sintético e pelos açúcares glicose e frutose como fontes energéticas para os microrganismos. Com o intuito de padronizar as concentrações de açúcares presente em todas as garrafas, foram adicionadas, separadamente, concentrações diferentes de glicose e frutose (na proporção 1:1) em cada garrafa até atingir a concentração final de  $190 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares, levando-se em consideração as concentrações iniciais de açúcares presente naturalmente nos extratos. Após a homogeneização desses compostos, o meio fermentativo teve seu pH ajustado para 3,3 com uma solução de hidróxido de potássio ( $10 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e foi adicionado de  $\text{SO}_2$  a uma concentração final de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ . Por último, adicionou-se o pré-inóculo na concentração de  $2 \cdot 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$ .

As garrafas foram incubadas em estufa com temperatura e agitação constantes de  $24^\circ\text{C}$  e 300 rpm, respectivamente, até o final das fermentações.

As fermentações foram acompanhadas diariamente através da construção de uma curva de fermentação, correlacionando-se o tempo decorrido e a perda de  $\text{CO}_2$  devido ao metabolismo microbiano, que pôde ser medida através da pesagem das garrafas.

Ao fim das fermentações, adicionou-se novamente  $\text{SO}_2$  a uma concentração final de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  e as garrafas foram armazenadas a uma temperatura de  $10^\circ\text{C}$  por 48 horas, com o intuito de paralisar qualquer resquício de atividade microbiana. Em seguida, os vinhos foram centrifugados por 15 minutos a uma temperatura de  $10^\circ\text{C}$  e 7000 rpm, para a retirada das células microbianas.

Os vinhos elaborados foram armazenados a uma temperatura de  $-15^\circ\text{C}$  até o momento das análises.

## **2.5. Determinação dos parâmetros enológicos e dos compostos nitrogenados dos mostos**

Para as análises dos parâmetros enológicos e dos compostos nitrogenados, tais como os teores de nitrogênio assimilável e de aminoácidos, os mostos foram descongelados e homogeneizados. Posteriormente, uma alíquota de 2 mL foi separada e centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos a uma temperatura de 20°C para ser analisada. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### **2.5.1. Determinação dos parâmetros enológicos dos mostos**

As análises clássicas do mosto, tais como pH, nitrogênio assimilável e acidez total e volátil, foram realizadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (OenoFoss TM). O equipamento estava devidamente calibrado para essas análises e as leituras foram feitas diretamente nos mostos, a temperatura ambiente. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### **2.5.2. Determinação dos aminoácidos totais dos mostos**

Os aminoácidos foram analisados de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Choi (2012), no Laboratório de Química Analítica, do Instituto de Ciências da Uva e do Vinho (ISVV), na cidade de Bordeaux, França.

Foi utilizado um Cromatógrafo a Líquido de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) UltiMate 3000 Dionex dotado de um sistema automatizado de injeção. A coluna empregada foi a XbridgeTMBEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m, Waters, France), com temperatura controlada de 40°C e vazão da fase móvel de 0,3 mL.minuto<sup>-1</sup>. Duas soluções foram utilizadas na composição da fase móvel, a primeira solução (solução A) foi composta por 20,6 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio (NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O), 3,7 mL.L<sup>-1</sup> de ácido propiônico, 20 mL.L<sup>-1</sup> de dimetilsulfoxido, 65 mL.L<sup>-1</sup> de acetonitrila e 11,3 g.L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -ciclodextrina, sendo o pH ajustado para 6,65, a segunda solução (solução B) foi composta por 400 mL.L<sup>-1</sup> de acetonitrila, 330 mL.L<sup>-1</sup> de metanol e 70 mL.L<sup>-1</sup> de dimetilsulfoxido. O gradiente de

concentração dos solventes durante a análise iniciou-se com 95% da solução A, passando para 90% em 12 minutos, 70% aos 20 minutos, 40% aos 36 minutos e 20% aos 43 minutos, retornando para 50% aos 48 minutos e, finalmente, 95% aos 53 minutos, permanecendo mais 7 minutos a essa concentração. O tempo de separação dos aminoácidos foi de 45 minutos e o tempo total da corrida cromatográfica, com o condicionamento da coluna, foi de 60 minutos. Os compostos foram detectados utilizando detector de fluorescência (comprimentos de onda de emissão e excitação fixados em 356 e 442 nm, respectivamente). O composto *o*-phtaldialdeído (OPA) foi utilizado para a reação de derivatização dos aminoácidos, o ácido iodoacético (IDA) foi empregado para promover a fluorescência e a Norvalina foi utilizada como padrão interno das análises. A reação entre esses compostos foi realizada de forma automatizada pelo sistema de injeção do equipamento. Um volume de 1  $\mu\text{L}$  do mosto foi aspirado para dentro da seringa juntamente com 2,5  $\mu\text{L}$  de Norvalina ( $2,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  de IDA ( $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 2,5  $\mu\text{L}$  de OPA ( $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os reagentes e o padrão interno ficaram em contato com o vinho durante 3 minutos para a realização da derivatização. Por último, o volume final de 8,5  $\mu\text{L}$  foi injetado para a análise dos aminoácidos presentes nos mostos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O perfil cromatográfico e os parâmetros da validação para esta metodologia podem ser visualizados nos Anexos 1 e 2, respectivamente.

## **2.6. Determinação dos parâmetros enológicos dos vinhos**

As análises clássicas dos vinhos, tais como pH, graduação alcoólica, açúcares e acidez total e volátil, foram realizadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (OenoFoss TM). O equipamento estava devidamente calibrado para essas análises e as leituras dos resultados foram feitas diretamente nos vinhos, em temperatura ambiente. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

## **2.7. Análise dos dados**

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes de comparação de médias de Tukey e de correlação de Pearson, sendo interpretados através do software STATISTICA® versão 8.0.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Determinação de açúcares nos extratos das cascas das uvas

Os resultados para as análises dos açúcares presentes nos extratos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* estão apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Concentrações de glicose e frutose obtidas para os extratos das cascas das variedades *Merlot* (M), *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.

Amostras	Açúcares (g.L <sup>-1</sup> )*	
	Glicose	Frutose
<i>Merlot</i>		
Mc	49,41 ± 1,11 <sup>a</sup>	47,97 ± 0,91 <sup>a</sup>
M10	51,02 ± 5,25 <sup>a</sup>	48,78 ± 5,03 <sup>a</sup>
M90	49,47 ± 0,65 <sup>a</sup>	47,38 ± 0,32 <sup>b</sup>
M120	51,87 ± 0,27 <sup>a</sup>	49,81 ± 0,21 <sup>b</sup>
M180	50,27 ± 0,48 <sup>a</sup>	48,95 ± 0,19 <sup>b</sup>
<i>Cabernet franc</i>		
CFc	42,20 ± 5,16 <sup>a</sup>	45,94 ± 7,39 <sup>a</sup>
CF10	42,35 ± 6,46 <sup>a</sup>	45,61 ± 7,59 <sup>a</sup>
CF90	41,61 ± 4,91 <sup>a</sup>	45,41 ± 5,67 <sup>a</sup>
CF120	32,77 ± 2,08 <sup>a</sup>	35,45 ± 2,21 <sup>a</sup>
CF180	41,05 ± 0,99 <sup>b</sup>	46,02 ± 1,05 <sup>a</sup>
<i>Cabernet sauvignon</i>		
CSc	54,03 ± 1,93 <sup>a</sup>	46,41 ± 2,57 <sup>b</sup>
CS10	52,45 ± 1,31 <sup>a</sup>	45,10 ± 2,69 <sup>b</sup>
CS60	51,31 ± 1,09 <sup>a</sup>	44,09 ± 1,66 <sup>b</sup>
CS120	51,44 ± 1,40 <sup>a</sup>	44,00 ± 3,37 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey (P < 0,05) entre os açúcares para os diferentes tratamentos de cada cultivar.

\* Valor médio para análises em triplicata. c: controle; 10, 60, 90, 120, 180: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>.

Os resultados demonstraram que as concentrações de glicose e frutose nos extratos de *Merlot* abrangeram uma faixa de 49,41 a 51,87 g.L<sup>-1</sup> e 47,38 a 49,81 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para os extratos de *Cabernet franc*, esses valores ficaram entre 32,77 e



42,35 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 35,45 e 45,94 g.L<sup>-1</sup> de frutose. Já a variedade *Cabernet sauvignon* apresentou extratos com valores entre 51,31 e 54,03 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 44,00 e 46,41 g.L<sup>-1</sup> de frutose.

Pode-se notar que não houve diferenças significativas entre os teores de glicose e frutose para a varietal *Cabernet franc*, entretanto tais diferenças foram encontradas para as outras duas variedades estudadas. De acordo com Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), a razão glicose/frutose nas uvas maduras é igual a 1 e seus teores tendem a ser praticamente iguais. Portanto, as diferenças significativas apresentadas podem ser explicadas pelo pequeno erro entre as análises, resultando em desvios-padrões com valores muito baixos.

Embora as amostras tenham apresentado pequenas diferenças para os teores de açúcares nos extratos, esses valores não influenciaram nas microvinificações. Esta análise foi realizada apenas para determinar as concentrações de açúcares a serem adicionadas em cada microvinificação, cuja concentração final foi de 190 g.L<sup>-1</sup> de açúcares para cada tratamento, sendo 50% de glicose e 50% de frutose.

### **3.2. Determinação dos parâmetros enológicos e dos compostos nitrogenados dos mostos**

Os resultados obtidos para os parâmetros enológicos estudados e para os compostos nitrogenados dos mostos estão apresentados na Tabela 2.5.

Os valores obtidos para o pH da cultivar *Merlot* variaram entre 3,64 (Mc) e 3,76 (M180). A cultivar *Cabernet franc* apresentou valores de pH entre 3,63 (FC180) e 3,74 (CF90) e, para a cultivar *Cabernet sauvignon*, foram apresentados valores entre 3,48 (CSc) e 3,56 (CS60). Com relação aos valores obtidos para acidez total, a cultivar *Merlot* exibiu teores entre 1,9 (M120) e 2,05 (Mc) g.L<sup>-1</sup>, a cultivar *Cabernet franc* ficou com os valores entre 2 (CFc) e 2,18 (CF90) g.L<sup>-1</sup> e a cultivar *Cabernet sauvignon* abrangeu a faixa entre 3,01 (CSc) e 3,15 (CS10) g.L<sup>-1</sup>. Embora os valores para pH e para acidez total tenham se diferido estatisticamente entre os tratamentos de cada cultivar, percebe-se que eles estão muito próximos uns dos outros. Isso pode ser explicado pelo fato de que o erro entre as análises é muito pequeno, resultando em valores muito baixos para os desvios padrões e, conseqüentemente, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos. Observou-se que houve diferenças estatísticas entre os tratamentos das

cultivares *Merlot* e *Cabernet franc*, porém as diferenças não foram significativas para os tratamentos da cultivar *Cabernet sauvignon* (Tabela 2.5).

Ao fazer uma comparação entre as cultivares estudadas, observa-se que a *Cabernet sauvignon* apresentou-se ligeiramente mais ácida em relação às outras duas cultivares, possuindo os menores valores para pH e os maiores valores para acidez total.

Os valores obtidos para a acidez volátil não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e entre as cultivares analisadas, ficando os resultados na faixa entre 0,01 (CSc, CS10 e CS120) e 0,07 (CF90) g.L<sup>-1</sup>.

Quando observa-se os valores obtidos para nitrogênio amina, nitrogênio amoniacal e nitrogênio assimilável, pode-se observar que houve diferenças significativas apenas entre os tratamentos das cultivares *Merlot* e *Cabernet franc*. Embora a cultivar *Cabernet sauvignon* não tenha apresentado tais diferenças, nota-se que seus tratamentos apresentaram resultados bem distintos uns dos outros. Neste caso, sugere-se que a indiferença apresentada entre os resultados se deva aos elevados valores obtidos para desvios-padrões, fato não ocorrido com as demais cultivares.

Os resultados obtidos para nitrogênio assimilável provêm da soma dos resultados obtidos para nitrogênio amina e nitrogênio amoniacal. As três variedades apresentaram valores bem distintos para nitrogênio assimilável, cujas concentrações variaram entre 128,00 (Mc) e 167,67 (M120) g.L<sup>-1</sup> para a *Merlot*, entre 103,88 (CFc) e 163,13 (CF90) g.L<sup>-1</sup> para a *Cabernet franc* e entre 115,00 (CSc) e 184,75 (CS60) g.L<sup>-1</sup> para a *Cabernet sauvignon*, que ficou com os maiores valores para nitrogênio assimilável.

Os teores de aminoácidos resultaram em diferenças significativas para as três variedades estudadas, apresentando valores bastante distantes entre os tratamentos de cada varietal. A *Merlot* foi a cultivar que apresentou as menores concentrações de aminoácidos, abrangendo uma faixa de 525,31 (M90) a 751,64 (M120) mg.L<sup>-1</sup>. Para a cultivar *Cabernet franc*, os aminoácidos apresentaram-se na faixa de 542,58 (CFc) a 921,93 (CF90) mg.L<sup>-1</sup> e para a cultivar *Cabernet sauvignon*, esses compostos ficaram na faixa de 601,88 (CSc) a 998,63 (CS60) mg.L<sup>-1</sup>.

Tabela 2.5. Parâmetros enológicos e compostos nitrogenados obtidos para os mostos das variedades *Merlot* (M), *Cabernet franc* (CF), e *Cabernet sauvignon* (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.

Parâmetros enológicos e compostos nitrogenados	<i>Merlot</i>					<i>Cabernet franc</i>					<i>Cabernet sauvignon</i>			
	Mc	M10	M90	M120	M180	CFc	CF10	CF90	CF120	CF180	CSc	CS10	CS60	CS120
<i>Acidez (g.L<sup>-1</sup>)</i>														
pH	3,64 <sup>d</sup>	3,71 <sup>b</sup>	3,66 <sup>c</sup>	3,72 <sup>b</sup>	3,76 <sup>a</sup>	3,67 <sup>ab</sup>	3,66 <sup>ab</sup>	3,74 <sup>a</sup>	3,70 <sup>ab</sup>	3,63 <sup>b</sup>	3,48 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup>	3,56 <sup>a</sup>	3,55 <sup>a</sup>
	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,04	± 0,02	± 0,01	± 0,02	± 0,07	± 0,04	± 0,04	± 0,09	± 0,04
Acidez total	2,05 <sup>b</sup>	2,15 <sup>a</sup>	2,00 <sup>b</sup>	1,90 <sup>c</sup>	2,00 <sup>b</sup>	2,00 <sup>a</sup>	2,01 <sup>a</sup>	2,18 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	2,11 <sup>a</sup>	3,01 <sup>a</sup>	3,15 <sup>a</sup>	3,11 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>
	± 0,05	± 0,05	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,21	± 0,2	± 0,02	± 0,25	± 0,02	± 0,19	± 0,2	± 0,33	± 0,21
Acidez volátil	0,03 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>
	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,06	± 0,02	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01
<i>Compostos nitrogenados (mg.L<sup>-1</sup>)</i>														
Nitrogênio amina	88 <sup>c</sup>	110,33 <sup>a</sup>	96,50 <sup>b</sup>	114,00 <sup>a</sup>	110,50 <sup>a</sup>	76,00 <sup>c</sup>	87,87 <sup>bc</sup>	118,87 <sup>a</sup>	105,62 <sup>ab</sup>	85,33 <sup>bc</sup>	79,00 <sup>a</sup>	86,50 <sup>a</sup>	120,25 <sup>a</sup>	111,00 <sup>a</sup>
	± 2,0	± 3,5	± 1,5	± 1,0	± 3,0	± 11,3	± 6,3	± 8,8	± 11,0	± 17,0	± 34,7	± 20,3	± 14,0	± 32,6
Nitrogênio amoniacal	40,00 <sup>b</sup>	45,00 <sup>ab</sup>	39,50 <sup>b</sup>	53,50 <sup>a</sup>	44,00 <sup>b</sup>	25,62 <sup>b</sup>	30,62 <sup>ab</sup>	46,5 <sup>a</sup>	36,62 <sup>ab</sup>	32,33 <sup>ab</sup>	36,00 <sup>a</sup>	43,12 <sup>a</sup>	64,50 <sup>a</sup>	54,00 <sup>a</sup>
	± 5,0	± 3,0	± 2,5	± 1,5	± 1,5	± 9,1	± 8,1	± 9,2	± 8,3	± 5,2	± 20,6	± 15,1	± 8,0	± 20,6
Nitrogênio assimilável	128,00 <sup>b</sup>	155,67 <sup>a</sup>	136,67 <sup>b</sup>	167,67 <sup>a</sup>	155,33 <sup>a</sup>	103,88 <sup>c</sup>	116,63 <sup>bc</sup>	163,13 <sup>a</sup>	142,25 <sup>ab</sup>	117,63 <sup>bc</sup>	115,00 <sup>a</sup>	129,63 <sup>a</sup>	184,75 <sup>a</sup>	165,00 <sup>a</sup>
	± 7,0	± 6,5	± 4,1	± 2,5	± 4,7	± 18,7	± 11,8	± 18,1	± 14,1	± 20,6	± 55,2	± 35,2	± 19,6	± 52,9
Aminoácidos totais	534,55 <sup>c</sup>	672,11 <sup>b</sup>	525,31 <sup>c</sup>	751,64 <sup>a</sup>	670,01 <sup>b</sup>	542,58 <sup>d</sup>	692,76 <sup>c</sup>	921,93 <sup>a</sup>	727,72 <sup>b</sup>	678,17 <sup>c</sup>	601,88 <sup>d</sup>	737,46 <sup>c</sup>	998,63 <sup>a</sup>	907,9 <sup>b</sup>
	± 1,0	± 3,1	± 7,0	± 9,8	± 4,5	± 3,5	± 8,3	± 8,1	± 7,4	± 6,7	± 7,3	± 9,6	± 1,5	± 9,1

Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey entre os tratamentos para cada cultivar (P < 0,05).

Valor médio para análises em triplicata.

c: controle; 10, 60, 90,120,180: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>

Relacionando-se as concentrações de amônia adicionadas nos vinhedos com os teores de pH, acidez total e acidez volátil presentes nos mostos, verificou-se que não houve correlação entre essas variáveis para todas as cultivares, sugerindo que a adição de amônia no solo não apresentou interferência sobre essas variáveis.

A ausência de correlação também foi verificada quando se relacionou as concentrações de amônia adicionadas aos vinhedos com as concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos presentes nos mostos. Este resultado pode ser erroneamente interpretado como um resultado negativo, pois esperava-se que os teores dos compostos nitrogenados presentes nos mostos fossem diretamente proporcionais aos teores de amônia adicionados no solo.

A técnica de pulverizar fontes de nitrogênio no solo é bastante comum, porém sua eficiência depende do grau de recuperação desse elemento pelas plantas, considerando os aspectos de absorção e metabolização desse elemento (Delfine e Formica, 2001).

Portanto, observando-se novamente a Tabela 2.5, pode-se notar que não houve uma resposta linear entre os compostos nitrogenados presentes nos mostos e as concentrações de amônia adicionadas nos vinhedos, ou seja, o tratamento que apresentou a maior concentração de nitrogênio assimilável não foi, obrigatoriamente, o tratamento que recebeu a maior concentração de amônia no solo. No entanto, pode-se afirmar que o resultado da adição de amônia no solo foi positiva, pois os tratamentos controles (Mc, CFc e CSc), que não foram pulverizados com amônia, apresentaram quantidades inferiores de nitrogênio assimilável e de aminoácidos em seus mostos se comparados com os outros tratamentos, comprovando assim a eficiência da técnica de manejo aplicada nos vinhedos. Dentre os demais tratamentos, alguns se destacaram pelos altos valores apresentados para os compostos nitrogenados, como é o caso dos tratamentos M120 (*Merlot*), CF90 (*Cabernet franc*) e CS60 (*Cabernet sauvignon*). Esses tratamentos obtiveram as maiores concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos, sugerindo que as videiras desses tratamentos foram mais eficientes em relação à absorção e metabolização da amônia recebida.

Ao correlacionar os resultados obtidos para os teores de pH, acidez total e acidez volátil presentes nos mostos com os teores de nitrogênio assimilável presentes nos mostos, foi verificada uma correlação negativa (-0,91) para a acidez total da varietal *Merlot*. Esse resultado demonstra que houve uma diminuição da acidez total em resposta ao aumento da concentração de nitrogênio assimilável presente no mosto. Resultados contraditórios foram encontrados por Moreira *et al.* (2011), que verificaram que o aumento

dos teores de nitrogênio assimilável nos mostos resultou no aumento dos teores de acidez total. Estes mesmos pesquisadores encontraram, também, correlações negativas para os teores de nitrogênio assimilável e os teores de pH. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho não mostraram nenhuma correlação entre esses dois parâmetros.

Uma forte correlação positiva foi encontrada entre os teores de nitrogênio assimilável e os teores de aminoácidos para as três cultivares analisadas, cujos coeficientes de correlação foram 0,97 para *Merlot*, 0,95 para *Cabernet franc* e 0,99 para *Cabernet sauvignon*, comprovando que a síntese de aminoácidos foi diretamente proporcional à quantidade de nitrogênio assimilada pelas videiras.

De acordo com Motta (2011), a síntese de aminoácidos pode ser realizada através das reações de aminação e transaminação. Na primeira reação, os aminoácidos são formados a partir de íons amônio e  $\alpha$ -cetoácidos, oriundos da fragmentação de açúcares. Na segunda reação ocorre a transferência de um grupamento amina ( $\text{NH}_2$ ) de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido, formando outro aminoácido. Sendo assim, os resultados encontrados mostraram que essas reações ocorreram de forma mais intensa nos mostos onde havia maiores concentrações de nitrogênio assimilável, que atuou como precursor para a formação dos aminoácidos.

Outras correlações positivas também foram encontradas, como por exemplo, entre o pH e a acidez volátil (0,88) para a *Merlot*. Para todas as variedades, observou-se também correlações positivas entre o nitrogênio assimilável e os nitrogênios amina e amoniacal e entre os aminoácidos e os nitrogênios amina e amoniacal.

### 3.3. Evolução das microvinificações

Para estudar os efeitos da adição de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica, diferentes concentrações de amônia foram pulverizadas no solo das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*. A amônia tem um papel primordial na fermentação alcoólica, pois trata-se da principal fonte de nitrogênio que será utilizada pelos microrganismos, sendo em seguida, os aminoácidos (Boulton *et al.*, 1995). A presença de nitrogênio no mosto tem um grande efeito na velocidade de fermentação, já que os compostos nitrogenados aumentam a produção de biomassa e estimulam a velocidade da metabolização do açúcar, evitando assim uma fermentação mais lenta ou incompleta (Arias-Gil *et al.*, 2007).

Em todos os tratamentos estudados, a somatória das concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos no mosto estava acima de  $267 \text{ mg.L}^{-1}$  (Tabela 2.5), valor mínimo de nitrogênio requerido pelos microrganismos para completar a fermentação alcoólica em tempo adequado (Barbosa *et al.*, 2009). Para todos os tratamentos, as microvinificações foram acompanhadas diariamente, correlacionando-se o tempo decorrido e a perda de  $\text{CO}_2$  devido ao metabolismo microbiano, que pôde ser medida através da pesagem das garrafas. Os resultados mostraram que, exceto pelos tratamentos M10 e M90 da cultivar *Merlot*, todas as microvinificações apresentaram perda de peso igual ou superior a 8,50 g (Tabela 2.6), valor referente à liberação de moléculas de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) provenientes da biotransformação de 190 g de açúcar (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

De acordo com Arias-Gil *et al.* (2007), não se pode esperar um grande efeito do nitrogênio em relação à perda total de peso alcançada no final das microvinificações, já que a quantidade de açúcar é semelhante para todas as garrafas, mas sim em relação à velocidade com que as microvinificações acontecem, pois um mosto rico em nitrogênio promove o aumento da biomassa e, com isso, a fermentação é acelerada e finalizada em tempo menor. Embora a maioria das microvinificações tenha atingido a perda ideal de peso (8,5 g), pode-se perceber que o tempo final das fermentações variou em alguns tratamentos, indicando que a atividade microbiana foi mais eficiente nas fermentações que atingiram a perda máxima de peso em menos dias, como é o caso dos tratamentos M120 e M180 da cultivar *Merlot*, que finalizaram suas fermentações em 7 dias, e dos tratamentos CS60 e CS120 da cultivar *Cabernet sauvignon*, que tiveram as fermentações finalizadas em 8 dias. Os outros tratamentos dessas duas cultivares demandaram mais tempo para finalizarem as fermentações, atingindo a perda ideal de peso após 9 dias do início das fermentações.

A *Cabernet franc* foi a única cultivar cujas microvinificações terminaram ao mesmo tempo que o controle. Embora todas as fermentações tenham se finalizado em 7 dias, pode-se perceber que o tratamento CF90 obteve uma perda de peso superior aos outros tratamentos desta variedade, atingindo o limite de 9,3 g. A indiferença no tempo final da fermentação em relação à diferentes concentrações de nitrogênio presentes nos mostos também foi verificada por Garde-Cerdán *et al.* (2008), ao vinificar uvas da varietal *Marzuelo*, e por Vilanova *et al.* (2012), ao vinificar uvas *Albariño*.

Tabela 2.6. Evolução das microvinificações das variedades *Merlot* (M), *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo, baseada na perda de peso em função da biotransformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono.

Amostras	Perda diária de peso durante as microvinificações (g)									
	Dias									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Merlot</i>										
Mc	0	1,31	4,13	5,71	6,86	7,02	7,77	8,43	8,50	8,66
M10	0	2,20	4,10	6,49	7,87	7,99	8,29	8,35	8,40	
M90	0	0,13	0,69	3,32	5,39	5,67	7,00	8,13	8,35	8,43
M120	0	3,05	6,13	8,36	9,01	9,05	9,08	9,16		
M180	0	2,73	5,59	7,56	8,31	8,35	8,38	8,47		
<i>Cabernet franc</i>										
CFc	0	0,27	4,22	6,62	8,22	8,74	8,76	8,94		
CF10	0	0,27	4,29	6,75	8,37	8,70	8,72	8,91		
CF90	0	0,94	5,17	7,56	8,87	9,08	9,08	9,30		
CF120	0	0,67	4,93	7,29	8,63	8,73	8,74	8,95		
CF180	0	0,28	4,40	6,91	8,47	8,64	8,66	8,86		
<i>Cabernet sauvignon</i>										
CSc	0	0,86	3,76	5,74	7,02	7,82	8,27	8,48	8,53	8,59
CS10	0	0,73	4,31	6,59	7,65	8,29	8,57	8,60	8,71	8,78
CS60	0	1,38	5,14	7,51	8,39	8,47	8,53	8,55	8,73	
CS120	0	1,28	5,13	7,53	8,38	8,47	8,52	8,54	8,76	

c: controle; 10, 60, 90,120,180: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>

A Figura 2.1 ilustra as cinéticas das fermentações obtidas para os tratamentos das três variedades utilizadas nas microvinificações. Através desta Figura, pode-se observar que dentre as três cultivares utilizadas neste estudo, a cultivar *Merlot* foi a que apresentou a maior variação da cinética entre os diferentes tratamentos. Pode-se perceber ainda que os tratamentos M120 e M180, que receberam maiores concentrações de amônia no solo, iniciaram a fermentação de forma mais acelerada, apresentando uma perda de peso mais acentuada desde os primeiros pontos da curva. Já o tratamento M90 demandou um maior tempo para o início da fermentação, sendo que no primeiro dia só havia perdido 0,13 g do seu peso inicial. Ainda analisando a curva cinética da *Merlot*, observa-se que o aumento da velocidade das fermentações não foi proporcional à concentração de amônia adicionada no solo para os tratamentos M10 e M90, o tratamento M10 teve uma fermentação mais rápida que o tratamento M90. Pode ser uma explicação o fato de que a concentração de nitrogênio assimilada pelo tratamento M10 tenha sido maior que a concentração assimilada pelo tratamento M90 (Tabela 2.5), favorecendo o tratamento M10 em maior concentração de nutriente disponível para os microrganismos. Além disso, vale lembrar que o tratamento M10 também apresentou uma concentração maior de aminoácidos (Tabela 2.5), tornando o meio mais rico em nutrientes para a fermentação.

A cultivar *Cabernet franc* não apresentou diferenças nas cinéticas de fermentação, para todos os tratamentos o comportamento nas vinificações foram semelhantes.

A variedade *Cabernet sauvignon* apresentou algumas variações nas cinéticas, principalmente nos primeiros pontos da curva, onde observa-se que os tratamentos CSc e CS10 mostraram menores perdas de peso. Os tratamentos que receberam maiores concentrações de amônia no solo (CS60 e CS120) tiveram suas fermentações realizadas de forma mais acelerada que os outros tratamentos.



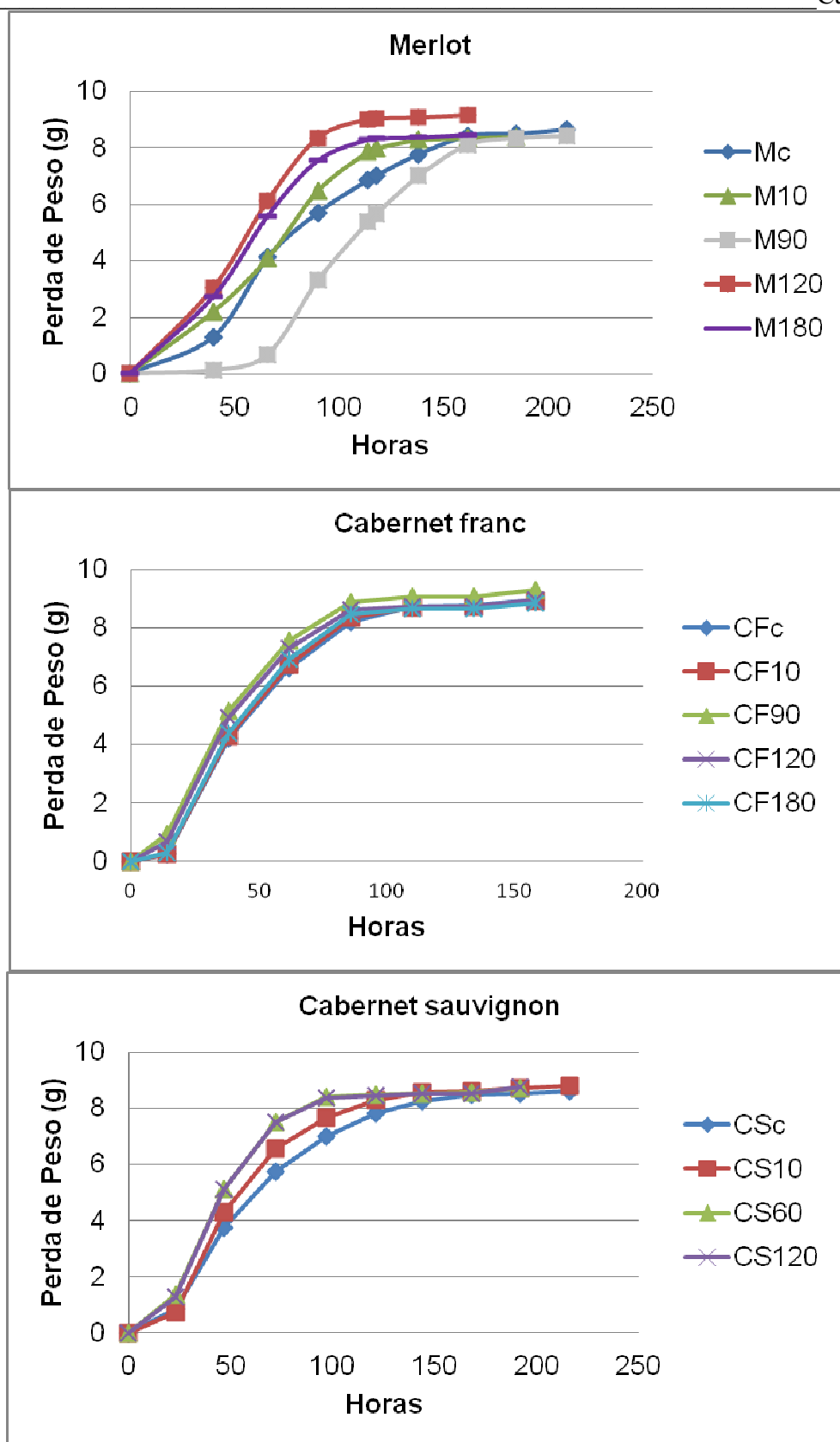


Figura 2.1. Curvas cinéticas de fermentação obtidas a partir das microvinificações das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* baseada na perda de peso das garrafas em relação ao tempo.

Para caracterizar as curvas cinéticas de fermentação, foram calculados os consumos total e diário de açúcares para cada microvinificação a partir do tempo das fermentações e das concentrações iniciais e finais de açúcares presentes em cada tratamento (Tabela 2.7). Através dessa tabela, observa-se que todos os tratamentos tiveram um consumo médio de  $187,75 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares ao longo das microvinificações. Entretanto, o consumo diário de açúcares foi diferente para os tratamentos e para as cultivares. A varietal *Cabernet franc* apresentou valores médios de  $26,83 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares consumidos diariamente para todos os seus tratamentos. Já as cultivares *Merlot* e *Cabernet sauvignon* apresentaram valores que variaram entre  $20,85$  e  $26,84 \text{ g.L}^{-1}$  e entre  $20,84$  e  $23,47 \text{ g.L}^{-1}$  de consumo diário de açúcares, respectivamente.

Assim, as fermentações que apresentaram maior consumo diário de açúcares foram aquelas que tiveram suas reações finalizadas em menor tempo e se referem aos tratamentos que receberam maiores concentrações de amônia no solo (M120, M180, CS60 e CS120), indicando que a adição de nitrogênio beneficiou e acelerou as fermentações. A maior quantidade de açúcar consumida diariamente é causada pelo aumento da biomassa presente no meio fermentativo, em consequência da boa disponibilidade de nutrientes para os microrganismos. O resultado de todos esses fatores é uma fermentação mais rápida e eficiente.

A aceleração da velocidade da fermentação alcoólica também foi demonstrada por outros autores. Torrea *et al.* (2011) observaram que o tempo total da fermentação foi diminuído em 5 dias com a adição de  $480 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio em mosto de *Chardonnay* e Arias-Gil *et al.* (2007) notaram que os mostos da cultivar *Mazuelo* fortificados com  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  de aminoácidos finalizaram as fermentações 6 dias antes que os mostos que não receberam a adição de nenhuma fonte de nitrogênio.

Tabela 2.7. Consumos total e diário de açúcares em relação ao tempo e às concentrações iniciais e finais de açúcares nas microvinificações das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.

Amostras	Tempo das microvinificações		Concentração de açúcar nas microvinificações (g.L <sup>-1</sup> )			
	Horas	Dias	Inicial	Final	Consumo total	Consumo diário
<i>Merlot</i>						
Mc	209	9	190,00	2,35	187,65	20,85
M10	185	8	190,00	2,40	187,60	23,45
M90	209	9	190,00	2,25	187,75	20,86
M120	165	7	190,00	2,15	187,85	26,84
M180	165	7	190,00	2,20	187,80	26,83
<i>Cabernet franc</i>						
CFc	158	7	190,00	2,15	187,85	26,83
CF10	158	7	190,00	2,15	187,85	26,83
CF90	158	7	190,00	2,15	187,85	26,83
CF120	158	7	190,00	2,11	187,89	26,84
CF180	158	7	190,00	2,20	187,80	26,82
<i>Cabernet sauvignon</i>						
CSc	216	9	190,00	2,48	187,52	20,84
CS10	216	9	190,00	2,35	187,65	20,85
CS60	192	8	190,00	2,27	187,73	23,47
CS120	192	8	190,00	2,28	187,72	23,47

c: controle; 10, 60, 90, 120, 180: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>

Todos esses resultados foram confirmados através dos testes de correlação. A varietal *Merlot* apresentou uma relação positiva entre o consumo diário de açúcares e as concentrações de nitrogênio assimilável (0,90) e de aminoácidos (0,91), mostrando que essas variáveis foram diretamente proporcionais, ou seja, o consumo diário de açúcares foi mais pronunciado nos tratamentos que apresentaram as maiores concentrações de nitrogênio assimilável nos mostos.

Para a varietal *Cabernet sauvignon*, foram verificadas correlações positivas entre o consumo diário de açúcares e as concentrações de nitrogênio assimilável (0,95) e de aminoácidos (0,93), indicando, novamente, que o consumo diário de açúcares foi fortemente influenciado pelas concentrações dos compostos nitrogenados presentes nos mostos.

Entretanto, nenhuma correlação foi encontrada para a cultivar *Cabernet franc*, um resultado esperado, tendo em vista que esta variedade não apresentou diferença no tempo final de suas microvinificações e, conseqüentemente, o consumo diário dos açúcares foi semelhante para todos os tratamentos.

### **3.4. Determinação dos parâmetros enológicos dos vinhos**

Na tabela 2.8 estão apresentados os valores para os parâmetros enológicos analisados nos vinhos. Através dos resultados obtidos, verifica-se que a pulverização de nitrogênio afetou significativamente esses parâmetros enológicos. Porém, como o ocorrido com as análises dos parâmetros enológicos dos mostos, novamente foram encontrados valores muito baixos para os desvios-padrões, resultando em diferenças significativas entre as análises. Nota-se também que os valores obtidos principalmente para pH, acidez total e acidez volátil, são muito próximos, indicando que a diferença estatística apresentada seja resultado do erro mínimo entre as análises. Avaliando-se os valores de pH, verifica-se que todos os vinhos apresentaram resultados em torno de 3,2, valor considerado ótimo para a boa conservação do produto (Arias-Gil *et al.*, 2007).

Com relação aos teores de glicose e frutose, pode-se verificar que os açúcares foram consumidos em sua quase totalidade em todos os tratamentos para a síntese de moléculas de etanol e de gás carbônico. Os tratamentos que apresentaram as menores concentrações de açúcares ao final das microvinificações foram os tratamentos nos quais se observou as maiores concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos nos mostos (M120, CF90 e CS60). Esses dados corroboram com os obtidos por Vilanova e colaboradores (2012) que relataram que a adição de nitrogênio estimula o crescimento microbiano, aumentando o metabolismo e diminuindo a concentração de açúcar no meio para a produção de etanol.

Os vinhos elaborados estão de acordo com os limites estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 1988) e pela legislação européia (União Européia, 2009), exceto para os valores obtidos para a acidez total. Os vinhos elaborados apresentaram

Tabela 2.8. Concentrações dos parâmetros enológicos obtidos para os vinhos elaborados com as variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.

Parâmetros enológicos	<i>Merlot</i>					<i>Cabernet franc</i>					<i>Cabernet sauvignon</i>			
	Mc	M10	M90	M120	M180	CFc	CF10	CF90	CF120	CF180	CSc	CS10	CS60	CS120
pH	3,22 <sup>bc</sup>	3,23 <sup>bc</sup>	3,24 <sup>ab</sup>	3,26 <sup>a</sup>	3,21 <sup>c</sup>	3,21 <sup>ab</sup>	3,22 <sup>ab</sup>	3,23 <sup>ab</sup>	3,25 <sup>a</sup>	3,21 <sup>b</sup>	3,31 <sup>a</sup>	3,26 <sup>b</sup>	3,24 <sup>b</sup>	3,24 <sup>b</sup>
	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,02	± 0,03	± 0,02	± 0,02	± 0,01	± 0,01	± 0,03	± 0,02	± 0,01	± 0,02
Acidez total (g.L <sup>-1</sup> )	2,91 <sup>a</sup>	2,71 <sup>bc</sup>	2,67 <sup>c</sup>	2,76 <sup>bc</sup>	2,81 <sup>ab</sup>	2,85 <sup>a</sup>	2,73 <sup>a</sup>	2,77 <sup>a</sup>	2,73 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a</sup>	2,44 <sup>b</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a</sup>
	± 0,05	± 0,03	± 0,06	± 0,02	± 0,04	± 0,07	± 0,09	± 0,10	± 0,06	± 0,05	± 0,11	± 0,12	± 0,08	± 0,05
Acidez volátil (g.L <sup>-1</sup> )	0,30 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>
	± 0,02	± 0,01	± 0,02	± 0,02	± 0,01	± 0,04	± 0,01	± 0,02	± 0,01	± 0,01	± 0,02	± 0,07	± 0,02	± 0,05
Glicose e frutose (g.L <sup>-1</sup> )	2,35 <sup>ab</sup>	2,40 <sup>a</sup>	2,25 <sup>abc</sup>	2,15 <sup>c</sup>	2,20 <sup>bc</sup>	2,15 <sup>a</sup>	2,15 <sup>a</sup>	2,15 <sup>a</sup>	2,11 <sup>a</sup>	2,20 <sup>a</sup>	2,48 <sup>a</sup>	2,35 <sup>ab</sup>	2,27 <sup>b</sup>	2,28 <sup>b</sup>
	± 0,05	± 0,01	± 0,05	± 0,05	± 0,1	± 0,06	± 0,04	± 0,11	± 0,24	± 0,12	± 0,05	± 0,07	± 0,14	± 0,02
Etanol (vol%)	11,15 <sup>c</sup>	11,27 <sup>b</sup>	11,04 <sup>d</sup>	11,55 <sup>a</sup>	11,30 <sup>b</sup>	11,23 <sup>ab</sup>	11,13 <sup>b</sup>	11,30 <sup>ab</sup>	11,77 <sup>a</sup>	11,05 <sup>b</sup>	11,19 <sup>a</sup>	10,95 <sup>a</sup>	11,06 <sup>a</sup>	10,84 <sup>a</sup>
	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,08	± 0,01	± 0,44	± 0,12	± 0,43	± 0,18	± 0,08	± 0,39	± 0,28	± 0,15	± 0,18

Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey entre os tratamentos para cada cultivar ( $P < 0,05$ ).

\* Valor médio para análises em triplicata.

c: controle; 10, 60, 90, 120, 180: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>

valores inferiores aos limites da legislação, que estabelece que a acidez total do vinho fino seco deve ser superior a 4,12 g.L<sup>-1</sup> (brasileira) e 3,5 g.L<sup>-1</sup> (europeia). Isso se deve ao fato dos vinhos deste trabalho não terem passado pela fermentação malolática, que contribui para a desacidificação do vinho.

Não foi observada correlação entre os parâmetros enológicos e o efeito da adição de amônia, porém, correlações positivas foram encontradas entre os teores de etanol e as concentrações de nitrogênio assimilável (0,88) e de aminoácidos (0,95) presentes nos mostos da varietal *Merlot*, mostrando que a produção de etanol foi mais eficiente no tratamento que melhor absorveu e metabolizou a amônia presente no solo. Esses resultados foram semelhantes aos resultados obtidos por Torrea *et al.* (2011), que também observaram que a concentração de etanol aumentou em resposta ao aumento da concentração de nitrogênio assimilável. Porém, resultados contrários foram encontrados por Moreira *et al.* (2011) e Vilanova *et al.* (2012), que verificaram a diminuição do teor de etanol em suas amostras, e por Garde-Cerdan *et al.* (2008), que não observaram correlações entre o teor de nitrogênio assimilável e o teor de etanol e de acidez volátil.

Para a cultivar *Cabernet sauvignon*, verificou-se que a acidez volátil foi negativamente influenciada pelas concentrações de nitrogênio assimilável (-0,99) e de aminoácidos (-0,99), indicando que a acidez volátil diminuiu com o aumento das concentrações dos compostos nitrogenados presentes no mostos. As concentrações restantes de glicose e frutose no final das fermentações também apresentaram correlações negativas com as concentrações de aminoácidos nos mostos (-0,95), mostrando que os tratamentos com maiores concentrações de aminoácidos tiveram um consumo maior de açúcares ao longo das fermentações.

Outras correlações também foram encontradas entre os parâmetros enológicos. Para a cultivar *Cabernet sauvignon*, os valores de pH (0,99) e de acidez volátil (-0,99) foram fortemente influenciados pelas concentrações de glicose e frutose consumidas ao longo das microvinificações. Já para a cultivar *Cabernet franc*, os valores de pH (0,92) e das concentrações de glicose e frutose (-0,90) tiveram influência sobre os valores de etanol.

#### 4. Conclusão

A técnica de pulverização de amônia foi eficiente, elevando as concentrações de nitrogênio nos mostos, importante nutriente para os microrganismos durante a vinificação, sem prejuízo dos parâmetros enológicos dos vinhos.

#### 5. Referências bibliográficas

- DELFINE, C. E.; FORMICA, J. V. Wine Microbiology. Science and Technology. Marcel Dekker, Inc. New York, 490 páginas, 2001.
- ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDA'N, T.; ANCI'N-AZPILICUETA, C. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1312-1318, 2007.
- BARBOSA, C.; FALCO, V.; MENDES-FAIA, A.; MENDES-FERREIRA, A. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.108, n.2, p.99-104, 2009.
- BISSON, L. F.; BUTZKE, C. E. Diagnosis and rectifications of stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.51, p.168-177, 2000.
- BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. Principles and Practices of Winemaking. New York – USA. Editora Chapman and Hall, 604 p., 1995.
- BRASIL – Ministério da Agricultura – Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988 – Publicada no Diário Oficial da União (D.O.U.) em 31/10/88.
- CHOI, E. Development of determination methods for amino compounds in musts and wines with UHPLC / fluorimeter. Dissertação de Mestrado, Universidade de Bordeaux 2, França, 2012.
- GARDE-CERDÁN, T; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters,

- alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. **LWT**, v.41, p.501-510, 2008.
- GARDE-CERDÁN, T.; MARTÍNEZ-GIL, A. M.; LORENZO, C.; LARA, J. F.; PARDO, F.; SALINAS, M. R. Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. **Food Chemistry**, v. 124, P. 106-116, 2011.
- JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª edição, Porto Alegre – RS. Editora Artmed, 711 p., 2005.
- LEE, J.; SCHREINER, R. P. Free amino acid profiles from ‘Pinot noir’ grapes are influenced by vine N-status and sample preparation method. **Food Chemistry**, v. 119, p. 484-489, 2010.
- LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos. Vol.3, 1ª edição, São Paulo – SP. Editora Edgard Blucher, 593 p., 2001.
- MOREIRA, N.; PINHO, P. G.; SANTOS, C.; VASCONCELOS. Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wine. **Food Chemistry**, v.126, p.1599-1607, 2011.
- MOTTA, V. T., Bioquímica. 2ª edição. Rio de Janeiro – RJ. Editora MedBook, 488 p., 2011.
- PINEAU, B. Contribution à l'étude de l'arôme fruité spécifique des vins rouges de *Vitis vinifera* L. cv. Merlot noir et Cabernet-Sauvignon. Tese de Doutorado, Universidade de Bordeaux 2, França, 2007.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Traité d'Oenologie: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments. Volume 2, 2ª edição, West Sussex : John Wiley and Sons, Ltd., 441 p., 2006.
- SANTOS, J.; SOUSA, M. J.; CARDOSO, H.; INÀCIO, J.; SILVA, S.; SPENCER-MARTINS, I. Ethanol tolerance of sugar transport and the rectification of stuck wine fermentations. **Microbiology**, v.154, p.422-430, 2008.
- TORREA, D.; VARELA, C.; UGLIANO, M.; ANCIN-AZPILICUETA, C.; FRANCIS, I. L.; HENSCHKE, P. A. **Food Chemistry**, v.127, p.1072-1083, 2011.
- UNIÃO EUROPÉIA - Limites analíticos e limites de emprego de certas substâncias em vinhos, bebidas espirituosas e vinagre de vinho – 2009. Acidez Total - Reg. (CE) nº 491/2009, Anexo III- 1 d). Acidez Volátil - Reg. (CE) nº 606/2009,



Anexo I C- 1 c). Açúcares - Reg. (CE) nº 607/2009, Anexo XIV - Parte A). Teor alcohólico - Reg. (CE) nº 491/2009, Anexo III – 1 c).

VILANOVA, M.; SIEBERT, T. E.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. **Food Chemistry**, v.33 , n.1, p.124-131, 2012.



**CAPÍTULO 3:**

**Influência da adição de diferentes concentrações de nitrogênio no vinhedo sobre a formação dos compostos de aroma nos vinhos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon***

**Rodrigues, Daniele<sup>1</sup>; Barbe, Jean-Christophe<sup>3</sup>; Revel, Gilles<sup>3</sup>; Wagner, Roger<sup>2</sup>;  
Godoy, Helena Teixeira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>: Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

<sup>2</sup>: Faculdade e Farmácia e Bioquímica – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>3</sup>: Faculté d’œnologie – Institut des Sciences de la Vigne et du Vin – Université Victor Segalen Bordeaux II, France.

*Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico*

*Food Chemistry (ISSN 0308-8146)*



**Influência da adição de diferentes concentrações de nitrogênio no vinhedo sobre a formação dos compostos de aroma nos vinhos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon***

**Rodrigues, D.; Barbe, J. C.; Revel, G.; Wagner, R.; Godoy, H. T.**

**RESUMO**

A composição aromática dos vinhos depende, principalmente, da fermentação alcoólica, pois é nessa fase da vinificação que ocorre a produção de compostos como os álcoois, os aldeídos, os ésteres e os ácidos, que contribuem significativamente para o aroma do vinho. Entretanto, a falta de nutrientes nos mostos, como o nitrogênio, pode resultar em uma fermentação lenta, com a formação insuficiente da biomassa e, conseqüentemente, a baixa síntese de compostos importantes para o aroma do vinho. Com o intuito de suprir a falta do nitrogênio no mosto para a fermentação, este trabalho teve como objetivo pulverizar diferentes concentrações de amônia no solo das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, a fim de avaliar a eficiência da técnica de manejo e a influência do nitrogênio sobre os álcoois e ésteres formados durante a vinificação. Os vinhedos foram divididos em parcelas, que receberam diferentes concentrações de amônia no solo (10, 60, 90, 120 e 180 kgN.Hectare<sup>-1</sup>). Na época da vindima, as uvas foram colhidas e vinificadas, e os vinhos foram analisados quanto aos compostos voláteis formados. Os resultados mostraram que a técnica aplicada foi satisfatória, pois as amostras oriundas do processo de pulverização apresentaram maiores concentrações de nitrogênio assimilável (167,163 e 184 mg.L<sup>-1</sup>, para as três cultivares, respectivamente) e, conseqüentemente, maiores concentrações de aminoácidos (752, 921 e 998 mg.L<sup>-1</sup>) nos mostos. A adição de amônia no solo contribuiu positivamente para a formação dos compostos voláteis, que se apresentaram em maiores concentrações nos vinhos provenientes dos tratamentos que continham as maiores concentrações de compostos nitrogenados nos mostos, indicando que a síntese dos compostos voláteis foi beneficiada pela presença das altas concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos nos mostos. Os resultados obtidos para vinhos provenientes de uvas que sofreram esses tratamentos alcançaram os valores de 190, 443 e 356 mg.L<sup>-1</sup> para os álcoois superiores e 6505, 6440 e 6298 µg.L<sup>-1</sup> para os ésteres, possuindo assim uma composição aromática mais intensa se comparados com os vinhos obtidos dos tratamentos controles. Correlações positivas foram encontradas entre alguns aminoácidos presentes nos mostos e alguns álcoois superiores formados nos vinhos, indicando que esses aminoácidos podem ser precursores para a formação desses compostos voláteis importantes para o aroma do vinho. Correlações positivas também foram encontradas entre alguns álcoois superiores e alguns ésteres acetatos presentes nos vinhos. Tendo em vista a participação do álcoois superiores na síntese dos ésteres acetatos, essas correlações indicam que tais álcoois podem ter atuado como precursores para a formação de tais ésteres.

Palavras-chaves: nitrogênio assimilável, aminoácidos, *Vitis vinifera*, álcoois, ésteres, compostos aromáticos.

**ABSTRACT**

The aromatic composition of wine depends mainly on the alcoholic fermentation, because it is in this stage of vinification that occurs the production of compounds such as alcohols, aldehydes, esters and acids, which contribute significantly to the aroma of wine. However, the lack of nutrients in musts, such as nitrogen, can result in a slow fermentation, with the formation of biomass insufficient and the low synthesis of compounds important for the aroma of the wine. In order to address the lack of nitrogen in the must to the fermentation, this study aimed to spray different concentrations of ammonia in the soil of *Merlot*, *Cabernet Franc* and *Cabernet Sauvignon*, in order to evaluate the efficiency of the management technique and the influence of nitrogen on the alcohols and esters formed during the vinification. The vineyards were divided into plots that received different concentrations of ammonia in the soil (10, 60, 90, 120 and 180 kgN.Hectare<sup>-1</sup>). At the time of harvest, the grapes were harvested and vinified, and the wines were analyzed for volatile compounds formed. The results showed that the technique applied was satisfactory, because the samples from the spraying process had higher concentrations of assimilable nitrogen (167, 163 and 184 mg.L<sup>-1</sup> for all three cultivars, respectively) and, consequently, higher concentrations of amino acids (752, 921 and 998 mg.L<sup>-1</sup>) in musts. The addition of ammonia in the soil contributed positively to the formation of volatile compounds, which were in higher concentrations in wines from the treatments containing the highest concentrations of nitrogen compounds in musts, indicating that the synthesis of volatile compounds was benefited by the presence of high concentrations of assimilable nitrogen and amino acids in the musts. The results obtained for wines made from grapes that have undergone these treatments reached values of 190, 443 and 356 mg.L<sup>-1</sup> for the higher alcohols and 6505, 6440 and 6298 µg.L<sup>-1</sup> for esters, having a composition aromatic more intense compared to wines made from control treatments. Positive correlations were found between some amino acids in musts and some higher alcohols formed in wines, indicating that these amino acids can be precursors for the formation of these aromatic compounds. Positive correlations were also found between some higher alcohols and some esters acetates present in wines. Given the involvement of higher alcohols in the synthesis of acetate esters, these correlations indicate that such alcohols may have acted as precursors for the formation of such esters.

Keywords: assimilable nitrogen, amino acids, *Vitis vinifera*, alcohols, esters, aromatics compounds.

## 1. Introdução

A composição aromática dos vinhos depende de vários fatores como a variedade da uva utilizada, os aromas produzidos durante a fermentação e aqueles formados durante o período de envelhecimento do vinho. Dentre os três, a produção dos compostos voláteis durante a fermentação é, sem dúvida, o fator de maior importância e influência para o aroma final dos vinhos. A produção dos compostos de aroma por leveduras durante a vinificação pode ser significativamente afetada por práticas aplicadas ao mosto como a clarificação, a aeração, a escolha das cepas utilizadas, a temperatura da fermentação e a adição de nutrientes (Hernández-Orte *et al.*, 2005).

A presença de nitrogênio no mosto tem um importante efeito na velocidade de fermentação, já que os compostos nitrogenados aumentam a produção de biomassa e estimulam a velocidade da metabolização do açúcar, evitando assim uma fermentação mais lenta ou incompleta (Arias-Gil *et al.*, 2007). Durante os primeiros estágios da fermentação, os compostos nitrogenados são rapidamente acumulados pelas leveduras, satisfazendo a demanda de aminoácidos necessários para a síntese de proteínas e o crescimento celular. A quantidade insuficiente de nitrogênio assimilável no mosto resulta em uma menor produtividade da biomassa e, conseqüentemente, uma menor velocidade da fermentação (Torrea *et al.*, 2011).

Adicionalmente aos benefícios do nitrogênio sobre o crescimento microbiano e a cinética da fermentação, este composto também pode regular o metabolismo das leveduras para a formação dos metabólitos voláteis e não voláteis do vinho, influenciando assim suas características físico-químicas e sensoriais (Garde-Cerdan e Ancin-Azpilicueta, 2008). Muitos dos compostos voláteis sintetizados pelas leveduras sofrem mudanças em resposta à concentração de nitrogênio presente no mosto. Dentre esses compostos, os mais importantes são os álcoois superiores, os ésteres acetatos e os éteres etílicos (Torrea *et al.*, 2011).

A formação dos álcoois superiores está ligada ao metabolismo dos aminoácidos. Através da reação de Ehrlich catabolizada pelas leveduras, os aminoácidos sofrem uma série de transformações, incluindo as reações de transaminação, descarboxilação e desidrogenação, resultando assim em moléculas de álcoois superiores (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Os ésteres acetatos, por sua vez, são produzidos pela condensação de um álcool superior e um Acetil-CoA, catalisada pela enzima acetil-transferase (Sumbly *et al.*, 2010). Já os ésteres etílicos são

provenientes da reação do etanol com uma acil-CoA, catabolizada pela enzima etanol-O-acil sintase (Saerens *et al.*, 2008).

Com o intuito de contornar o problema da falta de nitrogênio nos mostos, alguns viticultores adicionam sais de amônia diretamente ao mosto antes da fermentação (Arias-Gil *et al.*, 2007). Entretanto, a escolha da melhor concentração de nitrogênio a ser adicionada ao mosto é de fundamental importância para a boa qualidade do produto final, já que vinhos com altas quantidades de resíduos de nitrogênio possuem maior risco de instabilidade microbiana, com possível formação de aminas biogênicas e etilcarbamato, compostos indesejáveis que depreciam a qualidade do vinho (Garde-Cerdán *et al.*, 2011). Os aminoácidos livres e a amônia constituem a maior parte do nitrogênio presente no meio para a vinificação, sendo utilizados como nutrientes para os microrganismos durante a fermentação para a produção de compostos de aroma (Lee e Schreiner, 2010). Diversos trabalhos já relatados na literatura comprovaram a influência do nitrogênio sobre a formação dos compostos de aroma nos vinhos (Hernandez-Orte *et al.*, 2005; Garde-Cerdán *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2009; Torrea *et al.*, 2011; Vilanova *et al.*, 2012). Todos esses trabalhos avaliaram a adição de nitrogênio diretamente ao mosto, com a possível chance de acumulação de resíduos desse composto. Outra alternativa para aumentar o teor de nitrogênio no mosto, mais segura e promissora, é a pulverização de nitrogênio diretamente no solo dos vinhedos, nas épocas de início da floração e de início da brotação, épocas em que a videira melhor recupera o nitrogênio presente no fertilizante devido às temperaturas amenas e às boas condições de umidade do solo no final do inverno, o que mantém e/ou aumenta a atividade da biomassa microbiana do solo, a disponibilidade de nutrientes e a atividade das raízes (Glad *et al.*, 1994). Existe uma dificuldade em se determinar a quantidade correta de nitrogênio a ser aplicado, pois o valor vai depender dos nutrientes já presentes no solo.

Sendo assim, este trabalho objetivou realizar a pulverização de diferentes concentrações de amônia em vinhedos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* localizados na região de Bordeaux, França, com o intuito de avaliar o desempenho da técnica de manejo e a influência do nitrogênio na formação dos álcoois superiores e dos ésteres nos vinhos elaborados.



## 2. Material e métodos

### 2.1. Descrição dos vinhedos e coleta das amostras

Para avaliar a influência da adição de nitrogênio no vinhedo sobre a fermentação alcoólica de *Vitis vinifera*, foram selecionadas 3 variedades de uvas oriundas de duas diferentes propriedades localizadas na região de Bordeaux, França. As amostras de *Cabernet sauvignon* foram colhidas no Château Haut Brion, localizado na cidade de Pessac, e as amostras de *Cabernet franc* e *Merlot* foram colhidas no Château Cheval Blanc, na cidade de Saint Emilion. Em ambos os Châteaux, o tipo de suporte e condução das videiras é do tipo espaldeira.

Pessac está localizado na altitude de 56 metros, latitude de 44° 48'00"N e longitude 00° 37'00"W. Saint Emilion possui altitude de 107 metros, latitude de 44° 53'00"N e longitude 00° 90'00"W. As duas cidades estão localizadas a uma distância de 53 Km e pertencem à região de Bordeaux, caracterizada pelo clima temperado do tipo oceânico, com invernos suaves (temperatura média de 6°C) e verões quentes (temperatura média de 25°C). A umidade relativa do ar está em torno de 80% e o solo é do tipo arenoso misturado a cascalho, com consistência macia e de fácil drenagem.

Para este estudo, os vinhedos foram divididos em parcelas (n=3), as quais foram aleatoriamente pulverizadas com diferentes concentrações de amônia (sulfato de amônia) no solo. Para as cultivares *Merlot* e *Cabernet franc*, as concentrações variaram entre 10 e 180 quilogramas de nitrogênio por hectare e para a cultivar *Cabernet sauvignon*, entre 10 e 120 quilogramas de nitrogênio por hectare (Tabela 3.1). Para avaliar a eficiência do tratamento, parcelas foram mantidas sem pulverização com nitrogênio (tratamentos controles). Para todas as outras parcelas, a amônia foi pulverizada duas vezes ao longo do ciclo vegetativo, no momento em que as videiras apresentaram o início da brotação e o no início da floração, com intervalo de aproximadamente 1 mês. Cerca de 5 Kg de uvas foram colhidas por toda a extensão de cada tratamento, no período de maturação completa (determinada pelo °Brix), entre os meses de agosto e setembro de 2011, e congeladas a uma temperatura de -25°C até serem analisadas e microvinificadas

Tabela 3.1. Identificação das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* e as concentrações de nitrogênio recebidas para cada tratamento.

<i>Merlot</i>		<i>Cabernet franc</i>		<i>Cabernet sauvignon</i>	
Tratamento	Concentração de Nitrogênio*	Tratamento	Concentração de Nitrogênio*	Tratamento	Concentração de Nitrogênio*
Mc**	0	CFc**	0	CSc**	0
M10	10	CF10	10	CS10	10
M90	90	CF90	90	CS60	60
M120	120	CF120	120	CS120	120
M180	180	CF180	180		

\*: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>. \*\*c: tratamento controle.

## 2.2. Reagentes e padrões

Todos os padrões de aminoácidos utilizados neste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, França). Ácido propiônico, dimetilsulfoxida,  $\beta$ -ciclodextrina, *o*-phtaldialdeído, ácido iodoacético e norvalina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, França). Fosfato de sódio foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrila e metanol (grau HPCL) foram adquiridos da VWR-Prolabo (Fontenay-sous-bois, França). Lactato de etila foi adquirido da Fischer Scientific Labosi (Elancourt, França). 3-hidroxi butirato de etila, succinato de monoetila e succinato de dietila foram adquiridos da Alfa Aesar A Johnson Matthey Company (Bischheim, França). 1-propanol, 2-metilpropanol, 1-butanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, 4-metilpentan-2-ol, acetato de etila, octan-2-one, acetato de propila, acetato de isobutila, acetato de hexila, acetato de octila, acetato de feniletila, propanoato de etila, butirato de etila, valerato de etila, hexanoato de etila, heptanoato de etila, octanoato de etila, nonanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, isobutirato de etila, 2-metilbutirato de etila, isovalerato de etila, fenilacetato de etila, 2-hidroxiexanoato de etila, cinamato de etila, dihidrocinamato de etila foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, França). Acetato de isoamila foi adquirido da VWR-Prolabo (Fontenay-sous-bois, França). Para a síntese dos padrões deuterados dos ésteres, butyryl, caproyl, octanoyl, cinnamoyl chloride e tributyl amina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, França). Diclorometano foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). Cloreto de sódio (99%) e sulfato de sódio foram obtidos da VWR-Prolabo (Fontenay-sous-bois, França).

### **2.3. Preparo dos mostos e microvinificações**

Para serem submetidas ao processo fermentativo, as uvas foram descongeladas lentamente em água corrente, com temperatura de aproximadamente 20°C, permitindo a lavagem das cascas. Em seguida as cascas foram separadas manualmente das polpas e das sementes pressionando-se as bagas entre os dedos polegar e indicador.

Os mostos obtidos, contendo as polpas e as sementes, foram homogeneizados e uma alíquota de 2 mL foi separada e centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 20°C para ser analisada quanto aos teores de nitrogênio assimilável e de aminoácidos.

As cascas, por sua vez, foram brevemente lavadas em água corrente, secas e utilizadas para as vinificações. Os processos de preparação dos extratos das cascas e das microvinificações foram realizados segundo Pineau (2007) e estão detalhados no Capítulo 2 desta tese.

### **2.4. Determinação de nitrogênio assimilável dos mostos**

A determinação dos teores de nitrogênio assimilável presente nos mostos foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (OenoFoss TM). O equipamento estava devidamente calibrado para essa análise e as leituras dos resultados foram feitas diretamente nos mostos, em temperatura ambiente. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### **2.5. Determinação de aminoácidos dos mostos**

Os aminoácidos foram analisados de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Choi (2012), no Laboratório de Química Analítica, do Instituto de Ciências da Uva e do Vinho (ISVV), na cidade de Bordeaux, França.

Foi utilizado um Cromatógrafo a Líquido de Ultra Eficiência (UHPLC) UltiMate 3000 Dionex dotado de um sistema automatizado de injeção. A coluna empregada foi a XbridgeTM BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 3,5 µm, Waters, France), com temperatura controlada de 40°C e vazão da fase móvel de 0,3 mL.minuto<sup>-1</sup>. Duas soluções foram utilizadas na composição da fase móvel, a primeira solução (solução A) foi composta

por 20,6 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio (NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O), 3,7 mL.L<sup>-1</sup> de ácido propiônico, 20 mL.L<sup>-1</sup> de dimetilsulfoxida, 65 mL.L<sup>-1</sup> de acetonitrila e 11,3 g.L<sup>-1</sup> de B-ciclodextrina, sendo o pH ajustado para 6,65, a segunda solução (solução B) foi composta por 400 mL.L<sup>-1</sup> de acetonitrila, 330 mL.L<sup>-1</sup> de metanol e 70 mL.L<sup>-1</sup> de dimetilsulfoxida. O gradiente de concentração dos solventes durante a análise iniciou-se com 95% da solução A, passando para 90% em 12 minutos, 70% aos 20 minutos, 40% aos 36 minutos e 20% aos 43 minutos, retornando para 50% aos 48 minutos e, finalmente, 95% aos 53 minutos, permanecendo mais 7 minutos a essa concentração. O tempo de separação dos aminoácidos foi de 45 minutos e o tempo total da corrida cromatográfica, com o condicionamento da coluna, foi de 60 minutos. Os compostos foram detectados utilizando detector de fluorescência (comprimentos de onda de emissão e excitação fixados em 356 e 442 nm, respectivamente). O composto o-ftaldialdeído (OPA) foi utilizado para a reação de derivatização dos aminoácidos, o ácido iodoacético (IDA) foi empregado para promover a fluorescência e a Norvalina foi utilizada com padrão interno das análises. A reação entre esses compostos foi realizada de forma automatizada pelo sistema de injeção do equipamento. Um volume de 1 µL do mosto foi aspirado para dentro da seringa juntamente com 2,5 µL de Norvalina (2,4 mg.L<sup>-1</sup>), 2,5 µL de IDA (35 g.L<sup>-1</sup>) e 2,5 µL de OPA (15 g.L<sup>-1</sup>). Os reagentes e o padrão interno ficaram em contato com o vinho durante 3 minutos para a realização da derivatização. Por último, o volume final de 8,5 µL foi injetado para a análise dos aminoácidos presentes nos mostos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O perfil cromatográfico e os parâmetros da validação para esta metodologia podem ser visualizados nos Anexos 1 e 2, respectivamente.

## **2.6. Determinação dos compostos voláteis dos vinhos**

A determinação dos compostos voláteis dos vinhos, como os alcoóis superiores e os ésteres, foi realizada de acordo com as metodologias desenvolvidas e validadas no Laboratório de Química Analítica, do Instituto de Ciências da Uva e do Vinho (ISVV), na cidade de Bordeaux, França. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### 2.6.1. Determinação de alcoóis, alcoóis superiores e acetato de etila nos vinhos

Foi utilizada a metodologia descrita por Antalick (2010a), referente à metodologia do Jornal Oficial das Comunidades Europeias (Journal Officiel des Communautés Européennes) de 29 de Dezembro de 2000, que permitiu determinar os seguintes compostos: metanol, 1-propanol, 2-metilpropanol, 1-butanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol e acetato de etila.

O preparo da amostra consistiu na adição de 50 µL do padrão interno 4-metilpentan-2-ol, com concentração de 10 g.L<sup>-1</sup>, em 5 mL de vinho. A solução foi homogeneizada e uma alíquota de 1 µL foi injetada diretamente no cromatógrafo a gás Agilent 5890 série II equipado com um detector de ionização em chama (FID). O injetor foi mantido em temperatura constante de 200°C e a válvula de *split* foi mantida com vazão de 1/60. Os compostos foram separados em uma coluna capilar CPWAX (50,0 m x 0,25 mm d.i com espessura de filme de 0,22 µm, Varian). O programa de temperatura da coluna iniciou em 40 °C e, após 5 minutos, aumentou para 200°C a uma taxa de 4°C.min<sup>-1</sup>. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com uma vazão de 2 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do detector foi mantida constante em 240°C. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O perfil cromatográfico para esta metodologia pode ser visualizado no Anexo 3.

### 2.6.2. Determinação de ésteres polares nos vinhos

Esta metodologia foi desenvolvida por Falcão et al. (2008) e adaptada e validada por Antalick (2010a) para as condições do laboratório. Foi possível a determinação dos seguintes compostos: lactato de etila, 3-hidroxibutirato de etila, succinato de monoetila e succinato de dietila.

Os compostos foram extraídos dos vinhos através da extração líquido-líquido, utilizando-se o diclorometano como solvente extrator. As extrações foram realizadas em um funil de separação, com volume final de 200 mL, contendo 50 mL de vinho fortificado com 25 µL do padrão interno octan-2-one na concentração de 1,1 g.L<sup>-1</sup>. Foram realizadas três extrações sucessivas, onde a primeira recebeu 5 mL de diclorometano e as últimas duas receberam 2 mL do mesmo solvente. A fase orgânica final foi recolhida, seca com sulfato de sódio e injetada diretamente no cromatógrafo a gás Agilent 5890 série II, equipado com um injetor automático Gerstel MPS 2 (Agilent

Technologies, Massy, France). A temperatura do injetor manteve-se em 250 °C e a válvula de *split* manteve-se fechada por 45 segundos. Os compostos foram identificados e quantificados por um espectrômetro de massas Agilent 5972, onde as moléculas foram ionizadas por impacto de elétrons (EI +70 eV) e analisadas em um quadropolo.

Os ésteres foram separados em coluna capilar BP21 (50,0 m x 0,32 mm d.i com espessura de filme de 0,25 µm), cujo programa de temperatura iniciou em 60°C, permanecendo por 5 minutos, e posteriormente aumentando até 200 °C a uma taxa de 3°C.min<sup>-1</sup>, permanecendo por 50 minutos. O gás de arraste utilizado foi o He com uma vazão de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. O analisador de massas foi configurado para monitorar as massas de íons específicos para cada composto (GC/MS-SIM): lactato de etila: 45 e 75; 3-hidroxibutirato de etila: 87, 71 e 88; succinato de monoetila: 101 e 129 e succinato de dietila: 101 e 128. A temperatura do detector foi mantida constante em 280°C. Nos experimentos foram consideradas as áreas geradas pela integração do íon quantitativo de cada composto. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O perfil cromatográfico e os parâmetros da validação para esta metodologia podem ser visualizados nos Anexos 4 e 5, respectivamente.

### **2.6.3. Determinação de ésteres apolares nos vinhos.**

Esta metodologia foi desenvolvida e validada por Antalick et al. (2010b) para as condições do laboratório e permitiu a análise de 22 ésteres (Tabela 3.2). A extração dos ésteres nos vinhos foi realizada através da técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* estático (HS-SPME), utilizando-se a fibra de revestimento simples PDMS (1 cm x 100 µm Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Um volume de 25 mL de vinho foi adicionado de 20 µL de uma solução de 4 padrões internos na concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup> (butirato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila e cinamato de etila, todos deuterados). Após a homogeneização, 10 mL foram transferidos para um vial de 20 mL vedado com septo de PTFE juntamente 3,5 g de cloreto de sódio (NaCl) para a realização da extração dos compostos.

A extração dos ésteres foi realizada na temperatura de 40°C durante 30 minutos com agitação constante de 500 rpm. O tempo de equilíbrio do *headspace* antes da extração foi de 2 minutos e o tempo de dessorção dos compostos da fibra no injetor do cromatógrafo a gás foi de 15 minutos a uma temperatura de 250°C, no modo *splitless*.

Tabela 3.2. Íons de monitoramento utilizados para a determinação dos ésteres apolares nos vinhos por HS-SPME-GC/MS.

Compostos	Abreviações	Íons de monitoramento
Acetato de propila	C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	61 e 43
Acetato de isobutila	C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub>	56 e 43
Acetato de isoamila	C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub>	70, 55 e 43
Acetato de hexila	C <sub>2</sub> C <sub>6</sub>	56 e 43
Acetato de octila	C <sub>2</sub> C <sub>8</sub>	56 e 43
Acetato de feniletila	C <sub>2</sub> PhC <sub>2</sub>	104, 91 e 43
Propanoato de etila	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	102, 57 e 75
Butirato de etila	C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	88, 71 e 60
Valerato de etila	C <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	85, 88 e 101
Hexanoato de etila	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	88, 99 e 60
Heptanoato de etila	C <sub>7</sub> C <sub>2</sub>	88 e 101
Octanoato de etila	C <sub>8</sub> C <sub>2</sub>	56 e 43
Nonanoato de etila	C <sub>9</sub> C <sub>2</sub>	88 e 101
Decanoato de etila	C <sub>10</sub> C <sub>2</sub>	88 e 101
Dodecanoato de etila	C <sub>12</sub> C <sub>2</sub>	88 e 101
Isobutirato de etila	iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	116, 88 e 71
2-metilbutirato de etila	2mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	102, 57 e 85
Isovalerato de etila	iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	88, 85 e 57
Fenilacetato de etila	PhC <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	91 e 105
2-hidroxihexanoato de etila	2OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	69 e 87
Cinamato de etila	CinC <sub>2</sub>	176 e 131
Dihidrocinamato de etila	DhCinC <sub>2</sub>	104, 91 e 178

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a gás Agilent 5890 série II equipado com um espectrômetro de massas Agilent 5972 e um injetor automático Gerstel MPS 2 (Agilent Technologies, Massy, France). Os compostos foram separados em coluna capilar BP21 (50,0 m x 0,32 mm d.i com espessura de filme de 0,25 µm, Varian). O programa de temperatura da coluna iniciou em 40°C e, após 5 minutos, aumentou para 220°C a uma taxa de 5°C.min<sup>-1</sup>, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. O gás de arraste utilizado foi o He com uma pressão de 8 psi.

A ionização dos compostos foi configurada no modo de impacto de elétrons (EI) a +70 eV. O analisador de massas quadropolos foi configurado para trabalhar no modo SIM (*Selective Ion Monitoring* - GC/MS-SIM), para o qual foram selecionados íons específicos para cada composto (Tabela 3.2). Esses íons são formados durante as fragmentações dos compostos devido ao impacto de suas moléculas com os elétrons gerados na fonte de ionização. A temperatura do detector foi mantida em 280°C. Nos experimentos foram consideradas as áreas geradas pela integração dos íons quantitativos de cada éster. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O perfil cromatográfico e os parâmetros da validação para esta metodologia podem ser visualizados nos Anexos 6 e 7, respectivamente.

## **2.7. Análise dos dados**

Os resultados obtidos neste trabalho foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes de comparação de médias de Tukey e de correlação de Pearson, sendo interpretados através do software STATISTICA® versão 8.0. Também foi utilizada a ferramenta de análise de componentes principais (PCA), sendo os resultados interpretados pelo software PIROUETTE versão 3.11.

## **3. Resultados e Discussões**

### **3.1. Determinação das frações nitrogenadas dos mostos**

Os resultados obtidos para as concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos encontrados nas amostras estudadas estão apresentados na Tabela 3.3.

Os valores obtidos para o nitrogênio assimilável apresentaram diferenças significativas apenas entre os tratamentos das cultivares *Merlot* e *Cabernet franc*. Embora a cultivar *Cabernet sauvignon* não tenha apresentado tais diferenças, notou-se que os tratamentos empregados para essa cultivar apresentaram resultados bem diferentes entre si, o que sugere que a indiferença apresentada entre os resultados se deva aos elevados valores obtidos para desvios-padrões, fato não ocorrido com as demais cultivares. Dessa maneira, pode-se sugerir que as três variedades apresentaram grandes diferenças para os teores de nitrogênio assimilável, cujas



concentrações variaram entre 128,00 (Mc) e 167,67 (M120) g.L<sup>-1</sup> para a *Merlot*, entre 103,88 (CFc) e 163,13 (CF90) g.L<sup>-1</sup> para a *Cabernet franc* e entre 115,00 (CSc) e 184,75 (CS60) g.L<sup>-1</sup> para a *Cabernet sauvignon*, que ficou com os maiores valores para nitrogênio assimilável. Esses valores estão bem acima dos valores encontrados por Lee e Schreiner (2010), que adicionaram diferentes concentrações de nitrogênio no solo da cultivar *Pinot noir* e obtiveram uma assimilação máxima de 0,02 g.K<sup>-1</sup> para o melhor tratamento.

No entanto, ao relacionar as concentrações de amônia adicionadas aos vinhedos e as concentrações de nitrogênio assimilável presentes nos mostos, verificou-se que não houve correlação. Este resultado pode ser erroneamente interpretado como um resultado negativo, pois esperava-se que os teores dos compostos nitrogenados presentes nos mostos fossem diretamente proporcionais aos teores de amônia adicionados no solo.

A técnica de pulverizar fontes de nitrogênio no solo é bastante comum, porém sua eficiência depende do grau de recuperação desse elemento pelas plantas, considerando os aspectos de absorção e metabolização desse elemento (Delfine e Formica, 2001).

Portanto, observando-se a Tabela 3.3, pode-se notar que não houve uma resposta linear entre os compostos nitrogenados presentes nos mostos e as concentrações de amônia adicionadas nos vinhedos, ou seja, o tratamento que apresentou a maior concentração de nitrogênio assimilável não foi o tratamento que recebeu a maior concentração de amônia no solo. No entanto, o resultado da adição de amônia ao solo foi positivo, pois os tratamentos controles (Mc, CFc e CSc), que não tiveram pulverização com amônia, apresentaram quantidades inferiores de nitrogênio assimilável em seus mostos se comparados com os outros tratamentos. Dentre os demais tratamentos, pode-se perceber que alguns se destacaram pelos altos valores apresentados para os compostos nitrogenados, como é o caso do M120 (*Merlot*), CF90 (*Cabernet franc*) e CS60 (*Cabernet sauvignon*). Essas amostras obtiveram as maiores concentrações de nitrogênio assimilável, sugerindo que suas videiras foram favorecidas em relação à absorção e metabolização da amônia recebida.

Tabela 3.3. Concentrações dos compostos nitrogenados obtidos para os mostos das cultivares *Merlot* (M), *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS), cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.

Compostos nitrogenados	Abreviações	<i>Merlot</i>					<i>Cabernet franc</i>					<i>Cabernet sauvignon</i>			
		Mc	M10	M90	M120	M180	CFc	CF10	CF90	CF120	CF180	CSc	CS10	CS60	CS120
<i>Aminoácidos (mg.L<sup>-1</sup>)</i>															
Ácido aspártico	ASP	9,12 <sup>a</sup>	4,56 <sup>b</sup>	8,67 <sup>a</sup>	2,23 <sup>c</sup>	5,04 <sup>b</sup>	1,72 <sup>d</sup>	3,83 <sup>c</sup>	8,12 <sup>a</sup>	6,08 <sup>b</sup>	3,79 <sup>c</sup>	4,38 <sup>d</sup>	6,42 <sup>c</sup>	14,75 <sup>a</sup>	10,84 <sup>b</sup>
Ácido glutâmico	GLU	3,85 <sup>c</sup>	6,50 <sup>b</sup>	4,02 <sup>c</sup>	11,30 <sup>a</sup>	7,15 <sup>b</sup>	1,96 <sup>d</sup>	4,07 <sup>c</sup>	5,59 <sup>b</sup>	7,79 <sup>a</sup>	3,63 <sup>c</sup>	3,66 <sup>d</sup>	7,10 <sup>c</sup>	13,72 <sup>b</sup>	17,61 <sup>a</sup>
Asparagina	ASP-NH <sub>2</sub>	10,74 <sup>a</sup>	7,75 <sup>b</sup>	10,96 <sup>a</sup>	5,36 <sup>c</sup>	8,04 <sup>b</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,77 <sup>cd</sup>	7,97 <sup>a</sup>	5,08 <sup>b</sup>	2,01 <sup>c</sup>	0,62 <sup>d</sup>	1,40 <sup>c</sup>	2,68 <sup>a</sup>	2,07 <sup>b</sup>
Serina	SER	12,68 <sup>c</sup>	15,67 <sup>b</sup>	12,70 <sup>c</sup>	18,18 <sup>a</sup>	16,11 <sup>b</sup>	12,04 <sup>d</sup>	18,36 <sup>c</sup>	33,26 <sup>a</sup>	27,14 <sup>b</sup>	18,45 <sup>c</sup>	10,07 <sup>d</sup>	17,38 <sup>c</sup>	30,38 <sup>a</sup>	22,31 <sup>b</sup>
Glutamina	GLN	8,69 <sup>c</sup>	15,08 <sup>a</sup>	8,63 <sup>c</sup>	12,09 <sup>b</sup>	14,59 <sup>a</sup>	22,62 <sup>b</sup>	29,55 <sup>a</sup>	16,99 <sup>c</sup>	15,21 <sup>c</sup>	27,86 <sup>a</sup>	32,21 <sup>b</sup>	36,53 <sup>a</sup>	26,48 <sup>c</sup>	23,17 <sup>d</sup>
Glicina	GLY	nd	nd	nd	nd	nd	3,00 <sup>a</sup>	2,79 <sup>ab</sup>	1,97 <sup>c</sup>	2,32 <sup>bc</sup>	2,79 <sup>ab</sup>	3,26 <sup>a</sup>	2,86 <sup>b</sup>	1,99 <sup>d</sup>	2,35 <sup>c</sup>
Treonina	THR	21,72 <sup>c</sup>	29,85 <sup>a</sup>	21,73 <sup>c</sup>	26,75 <sup>b</sup>	29,89 <sup>a</sup>	56,64 <sup>b</sup>	71,38 <sup>a</sup>	47,94 <sup>c</sup>	39,29 <sup>d</sup>	75,24 <sup>a</sup>	64,59 <sup>a</sup>	57,29 <sup>b</sup>	33,50 <sup>d</sup>	38,36 <sup>c</sup>
Arginina	ARG	23,89 <sup>c</sup>	36,08 <sup>a</sup>	23,58 <sup>c</sup>	28,60 <sup>b</sup>	36,12 <sup>a</sup>	63,80 <sup>c</sup>	71,33 <sup>b</sup>	55,24 <sup>d</sup>	45,71 <sup>e</sup>	74,69 <sup>a</sup>	23,20 <sup>d</sup>	52,33 <sup>c</sup>	71,32 <sup>b</sup>	90,06 <sup>a</sup>
Alanina	ALA	324,31 <sup>c</sup>	389,11 <sup>b</sup>	315,58 <sup>c</sup>	461,40 <sup>a</sup>	389,47 <sup>b</sup>	270,09 <sup>e</sup>	354,76 <sup>c</sup>	555,32 <sup>a</sup>	403,59 <sup>b</sup>	335,22 <sup>d</sup>	366,08 <sup>d</sup>	429,37 <sup>c</sup>	619,37 <sup>a</sup>	525,12 <sup>b</sup>
Ácido gama aminobutírico	GABA	14,99 <sup>c</sup>	17,97 <sup>b</sup>	13,85 <sup>c</sup>	20,29 <sup>a</sup>	17,80 <sup>b</sup>	17,81 <sup>d</sup>	24,53 <sup>c</sup>	41,69 <sup>a</sup>	32,65 <sup>b</sup>	24,12 <sup>c</sup>	34,34 <sup>d</sup>	43,86 <sup>c</sup>	52,69 <sup>b</sup>	68,45 <sup>a</sup>
Tirosina	TYR	0,57 <sup>c</sup>	1,38 <sup>a</sup>	0,55 <sup>c</sup>	1,12 <sup>b</sup>	1,39 <sup>a</sup>	1,59 <sup>b</sup>	1,78 <sup>a</sup>	1,20 <sup>c</sup>	0,91 <sup>d</sup>	1,75 <sup>a</sup>	1,60 <sup>b</sup>	1,85 <sup>a</sup>	1,43 <sup>c</sup>	1,25 <sup>d</sup>
Etanolamina	ETN	5,16 <sup>c</sup>	7,03 <sup>b</sup>	4,89 <sup>c</sup>	9,07 <sup>a</sup>	6,79 <sup>b</sup>	5,22 <sup>d</sup>	6,58 <sup>c</sup>	9,08 <sup>b</sup>	12,27 <sup>a</sup>	7,15 <sup>c</sup>	5,04 <sup>d</sup>	6,82 <sup>c</sup>	8,58 <sup>b</sup>	12,21 <sup>a</sup>
Valina	VAL	12,81 <sup>c</sup>	23,19 <sup>a</sup>	12,12 <sup>c</sup>	18,10 <sup>b</sup>	23,01 <sup>a</sup>	12,66 <sup>d</sup>	17,51 <sup>c</sup>	32,81 <sup>a</sup>	21,41 <sup>b</sup>	16,81 <sup>c</sup>	5,64 <sup>d</sup>	11,62 <sup>c</sup>	24,43 <sup>a</sup>	18,30 <sup>b</sup>

Continuação da Tabela 3.3.

Triptofano	TRP	nd	nd	nd	nd	nd	1,94 <sup>a</sup>	1,64 <sup>b</sup>	0,78 <sup>d</sup>	1,35 <sup>c</sup>	1,69 <sup>b</sup>	1,35 <sup>a</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,25 <sup>d</sup>	0,45 <sup>c</sup>
Fenilalanina	PHE	3,28 <sup>b</sup>	4,26 <sup>b</sup>	2,79 <sup>b</sup>	6,39 <sup>a</sup>	3,98 <sup>b</sup>	2,91 <sup>d</sup>	4,94 <sup>c</sup>	8,82 <sup>a</sup>	6,97 <sup>b</sup>	4,73 <sup>c</sup>	1,17 <sup>d</sup>	2,88 <sup>c</sup>	9,32 <sup>a</sup>	5,87 <sup>b</sup>
Isoleucina	ILE	5,12 <sup>c</sup>	12,06 <sup>a</sup>	4,83 <sup>c</sup>	8,21 <sup>b</sup>	11,81 <sup>a</sup>	5,95 <sup>d</sup>	8,54 <sup>c</sup>	12,87 <sup>a</sup>	10,86 <sup>b</sup>	8,57 <sup>c</sup>	1,09 <sup>d</sup>	2,78 <sup>c</sup>	6,86 <sup>a</sup>	4,84 <sup>b</sup>
Leucina	LEU	9,25 <sup>c</sup>	16,82 <sup>a</sup>	8,69 <sup>c</sup>	12,20 <sup>b</sup>	17,32 <sup>a</sup>	8,74 <sup>d</sup>	12,36 <sup>c</sup>	21,40 <sup>a</sup>	17,74 <sup>b</sup>	12,67 <sup>c</sup>	2,89 <sup>d</sup>	6,42 <sup>c</sup>	13,16 <sup>a</sup>	10,43 <sup>b</sup>
Ornitina	ORN	62,55 <sup>c</sup>	81,54 <sup>b</sup>	65,75 <sup>c</sup>	108,75 <sup>a</sup>	79,17 <sup>b</sup>	46,21 <sup>d</sup>	51,44 <sup>c</sup>	57,27 <sup>b</sup>	66,56 <sup>a</sup>	51,45 <sup>c</sup>	37,83 <sup>d</sup>	46,55 <sup>c</sup>	66,02 <sup>a</sup>	53,24 <sup>b</sup>
Lisina	LYS	5,83 <sup>a</sup>	3,26 <sup>a</sup>	5,95 <sup>a</sup>	1,59 <sup>a</sup>	3,23 <sup>a</sup>	6,91 <sup>a</sup>	5,53 <sup>b</sup>	3,55 <sup>d</sup>	4,72 <sup>c</sup>	5,51 <sup>b</sup>	2,76 <sup>b</sup>	3,41 <sup>a</sup>	1,63 <sup>c</sup>	0,90 <sup>d</sup>
<i>Total</i>		534,55 <sup>c</sup>	672,11 <sup>b</sup>	525,31 <sup>c</sup>	751,64 <sup>a</sup>	670,01 <sup>b</sup>	542,58 <sup>d</sup>	692,76 <sup>c</sup>	921,93 <sup>a</sup>	727,72 <sup>b</sup>	678,17 <sup>c</sup>	601,88 <sup>d</sup>	737,46 <sup>c</sup>	998,63 <sup>a</sup>	907,9 <sup>b</sup>
		± 1,00	± 3,1	± 7,0	± 9,8	± 4,5	± 3,5	± 8,3	± 8,1	± 7,4	± 6,7	± 7,3	± 9,6	± 1,5	± 9,1
<i>Nitrogênio assimilável (mg.L<sup>-1</sup>)</i>		128,00 <sup>b</sup>	155,68 <sup>a</sup>	136,67 <sup>b</sup>	167,69 <sup>a</sup>	155,33 <sup>a</sup>	103,88 <sup>c</sup>	116,63 <sup>bc</sup>	163,13 <sup>a</sup>	142,25 <sup>ab</sup>	117,63 <sup>bc</sup>	115,00 <sup>a</sup>	129,63 <sup>a</sup>	184,75 <sup>a</sup>	165,00 <sup>a</sup>
		± 7,0	± 6,5	± 4,1	± 2,5	± 4,7	± 18,7	± 11,8	± 18,1	± 14,1	± 20,6	± 55,2	± 35,2	± 19,6	± 52,9

Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey entre os tratamentos para cada cultivar (P < 0,05).

\* Valor médio para análises em triplicata. c: controle; 10, 60, 90, 120, 180: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>

Com relação aos aminoácidos, diferenças significativas foram encontradas para as três varietais estudadas, apresentando valores bastante distintos entre os mostos obtidos de cada procedimento para cada varietal. A *Merlot* foi a cultivar que apresentou as menores concentrações de aminoácidos, abrangendo uma faixa de 525,31 (M90) a 751,64 (M120) mg.L<sup>-1</sup>. Para a cultivar *Cabernet franc*, os aminoácidos apresentaram-se na faixa de 542,58 (CFc) a 921,93 (CF90) mg.L<sup>-1</sup> e para a cultivar *Cabernet sauvignon*, esses compostos ficaram na faixa de 601,88 (CSc) a 998,63 (CS60) mg.L<sup>-1</sup>.

Um total de 19 aminoácidos pôde ser detectado e quantificado na maioria das amostras. A composição de aminoácidos presente nas amostras foi semelhante à composição encontrada por Stines *et al.* (2000) e por Lee e Schreiner (2010) para a variedade *Pinot noir*, com exceção dos aminoácidos alanina e arginina, que apresentaram-se em concentrações invertidas, ou seja, nos trabalhos citados foram encontradas altas concentrações de arginina enquanto neste trabalho foram encontrada altas concentrações de alanina. As varietais *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* apresentaram todos os aminoácidos analisados. Entretanto, a varietal *Merlot* não apresentou a glicina e o triptofano em nenhuma de suas amostras. Alguns aminoácidos, como a cisteína e a metionina, não foram encontrados em nenhuma das amostras analisadas.

Dentre todos os aminoácidos analisados, a alanina foi o que mais se destacou, apresentando concentrações mais elevadas para todas as amostras, que variaram de 270,09 (CFc) a 619,37 (CS60) mg.L<sup>-1</sup>. De acordo com Boulton *et al.* (1995), os aminoácidos prolina, arginina e alanina estão presentes em altas concentrações nos mostos das uvas e, com exceção da prolina e juntamente com a serina, a treonina e a asparagina, compõem o 3º lugar do ranking de compostos nitrogenados utilizados durante a fermentação alcoólica, perdendo apenas para a amônia e para a glutamina.

Quando se relaciona as concentrações de amônia adicionadas nos vinhedos e as concentrações totais de aminoácidos presentes nos mostos, verificou-se que, assim como o nitrogênio assimilável, novamente não houve correlações entre esses resultados devido à falta de linearidade entre as respostas. Porém, os resultados indicam que os tratamentos que receberam a amônia no solo apresentaram seus mostos mais ricos em aminoácidos se comparados com os tratamentos controles, comprovando a eficiência da técnica de manejo aplicada nos vinhedos.

Uma correlação positiva foi encontrada entre os teores de nitrogênio assimilável e os teores de aminoácidos para as três cultivares analisadas, cujos coeficientes de

correlação foram 0,97 para *Merlot*, 0,95 para *Cabernet franc* e 0,99 para *Cabernet sauvignon*, comprovando que a síntese de aminoácidos foi diretamente proporcional à quantidade de nitrogênio assimilada pelas videiras. Os tratamentos que se destacaram pelos altos valores de aminoácidos foram os mesmos tratamentos que se destacaram pelos altos valores obtidos para o nitrogênio assimilável, M120 (*Merlot*), CF90 (*Cabernet franc*) e CS60 (*Cabernet sauvignon*). Esses tratamentos obtiveram as maiores concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos, sugerindo que as videiras desses tratamentos foram favorecidas em relação à absorção e metabolização da amônia recebida e a consequente síntese de aminoácidos.

De acordo com Motta (2011), a síntese de aminoácidos pode ser realizada através das reações de aminação e transaminação. Na primeira reação, os aminoácidos são formados a partir de íons amônio e  $\alpha$ -cetoácidos, oriundos da fragmentação de açúcares. Na segunda reação ocorre a transferência de um grupamento amina ( $\text{NH}_2$ ) de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido, formando outro aminoácido. Assim, os resultados mostraram que essas reações ocorreram de forma mais intensa nos mostos onde havia maiores concentrações de amônia, que atuou como precursora para a formação dos aminoácidos.

Quando os resultados dos testes de correlação são analisados separadamente para cada aminoácido, pode-se verificar que as concentrações de vários aminoácidos foram influenciadas pela presença do nitrogênio nos mostos. Para a varietal *Merlot*, as concentrações de nitrogênio assimilável aumentaram proporcionalmente as concentrações de ácido glutâmico, serina, alanina, ácido gama aminobutírico, etanolamina, ornitina e asparagina (coeficientes de correlação 0,93; 0,93; 0,95; 0,94; 0,94; 0,93; 0,96; respectivamente) e diminuíram as concentrações do ácido aspártico e da lisina (-0,99 e -0,98; respectivamente). Já para a varietal *Cabernet franc*, o nitrogênio assimilável apresentou correlações positivas com o ácido aspártico, a asparagina, a serina, a alanina, o ácido gama aminobutírico, a valina, a fenilalanina, a isoleucina e a leucina (0,99; 0,99; 0,99; 0,97; 0,99; 0,97; 0,99; 0,99; 0,99; respectivamente) e correlações negativas com a glicina, o triptofano e a lisina (todas com coeficiente de correlação de -0,99). Por último, a *Cabernet sauvignon* também apresentou correlações positivas entre o nitrogênio assimilável e os aminoácidos ácido aspártico, asparagina, serina, alanina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina e ornitina (0,99; 0,98; 0,97; 0,99; 0,99; 0,99; 0,98; 0,99; 0,97; respectivamente) e correlações negativas com a glicina e a treonina (ambas com coeficiente de correlação de -0,99). De acordo com esses

resultados, pode-se concluir que a serina, a alanina e a fenilalanina foram os aminoácidos que apresentaram correlação positiva para as três variedades de uvas, indicando que suas concentrações aumentaram proporcionalmente com o aumento das concentrações de nitrogênio assimilável. Já a glicina e o triptofano apresentaram correlações negativas para essas variedades, e suas concentrações diminuíram com o aumento das concentrações de nitrogênio assimiladas pelas plantas.

Foi aplicada a ferramenta estatística de Análise de Componentes Principais (PCA) com o intuito de permitir a visualização da relação entre as amostras (14 mostos: 5 para *Merlot*, 5 para *Cabernet franc* e 4 para *Cabernet sauvignon*) e os dados experimentais (21 aminoácidos) em um plano dimensional. Para isso, trabalhou-se com a inclusão de três Componentes Principais (PCs) neste plano, capazes de explicar 83,21% do conjunto dos dados. A Figura 3.1 representa a inclusão das duas primeiras componentes principais. A primeira componente principal (PC1) foi capaz de explicar 38,17% da variância total do conjunto de dados, enquanto a segunda componente principal (PC2) explicou 29,6%.

Através da Figura 3.1 (A), pode-se perceber a formação de três grandes grupos, separados de acordo com as variedades e com as diferentes concentrações de amônia pulverizada nos vinhedos. A PC1 teve uma tendência em separar as amostras *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* de acordo com as concentrações de amônia, pois nota-se que os tratamentos que receberam as maiores dosagens desse composto localizaram-se mais à direita do conjunto de dados, demonstrando maior semelhança da composição aminoacídica entre si, enquanto que os tratamentos controles e que receberam as menores dosagens de amônia concentraram-se do lado esquerdo. Exceção se faz ao tratamento CF180 (*Cabernet franc*) que, embora tenha recebido a maior dosagem de amônia no solo, ficou localizado próximo ao tratamento que recebeu apenas 10 KgN.Hectare<sup>-1</sup> (CF10). Isso se deve ao fato da amostra CF180 não ter assimilado todo o nitrogênio presente no solo, resultando na semelhança de sua composição de aminoácidos com o tratamento CF10. De acordo com a comparação de médias obtida pelo teste de Tukey (Tabela 3.3), as concentrações totais de nitrogênio assimilável e de aminoácidos para essas duas amostras (CF180 e CF10) apresentaram valores muito próximos, não se diferindo estatisticamente. A Figura 3.1 (B) indica que os aminoácidos alanina, serina, etanolamina, fenilalanina e ácido aspártico estão associados e presentes em maiores concentrações nos tratamentos que receberam as maiores dosagens de amônia no solo, enquanto os outros tratamentos apresentaram maiores concentrações dos aminoácidos tirosina, glicina, glutamina, treonina e triptofano.

A PC2 teve a tendência em separar as amostras de acordo com o tipo de varietal, pois separou a *Merlot*, localizada na parte inferior do conjunto de dados, das *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, localizadas na parte superior, indicando a diferença da composição aminoacídica entre essas variedades. A Figura 3.1 (B) indica que a *Merlot* foi a varietal que apresentou as maiores concentrações dos aminoácidos ornitina e asparagina.

Ao inserir a terceira componente principal (PC3) no conjunto de dados, capaz de explicar 15,43% da variância dos dados, foi possível a separação das 3 variedades utilizadas neste trabalho, com a formação de 3 grandes grupos (Figura 3.2). Nesta figura, observa-se que os aminoácidos sintetizados em maiores concentrações na *Cabernet franc* foram alanina, valina, lisina, leucina e isoleucina, enquanto para a *Cabernet sauvignon* foram glutamina, arginina e ácido gama aminobutírico. Esses dados estão de acordo com a comparação de médias obtida pelo teste de Tukey (Tabela 3.3).

A diferença existente na composição de aminoácidos para cada cultivar proveniente de diferentes procedimentos pode ser explicada pelas concentrações de nitrogênio assimiladas, influenciando assim as sínteses e as concentrações dos aminoácidos. Já a diferença entre as variedades pode ser explicada pelas características específicas de cada cultivar.

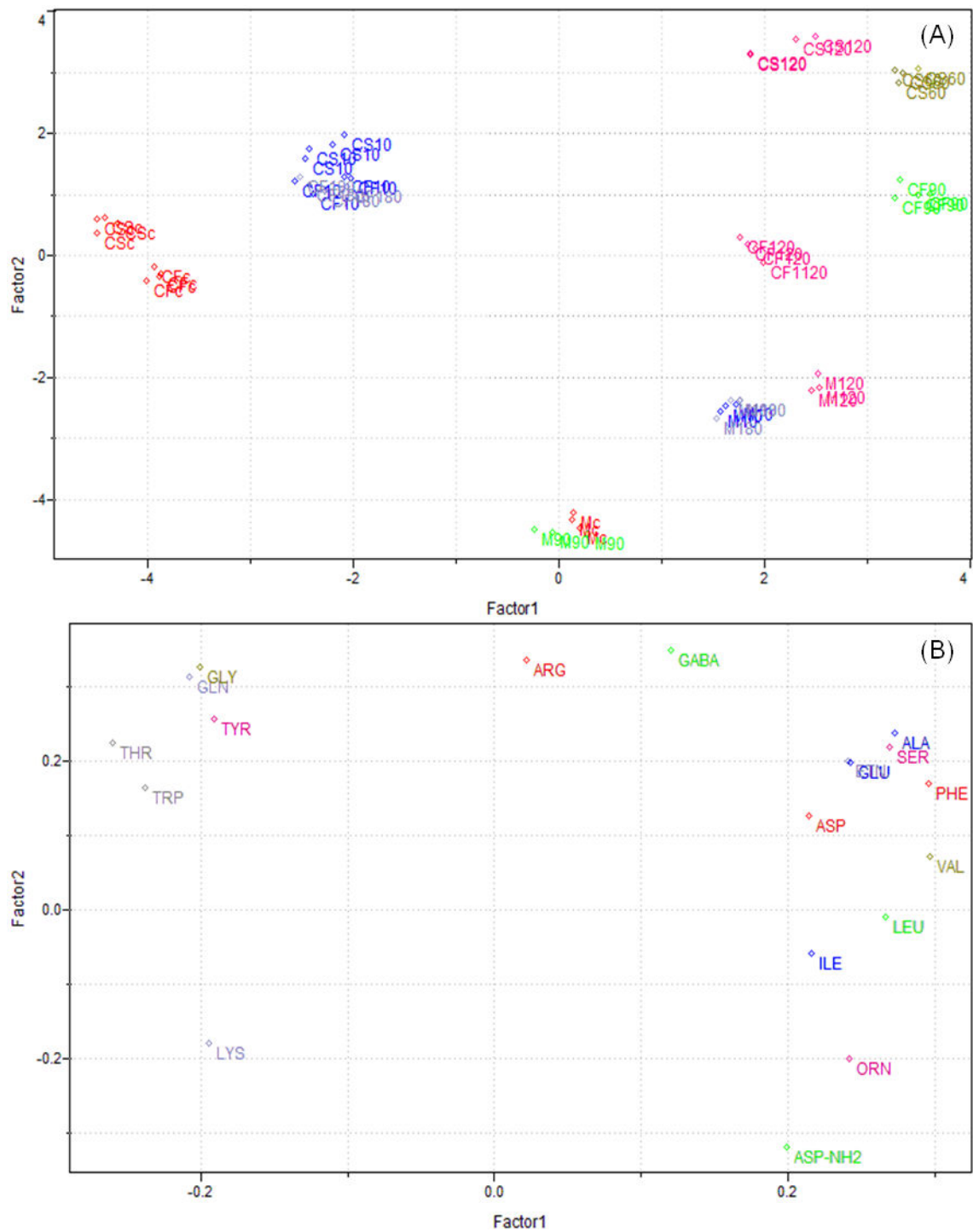


Figura 3.1. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os aminoácidos analisados (B). Abreviações segundo a Tabela 3.3. Fator 1: Componente Principal 1 e Fator 2: Componente Principal 2.



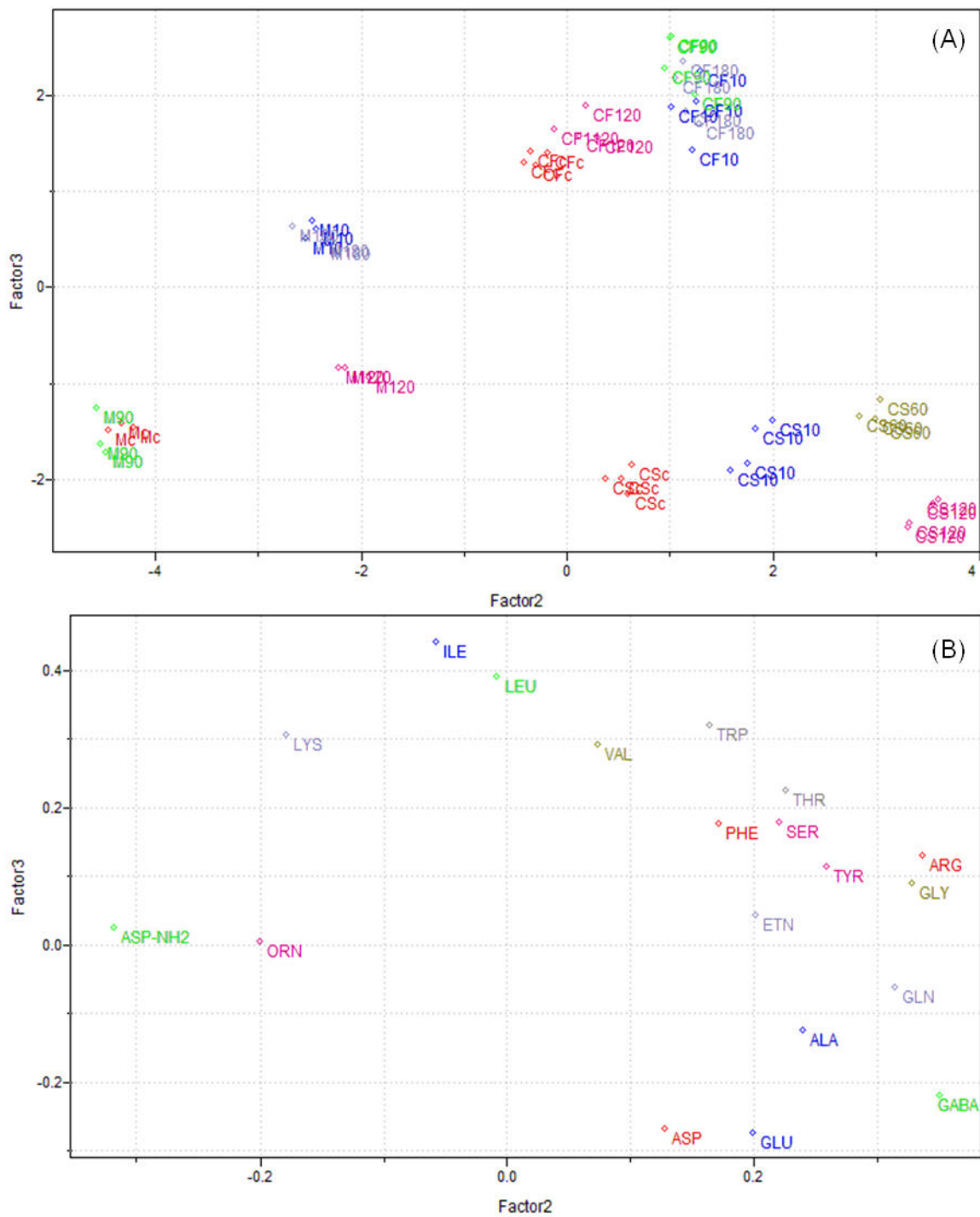


Figura 3.2. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os aminoácidos analisados (B). Abreviações segundo a Tabela 3.3. Fator 2: Componente Principal 2 e Fator 3: Componente Principal 3.

### 3.2. Determinação dos compostos voláteis dos vinhos

Os valores obtidos para as concentrações de álcoois e ésteres presentes nos vinhos estão apresentados na Tabela 3.4. Um total de 6 álcoois, compreendendo o metanol e 5 álcoois superiores, além de 27 ésteres, compreendendo os ésteres acetatos, os ésteres de ácidos fixos, os ésteres etílicos e o ésteres cinamatos, foram identificados e quantificados na maioria das amostras.

Para essas duas classes de compostos voláteis, houve diferenças significativas entre os tratamentos das três cultivares.

O metanol foi encontrado em todas as amostras. A presença desse composto no vinho é resultante da degradação de substâncias pécticas presentes nas cascas das uvas pela ação de enzimas. Apesar de não apresentar características organolépticas perceptíveis, a presença do metanol no vinho pode causar sérios danos à saúde. O limite máximo aceitável de metanol em vinhos é de 350 mg.L<sup>-1</sup> (Boulton et al., 1995). As concentrações de metanol encontradas para todas as amostras ficou abaixo do limite máximo aceitável, em torno de 2 mg.L<sup>-1</sup>.

Observando os resultados para os álcoois superiores, percebe-se que o 1-butanol apresentou as menores concentrações para as cultivares *Merlot* e *Cabernet franc*, não sendo detectado na cultivar *Cabernet sauvignon*. O 2-metilbutanol, seguido do 2-metilpropanol, representaram em média 76% da concentração dos álcoois superiores em todos os tratamentos da varietal *Merlot*. Esses dois compostos possuem aroma floral, sendo que o 2-metilbutanol possui, também, o aroma descrito como de banana (Torrea et al., 2011).

Nos vinhos produzidos pelas cultivares *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, o 3-metilbutanol foi o álcool majoritário, representando em média 71% dos álcoois superiores. De acordo com Barbosa et al. (2009), este composto é caracterizado pelo aroma de álcool e de removedor de esmalte (“nail polish remover”).

Em relação à concentração total de álcoois, a cultivar *Merlot* apresentou os vinhos com as menores concentrações de álcoois superiores, abrangendo uma faixa de 175,47 (Mc) a 190,89 (M120) mg.L<sup>-1</sup>, seguida da cultivar *Cabernet sauvignon*, com valores entre 223,96 (CSc) e 356,27 (M60) mg.L<sup>-1</sup>. Os vinhos com as maiores concentrações de álcoois superiores foram os *Cabernet franc*, com uma faixa de 339,37 (CFc) a 443,31 (CF90) mg.L<sup>-1</sup>. Dentre os tratamentos dessa cultivar, dois deles (CF90 e CF120) apresentaram

concentrações superiores a  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ , valor considerado limite para a contribuição positiva dos aromas dos alcoóis superiores no *bouquet* do vinho (Vilanova *et al.*, 2012). Uma explicação para esses valores elevados está relacionada às altas concentrações de nitrogênio, que proporciona uma produção elevada de  $\alpha$ -cetoácidos, que estão diretamente ligados com a produção dos alcoóis superiores (Barbosa *et al.*, 2009). As altas concentrações de álcoois superiores para essas amostras devem-se, provavelmente, às altas concentrações do 3-metilbutanol.

Os resultados obtidos para os álcoois superiores indicam que não houve uma resposta linear entre aumento das concentrações desses compostos e o aumento das concentrações de amônia adicionadas nos vinhedos. Porém, é possível observar que alguns tratamentos apresentaram altas concentrações para a maioria dos alcoóis superiores, como é o caso do M120, CF90 e CS 60, que também apresentaram as maiores concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos. Os tratamentos controles, exceto para a cultivar *Merlot*, foram desfavorecidos em relação aos outros tratamentos, pois apresentaram concentrações inferiores de alcoóis superiores.

Ao relacionar as concentrações de álcoois superiores presentes nos vinhos e as concentrações dos compostos nitrogenados presentes nos mostos, verificou-se correlações entre esses dois parâmetros. Para as três variedades de vinhos, observou-se uma correlação positiva das concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos sobre o metanol, o 1-butanol (exceto para *Cabernet sauvignon*), o 2-metilbutanol e o 3-metilbutanol, coeficientes de correlação acima de 0,92; 0,96; 0,91; 0,92; respectivamente. Entretanto, alguns álcoois apresentaram correlações negativas com os compostos nitrogenados, como é o caso do 1-propanol e do 2-metilpropanol, coeficientes de correlação acima de -0,97 e -0,96; respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Torrea *et al.* (2011), que verificaram um aumento da concentração de 2-metilbutanol e 3-metilbutanol proporcional ao aumento da concentração de nitrogênio adicionado no mosto de *Chardonnay*, enquanto que o 2-metilpropanol respondeu inversamente ao aumento da concentração de nitrogênio. Vilanova *et al.* (2012) também observaram o aumento do 3-metilbutanol, porém o 2-metilbutanol teve sua concentração diminuída, igualmente ao 2-metilpropanol. Garde-Cerdán *et al.* (2008), por sua vez, verificaram a diminuição da concentração de 1-propanol em mostos com maiores teor de nitrogênio.

Tabela 3.4. Concentrações dos compostos voláteis obtidos para os vinhos elaborados com as variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, cujos vinhedos foram pulverizados com diferentes concentrações de amônia no solo.

Compostos voláteis	Abreviações	<i>Merlot</i>					<i>Cabernet franc</i>					<i>Cabernet sauvignon</i>			
		Mc	M10	M90	M120	M180	CFc	CF10	CF90	CF120	CF180	CSc	CS10	CS60	CS120
<i>Álcoois (mg.L<sup>-1</sup>)</i>															
Metanol		1,75 <sup>c</sup>	1,97 <sup>b</sup>	1,75 <sup>c</sup>	2,36 <sup>a</sup>	1,98 <sup>b</sup>	1,74 <sup>c</sup>	1,98 <sup>b</sup>	2,35 <sup>a</sup>	2,20 <sup>a</sup>	1,99 <sup>b</sup>	1,68 <sup>d</sup>	1,73 <sup>c</sup>	1,93 <sup>a</sup>	1,80 <sup>b</sup>
1-propanol		12,43 <sup>a</sup>	9,94 <sup>b</sup>	12,57 <sup>a</sup>	7,95 <sup>c</sup>	10,13 <sup>b</sup>	17,19 <sup>a</sup>	14,59 <sup>b</sup>	10,75 <sup>d</sup>	13,02 <sup>c</sup>	14,88 <sup>b</sup>	10,37 <sup>a</sup>	9,00 <sup>b</sup>	4,78 <sup>d</sup>	6,91 <sup>c</sup>
2-metilpropanol		53,33 <sup>a</sup>	42,67 <sup>b</sup>	53,63 <sup>a</sup>	32,11 <sup>c</sup>	42,75 <sup>b</sup>	49,16 <sup>a</sup>	40,86 <sup>b</sup>	22,12 <sup>d</sup>	35,92 <sup>c</sup>	42,93 <sup>b</sup>	38,47 <sup>a</sup>	31,18 <sup>b</sup>	19,84 <sup>d</sup>	26,03 <sup>c</sup>
1-butanol		0,28 <sup>c</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,29 <sup>c</sup>	0,82 <sup>a</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,34 <sup>d</sup>	0,49 <sup>c</sup>	0,89 <sup>a</sup>	0,69 <sup>b</sup>	0,49 <sup>c</sup>	nd	nd	nd	nd
2-metilbutanol		84,24 <sup>c</sup>	92,59 <sup>b</sup>	85,64 <sup>c</sup>	112,25 <sup>a</sup>	93,89 <sup>b</sup>	44,54 <sup>d</sup>	49,94 <sup>c</sup>	76,58 <sup>a</sup>	63,14 <sup>b</sup>	50,86 <sup>c</sup>	27,15 <sup>d</sup>	33,02 <sup>c</sup>	54,99 <sup>a</sup>	40,01 <sup>b</sup>
3-metilbutanol		23,42 <sup>c</sup>	29,50 <sup>b</sup>	23,46 <sup>c</sup>	35,38 <sup>a</sup>	29,34 <sup>b</sup>	226,38 <sup>d</sup>	280,67 <sup>c</sup>	330,59 <sup>a</sup>	300,62 <sup>b</sup>	281,29 <sup>c</sup>	146,26 <sup>d</sup>	195,15 <sup>c</sup>	274,71 <sup>a</sup>	219,86 <sup>b</sup>
<i>Total</i>		175,47 <sup>b</sup>	177,28 <sup>b</sup>	176,35 <sup>b</sup>	190,89 <sup>a</sup>	178,69 <sup>b</sup>	339,37 <sup>d</sup>	388,55 <sup>c</sup>	443,31 <sup>a</sup>	415,62 <sup>b</sup>	392,47 <sup>c</sup>	223,96 <sup>d</sup>	270,09 <sup>c</sup>	356,27 <sup>a</sup>	294,63 <sup>b</sup>
		± 1,0	± 2,0	± 2,9	± 0,5	± 2,0	± 0,8	± 2,7	± 1,8	± 1,7	± 1,9	± 0,7	± 0,4	± 0,2	± 0,4
<i>Acetatos de álcoois superiores (ug.L<sup>-1</sup>)</i>															
Acetato de etila (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	63,72 <sup>d</sup>	72,25 <sup>c</sup>	64,67 <sup>d</sup>	107,65 <sup>a</sup>	82,44 <sup>b</sup>	48,27 <sup>e</sup>	58,09 <sup>c</sup>	68,40 <sup>a</sup>	61,06 <sup>b</sup>	56,43 <sup>d</sup>	51,03 <sup>d</sup>	55,57 <sup>c</sup>	72,06 <sup>a</sup>	64,06 <sup>b</sup>
Acetato de propila	C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	19,82 <sup>a</sup>	12,26 <sup>b</sup>	18,51 <sup>a</sup>	9,11 <sup>c</sup>	11,61 <sup>b</sup>	14,81 <sup>a</sup>	11,12 <sup>b</sup>	10,59 <sup>b</sup>	9,08 <sup>c</sup>	11,01 <sup>b</sup>	11,05 <sup>a</sup>	7,76 <sup>c</sup>	6,24 <sup>d</sup>	8,88 <sup>b</sup>
Acetato de isobutila	C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub>	71,03 <sup>a</sup>	53,99 <sup>b</sup>	70,74 <sup>a</sup>	43,79 <sup>c</sup>	53,50 <sup>b</sup>	56,61 <sup>a</sup>	46,95 <sup>b</sup>	39,13 <sup>d</sup>	41,93 <sup>c</sup>	47,02 <sup>b</sup>	50,22 <sup>a</sup>	41,83 <sup>b</sup>	26,23 <sup>d</sup>	36,86 <sup>c</sup>
Acetato de isoamila	C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub>	1568,67 <sup>c</sup>	2188,43 <sup>b</sup>	1565,55 <sup>c</sup>	2553,77 <sup>a</sup>	2173,69 <sup>b</sup>	1253,60 <sup>d</sup>	1642,11 <sup>c</sup>	2166,62 <sup>a</sup>	1963,30 <sup>b</sup>	1631,27 <sup>c</sup>	1554,91 <sup>d</sup>	1951,82 <sup>c</sup>	2346,70 <sup>a</sup>	2075,2 <sup>b</sup>
Acetato de hexila	C <sub>2</sub> C <sub>6</sub>	3,29 <sup>d</sup>	3,59 <sup>c</sup>	3,31 <sup>d</sup>	4,91 <sup>a</sup>	3,75 <sup>b</sup>	1,092 <sup>d</sup>	1,63 <sup>c</sup>	2,81 <sup>a</sup>	2,43 <sup>b</sup>	1,64 <sup>c</sup>	1,31 <sup>d</sup>	1,85 <sup>c</sup>	3,73 <sup>a</sup>	2,41 <sup>b</sup>
Acetato de octila	C <sub>2</sub> C <sub>8</sub>	0,59 <sup>c</sup>	1,31 <sup>b</sup>	0,63 <sup>c</sup>	1,89 <sup>a</sup>	1,33 <sup>b</sup>	0,37 <sup>e</sup>	0,49 <sup>d</sup>	1,53 <sup>a</sup>	1,23 <sup>b</sup>	0,58 <sup>c</sup>	0,25 <sup>d</sup>	0,59 <sup>c</sup>	1,40 <sup>a</sup>	0,94 <sup>b</sup>
Acetato de feniletila	C <sub>2</sub> PhC <sub>2</sub>	539,98 <sup>c</sup>	849,54 <sup>b</sup>	545,36 <sup>c</sup>	1138,83 <sup>a</sup>	854,87 <sup>b</sup>	659,06 <sup>e</sup>	734,05 <sup>d</sup>	741,41 <sup>c</sup>	811,42 <sup>b</sup>	992,25 <sup>a</sup>	240,49 <sup>d</sup>	366,30 <sup>c</sup>	811,45 <sup>a</sup>	763,68 <sup>b</sup>
<i>Ésteres de ácidos fixos (ug.L<sup>-1</sup>)</i>															
Lactato de etila	LE	62,72 <sup>c</sup>	73,25 <sup>b</sup>	64,10 <sup>c</sup>	118,65 <sup>a</sup>	74,34 <sup>b</sup>	933,36 <sup>d</sup>	995,28 <sup>c</sup>	1030,80 <sup>b</sup>	1150,71 <sup>a</sup>	999,75 <sup>c</sup>	834,51 <sup>d</sup>	900,51 <sup>c</sup>	952,37 <sup>b</sup>	1116,76 <sup>a</sup>
Succinato de dietila	SDE	20,56 <sup>c</sup>	31,63 <sup>a</sup>	22,16 <sup>c</sup>	27,38 <sup>b</sup>	32,28 <sup>a</sup>	23,79 <sup>d</sup>	25,98 <sup>c</sup>	32,15 <sup>a</sup>	28,21 <sup>b</sup>	25,82 <sup>c</sup>	19,96 <sup>d</sup>	24,51 <sup>c</sup>	31,13 <sup>b</sup>	40,54 <sup>a</sup>
Succinato de monoetila	SME	981,17 <sup>d</sup>	1052,42 <sup>b</sup>	985,43 <sup>c</sup>	901,37 <sup>e</sup>	1056,69 <sup>a</sup>	896,70 <sup>e</sup>	1115,16 <sup>b</sup>	952,85 <sup>d</sup>	1016,01 <sup>c</sup>	1132,43 <sup>a</sup>	876,78 <sup>d</sup>	927,02 <sup>c</sup>	1016,05 <sup>a</sup>	974,62 <sup>b</sup>

Continuação da Tabela 3.4.

<i>Ésteres etílicos de ácidos graxos (ug.L<sup>-1</sup>)</i>															
Propanoato de etila	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	75,54 <sup>c</sup>	104,50 <sup>b</sup>	77,56 <sup>c</sup>	185,40 <sup>a</sup>	105,81 <sup>b</sup>	64,82 <sup>d</sup>	76,22 <sup>c</sup>	94,30 <sup>a</sup>	80,54 <sup>b</sup>	76,96 <sup>c</sup>	74,89 <sup>d</sup>	78,09 <sup>c</sup>	114,40 <sup>a</sup>	94,33 <sup>b</sup>
Butirato de etila	C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	84,98 <sup>c</sup>	125,67 <sup>a</sup>	85,19 <sup>c</sup>	115,54 <sup>b</sup>	128,40 <sup>a</sup>	101,03 <sup>d</sup>	110,07 <sup>c</sup>	125,20 <sup>a</sup>	117,13 <sup>b</sup>	111,41 <sup>c</sup>	63,43 <sup>d</sup>	78,90 <sup>c</sup>	133,51 <sup>a</sup>	107,39 <sup>b</sup>
Valerato de etila	C <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	2,04 <sup>e</sup>	3,35 <sup>b</sup>	2,08 <sup>d</sup>	2,65 <sup>c</sup>	3,39 <sup>a</sup>	1,58 <sup>d</sup>	1,86 <sup>c</sup>	2,13 <sup>b</sup>	2,25 <sup>a</sup>	1,95 <sup>c</sup>	1,75 <sup>b</sup>	1,69 <sup>b</sup>	2,48 <sup>a</sup>	2,18 <sup>a</sup>
Hexanoato de etila	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	422,71 <sup>b</sup>	372,79 <sup>d</sup>	451,77 <sup>a</sup>	315,47 <sup>e</sup>	406,43 <sup>c</sup>	320,42 <sup>a</sup>	275,41 <sup>b</sup>	236,87 <sup>e</sup>	261,62 <sup>d</sup>	272,23 <sup>c</sup>	293,90 <sup>a</sup>	261,69 <sup>b</sup>	191,98 <sup>d</sup>	216,26 <sup>c</sup>
Heptanoato de etila	C <sub>7</sub> C <sub>2</sub>	9,52 <sup>e</sup>	10,73 <sup>b</sup>	9,67 <sup>d</sup>	10,17 <sup>c</sup>	10,77 <sup>a</sup>	6,23 <sup>e</sup>	6,97 <sup>b</sup>	6,42 <sup>d</sup>	6,66 <sup>c</sup>	7,51 <sup>a</sup>	4,88 <sup>d</sup>	6,62 <sup>a</sup>	5,36 <sup>c</sup>	5,81 <sup>b</sup>
Octanoato de etila	C <sub>8</sub> C <sub>2</sub>	360,65 <sup>c</sup>	453,42 <sup>b</sup>	362,47 <sup>c</sup>	596,26 <sup>a</sup>	452,73 <sup>b</sup>	262,71 <sup>e</sup>	285,87 <sup>d</sup>	398,48 <sup>a</sup>	314,50 <sup>b</sup>	287,97 <sup>c</sup>	222,29 <sup>d</sup>	266,94 <sup>c</sup>	302,16 <sup>b</sup>	369,80 <sup>a</sup>
Nonanoato de etila	C <sub>9</sub> C <sub>2</sub>	2,26 <sup>b</sup>	2,08 <sup>c</sup>	2,30 <sup>a</sup>	1,85 <sup>d</sup>	2,10 <sup>c</sup>	2,15 <sup>a</sup>	1,95 <sup>b</sup>	1,61 <sup>d</sup>	1,82 <sup>c</sup>	1,99 <sup>b</sup>	1,53 <sup>d</sup>	2,27 <sup>a</sup>	1,98 <sup>c</sup>	2,15 <sup>b</sup>
Decanoato de etila	C <sub>10</sub> C <sub>2</sub>	107,57 <sup>c</sup>	167,35 <sup>b</sup>	110,30 <sup>c</sup>	227,40 <sup>a</sup>	169,28 <sup>b</sup>	94,85 <sup>d</sup>	118,53 <sup>c</sup>	143,01 <sup>a</sup>	134,38 <sup>b</sup>	116,89 <sup>c</sup>	105,65 <sup>d</sup>	123,70 <sup>c</sup>	132,63 <sup>b</sup>	167,16 <sup>a</sup>
Dodecanoato de etila	C <sub>12</sub> C <sub>2</sub>	32,67 <sup>a</sup>	27,56 <sup>b</sup>	32,47 <sup>a</sup>	21,62 <sup>c</sup>	29,47 <sup>b</sup>	25,39 <sup>d</sup>	36,61 <sup>b</sup>	30,96 <sup>c</sup>	34,02 <sup>bc</sup>	41,91 <sup>a</sup>	34,04 <sup>a</sup>	27,93 <sup>b</sup>	20,07 <sup>d</sup>	24,10 <sup>c</sup>
Isobutirato de etila	iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	11,95 <sup>c</sup>	20,15 <sup>b</sup>	13,59 <sup>c</sup>	26,74 <sup>a</sup>	19,16 <sup>b</sup>	17,84 <sup>d</sup>	21,55 <sup>c</sup>	26,53 <sup>b</sup>	31,49 <sup>a</sup>	23,93 <sup>bc</sup>	17,88 <sup>d</sup>	20,53 <sup>c</sup>	26,98 <sup>a</sup>	23,18 <sup>b</sup>
2-metilbutirato de etila	2mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	1,49 <sup>a</sup>	1,04 <sup>c</sup>	1,47 <sup>a</sup>	0,74 <sup>d</sup>	1,09 <sup>b</sup>	1,75 <sup>d</sup>	2,25 <sup>c</sup>	2,44 <sup>b</sup>	2,71 <sup>a</sup>	2,29 <sup>c</sup>	0,86 <sup>b</sup>	0,93 <sup>b</sup>	1,70 <sup>a</sup>	2,05 <sup>a</sup>
Isovalerato de etila	iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	1,63 <sup>e</sup>	4,01 <sup>b</sup>	1,75 <sup>d</sup>	3,78 <sup>c</sup>	4,23 <sup>a</sup>	2,45 <sup>e</sup>	3,22 <sup>d</sup>	4,56 <sup>b</sup>	5,44 <sup>a</sup>	3,75 <sup>c</sup>	1,88 <sup>d</sup>	2,04 <sup>c</sup>	3,85 <sup>a</sup>	2,66 <sup>b</sup>
Fenilacetato de etila	PhC <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	1,24 <sup>c</sup>	1,30 <sup>b</sup>	1,25 <sup>c</sup>	1,78 <sup>a</sup>	1,31 <sup>b</sup>	1,60 <sup>d</sup>	1,74 <sup>c</sup>	2,11 <sup>a</sup>	1,85 <sup>b</sup>	1,76 <sup>c</sup>	1,079 <sup>d</sup>	1,16 <sup>c</sup>	2,12 <sup>a</sup>	1,78 <sup>b</sup>
<i>Ésteres etílicos hidroxilados (ug.L<sup>-1</sup>)</i>															
3-hidroxi-butirato de etila	3OHC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	91,23 <sup>ab</sup>	88,36 <sup>bc</sup>	92,51 <sup>a</sup>	86,15 <sup>c</sup>	90,66 <sup>ab</sup>	77,77 <sup>a</sup>	69,87 <sup>c</sup>	66,04 <sup>e</sup>	67,47 <sup>d</sup>	71,75 <sup>b</sup>	100,40 <sup>a</sup>	94,52 <sup>b</sup>	88,78 <sup>d</sup>	92,03 <sup>c</sup>
2-hidroxi-hexanoato de etila	2OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	0,32 <sup>d</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,35 <sup>c</sup>	0,4 <sup>b</sup>	0,65 <sup>a</sup>	0,17 <sup>d</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,26 <sup>c</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,33 <sup>d</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,44 <sup>c</sup>	0,56 <sup>b</sup>
<i>Cinamatos (ug.L<sup>-1</sup>)</i>															
Cinamato de etila	CinC <sub>2</sub>	1,06 <sup>c</sup>	1,12 <sup>b</sup>	1,07 <sup>c</sup>	1,17 <sup>a</sup>	1,13 <sup>b</sup>	0,96 <sup>e</sup>	1,04 <sup>d</sup>	1,21 <sup>b</sup>	1,29 <sup>a</sup>	1,10 <sup>c</sup>	1,26 <sup>d</sup>	1,29 <sup>c</sup>	1,34 <sup>b</sup>	1,39 <sup>a</sup>
Dihidrocina-mato de etila	DhCinC <sub>2</sub>	0,52 <sup>e</sup>	1,14 <sup>b</sup>	0,56 <sup>d</sup>	0,73 <sup>c</sup>	1,17 <sup>a</sup>	1,24 <sup>d</sup>	1,38 <sup>c</sup>	1,49 <sup>b</sup>	1,72 <sup>a</sup>	1,43 <sup>bc</sup>	1,01 <sup>d</sup>	1,54 <sup>a</sup>	1,25 <sup>c</sup>	1,41 <sup>b</sup>
<b>Total</b>		4538,76 <sup>e</sup>	5723,56 <sup>c</sup>	4586,38 <sup>d</sup>	6505,11 <sup>a</sup>	5772,37 <sup>b</sup>	4870,76 <sup>d</sup>	5645,99 <sup>c</sup>	6440,84 <sup>a</sup>	6150,76 <sup>b</sup>	5672,78 <sup>c</sup>	4567,68 <sup>d</sup>	5248,57 <sup>c</sup>	6298,49 <sup>a</sup>	6198,32 <sup>b</sup>
		± 9,7	± 4,1	± 3,8	± 13,1	± 11,2	± 12,2	± 17,7	± 3,6	± 14,8	± 14,7	± 21,8	± 2,0	± 17,1	± 13,6

Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas pelo teste de Tukey entre os tratamentos para cada cultivar (P < 0,05).

Valor médio para análises em triplicata.

c: controle; 10, 60, 90, 120, 180: Kg N.Hectare<sup>-1</sup>

Alguns ésteres se destacaram nos vinhos, apresentando-se em maiores concentrações para amostras provenientes de todos os tratamentos, como é o caso do acetato de isoamila, acetato de feniletila, lactato de etila, succinato de monoetila, hexanoato de etila e octanoato de etila. No entanto, ao comparar a concentração desses compostos com trabalhos da literatura (Garde-Cerdán *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2009; Torrea *et al.*, 2011), a concentração encontrada nos vinhos elaborados foi baixa. O lactato de etila apresentou uma grande diferença no vinho das diferentes variedades, na cultivar *Merlot*, esse composto foi encontrado em uma concentração média de 70 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que para as cultivares *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, sua concentração foi em torno de 950 mg.L<sup>-1</sup>.

Contrariamente aos alcoóis superiores, não existe um limite para a concentração dos ésteres nos vinhos. As concentrações totais dos ésteres variaram de uma faixa de 4500 a 6500 ug.L<sup>-1</sup> para todas as cultivares e em todos os tratamentos. Concentrações superiores à essas foram encontradas por Garde-Cerdán e Ancín-Azpilicueta (2008), atingindo um limite máximo de 7000 ug.L<sup>-1</sup> para a varietal *Marzuelo* e por Torrea *et al.* (2011), obtendo concentrações totais de até 16000 ug.L<sup>-1</sup> para a cultivar *Chardonnay*.

Os tratamentos que mais se destacaram pela alta concentração de ésters foram M120, CF90 e CS60, possuindo os valores mais elevados de concentrações para esses compostos. Esses resultados sugerem que esses vinhos possam ser caracterizados com um aroma mais frutado. Em estudo realizado por Torrea *et al.* (2011), foi verificado que os vinhos com as maiores concentrações de ésteres possuíam um aroma frutado mais pronunciado, e que esses vinhos haviam recebido as maiores concentrações de nitrogênio durante a vinificação. Os tratamentos M120, CF90 e CS60 também apresentaram maiores concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos, além da elevada concentração de alcoóis superiores. A alta concentração de ésteres nestes tratamentos é mais uma evidência de que a técnica de manejo aplicada nos vinhedos foi eficiente.

Igualmente ao ocorrido com os alcoóis superiores, não houve resposta linear entre o aumento da concentração de ésteres com o aumento da concentração de amônia adicionada nos vinhedos. Entretanto, correlações positivas foram encontradas entre os ésteres e as concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos.

Quando se relacionou as concentrações dos ésteres presentes nos vinhos e as concentrações dos compostos nitrogenados presentes nos mostos, foi possível observar que alguns ésteres foram influenciados positiva e negativamente pela presença dos

compostos nitrogenados. Para todas as três variedades de vinhos, o aumento das concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos nos mostos aumentou proporcionalmente as concentrações de acetato de isoamila, acetato de octila e acetato de feniletila (coeficientes de correlação acima de 0,94; 0,98; 0,97; respectivamente) e diminuiu as concentrações de acetato de isobutila (coeficientes de correlação acima de -0,91).

Outras correlações foram encontradas especificamente para cada varietal. Ao analisar os vinhos *Merlot*, observou-se que o aumento dos compostos nitrogenados nos mostos contribuiu para o aumento do octanoato de etila, do decanoato de etila, do isobutirato de etila, do isovalerato de etila e do cinamato de etila (0,93; 0,97; 0,97; 0,90; 0,98; respectivamente) e diminuiu proporcionalmente as concentrações do acetato de propila, do hexanoato de etila (somente os aminoácidos), do nonanoato de etila, do dodecanoato de etila e do 2-metilbutirato de etila (-0,99; -0,91; -0,93; -0,91; -0,98; respectivamente).

Para a varietal *Cabernet franc*, o aumento das concentrações de nitrogênio assimilável e de aminoácidos nos mostos elevaram proporcionalmente as concentrações do acetato de etila, do acetato de hexila, do succinato de dietila, do propanoato de etila, do butirato de etila, do octanoato de etila, do decanoato de etila e do fenilacetato de etila (0,95; 0,93; 0,98; 0,95; 0,97; 0,96; 0,94; 0,97; respectivamente) e diminuíram as concentrações do hexanoato de etila, do nonanoato de etila e do 3-hidroxibutirato de etila (somente os aminoácidos) nos vinhos (-0,90; -0,98; -0,90; respectivamente).

Os vinhos *Cabernet sauvignon* também apresentaram diferenças nas concentrações de seus ésteres em função dos compostos nitrogenados dos mostos. Dentre os ésteres que apresentaram correlações positivas com esses compostos pode-se citar o acetato de etila, o acetato de hexila, o succinato de monoetila, o propanoato de etila, o butirato de etila, o valerato de etila, o isobutirato de etila, o isovalerato de etila e o fenilacetato de etila (0,99; 0,90; 0,99; 0,90; 0,99; 0,90; 0,98; 0,9; 0,99; respectivamente). Já os ésteres que apresentaram correlações negativas com os compostos nitrogenados são o hexanoato de etila, o dodecanoato de etila, o 3-hidroxibutirato de etila e o 2-metilbutirato de etila (-0,99; -0,97; -0,95; -0,90; respectivamente).

Ao observar essas correlações, pode-se notar que, para as variedades *Merlot* e *Cabernet franc*, houve um aumento das concentrações do octanoato de etila e do decanoato de etila em resposta ao aumento dos aminoácidos nos mostos. Foi verificada também, agora para as três variedades estudadas, uma diminuição do hexanoato de etila

em resposta ao aumento dos aminoácidos. Torrea *et al.* (2011) também verificaram o aumento do octanoato de etila e do decanoato de etila. Barbosa *et al.* (2009), por sua vez, verificaram uma diminuição desses dois compostos e, também do hexanoato de etila, assim como neste estudo. Já Garde-Cerdán e Ancí-Azpilicueta (2008) verificaram que esses três compostos não apresentaram qualquer correlação com as concentrações de aminoácidos presentes nos mostos.

De acordo com os resultados obtidos para os compostos aromáticos, foi realizada a Análise de Componentes Principais com a finalidade de relacionar as amostras (14 vinhos: 5 para *Merlot*, 5 para *Cabernet franc* e 4 para *Cabernet sauvignon*) e os dados experimentais (33 compostos aromáticos: 6 álcoois e 27 ésteres) em um plano dimensional. Foram utilizadas três Componentes Principais (PCs), responsáveis por explicar 80,48% do conjunto de dados. A Figura 3.3 representa a inclusão das duas primeiras componentes principais. A primeira componente principal (PC1) foi capaz de explicar 36,45% da variância total do conjunto de dados, enquanto a segunda componente principal (PC2) explicou 27,17%.

Através da Figura 3.3 (A), pode-se verificar que a PC1 teve uma tendência em separar as amostras de acordo com as diferentes concentrações de amônia pulverizada nos vinhedos. Nota-se que os tratamentos que receberam as maiores dosagens desse composto localizaram-se do lado direito do conjunto de dados, enquanto que os tratamentos controles e que receberam as menores dosagens de amônia concentraram-se do lado esquerdo. Isso demonstra a diferença na composição aromática entre esses dois extremos. Assim como o ocorrido com a análise dos componentes principais para os aminoácidos, aqui também nota-se que o tratamento CF180 (*Cabernet franc*), que recebeu a maior dosagem de amônia no solo, ficou localizado próximo ao tratamento que recebeu apenas 10 KgN.Hectare<sup>-1</sup> (CF10), bem como as proximidades encontradas entre os tratamentos Mc e M90 (*Merlot*) e M10 e M180 (*Merlot*). As aproximações entre esses tratamentos significam que, embora tenham recebido concentrações diferentes de amônia no solo, eles assimilaram quantidades parecidas de nitrogênio, resultando na semelhança de suas composições aromáticas. Esses dados também podem ser visualizados na análise de comparação de médias obtida pelo teste de Tukey (Tabela 3.3), que mostra que as concentrações totais de nitrogênio assimilável e de aminoácidos para essas amostras (CF180 e CF10, Mc e M90, M10 e M180) apresentaram valores muito próximos, não se diferindo estatisticamente.



A Figura 3.3 (B) indica que os álcoois 1-butanol e 2-metilbutanol, e os ésteres acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de octila, acetato de feniletila, propanoato de etila, butirato de etila e isovalerato de etila, estão associados e presentes em maiores concentrações nos vinhos referentes aos tratamentos que receberam as maiores dosagens de amônia no solo, enquanto os outros tratamentos apresentaram maiores concentrações dos álcoois 1-propanol e 2-metilpropanol e dos ésteres acetato de isobutila, acetato de propila, hexanoato de etila e dodecanoato de etila

A PC2 teve a tendência em separar os vinhos de acordo com o tipo de varietal, pois separou o *Merlot*, localizado na parte superior do conjunto de dados, dos *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, localizados na parte inferior, indicando a diferença da composição aromática entre esses varietais.

Com a inserção da terceira componente principal (PC3), que explicou 16,19% da variância dos dados, foi possível a separação dos vinhos *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*, além da separação dos vinhos *Merlot* já ocorrida com a PC2, formando assim 3 grupos no plano dimensional (Figura 3.4). Nota-se que os compostos de aroma encontrados em maiores concentrações na varietal *Merlot* foram 2-metilpropanol, 2-metilbutanol, acetato de etila, acetato de hexila, valerato de etila, hexanoato de etila, heptanoato de etila e octanoato de etila. Já a varietal *Cabernet franc* mostrou as maiores quantidades para 3-metilbutanol, isobutirato de etila, 2-metilbutirato de etila, fenilacetato de etila e dihidrocinamato de etila. Por último, a *Cabernet sauvignon* ficou com os maiores teores de lactato de etila, succinato de dietila e cinamato de etila. Esses dados estão de acordo com a comparação de médias obtida pelo teste de Tukey (Tabela 3.3).

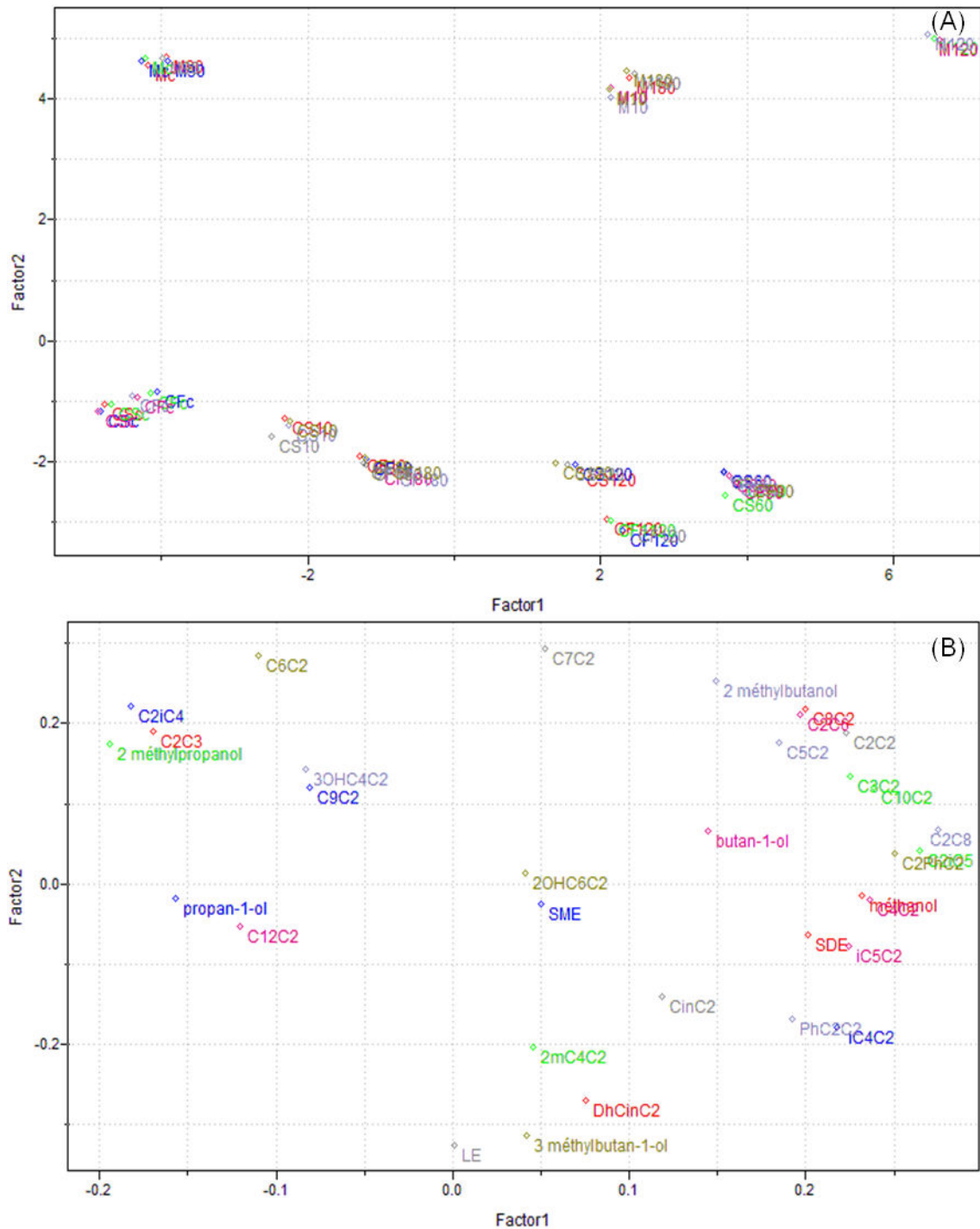


Figura 3.3. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os compostos voláteis analisados (B). Abreviações segundo a Tabela 3.4. Fator 1: Componente Principal 1 e Fator 2: Componente Principal 2.

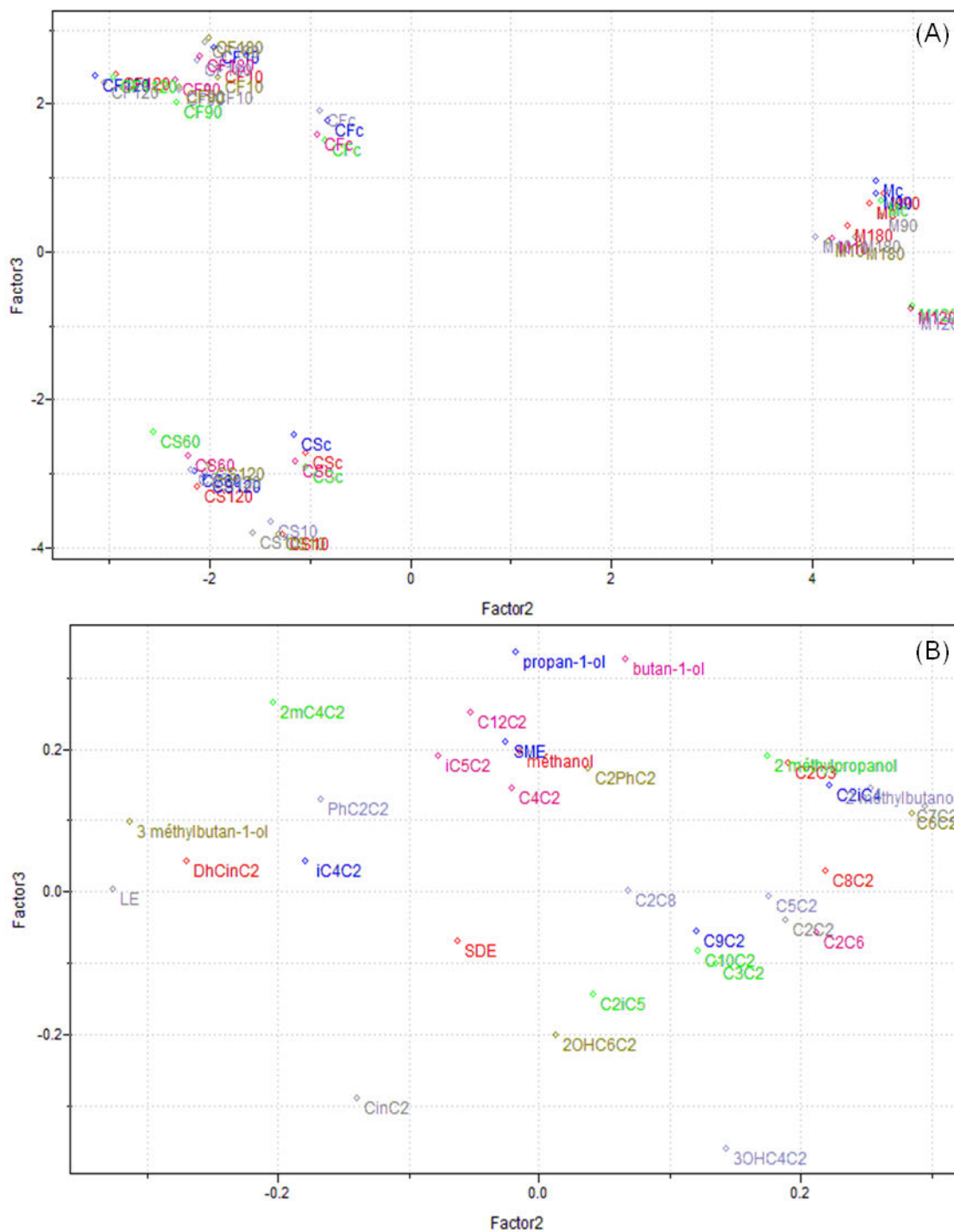


Figura 3.4. Análise de componentes principais para os tratamentos das cultivares *Merlot* (M) *Cabernet franc* (CF) e *Cabernet sauvignon* (CS) (A) e para os compostos voláteis analisados (B). Abreviações segundo a Tabela 3.4. Fator 2: Componente Principal 2 e Fator 3: Componente Principal 3.

### **3.3. Correlação entre os aminoácidos dos mostos e os compostos voláteis presentes nos vinhos.**

Com os resultados obtidos das análises de aminoácidos presentes nos mostos e dos álcoois superiores presentes nos vinhos, foi possível fazer uma correlação entre essas duas classes de compostos. Os testes de correlação mostraram que várias correlações positivas e negativas foram encontradas entre os aminoácidos e os álcoois superiores. As correlações positivas estão apresentadas na Tabela 3.5.

Esses resultados sugerem que os aminoácidos influenciaram a formação dos álcoois superiores, atuando como precursores para as reações. No entanto, são apenas resultados preliminares. Estudos mais aprofundados envolvendo a síntese completa e detalhada de tais compostos torna-se necessária. Na literatura, já foi comprovado que o 2-metilbutanol é derivado da isoleucina, fato ocorrido com a cultivar *Cabernet franc*, e que o 3-metilbutanol é derivado da leucina, também ocorrido para a mesma cultivar (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Gutiérrez, 2012).

Tabela 3.5. Correlações positivas encontradas entre os álcoois superiores e os aminoácidos nos vinhos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*.

Álcoois superiores	Aminoácidos		
	<i>Merlot</i>	<i>Cabernet franc</i>	<i>Cabernet sauvignon</i>
1-propanol	ácido aspártico asparagina lisina	glicina triptofano lisina	glicina treonina
2-metilpropanol	ácido aspártico asparagina lisina	glicina triptofano	glicina treonina
1-butanol	ácido glutâmico serina alanina ácido gama aminobutírico etanolamina fenilalanina ornitina	ácido aspártico asparagina serina alanina ácido gama aminobutírico valina fenilalanina isoleucina leucina	
2-metilbutanol	ácido glutâmico serina alanina ácido gama aminobutírico etanolamina fenilalanina ornitina	ácido aspártico asparagina serina alanina ácido gama aminobutírico valina fenilalanina isoleucina leucina	ácido aspártico asparagina serina alanina fenilalanina isoleucina leucina ornitina
3-metilbutanol	ácido glutâmico serina alanina ácido gama aminobutírico etanolamina fenilalanina ornitina	ácido aspártico asparagina serina alanina ácido gama aminobutírico valina fenilalanina isoleucina leucina	ácido aspártico asparagina serina alanina valina fenilalanina isoleucina leucina ornitina

Já que os ésteres acetatos são compostos produzidos em grandes concentrações pelas leveduras durante a fermentação alcoólica (Sumbly *et al.*, 2010), foi verificada a correlação entre os os álcoois superiores e os ésteres acetatos. As correlações positivas encontradas estão apresentadas na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Correlações positivas encontradas entre os álcoois superiores e os ésteres acetatos nos vinhos das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon*.

Álcoois superiores	Ésteres acetatos		
	<i>Merlot</i>	<i>Cabernet franc</i>	<i>Cabernet sauvignon</i>
1-propanol	acetato de propila acetato de isobutila	acetato de isobutila	acetato de isobutila
2-metilpropanol	acetato de propila acetato de isobutila	acetato de isobutila	acetato de isobutila
1-butanol	acetato de etila acetato de isoamila acetato de hexila acetato de octila acetato de feniletila	acetato de etila acetato de isoamila acetato de hexila acetato de octila acetato de feniletila	
2-metilbutanol	acetato de etila acetato de isoamila acetato de hexila acetato de octila acetato de feniletila	acetato de etila acetato de isoamila acetato de hexila acetato de octila acetato de feniletila	acetato de etila acetato de hexila acetato de octila
3-metilbutanol	acetato de etila acetato de isoamila acetato de hexila acetato de octila acetato de feniletila	acetato de etila acetato de isoamila acetato de hexila acetato de feniletila	acetato de etila acetato de isoamila acetato de hexila acetato de octila

Dessa forma, pode-se sugerir que os álcoois superiores influenciaram na formação de tais ésteres. Porém, igualmente às correlações obtidas entre os aminoácidos e os álcoois superiores, tratam-se apenas de resultados preliminares. Na literatura, as sínteses de alguns ésteres já foram comprovadas, como é o caso do acetato de isobutila, que é sintetizado a partir do 2-metilpropanol, e do acetato de isoamila, sintetizado a partir do 3-metilbutanol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Gutiérrez, 2012). Os resultados aqui apresentados corroboram com esses dados.

#### 4. Conclusão

A pulverização de amônia no solo das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* mostrou-se uma técnica eficiente, pois aumentou a concentração dos álcoois superiores e dos ésteres nos vinhos. A influência positiva ou negativa da técnica de manejo sobre o aroma dos vinhos necessitaria de avaliações sensoriais.

#### 5. Referências bibliográficas

- ANTALICK, G. Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique : Rôle particulier des esters. Tese de Doutorado, Universidade de Bordeaux 2, França, 2010a.
- ANTALICK, G; PERELLO, M. C.; REVEL, G. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 121, p. 1236-1245, 2010b.
- ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDA'N, T.; ANCI'N-AZPILICUETA, C. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1312-1318, 2007.
- BARBOSA, C.; FALCO, V.; MENDES-FAIA, A.; MENDES-FERREIRA, A. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.108, n.2, p.99-104, 2009.
- BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. Principles and Practices of Winemaking. New York – USA. Editora Chapman and Hall, 604 p., 1995.
- DELFINE, C. E FORMICA, J. V. Wine Microbiology. Science and Technology. 2001  
Marcel Dekker, Inc. New York, 490 páginas.
- FALCÃO, L. D.; CHAVES, E. S.; BURIN, V. M.; FALCÃO, A. P.; GRIS, E. F.; BONIN, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Maturity of Cabernet Sauvignon berries from grapevines

grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 35, p. 271-282, 2008.

GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. **LWT**, v.41, p.501-510, 2008.

GARDE-CERDÁN, T.; MARTÍNEZ-GIL, A. M.; LORENZO, C.; LARA, J. F.; PARDO, F.; SALINAS, M. R. Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. **Food Chemistry**, v. 124, P. 106-116, 2011.

GLAD, C.; FARINEAU, J.; REGNARD, J. -L.; MOROT-GAUDRY, J.-L. The relative contribution of nitrogen originating from two seasonal <sup>15</sup>N supplies to the total nitrogen pool present in the bleeding sap and in whole *Vitis vinifera* cv. Pinot noir grapevines at bloom time. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.45, p. 327-332, 1994.

GUTIÉRREZ, I. H. Apostila da “Universidad del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos”, 2012.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; IBARZ, M. J.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. **Food Chemistry**, v. 89, p. 163-174, 2005.

LEE, J.; SCHREINER, R. P. Free amino acid profiles from ‘Pinot noir’ grapes are influenced by vine N-status and sample preparation method. **Food Chemistry**, v. 119, p. 484-489, 2010.

MOTTA, V. T., Bioquímica. 2ª edição. Rio de Janeiro – RJ. Editora MedBook, 488 p., 2011.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. *Traité d’Oenologie: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. Volume 2, 2ª edição, West Sussex : John Wiley and Sons, Ltd., 441 p., 2006.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VESTREPEN, K.J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. **Applied and Environmental**



**Microbiology**, v.74, n.2, p.454-461, 2008.

STINES, A. P.; GRUBB, J.; GOCKOWIAK, H.; HENSCHKE, P. A.; HOJ, P. B.; HEESWIJCK, R. Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.6, p.150-158, 2000.

SUMBY, K. M.; GRBIN, P.R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, v.121, n.1, p.1-16, 2010.

TORREA, D.; VARELA, C.; UGLIANO, M.; ANCIN-AZPILICUETA, C.; FRANCIS, I. L.; HENSCHKE, P. A. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Food Chemistry**, v.127, p.1072-1083, 2011.

VILANOVA, M.; SIEBERT, T. E.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. **Food Chemistry**, v.33, n.1, p.124-131, 2012.



**CAPÍTULO 4:**

**Influência da cobertura do vinhedo e da dupla poda no teor de metoxipirazinas em uvas e vinhos *Cabernet sauvignon* no estado de São Paulo**

**Rodrigues, Daniele<sup>1</sup>; Revel, Gilles<sup>3</sup>; Wagner, Roger<sup>2</sup>; Godoy, Helena Teixeira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>: Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

<sup>2</sup>: Faculdade e Farmácia e Bioquímica – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>3</sup>: Faculté d'Œnologie – Institut des Sciences de la Vigne et du Vin – Université Victor Segalen Bordeaux II, France.

*Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico  
Food Chemistry (ISSN 0308-8146)*



## Influência da cobertura do vinhedo e da dupla poda no teor de metoxipirazinas em uvas e vinhos *Cabernet sauvignon* no estado de São Paulo

Rodrigues, D.; Revel, G.; Wagner, R.; Godoy, H. T.

### RESUMO

Metoxipirazinas são compostos presentes naturalmente em uvas *Cabernet sauvignon* e que são incorporadas no vinho durante o processo de vinificação. Seu limiar de percepção pelo olfato humano é extremamente baixo, abrangendo concentrações na ordem de poucos  $\text{ng.L}^{-1}$ . Dentre as metoxipirazinas, a IBMP (2-metoxi-3-isobutilpirazina) é a principal responsável pelo aroma herbáceo ou vegetal. Em baixas concentrações, a presença desses compostos é requerida, pois caracteriza a composição da fração volátil dos vinhos elaborados com essa varietal. Porém, em altas concentrações, seu aroma se sobressai, tornando-se um *off-flavour*, mascarando os outros compostos e depreciando a qualidade do vinho. Vários parâmetros têm sido relacionados com altas concentrações desses compostos em vinhos, sendo o mais importante a maturação das uvas na época da colheita, que pode ser influenciada por fatores naturais como a umidade do ar, as precipitações pluviométricas, a temperatura, entre outros. Diante desses fatores, esse trabalho sugeriu a aplicação de duas técnicas de manejo, cobertura do vinhedo e dupla poda, em vinhedos localizados no estado de São Paulo com o intuito de avaliar seus efeitos sobre a concentração de metoxipirazinas nas uvas e nos vinhos *Cabernet sauvignon*. As amostras de uvas foram colhidas semanalmente para acompanhar a evolução desses compostos, bem como os teores de sólidos solúveis totais e de pH, ao longo da maturação das uvas. As análises das metoxipirazinas foram realizadas por HS-SPME-GC/MS, os sólidos solúveis por refratometria e o pH por peagâmetro digital. Os resultados mostraram que esses compostos sofreram degradação ao longo do período de maturação, com valores para a concentração de IBMP iniciando em  $46 \text{ ng.L}^{-1}$  e finalizando abaixo de  $2,5 \text{ ng.L}^{-1}$ . A cobertura do vinhedo foi a técnica mais eficiente na redução de metoxipirazinas em safras colhidas no verão, apresentando uvas com concentração final máxima para a IBMP de  $5,27 \text{ ng.L}^{-1}$ , sugerindo que a alta temperatura abaixo da cobertura favoreceu a degradação desses compostos. Porém, a dupla poda inverteu a época da colheita do verão para o inverno, época mais fria e de menor intensidade pluviométrica, contribuindo para o aumento do tempo para as bagas atingirem a maturação ideal e, indiretamente, favorecendo a degradação das metoxipirazinas durante este tempo, chegando a valores finais de concentração inferiores a  $2,5 \text{ ng.L}^{-1}$ , tornando assim a dupla poda o tratamento mais eficaz para a redução das metoxipirazinas nas uvas e, conseqüentemente, no vinho. Com relação aos parâmetros físico-químicos dos mostos, não foram encontradas grandes diferenças para os teores de sólidos solúveis totais e de pH, mostrando que as técnicas de manejo estudadas não tiveram influência sobre essas características, mantendo as uvas em suas condições ideais para a elaboração de vinhos de qualidade.

Palavras-chaves: metoxipirazinas, *Cabernet sauvignon*, *Vitis vinifera*, cobertura do vinhedo, dupla poda.

**ABSTRACT**

Methoxypyrazines are compounds naturally present in *Cabernet Sauvignon* and are incorporated into wine during the vinification process. Your perception threshold by human smell is extremely low, covering concentrations in order of  $\text{ng.L}^{-1}$ . Among methoxypyrazines, the IBMP (2-methoxy-3-isobutylpyrazine) is primarily responsible for the flavor herbaceous or vegetable. At low concentrations, the presence of these compounds is required because it characterizes the aromatic composition of wines produced with this varietal. However, at high concentrations, its flavor stands out, becoming an *off-flavour*, masking the other compounds and depreciating the quality of wine. Several parameters have been related to high concentrations of these compounds in wines, the most important is the maturation of the grapes at harvest time, which can be influenced by natural factors such as humidity, rainfalls, temperature, between others. Given these factors, this work suggested the application of two management techniques, coverage vineyard and double pruning, in vineyards located in the state of São Paulo in order to evaluate its effects on the concentration of methoxypyrazines in grapes and wines *Cabernet Sauvignon*. The grape samples were collected weekly to monitor the development of these compounds, as well as the levels of soluble solids and pH, during the maturation time. The analyzes of methoxypyrazines were performed by HS-SPME-GC/MS, soluble solids by refractometry and pH by a digital pHmeter. The results showed that these compounds undergo degradation during the maturation period, with values for the concentration of IBMP starting at  $46 \text{ ng.L}^{-1}$  and ending below  $2,5 \text{ ng.L}^{-1}$ . The coverage vineyard technique was more effective in reducing methoxypyrazines in crops harvested in summer, with grapes with a maximum final concentration of IBMP of  $5,27 \text{ ng.L}^{-1}$ , suggesting that the high temperature below the coverage favored the degradation of these compounds. However, double pruning reversed the harvest season from summer to winter, coldest and least rainfall intensity, contributing to the increase in time for the berries reach optimum ripeness and, indirectly, favoring the degradation of methoxypyrazines during this time, reaching a final concentration values below  $2,5 \text{ ng.L}^{-1}$ , making the double pruning the most effective treatment for reducing methoxypyrazines in grapes and wines. With respect to physico-chemical parameters of musts, significant differences were not found for total soluble solids and pH, showing that management techniques studied had no influence on these characteristics, keeping the grapes in their ideal conditions for the development of wines of good quality.

Keywords: methoxypyrazines, *Cabernet Sauvignon*, *Vitis vinifera*, coverage of the vineyard, double pruning.

## 1. Introdução

A abertura da economia na década de 1990 tornou cada vez mais fácil o acesso do consumidor brasileiro aos vinhos importados, principalmente os finos, resultando na formação de um mercado consumidor cada vez mais exigente. Para se adequar a esta nova realidade, os produtores nacionais de vinhos vêm tentando melhorar a qualidade do produto e sua aceitabilidade entre tantas outras variedades (Souza, 2009).

No Brasil, a produção de uvas atingiu o marco de 1.295.442 toneladas em 2010, colocando o país em 19º lugar no ranking mundial dos produtores de uvas. Do total de uvas produzidas, 43% foram destinados ao processamento para a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura* (Mello, 2011).

A produção de vinhos brasileiros está dividida em vinhos de mesa comuns e vinhos de mesa finos, sendo cerca de 80% de vinhos comuns e 20% de vinhos finos (UVIBRA, 2010). O vinho fino nacional, embora tenha melhorado em qualidade, conquistado reconhecimento no exterior e espaço na mídia, ainda não consegue ter uma boa colocação no mercado mundial. O Brasil importou, em 2010, um total de quase 75 milhões de litros de vinho, o que representa 75% do vinho fino comercializado no país, enquanto exportou apenas 10 milhões (Mello, 2011). A alta qualidade dos vinhos importados tem colocado o setor de vinhos finos brasileiros em condições desfavoráveis. Diante deste cenário, o setor está investindo no aumento da qualidade dos vinhos e na promoção de indicações geográficas, buscando a valorização do produto pelos valores territoriais e culturais (Mello, 2007).

Para alavancar novos mercados e melhorar a participação dos vinhos finos no mercado interno, existe a necessidade da melhoria da qualidade dos vinhos, como a eliminação de compostos *off-flavours*, cujos aromas se sobressaem diante dos outros compostos aromáticos e se tornam predominantes, depreciando assim a qualidade do vinho. Como exemplo desses compostos, pode-se citar as metoxipirazinas, presentes naturalmente em algumas variedades *V. viníferas*, como *Cabernet sauvignon*, *Cabernet franc*, *Sauvignon blanc*, *Merlot* e *Pinot noir*, e que são responsáveis pelos aromas herbáceo ou vegetal (Sala *et al.*, 2000). Quando em baixas concentrações, a presença desses compostos é importante para a caracterização do *bouquet* do vinho, porém, em altas concentrações, seu aroma acentua-se diante dos outros compostos aromáticos

presentes, fazendo com que o vinho perca sua qualidade (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2002).

Três metoxipirazinas são descritas como responsáveis por esses potentes aromas, 2-metoxi-3-isopropilpirazina (IPMP), 2-metoxi-3-secbutilpirazina (SBMP) e 2-metoxi-3-isobutilpirazina (IBMP), sendo esta a principal, representando cerca de 80% do total (Schmarr *et al.*, 2010).

O limiar de percepção das metoxipirazinas pelo olfato humano é extremamente baixo, abrangendo uma faixa de concentração entre 1 a 10 ng.L<sup>-1</sup> quando presentes em água (Hartmann *et al.*, 2002) e entre 10 e 16 ng.L<sup>-1</sup> quando presentes em vinho tinto (Roujou de Boubée *et al.*, 2000). A grande maioria dos trabalhos científicos que analisam as metoxipirazinas em vinhos detecta que estes compostos geralmente estão presentes em concentrações acima do limiar de percepção do olfato humano. Segundo Culleré *et al.* (2009), esses compostos geralmente estão presentes na cultivar *Cabernet sauvignon* em níveis acima de 15 ng.L<sup>-1</sup> e, portanto, podem ser facilmente detectáveis pelo olfato humano. Em estudos realizados com vinhos *Cabernet sauvignon*, *Cabernet franc*, *Sauvignon blanc* e *Merlot*, foram encontradas concentrações de metoxipirazinas que variaram entre 1,7 e 56 ng.L<sup>-1</sup> (Allen *et al.*, 1994; Kotseridis *et al.*, 1999; Sala *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2007), sugerindo que os vinhos contendo as maiores concentrações desses compostos possuem um aroma herbáceo mais pronunciado.

Altas concentrações de metoxipirazinas encontradas nos vinhos demonstra a necessidade de investimentos na melhoria da qualidade da matéria prima, pois resultaria em uvas com menores concentrações desses compostos e vinhos de melhor qualidade. O conhecimento de fatores ambientais e práticas de manejo que possam influenciar o conteúdo desses compostos em uvas, bem como o conhecimento sobre sua evolução durante o desenvolvimento das bagas, podem mostrar um caminho para o controle do aroma e da qualidade final do vinho.

Inúmeros parâmetros têm sido relacionados com altas concentrações de metoxipirazinas em vinhos, sendo o mais importante a maturação incompleta das uvas na época da colheita (Lacey *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Kotseridis *et al.*, 1999b). Sabe-se que a concentração de metoxipirazinas decresce com o progresso da maturação (Lacey *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Roujou-de-Boubée *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2010). Portanto, vinhos produzidos com uvas mais maduras, tendem a possuir menores concentrações de IBMP, sendo que um atraso de 15 dias na colheita pode diminuir significativamente os



níveis desse composto (Kotseridis *et al.*, 1999b).

Entretanto, na maioria das regiões vitícolas brasileiras, a colheita das uvas coincide com o período de maior intensidade pluviométrica, condição que afeta negativamente a qualidade dos vinhos finos. A ocorrência de dias chuvosos com forte nebulosidade prejudica não somente a maturação, mas também a sanidade das uvas. Neste sentido, várias iniciativas têm sido tomadas atualmente no Brasil, com o propósito de identificar novas regiões vitícolas, ou mesmo melhorar as regiões já existentes, cujas condições edafoclimáticas sejam mais favoráveis à obtenção de melhores índices de maturação e qualidade da uva, contribuindo com menores índices de precipitação pluviométrica no período que antecede a colheita e uma amplitude térmica ideal que permita o bom desenvolvimento das bagas, com incremento da síntese de açúcares, decréscimo da acidez e aumento dos teores de polifenóis (Regina *et al.*, 2010).

Diante desses fatores, a alteração do ciclo de produção da videira, do verão para o inverno, através da dupla poda possibilita colher uvas em períodos secos mais favoráveis à maturação, evitando-se assim os excessos de chuvas do verão. (Amorim *et al.*, 2005; Regina *et al.*, 2006). Esta técnica, nova e promissora, vem sendo implantada com grande êxito por produtores de uva de mesa em todo o Brasil. Mota *et al.* (2006), Amorim *et al.* (2005), Favero *et al.* (2008) e Abrahão *et al.* (2002) utilizaram esta técnica e aumentaram a viabilidade de produção da videira Syrah e Niágara rosada na região sul de Minas Gerais. Souza e Fochesato (2007) e Anzanello *et al.* (2010) utilizaram a dupla poda no Rio Grande do Sul para alterar o ciclo vegetativo das cultivares Niágara Branca e Niágara Rosada. Mais recentemente, Hernandes *et al.* (2011) beneficiou-se desta técnica para melhorar a qualidade de Niágara Rosada na cidade de Louveira, no estado de São Paulo. Em todos esses trabalhos foram observados resultados satisfatórios com relação à técnica de dupla poda, permitindo a colheita em períodos mais secos do ano, garantido a maturação completa e o aumento na qualidade das uvas, melhores preços e menor incidência de doenças fúngicas. Entretanto, nenhum trabalho foi relatado na literatura utilizando esta técnica para variedades *V. vinifera*.

O clima também desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento e a maturação da uva. A temperatura de maturação das uvas tem uma grande influência na concentração de metoxipirazinas presentes nos vinhos. Trabalhos na literatura constataram que o amadurecimento das uvas em climas mais frios faz com que estas apresentem um aroma herbáceo mais pronunciado do que aquelas que passam pelo

amadurecimento em regiões mais quentes (Roujou-de-Boubée *et al.*, 2000; Falcão *et al.*, 2007; Ryona *et al.*, 2008). Desta forma, a maior exposição à radiação incidente, principalmente nas horas do dia com temperaturas mais amenas, ativa os processos metabólicos na fruta, resultando na elevação dos níveis de sólidos solúveis totais (°Brix) e reduzindo os teores de metoxipirazinas (Hashizume e Samuta, 1999). Neste sentido, o ato de cobrir o vinhedo com plástico transparente pode ser favorável, pois ao mesmo tempo em que permite a passagem parcial da luz solar através da cobertura, pode formar um efeito estufa, fazendo com que o calor fique retido, elevando ainda mais temperatura e, conseqüentemente, degradando as metoxipirazinas.

Portanto, algumas ações que visam a melhora da qualidade das cultivares são imprescindíveis, uma vez que elas podem complementar os investimentos que já vêm sendo aplicados na modernização das vinícolas e no desenvolvimento dos processos de vinificação. As técnicas de dupla poda e de cobertura do vinhedo aqui descritas podem ser práticas promissoras para aumentar a qualidade das uvas, pois permitem a maturação das bagas em tempo e condições ideais, diminuindo as concentrações das metoxipirazinas e elevando a qualidade dos vinhos.

Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dessas técnicas de manejo cobertura do vinhedo e a dupla poda, sobre as concentrações de metoxipirazinas presentes nas uvas e nos vinhos da cultivar *Cabernet sauvignon* cultivada nas cidades de Campos do Jordão – SP e São Bento do Sapucaí – SP, respectivamente.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Descrição dos vinhedos**

Para avaliar a influência de duas técnicas de manejo, cobertura do vinhedo e dupla poda, sobre os níveis de metoxipirazinas em uvas da varietal *Cabernet sauvignon*, foi realizado um estudo em dois vinhedos localizados no estado de São Paulo, sendo Campos do Jordão e São Bento do Sapucaí, respectivamente. Embora pertencentes a cidades diferentes, os dois vinhedos selecionados para esse estudo estão localizados muito próximos um do outro (distância de 33 Km), sendo assim, as condições geográficas e climáticas são semelhantes em ambos os vinhedos, não interferindo na influência das

técnicas de manejo estudadas.

Campos do Jordão está localizado na altitude de 1628 metros, latitude de 22° 44'22"S e longitude 45° 35'29"W. São Bento do Sapucaí possui a altitude de 886 metros, latitude de 22° 41'20"S e longitude 45° 43'51"W. Ambos os municípios integram o microclima de Campos do Jordão e o mesoclima do Vale do Paraíba (SP). Nesta região o clima é classificado como tropical de altitude, em que a temperatura raramente ultrapassa 30° C no verão, e o inverno é relativamente frio. A umidade relativa do ar está em torno de 70% e o solo é classificado como pré-cambriano, apresentando-se como hidromórfico, argilossolo e latossolo vermelho – amarelo. Os dois vinhedos apresentam solos bem drenados, com consistência macia, alta capacidade de retenção de água e ausência de pedras argilosas (CATI, 2009).

A escolha do porta-enxerto determina a quantidade e a qualidade de produção. Em ambos os vinhedos, o porta-enxerto utilizado foi o Pausen 1103, que confere maior resistência à seca e as pragas e maior tolerância ao excesso de umidade do solo (Regina *et al.*, 2006). O tipo de suporte e condução utilizado nas videiras foi o espaldeira, que garante maior ventilação para a as bagas.

## **2.2. Tratamentos aplicados nos vinhedos**

### **2.2.1. Cobertura do vinhedo**

Este experimento foi realizado no vinhedo localizado no município de Campos do Jordão, no estado de São Paulo. As videiras foram cobertas com plástico transparente de polietileno (0,2 mm de espessura), que protegeu as mesmas contra a chuva e proporcionou o acúmulo de calor sob a cobertura, elevando a temperatura e formando um efeito estufa ao redor das videiras e, possivelmente contribuindo para a redução da concentração de metoxipirazinas nas bagas. Neste experimento, as videiras iniciaram a brotação em setembro, floresceram em outubro e iniciaram a maturação em janeiro para serem colhidas entre fevereiro e março. Neste tipo de ciclo, apenas uma safra pôde ser colhida por ano.

### 2.2.2. Dupla poda

Este experimento foi conduzido no município de São Bento do Sapucaí, no estado de São Paulo, e avaliou o efeito da técnica de dupla poda em reduzir os teores de metoxipirazinas nas uvas. Esta técnica consistiu em alterar o ciclo das videiras, adiando-se a época da colheita, geralmente ocorrida entre os meses de fevereiro e março, para períodos de menor intensidade pluviométrica, ou seja, entre os meses de julho a agosto, evitando-se que as uvas sofressem contaminações fúngicas devido à alta umidade do ar e possibilitando que as mesmas pudessem ser colhidas no seu período correto, em que a maturação estivesse completamente finalizada.

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Amorim et al. (2005), onde se implantou um segundo ciclo vegetativo e produtivo da videira, através da poda e quebra da dormência artificial das plantas. Sendo assim, em agosto foi realizada a primeira poda para a remoção dos ramos velhos e a formação dos novos ramos, que originarão a safra seguinte. Em janeiro, após a formação completa dos novos ramos, realizou-se a segunda poda, denominada poda de produção, com o intuito de eliminar os ramos contendo mais de 8 gemas, deixando apenas os ramos contendo esse valor ou um número menor de gemas. Esses ramos foram arqueados à altura do primeiro arame da espaldeira, deixando-se aproximadamente 24 gemas por videira. Em seguida, aplicou-se cianamida hidrogenada 6% (dormex) por pincelamento em todas as gemas, para que a brotação ocorresse de forma homogênea em todas as gemas. Neste ciclo, a brotação ocorreu duas semanas após a segunda poda, a floração iniciou-se no final de fevereiro e a maturação iniciou-se em maio e seguiu até agosto, época da colheita.

A técnica de dupla poda permite a obtenção de até duas safras por ano, sendo uma de verão e a outra de inverno. Porém, duas safras por ano não é viável, pois as videiras não originarão frutos sadios e adequados para a vinificação. Este trabalho teve por objetivo estudar a safra de inverno, porém algumas videiras foram mantidas viáveis durante as duas safras para possibilitar comparação dos resultados.

### 2.3. Coleta das amostras

Para acompanhar a evolução da concentração de metoxipirazinas durante o período de maturação das uvas, amostras dos dois vinhedos foram colhidas semanalmente a partir da época do *véraison*, ou seja, época da mudança de cor das bagas do verde para o tinto, até a data da colheita. As amostras foram colhidas de forma aleatória por toda a extensão do vinhedo para uma maior representatividade e foram armazenadas em freezers (-20°C) até a data da análise.

Duas safras consecutivas foram obtidas do vinhedo localizado em Campos do Jordão, referentes aos anos de 2010 e 2011, cada safra contendo 8 amostras. Para o vinhedo localizado em São Bento do Sapucaí, foram obtidas duas safras de verão (2010 e 2011), contendo 7 amostras para cada uma, e uma safra de inverno (2009), contendo 11 amostras.

### 2.4. Vinificação

Na época da vindima, as uvas dos dois experimentos passaram pelo processo de vinificação. As uvas de Campos do Jordão foram vinificadas na fazenda pelo proprietário e as uvas de São Bento do Sapucaí foram transportadas para serem vinificadas na EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) em Caldas, Minas Gerais. Em seguida, os vinhos dos dois experimentos foram analisados para a determinação da concentração de metoxipirazinas.

Em ambos os casos, as vinificações seguiram os protocolos para vinificação clássica em vinhos tintos, incluindo as fermentações alcoólica e malolática. As uvas foram colhidas dos parreirais, desengaçadas para a retirada das uvas do cacho e esmagadas para a liberação do suco, formando assim o mosto. Estes, por sua vez, foram inoculados com cepas da levedura *Saccharomyces sp* para a realização da fermentação alcoólica, onde os açúcares fermentescíveis foram biotransformados em etanol e dióxido de carbono. O fim da fermentação alcoólica foi determinado quando as concentrações residuais de açúcares apresentaram-se inferiores a 5 g.L<sup>-1</sup> (Brasil, 1988). Em seguida ocorreu a maceração para a extração dos compostos presentes nas partes sólidas da uva, principalmente dos compostos fenólicos (antocianinas e taninos) presentes nas

cascas. A separação das fases sólida e líquida, denominada como descuba, foi realizada para preparar o vinho para a fermentação malolática, em que o ácido málico foi transformado em ácido láctico pela ação das bactérias lácticas. Em seguida, os vinhos foram engarrafados e encaminhados para as análises.

## **2.5. Metodologia analítica**

### **2.5.1. Reagentes e padrões**

Os padrões de metoxipirazinas, cito 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP), 3-secbutil-2-metoxipirazina (SBMP) e 3-etil-2-metoxipirazina (EMP) e 2-metil-3-metoxipirazina (MMP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Oakville, ON (99, 99, 97, 99 e 99% de pureza, respectivamente). O análogo deuterado da IBMP - [ $^2\text{H}_3$ ]-IBMP (98% de pureza) foi adquirido da CDN isotopes (Quebec, CA), para ser utilizado como padrão interno (PI) nos experimentos de validação e de determinação das metoxipirazinas. Os padrões foram diluídos em etanol absoluto (99,8% Vetec) para uso nos ensaios da validação. Ainda foi utilizado cloreto de sódio (Vetec) em todas as extrações.

### **2.5.2. Extração e análise de metoxipirazinas dos mostos**

A extração das metoxipirazinas nos mostos foi realizada através da técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* estático (HS-SPME), utilizando-se a fibra de triplo revestimento DVB/CAR/PDMS (2 cm x 50/30  $\mu\text{m}$  Supelco, Bellefonte, PA, USA).

As uvas foram descongeladas em temperatura ambiente e seus mostos homogeneizados manualmente por 10 minutos e centrifugados a 6000 rpm durante 5 minutos em temperatura de 20°C para a separação das cascas e das sementes. Em seguida, 10 mL dos mostos centrifugados foram transferidos para *vials* âmbar de 20 mL vedados hermeticamente com septo de PTFE. Juntamente com os mostos, adicionou-se aos *vials* 3 g cloreto de sódio (NaCl) e padrão interno [ $^2\text{H}_3$ ]-IBMP na concentração final de

20 ng.L<sup>-1</sup>.

A extração das metoxipirazinas foi realizada na temperatura de 65°C durante 60 minutos com agitação constante de aproximadamente 1000 rpm. O tempo de equilíbrio do *headspace* antes da extração foi de 5 minutos e o tempo de dessorção dos compostos da fibra no injetor do cromatógrafo a gás foi de 10 minutos em temperatura de 260°C, no modo *splitless*.

As metoxipirazinas foram analisadas em um cromatógrafo à gás Agilent modelo 7890A e identificadas e quantificadas em um espectrômetro de massas Agilent modelo 5975C, onde as moléculas foram ionizadas por impacto de elétrons (EI +70 eV) e analisadas em um quadrupolo. Os parâmetros para a análise das metoxipirazinas foram estabelecidos de acordo com Kotseridis *et al.* (2008), com algumas modificações.

As metoxipirazinas foram separadas em uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Agilent) 30,0 m x 0,25 mm d.i com espessura de filme de 0,25 µm. O programa de temperatura da coluna iniciou em 40 °C, permanecendo por 5 minutos, posteriormente aumentando até 110 °C a uma taxa de 3 °C.min<sup>-1</sup>, mantendo em isoterma por 1 minuto, subindo em seguida até 240 °C, com rampa de 25 °C.min<sup>-1</sup>, permanecendo por 2,5 minutos. O gás de arraste utilizado foi o He com uma vazão de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas da interface GC/MS e da fonte de íons foram mantidas a 250°C. O analisador de massas foi configurado para monitorar as massas de íons específicos para cada metoxipirazina (GC/MS-SIM), sendo um íon quantitativo e outro qualitativo: MMP: 124 e 109, EMP: 138 e 123, IPMP: 137 e 152, SBMP: 138 e 124, IBMP: 124 e 109 e análogo deuterado da IBMP - [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-IBMP: 127 e 109. A voltagem aplicada ao detector foi de 0,96 kV. Nos experimentos foram consideradas as áreas geradas pela integração do íon quantitativo de cada metoxipirazina. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O perfil cromatográfico para esta metodologia pode ser visualizado no Anexo 8.

A validação da metodologia analítica foi realizada de acordo com o protocolo da ANVISA (2003), através da construção de uma curva de calibração e da análise dos parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, repetitividade, precisão intermediária e exatidão, utilizando-se amostras de *Cabernet sauvignon* colhidas no ponto de maturação. Em todas as análises foram adicionados à matriz o padrão interno [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-IBMP na concentração final de 20 ng.L<sup>-1</sup>.

*Curva de Calibração e Linearidade* – para verificar o intervalo de linearidade, uma curva padrão foi preparada para cada metoxipirazina, MMP, EMP, IPMP, SBMP e IBMP,

fortificando-se o mosto nas concentrações finais de 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 ng.L<sup>-1</sup> de cada MP. Cada ponto foi analisado em três repetições e sempre adicionado do padrão interno [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-IBMP. Análises das matrizes sem fortificação também foram realizadas e, no caso do mosto conter uma quantidade traço das metoxipirazinas estudadas, as mesmas tiveram a área subtraída de todos os pontos da curva.

*Limites de detecção e quantificação* – os limites do equipamento foram determinados em solução aquosa, tendo em vista que não havia uma matriz isenta dos analitos em estudo. Os limites de detecção (LOD) foram estabelecidos considerando-se as concentrações das metoxipirazinas que forneceram a razão sinal/ruído = 3 e os limites de quantificação (LOQ) as concentrações que forneceram a razão sinal/ruído = 10.

*Precisão* – a precisão do método foi avaliada pela estimativa do coeficiente de variação (RSD) da repetitividade e da precisão intermediária. A repetitividade foi determinada através da análise de seis amostras idênticas em um mesmo dia e a precisão intermediária através de 15 determinações, divididas em 5 repetições extraídas em três dias consecutivos. Nos dois casos o mosto foi fortificado com uma solução padrão equivalente a concentração final de 10 ng.L<sup>-1</sup> de cada metoxipirazina.

*Exatidão* – para avaliar a exatidão do método, utilizou-se o teste de recuperação. Os mostos foram fortificados com três diferentes concentrações de metoxipirazinas, 5, 10 e 20 ng.L<sup>-1</sup> (n = 5) e a exatidão foi expressa pela porcentagem dos analitos recuperados em cada nível de concentração.

### **2.5.3. Extração e análise de metoxipirazinas nos vinhos**

A metodologia para a extração e a análise de metoxipirazinas nos vinhos foi realizada de acordo com a metodologia validada e utilizada no Laboratório de Química Analítica, do Instituto de Ciências da Uva e do Vinho (ISVV), na cidade de Bordeaux, França.

A extração das metoxipirazinas nos vinhos também foi realizada através da técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* estático (HS-SPME), porém utilizou-se a fibra de duplo revestimento PDMS/DVB (1 cm x 50/30 µm Supelco, Bellefonte, PA, USA).



Os vinhos foram abertos no momento da análise. Um volume de 20 mL de vinho foi adicionado de padrão interno [ $^2\text{H}_3$ ]-IBMP a uma concentração final de  $90 \text{ ng.L}^{-1}$  e seu pH foi ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio (NaOH)  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ . Em seguida, foi transferido um volume de 5 mL para um vial âmbar de 20 mL vedado com septo de PTFE juntamente com 5 mL de água deionizada (Milli-Q) e 3 g de cloreto de sódio (NaCl) para a realização da extração das metoxipirazinas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A extração das metoxipirazinas foi realizada na temperatura de  $40^\circ\text{C}$  durante 50 minutos com agitação constante de 800 rpm. O tempo de equilíbrio do *headspace* antes da extração foi de 7 minutos e o tempo de dessorção dos compostos da fibra no injetor do cromatógrafo a gás foi de 5 minutos, no modo *splitless*.

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a gás Agilent 6890 equipado com espectrômetro de massas Agilent 5973 e injetor automático Gerstel MPS 2 (Agilent Technologies, Massy, France). A dessorção térmica das metoxipirazinas da fibra ocorreu no injetor do GC a  $250^\circ\text{C}$ , com tempo de *split* de 0,5 minuto. As metoxipirazinas foram separadas em coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30,0 m x 0,25 mm d.i com espessura de filme de  $0,25 \mu\text{m}$ , Agilent Technologies). O programa de temperatura da coluna iniciou em  $60^\circ\text{C}$  e, após 5 minutos, aumentou para  $220^\circ\text{C}$  a uma taxa de  $3^\circ\text{C.min}^{-1}$ , permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hélio (He) com uma vazão de  $4,1 \text{ mL.min}^{-1}$ . As temperaturas da interface GC/MS e da fonte de íons foram mantidas a  $250^\circ\text{C}$ . A ionização dos compostos foi realizada no modo de ionização por elétrons (EI) a  $+70 \text{ eV}$ . O analisador de massas quadropolos foi configurado para monitorar as massas de íons específicos para cada MP (GC/MS-SIM), sendo um íon quantitativo e o outro qualitativo: IPMP: 137 e 152, IBMP: 124 e 151 e IBMP - [ $^2\text{H}_3$ ]-IBMP: 127 e 151. O detector foi mantido em temperatura de  $280^\circ\text{C}$ . Nos experimentos foram consideradas as áreas geradas pela integração do íon quantitativo de cada metoxipirazina. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

## **2.6. Determinação de sólidos solúveis totais e de pH dos mostos**

A determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix) foi realizada por refratometria e a determinação do pH foi feita em um medidor de pH (peagâmetro). Ambos os equipamentos estavam calibrados para as análises e as leituras dos resultados foram feitas diretamente nos mostos, em temperatura ambiente.

## **2.7. Análise dos dados**

Os resultados obtidos neste trabalho foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes de comparação de médias de Tukey e de correlação de Pearson, sendo interpretados através do software STATISTICA® versão 8.0.

# **3. Resultados e Discussão**

## **3.1. Validação da metodologia de extração de metoxipirazinas nos mostos**

Durante o desenvolvimento deste trabalho, um método para a extração e análise de metoxipirazinas em mostos foi adaptado e validado para as condições do laboratório em que o projeto foi desenvolvido. Os resultados detalhados desta validação encontram-se a seguir. A extração e análise das metoxipirazinas em vinhos foram realizadas em outro laboratório e já estavam validadas.

*Curva de Calibração e Linearidade* – uma curva padrão foi preparada para cada metoxipirazina fortificando-se os mostos da cultivar *Cabernet sauvignon*. Para a MMP a faixa de concentração estudada foi de 5 a 30 ng.L<sup>-1</sup>, com 5 pontos na curva (n=3). Para a EMP, IPMP e SBMP a faixa de concentração estudada foi de 2,5 a 30 ng.L<sup>-1</sup>, com 6 pontos na curva (n=3). Já para a IBMP a faixa de concentração estudada foi de 2,5 a 50 ng.L<sup>-1</sup>, com 7 pontos na curva (n=3). De acordo com as equações lineares e com os

coeficientes de determinação ( $R^2$ ) apresentados na tabela 4.1, pode-se comprovar a linearidade do método analítico. Todas as metoxipirazinas apresentaram um coeficiente de correlação acima de 0,99, com exceção da MMP, que obteve um  $R^2$  de 0,98.

*Limites de detecção e quantificação* – os limites obtidos para a detecção (LOD) e a quantificação (LOQ) das metoxipirazinas foram adequados com os limites encontrados na literatura e estão apresentados na Tabela 4.1. Para a EMP, IPMP, SBMP e IBMP os limites de detecção e quantificação foram 1,0 e 2,5  $\text{ng.L}^{-1}$ , respectivamente. Para a MMP esses limites foram maiores, ficando o limite de detecção com 2,5  $\text{ng.L}^{-1}$  e o limite de quantificação com 5,0  $\text{ng.L}^{-1}$ . Embora esses valores estejam mais elevados, os resultados foram considerados satisfatórios, pois a MMP é um composto difícil de ser analisado e raramente está presente entre os analitos estudados na literatura.

Tabela 4.1. Parâmetros da validação para metoxipirazinas em mosto de *Cabernet sauvignon*. Valores referentes à linearidade e aos limites de detecção e quantificação do método analítico.

Composto	Equação linear	Faixa linear*	$R^2$	LOD*	LOQ*
MMP	$y = 0,0035x + 0,0012$	5,0 - 30	0,9897	2,5	5,0
EMP	$y = 0,0115x - 0,0047$	2,5 - 30	0,9915	1,0	2,5
IPMP	$y = 0,038x - 0,0355$	2,5 - 30	0,9923	1,0	2,5
SBMP	$y = 0,0623x - 0,1823$	2,5 - 30	0,9919	1,0	2,5
IBMP	$y = 0,0672x + 0,05$	2,5 - 50	0,994	1,0	2,5

\* concentração:  $\text{ng.L}^{-1}$

*Precisão* – para determinar a precisão do método foram realizados ensaios de repetitividade (intra-dia,  $n=6$ ) e precisão intermediária (inter-dia,  $n=15$ ), e os resultados foram estabelecidos de acordo com os desvios padrão relativos (RSD) para cada ensaio (Tabela 4.2). Os valores encontrados para a repetitividade e para a precisão intermediária ficaram todos abaixo de 10%, valor considerado ótimo para esses ensaios (Ribani *et al.*, 2004; ANVISA, 2003). Embora a SBMP tenha apresentado um valor acima desse limite (11,31%), esse resultado ainda é considerado aceitável devido a baixa faixa de concentração estudada e, portanto, não prejudica o método analítico.

*Exatidão* – a exatidão do método foi obtida de acordo com os ensaios de

recuperação realizados em três diferentes concentrações de metoxipirazinas (10, 20 e 30 ng.L<sup>-1</sup>) fortificadas nos mostos de *Cabernet sauvignon*. Os resultados, apresentados na Tabela 4.2, indicam que os valores das recuperações variaram entre 77,01 e 112,15% entre as cinco metoxipirazinas e entre os três níveis analisados. Estes resultados estão dentro dos limites aceitáveis para a faixa de concentração estudada (Ribani *et al.*, 2004), tornando o método adequado para a análise desses compostos.

Tabela 4.2. Parâmetros da validação para metoxipirazinas em mosto de *Cabernet sauvignon*. Valores obtidos para a precisão e a exatidão do método analítico.

MP	Repetitividade	Precisão Intermediária	Recuperação		
	RSD* (10 ng.L <sup>-1</sup> )	RSD (10 ng.L <sup>-1</sup> )	RSD (5 ng.L <sup>-1</sup> )	RSD (10 ng.L <sup>-1</sup> )	RSD (20 ng.L <sup>-1</sup> )
MMP	7,68	9,74	78,85	86,28	93,42
EMP	8,47	8,40	102,03	112,15	98,74
IPMP	4,95	9,41	77,01	103,36	98,83
SBMP	7,53	11,31	112,18	97,64	95,59
IBMP	5,77	9,02	85,59	89,44	98,36

\* RSD: desvio padrão relativo

### 3.2. Determinação de metoxipirazinas durante a maturação de uvas *Cabernet sauvignon*

Amostras de uvas *Cabernet sauvignon* foram colhidas em dois vinhedos distintos, Campos do Jordão e São Bento do Sapucaí, e analisadas com o intuito de avaliar a influência de duas técnicas de manejo, cobertura do vinhedo e dupla poda, respectivamente, sobre a evolução da concentração de metoxipirazinas durante o período de maturação das uvas dessa varietal.

Os resultados obtidos a partir das amostras coletadas em Campos do Jordão (safra 2010 e 2011) e em São Bento do Sapucaí (safra 2009, 2010 e 2011) estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Concentração de metoxipirazinas por HS-SPME-GC-MS durante a maturação de uvas *Cabernet sauvignon* submetidas a duas técnicas de manejo distintas.

Amostras	Metoxipirazinas (ng.L <sup>-1</sup> )					Sólidos <sup>c</sup>	pH
	MMP <sup>a</sup>	EMP <sup>b</sup>	IPMP <sup>b</sup>	SBMP <sup>b</sup>	IBMP <sup>b</sup>	Solúveis	
CJ CV* 20/01/2010	<LOQ	3,99	6,05	13,04	20,28	16,5	2,58
CJ CV 28/01/2010	<LOQ	3,53	4,61	9,11	17,07	18,00	2,67
CJ CV 05/02/2010	<LOQ	2,70	3,98	8,04	9,31	19,30	2,81
CJ CV 12/02/2010	<LOQ	<LOQ	3,68	5,35	6,70	20,10	2,93
CJ CV 18/02/2010	<LOQ	<LOQ	2,97	3,68	5,92	20,80	3,09
CJ CV 26/02/2010	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,12	4,04	21,10	3,28
CJ CV 03/03/2010	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,97	4,26	21,90	3,45
CJ CV 07/03/2010	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,94	3,84	22,80	3,59
CJ CV 18/01/2011	<LOQ	6,44	10,45	18,75	27,88	15,70	2,35
CJ CV 25/01/2011	<LOQ	5,98	8,58	16,03	20,13	16,90	2,42
CJ CV 01/02/2011	<LOQ	3,56	8,23	10,26	13,89	17,70	2,64
CJ CV 07/02/2011	<LOQ	3,73	5,04	7,22	12,13	18,30	2,85
CJ CV 19/02/2011	<LOQ	2,71	3,58	4,33	8,91	19,00	3,01
CJ CV 25/02/2011	<LOQ	<LOQ	2,91	3,91	6,95	20,30	3,15
CJ CV 28/02/2011	<LOQ	<LOQ	2,84	3,59	6,27	21,30	3,19
CJ CV 04/03/2011	<LOQ	<LOQ	2,95	3,26	5,27	22,20	3,51
SB DP** 26/12/2009	<LOQ	3,03	3,00	16,02	35,18	15,10	2,83
SB DP 04/01/2010	<LOQ	2,88	2,83	11,62	26,52	16,60	2,83
SB DP 11/01/2010	<LOQ	2,81	<LOQ	5,96	24,44	17,50	2,95
SB DP 18/01/2010	<LOQ	2,68	<LOQ	4,46	12,88	18,20	3,15
SB DP 25/01/2010	<LOQ	2,87	<LOQ	3,68	12,21	18,90	3,22
SB DP 01/02/2010	<LOQ	2,69	<LOQ	3,42	7,36	20,30	3,27
SB DP 08/02/2010	<LOQ	2,59	<LOQ	3,34	7,37	21,10	3,33
SB DP 27/12/2010	<LOQ	6,14	4,41	18,12	46,83	13,60	2,64
SB DP 03/01/2011	<LOQ	5,26	4,23	13,00	38,66	14,80	2,75
SB DP 15/01/2011	<LOQ	4,87	3,94	10,65	21,69	16,20	2,97
SB DP 22/01/2011	<LOQ	4,20	3,08	4,95	16,36	17,10	3,06
SB DP 25/01/2011	<LOQ	3,08	<LOQ	5,26	12,51	18,60	3,13
SB DP 01/02/2011	<LOQ	2,67	<LOQ	3,80	6,20	20,20	3,17
SB DP 11/02/2011	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,31	5,62	22,20	3,32

SB DP*** 03/06/2009	<LOQ	6,62	5,88	16,11	30,44	15,70	2,75
SB DP 10/06/2009	<LOQ	4,63	5,12	13,92	27,09	17,00	2,88
SB DP 17/06/2009	<LOQ	3,43	4,97	11,01	26,16	18,40	2,95
SB DP 24/06/2009	<LOQ	3,71	3,87	10,19	23,03	18,90	3,04
SB DP 01/07/2009	<LOQ	3,08	3,12	6,73	13,85	19,30	3,1
SB DP 08/07/2009	<LOQ	2,92	3,02	4,08	7,95	19,70	3,19
SB DP 15/07/2009	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,21	4,86	20,10	3,27
SB DP 22/07/2009	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,04	3,07	21,00	3,31
SB DP 29/07/2009	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,03	2,76	21,30	3,37
SB DP 05/08/2009	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,04	2,50	21,80	3,44
SB DP 12/08/2009	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,96	<LOQ	22,80	3,49

\*CJ CV: Campos do Jordão Cobertura do Vinhedo; \*\*SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda; \*\*\*SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda (safra de inverno); <sup>a</sup>:LOQ: 5 ng.L<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>: LOQ: 2,5 ng.L<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>: °Brix. Valor médio para análises em triplicata.

Ao analisar os resultados obtidos para as duas técnicas de manejo estudadas, pôde-se observar que a MMP foi detectada em todas as amostras, porém não pôde ser quantificada por estar abaixo do limite de quantificação. Todas as outras metoxipirazinas puderam ser quantificadas na maioria das amostras e abrangeram uma faixa bem ampla de concentração, que variou de valores abaixo do limite de quantificação a valores superiores a 35 ng.L<sup>-1</sup>. A EMP e a IPMP obtiveram as menores concentrações para as duas técnicas de manejo, compreendendo valores entre <LOQ e 6,62 ng.L<sup>-1</sup> (SB DP 03/06/2009) e <LOQ e 10,45 ng.L<sup>-1</sup> (CJ CV 18/01/2011), respectivamente. Embora a EMP e a IPMP estivessem presentes em quantidades mais baixas com relação as outras metoxipirazinas, houve diferença nos resultados desses dois compostos de acordo com a técnica aplicada no vinhedo. Para a técnica de cobertura do vinhedo, a IPMP apresentou-se em concentrações maiores que a EMP para todas as amostras, enquanto que, para a técnica de dupla poda, resultados contrários foram observados, ficando a EMP com as maiores concentrações para a maioria das amostras. Esses resultados sugerem que as técnicas de manejo estudadas influenciaram a presença dessas metoxipirazinas, sendo a técnica de cobertura do vinhedo mais vantajosa para a IPMP e a técnica de dupla poda mais conveniente para a EMP.

As metoxipirazinas encontradas em maiores quantidades foram a SBMP e a IBMP para todas as amostras e para os dois vinhedos, abrangendo faixas de concentração de 2,96 a 16,11 ng.L<sup>-1</sup> e de <LOQ a 46,83 ng.L<sup>-1</sup>, respectivamente. De acordo com Schmar *et al.* (2010), a IPMP, a SBMP e a IBMP são descritas como as principais responsáveis pelo potente aroma caracterizado como herbáceo ou vegetal, estando a IBMP sempre em maior quantidade, representando cerca de 80% do total.

Independente se as metoxipirazinas foram encontradas em menores ou maiores concentrações, todas elas seguiram a mesma tendência, reduzindo-se em quantidade de acordo com o decorrer da maturação (dias após o *véraison*). As Figuras 4.1 e 4.2 ilustram a concentração de todas as metoxipirazinas e da IBMP isolada, respectivamente, nas amostras em função do tempo de maturação. Nestas figuras pode ser visualizado facilmente o decréscimo das metoxipirazinas em todos os mostos das uvas estudadas. Este decréscimo está relacionado com o metabolismo da fruta. Segundo Roujou-de-Boubée *et al.* (2002), a síntese de IBMP ocorre desde a formação da baga até 2 a 3 semanas que antecedem o *véraison* e, do *véraison* até a maturação completa, o ciclo de IBMP inverte, e sua degradação passa a ser maior que sua síntese. Esta metoxipirazina está presente principalmente nas cascas (72%), sendo encontrada também nas sementes (23,8%) e na polpa (aproximadamente 4%).

Ao observar as Figuras 4.1 e 4.2, nota-se que houve diferença entre os dois tratamentos aplicados nos vinhedos. Na Figura 4.1, ao comparar as safras de 2010 e 2011 (verão) entre os dois tratamentos, pode-se observar que a cobertura do vinhedo originou frutas com menores concentrações de metoxipirazinas, em relação ao vinhedo que passou pela dupla poda, tornando a cobertura do vinhedo o tratamento mais eficiente na produção de uvas de verão com teores reduzidos de metoxipirazinas. Porém, é importante lembrar que as safras de 2010 e 2011 (verão), para o vinhedo que sofreu a dupla poda, são apenas safras experimentais, que foram colhidas excepcionalmente para este estudo, e que a safra realmente utilizada para a vinificação corresponde à safra de inverno, referente ao gráfico 2009 (inverno). Portanto, ao comparar este gráfico com os gráficos da cobertura do vinhedo, observa-se que o tratamento que se torna mais eficaz na produção de uvas com menores concentrações de metoxipirazinas deixa de ser o de cobertura do vinhedo e passa a ser o de dupla poda, com uvas colhidas no inverno.

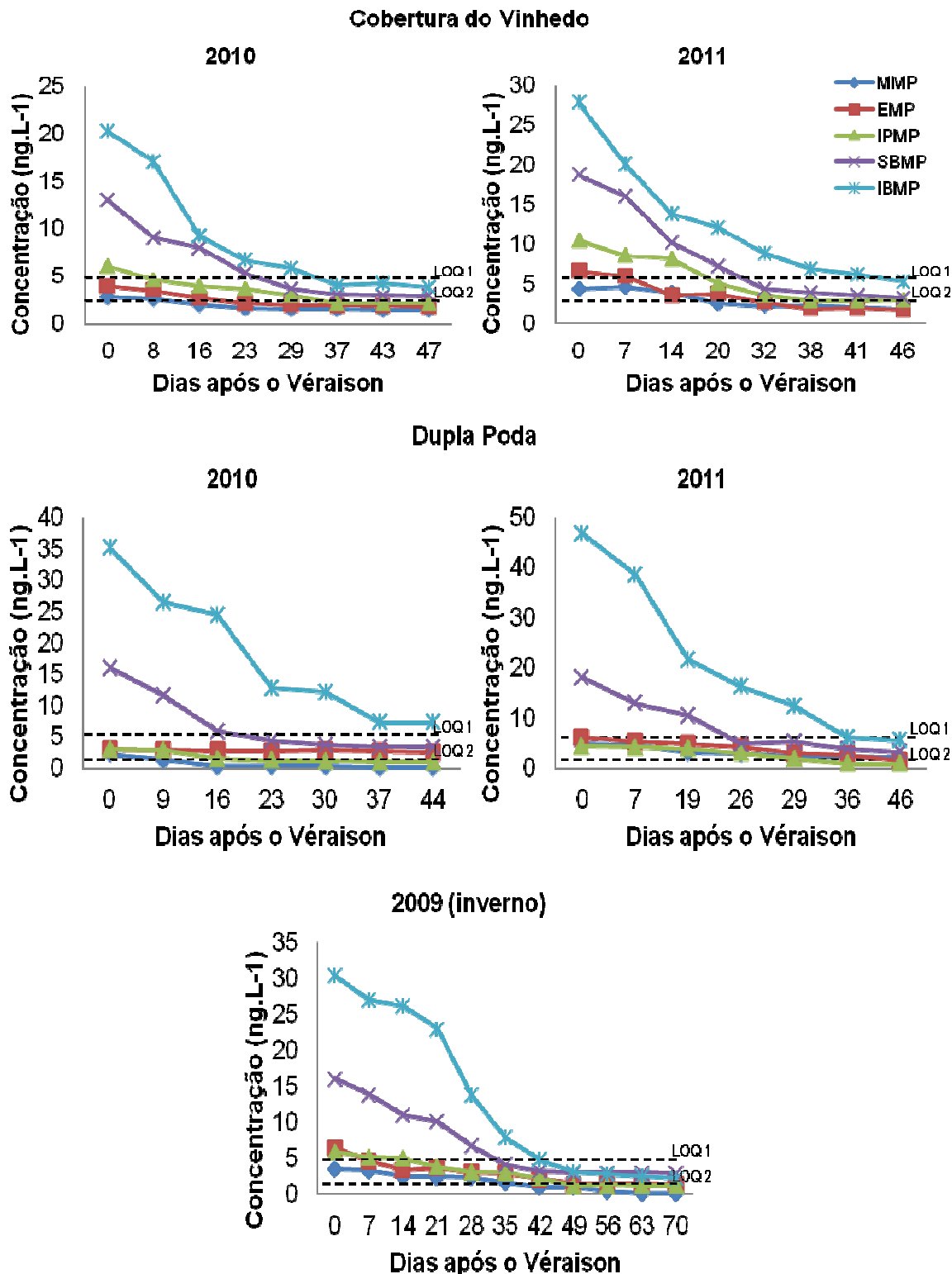


Figura 4.1. Concentração de metoxipirazinases em mostos de uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas em duas diferentes técnicas de manejo e colhidas em diferentes pontos de maturação (dias após o *véraison*). LOQ 1: 5 ng.L<sup>-1</sup> (MMP); LOQ 2: 2,5 ng.L<sup>-1</sup> (EMP, IPMP, SBMP e IBMP).



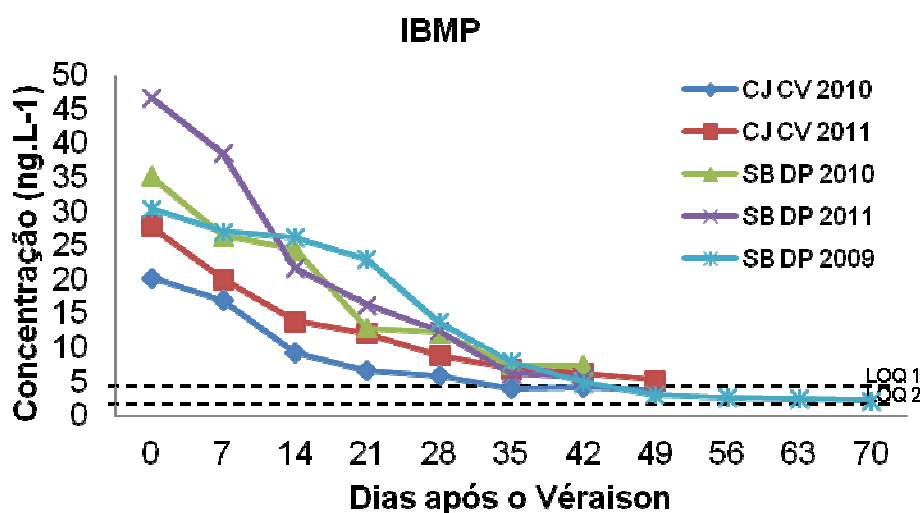


Figura 4.2. Concentração de IBMP em mostos de uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas em duas diferentes técnicas de manejo e colhidas em diferentes pontos de maturação (dias após o *véraison*), para as safras de 2009 (inverno) e de 2010 e 2011 (verão). CV CJ: Campos do Jordão Cobertura do Vinhedo; SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda; LOQ 1: 5 ng.L<sup>-1</sup> (MMP); LOQ 2: 2,5 ng.L<sup>-1</sup> (EMP, IPMP, SBMP e IBMP).

O ato de alterar a época da colheita do verão para o inverno permitiu um maior período de maturação das uvas, que levaram em torno de 70 dias para estarem prontas para a colheita, enquanto que nas safras de verão esse período de maturação ficou em torno de 45 dias. A extensão deste período, verificada neste caso, pode ser atribuída às temperaturas mais baixas ocorridas durante outono e início do inverno e, em princípio, podem representar um aspecto positivo para a qualidade da uva, permitindo uma lenta evolução dos componentes da maturação, ou até mesmo uma sobrematuração das bagas (Amorim *et al.*, 2005). Com esse comportamento, as uvas levam mais tempo para atingirem os níveis ideais de acidez e de açúcares e, com isso, as metoxipirazinas são favorecidas, possuindo também um maior tempo para sofrerem degradação.

Adicionalmente, com a análise da Figura 4.1 também é possível fazer uma comparação entre as safras para as duas técnicas de manejo. Independente se o tratamento aplicado foi a cobertura do vinhedo ou a dupla poda, os resultados mostraram que as safras de 2010 originaram uvas com menores concentrações de metoxipirazinas, se comparadas com as safras de 2011. A diferença existente entre as safras pode ser

explicada pelos fatores climáticos diferentes para cada ano. As diferenças existentes na disponibilidade de água no solo, as precipitações pluviométricas, a umidade relativa do ar, a temperatura e a exposição da uva ao sol, são alguns dos fatores que determinam o vigor do vinhedo e, indiretamente, a quantidade de metoxipirazinas nas uvas e nos vinhos. Em estudo realizado por Sala *et al.* (2005), foi verificado que os vinhos produzidos com uvas de vinhedos irrigados apresentaram maiores teores de metoxipirazinas e aroma herbáceo mais intenso quando comparados com vinhos oriundos de vinhedos não irrigados. Além disso, sabe-se também que os altos níveis de umidade do ar nos meses que antecedem o período de *véraison*, contribuem para a presença de maiores quantidades de IBMP no final da maturação das uvas (Noble *et al.*, 1995). Adicionalmente, em estudo realizado por Falcão *et al.* (2007) com vinhedos localizados em diferentes altitudes no estado de Santa Catarina, verificou-se que os vinhedos situados em altitudes mais elevadas apresentaram inverno e verão com temperaturas mais baixas quando comparados com os vinhedos situados em menores altitudes. Isso resultou na diferença sensorial dos vinhos elaborados com essas safras, pois as uvas cultivadas em maiores altitudes resultaram em vinhos com aroma vegetal mais pronunciado, enquanto que as uvas cultivadas em menores altitudes resultaram em vinhos com aroma de frutas vermelhas. O ano de 2011 foi caracterizado por muitas precipitações e, por isso, com menores incidências solares e menores temperaturas, o que favoreceu às grandes quantidades de metoxipirazinas nas uvas desta safra. De acordo com os dados pluviométricos obtidos pelo CIIAGRO (Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas do estado de São Paulo) para a região de Campos do Jordão, verificou-se que a média de chuva mensal obtida para a época do *véraison* em 2010 ficou em torno de 200 mm/m<sup>2</sup>, enquanto que para o ano de 2011 essa média foi de 500 mm/m<sup>2</sup>, contribuindo assim para a obtenção de uvas com maiores teores de metoxipirazinas em 2011.

### **3.3. Determinação de metoxipirazinas dos vinhos**

Amostras das uvas *Cabernet sauvignon* colhidas nos vinhedos que receberam as técnicas de manejo estudadas neste trabalho foram vinificadas e analisadas para a determinação de metoxipirazinas. Os resultados referentes à safra de 2011 para a cobertura do vinhedo e às safras de 2011 e de 2009 (inverno) para a dupla poda

encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Concentração de metoxipirazinas em vinhos elaborados com *Cabernet sauvignon* que passaram por diferentes técnicas de manejo.

Amostras	Metoxipirazinas (ng.L <sup>-1</sup> )	
	IPMP	IBMP
CJ CV* 2011	nd	2,76 <sup>b</sup> ± 0,05
SB DP** 2011	nd	3,86 <sup>a</sup> ± 0,05
SB DP*** 2009	nd	1,62 <sup>c</sup> ± 0,03

\*CJ CV: Campos do Jordão Cobertura do Vinhedo; \*\*SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda (safra de verão); \*\*\*SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda (safra de inverno). Valores médios para análises em triplicata.

O método analítico empregado para a determinação de metoxipirazinas nos vinhos permitiu apenas a análise da IPMP e da IBMP. Em nenhuma das amostras foi possível detectar a IPMP, resultado já esperado devido à baixa concentração desta metoxipirazina nos mostos analisados anteriormente. Já a IBMP pôde ser detectada e quantificada nas três amostras analisadas. Assim como nos mostos, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as técnicas aplicadas nos vinhedos e também entre as safras. Ao fazer uma comparação entre os resultados da cobertura do vinhedo e da dupla poda para a safra de 2011 (verão), os vinhos originados a partir do vinhedo coberto apresentaram menores concentrações de IBMP (2,76 ng.L<sup>-1</sup>), sendo a cobertura do vinhedo mais eficiente na redução das metoxipirazinas em uvas de verão. Porém, novamente lembrando que a safra de verão (2011) referente ao tratamento de dupla poda é somente uma safra experimental, os resultados referentes à safra de inverno (2009) são mais relevantes para o nosso trabalho. Portanto, comparando-se os resultados do vinhedo coberto (2011) com os resultados da dupla poda (2009), pode-se afirmar que o tratamento de dupla poda foi o mais eficaz em reduzir os teores de metoxipirazinas nas uvas, originando vinhos com baixas concentrações de IBMP (1,62 ng.L<sup>-1</sup>). Ao fazer uma comparação entre as safras de 2009 e 2011 para a dupla poda, pôde-se observar que também houve diferenças significativas entre os resultados, possivelmente devido aos diferentes fatores climáticos para cada ano naquela região.

O limiar de percepção das metoxipirazinas pelo olfato humano é extremamente baixo, abrangendo uma faixa de concentração entre 10 e 16 ng.L<sup>-1</sup> quando presentes em vinho tinto (Roujou de Boubée *et al.*, 2000). A grande maioria dos trabalhos científicos que analisam as metoxipirazinas em vinhos detectam que estes compostos geralmente estão presentes em concentrações acima do limiar de percepção do olfato humano. Segundo Culleré *et al.* (2009), esses compostos geralmente estão presentes na cultivar *Cabernet Sauvignon* em níveis acima de 15 ng.L<sup>-1</sup> e, portanto, podem ser facilmente detectáveis pelo olfato humano. Em estudos realizados com vinhos *Cabernet sauvignon*, *Cabernet franc*, *Sauvignon blanc* e *Merlot*, foram encontradas concentrações de metoxipirazinas que variaram entre 1,7 e 56 ng.L<sup>-1</sup> (Allen *et al.*, 1994; Kotseridis *et al.*, 1999; Sala *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2007).

Os resultados deste trabalho mostraram valores de IBMP inferiores aos valores relatados na literatura e, principalmente, inferiores aos limiares de percepção pelo olfato humano, sugerindo assim que os tratamentos de manejo estudados neste trabalho foram eficazes em reduzir as concentrações de metoxipirazinas nas uvas e, conseqüentemente, nos vinhos delas originados. Sendo assim, através destes resultados, pode-se sugerir que os vinhos analisados não possuem o aroma herbáceo característico das metoxipirazinas por apresentarem concentrações bastante reduzidas de IBMP. Entretanto, análises sensoriais devem ser realizadas para a confirmação desta hipótese.

#### **3.4. Determinação de sólidos solúveis totais e de pH dos mostos**

Os valores de sólidos solúveis totais e de pH das amostras de uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas em duas diferentes técnicas de manejo, cobertura do vinhedo e dupla poda, e colhidas durante todo o período de maturação estão apresentados na Tabela 3.3 e na Figura 3.3.

Os resultados da Figura 4.3 indicam que, tanto para os valores de sólidos solúveis totais quanto para os valores de pH, não houve grandes diferenças entre as técnicas de manejo aplicadas nos vinhedos e entre as safras estudadas. Todas as amostras seguiram a mesma tendência, aumentando os níveis de sólidos solúveis e os valores de pH com o decorrer da maturação das uvas. Embora a amostra referente à safra de 2009 (inverno) tenha demandado um maior tempo para a maturação (70 dias), percebe-se que seus valores iniciais e finais para sólidos solúveis e para pH ficaram muito próximos aos

valores das outras amostras, não sendo detectada a possível sobrematuração desta amostra com aumento dos sólidos solúveis e do pH conforme proposto por Amorim *et al.* (2005).

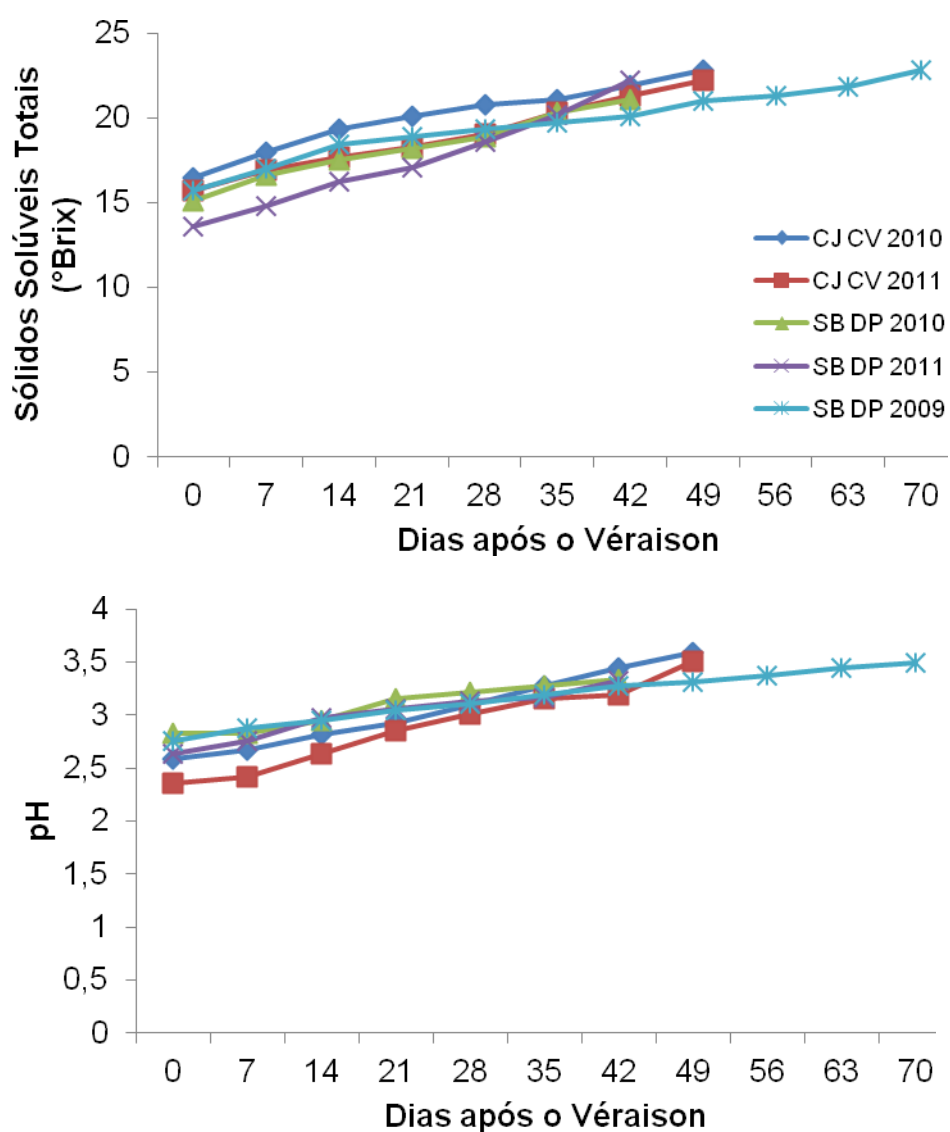


Figura 4.3. Teor de sólidos solúveis totais e pH em mostos de uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas em duas diferentes técnicas de manejo e colhidas em diferentes pontos de maturação (dias após o véraison), para as safras de 2009 (inverno) e de 2010 e 2011 (verão). CV CJ: Campos do Jordão Cobertura do Vinhedo; SB DP: São Bento do Sapucaí Dupla Poda.

Para todas as amostras, os sólidos solúveis totais variaram entre 13,6 (SB DP 2011) e 16,5 °Brix (CJ CV 2010) para o primeiro ponto da maturação, atingindo uma faixa de 21,1 (SB DP 2010) e 22,8 °Brix (CJ CV 2010 e SB DP 2009) na época da colheita. Ao comparar os resultados obtidos para os dois tratamentos, percebe-se que o vinhedo coberto originou uvas com valores ligeiramente mais altos de sólidos solúveis.

Com relação ao pH, as amostras iniciaram a maturação com valores entre 2,35 (CJ CV 2011) e 2,83 (SB DP 2010) e alcançaram valores entre 3,32 (SB DP 2011) e 3,59 (CJ CV 2010) no final da maturação. Apesar da pouca diferença existente nos resultados das amostras, pode-se perceber que o vinhedo coberto iniciou a maturação com uvas ligeiramente mais ácidas e terminou a maturação com uvas contendo uma menor acidez, se comparadas com as uvas obtidas com o tratamento de dupla poda. Ao fazer uma comparação entre as safras de 2010 e 2011 observa-se que, independente do tratamento aplicado no vinhedo, as amostras da safra de 2010 obtiveram valores ligeiramente mais altos para sólidos solúveis e para pH. Isso se deve ao fato de que o ano de 2011 apresentou um maior índice pluviométrico, o que levou a maior retenção de umidade pelas bagas e, conseqüentemente, diluição dos açúcares e dos ácidos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Regina *et al.* (2010) ao analisar uvas *Chardonnay* e *Pinot noir* de Minas Gerais nas safras de 2007 e 2008.

De acordo com Rizzon e Link (2006), as condições ideais da uva para produção de vinhos tintos de qualidade incluem baixos teores de acidez, entre 3,1 e 3,3, e valores de sólidos solúveis totais de, no mínimo, 14 °Brix. Os resultados deste trabalho mostraram valores ligeiramente superiores para pH, abrangendo a faixa entre 3,3 (SB DP 2010 e SB DP 2011) e 3,5 (CJ CV 2010 e CJ CV 2011) na época da colheita. Resultados semelhantes ou até superiores foram encontrados por Falcão *et al.* (2007) e Falcão *et al.* (2008), para uvas *Cabernet sauvignon* cultivadas no estado de Santa Catarina. De acordo com Amorim *et al.* (2005), o pH do mosto depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos e da concentração de cátions, principalmente o potássio. Dessa forma, os valores de pH podem variar de uma safra para outra ou de uma região para outra, não sendo motivo para a inviabilidade de determinada safra. Com relação ao teor de sólidos solúveis totais, todas as amostras ultrapassaram o valor de 21 °Brix, sugerindo estarem em condições ideais para a fermentação e a elaboração de um produto de qualidade.

Ao analisar a relação entre a concentração de IBMP e os teores de sólidos solúveis totais, observou-se uma correlação negativa para todas as amostras, com

coeficientes de correlação ( $R^2$ ) entre -0,92 (CJ CV 2011 e SB DP 2009) e -0,96 (SB DP 2010), mostrando que as variáveis foram inversamente proporcionais, ou seja, ocorreu uma diminuição na concentração de IBMP e um aumento no teor de sólidos solúveis conforme o decorrer da maturação.

Quando relacionou-se a concentração de IBMP com os valores de pH, novamente uma forte correlação negativa foi observada para todas as amostras, mostrando que as variáveis foram novamente inversamente proporcionais. Os valores obtidos para os coeficientes de correlação ficaram entre -0,87 (CJ CV 2010) e -0,98 (SB DP 2011).

No entanto, ao relacionar os valores obtidos para sólidos solúveis e para pH, observou-se uma forte correlação positiva entre essas amostras, com valor mínimo de 0,95 obtido para a amostra SB DP 2010 e valor máximo de 0,99 para SB DP 2009, mostrando que essas variáveis foram diretamente proporcionais, aumentando seus valores com o decorrer da maturação.

#### 4. Conclusão

Com este trabalho, concluiu-se que as duas técnicas de manejo foram capazes de diminuir as concentrações de metoxipirazinas nas uvas e nos vinhos elaborados.

#### 5. Referências bibliográficas

- ABRAHÃO, E.; ALVARENGA, A.A.; FRÁGUAS, J.C.; REGINA, M.A.; SILVA, V.J. Potencialidades do município de Lavras-MG, para produção extemporânea de uvas 'Niágara Rosada' para mesa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.4, p.865-868, 2002.
- ALLEN, M. S. ; LACEY, M. J.; BOYD, S. Determination of methoxypyrazines in Red Wine by Stable Isotope dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1734-1738, 1994

- ALLEN, M. S.; LACEY, M. J.; BOYD, S. Methoxypyrazines in red wines: Occurrence of 2-methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 769-772, 1995.
- AMORIM, D. A.; FÁVERO A. C.; REGINA, M. A.. Produção extemporânea da videira cv. Sirah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 327 – 331, 2005.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U. 02/06/2003.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P.V.D.; COELHO, P.F. Uso de poda seca e da poda verde para obtenção de duas safras por ciclo vegetativo em três cultivares de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.1, p.196-203, 2010.
- BRASIL – Ministério da Agricultura – Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988 – Publicada no Diário Oficial da União (D.O.U.) em 31/10/88.
- CATI – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – Núcleo de produção de mudas de São Bento de Sapucaí, 08/04/2009. Disponível em: [http://www.cati.sp.gov.br/Cati/\\_produtos/SementesMudas/unidadesDSMM/saobento.php](http://www.cati.sp.gov.br/Cati/_produtos/SementesMudas/unidadesDSMM/saobento.php). Acesso em: 12/04/2011.
- CHAPMAN, D. M.; THORNGATE, J. H.; MATTHEWS, M. A.; GUINARD, J. X.; EBELER, S. E. Yield Effects on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine concentration in Cabernet Sauvignon Using a Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5431-5435, 2004.
- CULLERÉ, C.; ESCUDERO, A.; CAMPO, E.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Multidimensional gas chromatography–mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4040-4045, 2009.
- FALCÃO, L. D.; REVEL, G.; PERELLO, M. C.; MOUTSIU, A.; ZANUS, M. C.; BORDIGNON-LUÍZ, M. T. A survey of seasonal temperatures and vineyard altitude influences on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, C<sub>13</sub>-norisoprenoids, and the sensory profile of Brazilian Cabernet Sauvignon wines. **Journal of Agricultural and Food**



- Chemistry**, v. 55, p. 3605-3612, 2007.
- FALCÃO, L. D.; CHAVES, E. S.; BURIN, V. M.; FALCÃO, A. P.; GRIS, E. F.; BONIN, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Maturity of Cabernet Sauvignon berries from grapevines grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 35, p. 271-282, 2008.
- FAVERO, A.C.; AMORIM, D.A.; MOTA, R.V.; SOARES, A.M.; REGINA, M.A. Viabilidade de produção da videira 'Syrah', em ciclo de outono-inverno, na região de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n.3, p.685-690, 2008.
- HARTMANN P. J.; McNAIR H. M.; ZOECKLEIN, B. W. Measurement of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazine by Headspace Solid-Phase Microextraction in Spiked Model Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 285-288, 2002.
- HASHIZUME, K.; SAMUTA, T.; Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 194-198, 1999.
- HERNANDES, J. L.; JÚNIOR, M. J. P.; BLAIN, G. C. Fenologia e produção da videira "Niágara Rosada" conduzida em manjedoura na forma de Y sob telado plástico durante as safras de inverno e verão. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. p. 499-504, 2011.
- KOCH, A.; DOYLE, C. L.; MATTHEWS, M. A.; WILLIAMS, L. E.; EBELER, S. E. 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2190-2198, 2010.
- KOTSERIDIS, Y.; BAUMES, R. L.; BERTRAND, A.; SKOUROUMOUNIS, J. K. Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using stable isotope dilution assay. **Journal of Chromatography A**, v. 841, p. 229-237, 1999.
- KOTSERIDIS, Y.; ANOCIBAR-BELOQUI, A.; BAYONOVE, CL.; BAUMES, R. L.; BERTRAND, A. Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 33, p. 19-23, 1999b.
- KOTSERIDIS, Y. S.; SPINK, M.; BRINDLE, A. J.; BLAKE, A. J.; SEARS, M.; CHEN, X.; SOLEAS, G.; INGLIS, D.; PICKERING, G. J. Quantitative analysis of 3-alkyl-2-

- methoxypyrazines in juice and wine using stable isotope labeled internal standard assay. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 294 – 301, 2008.
- LACEY, M. J.; ALLEN, M. S.; HARRIS, R. L. N.; BROWN, W. V. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc and wines. **American Journal of Enology and Viticultural**, v. 42, p. 109-112, 1991.
- MELLO, L. M. R. de. **Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial: Panorama 2007**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2007. Disponível em:[http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2007\\_vitivinicola\\_mundial.pdf](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2007_vitivinicola_mundial.pdf). Acesso em 12/04/2011.
- MELLO, L. M. R. de. **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2010**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2011. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos>. Acesso em 12/04/2011.
- MOTA, R.V.; REGINA, M.A.; AMORIN, D.A.; FÁVERO, A.C. Fatores que afetam a maturação e a qualidade da uva para vinificação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.234, p.56- 64, 2006.
- NOBLE, A. C.; ELLIOTFISK, D. L.; ALLEN, M. S. Vegetative Flavor and Methoxypyrazines in Cabernet sauvignon. **Fruit Flavors**, v. 596, p. 226-234, 1995.
- REGINA, M. A.; FRÁGUAS, J. C.; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, C. R.; AMORIM D. A.; MOTA, R. V.; FÁVERO, A. C. Implantação e manejo do vinhedo para produção de vinhos de qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.234, p. 16-31, set/out. 2006.
- REGINA, M. A.; CARMO, E. L.; FONSECA, A. R.; PURGATTO, E.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M.; RIBEIRO, A. P.; MOTA, R. V. Influência da altitude na qualidade das uvas “Chardonnay” e “Pinot Noir” em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 143-150, 2010.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004
- RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 689-692, 2006.
- ROUJOU-DE-BOUBÉE, D.; LEEUWEN, C. VAN.; DUBORDIEU, D. Organoleptic impact of

- 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on Red Bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions in grapes during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4830-4834, 2000.
- ROUJOU-DE-BOUBÉE, D.; CUMSILLE, A. M.; PONS, D.; DUBORDIEU, D. Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet sauvignon bunches and its extractability during vinification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 1-5, 2002.
- RYONA, I.; PAN, B. S.; INTRIGLIOLO, D. S.; LAKSO, A. N.; SACKS, G. L. Effects of cluster light exposure on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Franc). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10838-10846, 2008.
- SALA, C.; MESTRES, M.; MARTÍ, M. P.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 93-99, 2000.
- SALA, C.; MESTRES, M.; MARTI, M. P.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Hadspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 1-6, 2002.
- SCHMARR, H. G.; GANB, S.; KOSCHINSKI, S.; FISCHER, U.; RIEHLE, C.; KINNART, J.; POTOURIDIS, T.; KUTYREV, M. Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography–mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry and on-line liquid chromatography-multidimensional gas chromatography–mass spectrometry as potential loopholes. **Journal or Chromatography A**, v. 1217, p. 6769-6777, 2010.
- SOUZA, P. V. D.; FOCESATO, M. L. Emprego da poda verde para obtenção de duas safras por ciclo vegetativo em 'Niágara Branca'. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.611-616, 2007.
- SOUZA, S. O. A internacionalização como estratégia para o incremento da competitividade da cadeia vinícola gaúcha. **Internext – Revista Eletrônica de Negócios Internacionais**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2009. Disponível em:

<http://internext.espm.br/index.php/internext/article/viewFile/59/71>. Acesso em: 14/04/2011.

UVIBRA – União Brasileira de Viticultura. **Produção de uvas, elaboração de vinhos e derivados: Panorama 1998-2010**, Bento Gonçalves, 2010. Disponível em: [http://www.uvibra.com.br/pdf/safra\\_uva1998-2010.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2010.pdf). Acesso em 12/04/2011.

## CONCLUSÕES GERAIS

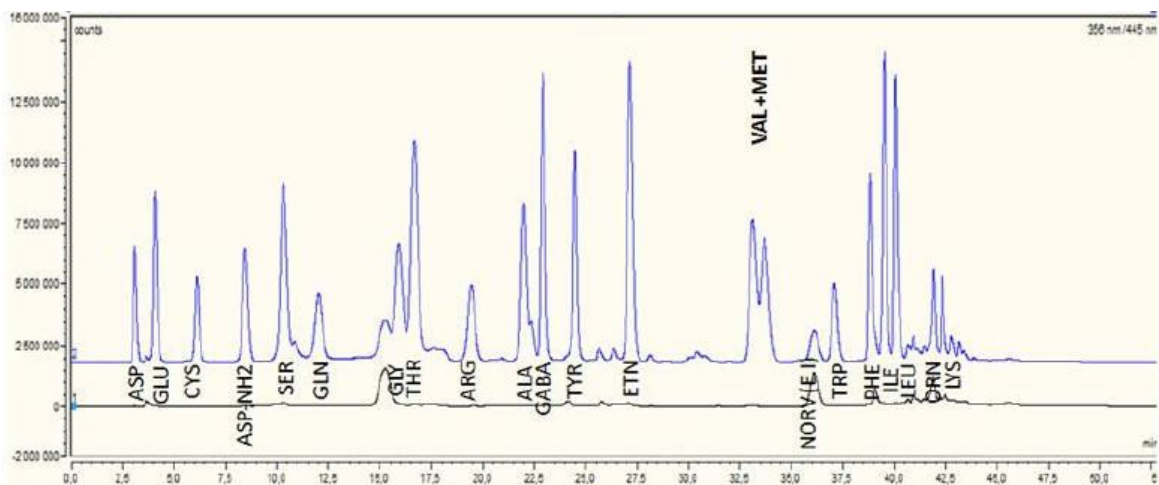
A técnica de pulverização de amônia no solo mostrou eficácia na vinificação das cultivares *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* da região de Bordeaux (França), mantendo as qualidades enológicas dos vinhos. Em relação aos compostos de aroma, a adição de amônia influenciou na composição e quantificação dos álcoois superiores e dos ésteres.

As práticas de cobertura do vinhedo e dupla poda mostraram-se bastante atrativas em relação à diminuição do teor de metoxipirazinas nas uvas *Cabernet sauvignon*, cultivadas no estado de São Paulo e, conseqüentemente nos vinhos produzidos.



## ANEXOS

**Anexo 1.** Perfil cromatográfico para a análise de aminoácidos em mostos das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC).



ASP: ácido aspártico; GLU: ácido glutâmico; CYS: cisteína; ASP-NH<sub>2</sub>: asparagina; SER: serina; GLN: glutamina; GLY: glicina; THR: treonina; ARG: arginina; ALA: alanina; GABA: ácido gama aminobutírico; TYR: tirosina; ETN: etanolamina; VAL: valina; MET: metionina; NORV: norvalina (padrão interno); TRP: triptofano; PHE: fenilalanina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; ORN: ornitina; LYS: lisina.

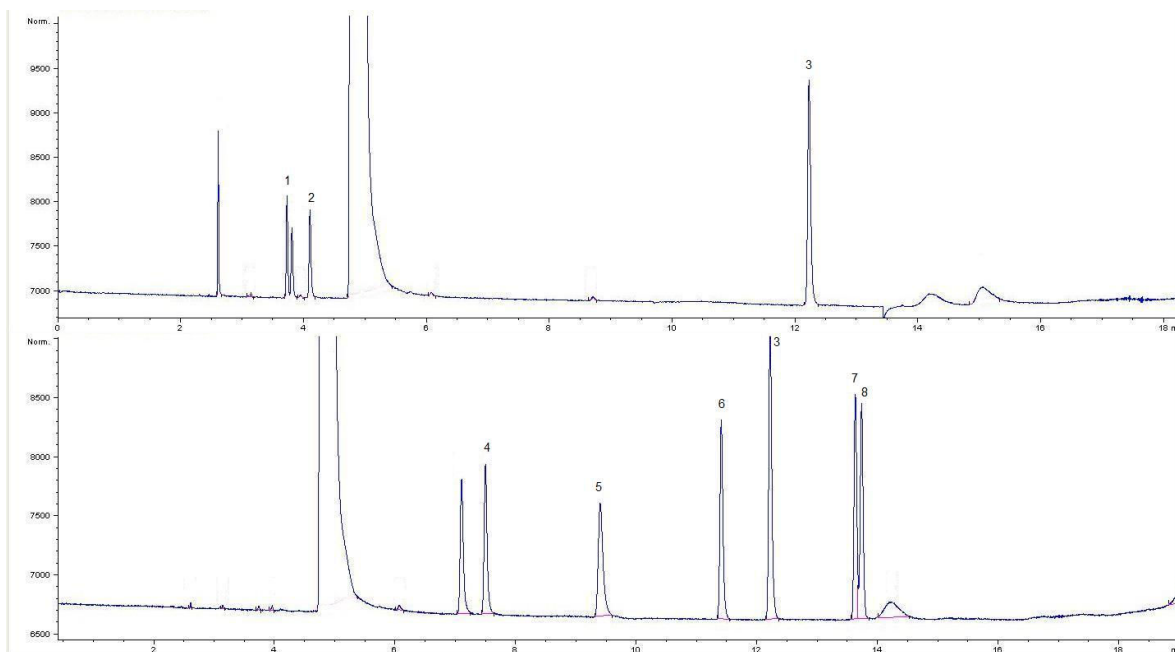
**Anexo 2.** Parâmetros da validação do método para a análise de aminoácidos em mostos das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC).

Composto	LD <sup>1</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	LQ <sup>2</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Repetibilidade (CV <sup>3</sup> ) (n=10)
ASP	0,44	1,45	4,5
GLU	0,05	0,16	3,4
ASP-NH <sub>2</sub>	0,05	0,16	5,6
SER	1,30	4,32	8,8
GLN	0,05	0,17	2,4
GLY	0,06	1,19	8,1
THR	1,08	3,60	8,9
ARG	0,21	0,69	6,7
ALA	1,14	3,81	5,9
TYR	0,14	0,41	4,4
GABA	0,42	1,41	7,4
ETN	0,01	0,05	5,1
VAL	0,05	0,15	2,6
TRP	0,12	0,40	6,7
PHE	0,36	1,22	8
ILE	0,03	0,09	4,7
LEU	0,04	0,14	5,4
ORN	1,86	6,19	17,5
LYS	0,58	1,28	18,8

<sup>1</sup>: Limite de Detecção, <sup>2</sup>: Limite de Quantificação, <sup>3</sup>: Coeficiente de Variação; ASP: ácido aspártico; GLU: ácido glutâmico; ASP-NH<sub>2</sub>: asparagina; SER: serina; GLN: glutamina; GLY: glicina; THR: treonina; ARG: arginina; ALA: alanina; TYR: tirosina; GABA: ácido gama aminobutírico; ETN: etanolamina; VAL: valina; TRP: triptofano; PHE: fenilalanina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; ORN: ornitina; LYS: lisina.

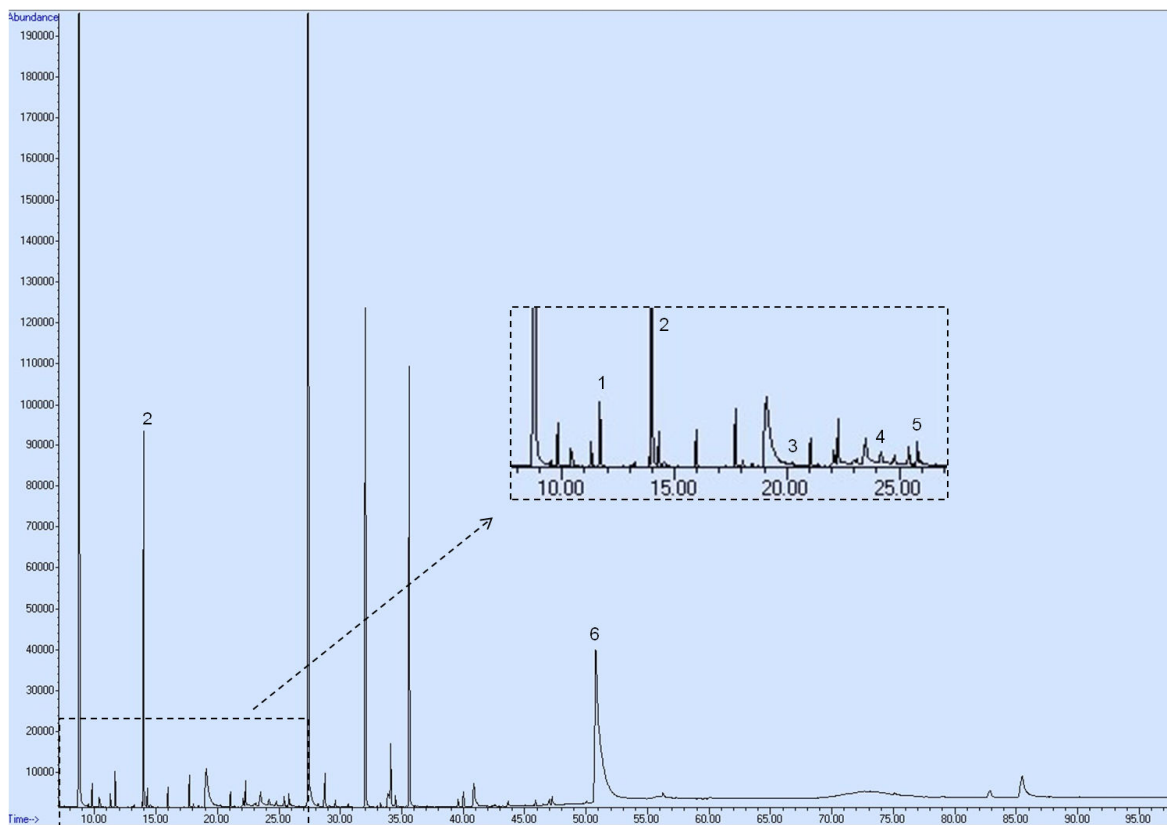


**Anexo 3.** Perfil cromatográfico para as análises de metanol, álcoois superiores e acetato de etila em vinhos das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* por Cromatografia Gasosa.



1: acetato de etila; 2: metanol; 3: 4-metilpentan-2-ol (padrão interno); 4: 1-propanol; 5: 2-metilpropanol; 6: 1-butanol; 7: 2-metilbutanol; 8: 3-metilbutanol.

**Anexo 4.** Perfil cromatográfico para as análises de ésteres polares em vinhos das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* por Cromatografia Gasosa.



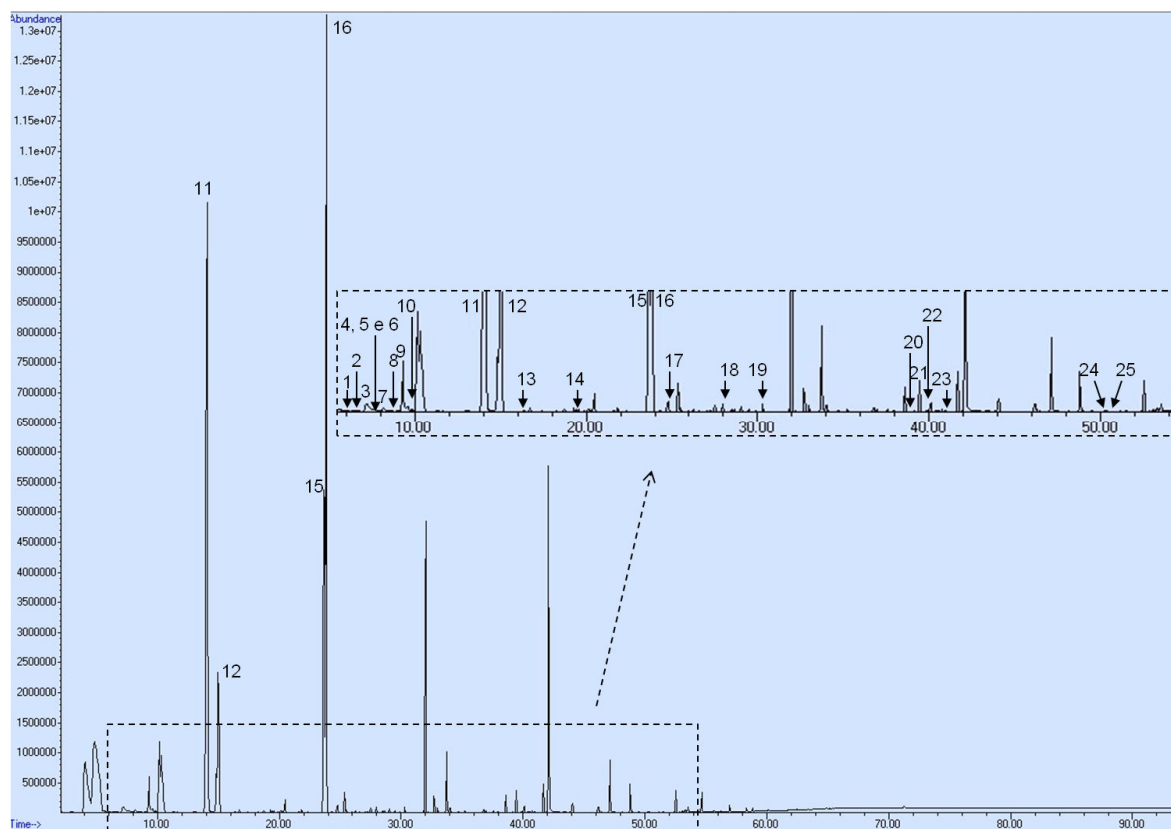
1: octan-2-one (padrão interno); 2: lactato de etila; 3: 3-hidroxiacetato de etila; 4: 2-hidroxi-hexanoato de etila; 5: succinato de dietila; 6: succinato de monoetila.

**Anexo 5.** Parâmetros da validação do método para a análise de ésteres polares em vinhos das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* por Cromatografia Gasosa.

Composto	Faixa linear ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	$R^2$	CV <sup>1</sup> (%) (n=10)	Recuperação (%)
LE	50 - 2000	0,99	6,3	92
3OHC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	0,1 - 200	0,99	8,6	86
2OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	0,1 - 200	0,99	7,6	95
SDE	0,1 - 50	0,99	4,6	92
SME	100 - 50000	0,99	20,9	75

<sup>1</sup>: Coeficiente de Variação; LE: lactato de etila; 3OHC<sub>4</sub>C<sub>2</sub>: 3-hidroxiacetato de etila; 2OHC<sub>6</sub>C<sub>2</sub>: 2-hidroxi-hexanoato de etila; SDE: succinato de dietila; SME: succinato de monoetila.

**Anexo 6.** Perfil cromatográfico para as análises de ésteres apolares em vinhos das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* por Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (HS-SPME-GC-MS)



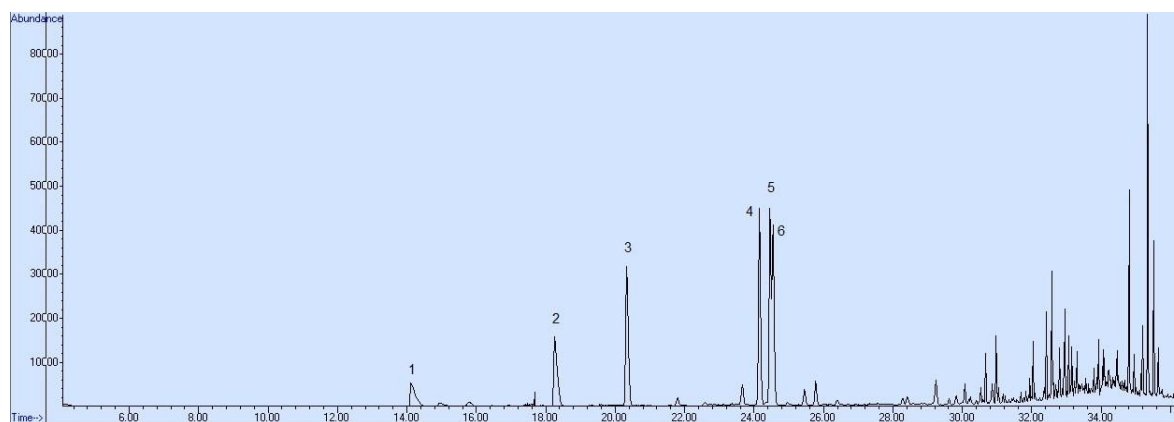
1: propanoato de etila; 2: isobutirato de etila; 3: acetato de propila; 4: acetato de isobutila; 5: butirato de etila deuterado (padrão interno); 6: butirato de etila; 7: 2-metilbutirato de etila; 8: isovalerato de etila; 9: acetato de isoamila; 10: valerato de etila; 11: hexanoato de etila deuterado (padrão interno); 12: hexanoato de etila; 13: acetato de hexila; 14: heptanoato de etila; 15: octanoato de etila deuterado (padrão interno); 16: octanoato de etila; 17: acetato de octila; 18: nonanoato de etila; 19: decanoato de etila; 20: fenilacetato de etila; 21: acetato de feniletila; 22: dodecanoato de etila; 23: dihidrocinamato de etila; 24: cinamato de etila deuterado (padrão interno); 25: cinamato de etila.

**Anexo 7.** Parâmetros da validação do método para a análise de ésteres apolares em vinhos das variedades *Merlot*, *Cabernet franc* e *Cabernet sauvignon* por Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (HS-SPME-GC-MS).

Composto	Faixa Linear ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LD <sup>1</sup> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LQ <sup>2</sup> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Repetibilidade (CV <sup>3</sup> ) (n=10)	Recuperação (%)
C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	1,22 - 609	0,99	1,2	4,1	3,9	101
iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	1,1 - 554	0,99	0,25	0,82	3	103
C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	1,08 - 541	0,99	0,45	1,5	4,3	101
C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub>	1,08 - 541	0,99	0,33	1,1	2,5	95
C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	8,14 - 4070	0,99	0,035	0,115	3	102
2mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	0,61 - 307	0,99	0,017	0,058	6,3	102
iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	0,58 - 291	0,99	0,015	0,049	4,9	99
C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub>	5,37 - 2685	0,99	0,11	0,37	3,6	103
C <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	0,11 - 53,3	0,99	0,035	0,12	4,4	93
C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	5,58 - 2790	0,99	0,0025	0,0083	4,7	99
C <sub>2</sub> C <sub>6</sub>	0,55 - 276	0,99	0,012	0,038	3,2	97
C <sub>7</sub> C <sub>2</sub>	0,12 - 58,3	0,99	0,0009	0,0030	2,4	100
C <sub>8</sub> C <sub>2</sub>	5,6 - 2800	0,99	0,0009	0,0031	5	94
C <sub>2</sub> C <sub>8</sub>	0,12 - 58,7	0,99	0,0044	0,015	11,2	103
C <sub>9</sub> C <sub>2</sub>	0,12 - 59,8	0,99	0,0004	0,0013	3	105
C <sub>10</sub> C <sub>2</sub>	5,32 - 2660	0,99	0,0002	0,0006	6,4	113
C <sub>12</sub> C <sub>2</sub>	0,59 - 295	0,99	0,0050	0,017	4,1	98
PhC <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	5,27 - 527	0,99	0,0001	0,0004	8,6	111
C <sub>2</sub> PhC <sub>2</sub>	0,64 - 1322	0,99	0,0071	0,024	3,7	97
DhCinC <sub>2</sub>	0,48 - 297	0,99	0,0030	0,010	7,4	104
CinC <sub>2</sub>	0,64 - 319	0,99	0,014	0,045	2,1	102

<sup>1</sup>: Limite de Detecção, <sup>2</sup>: Limite de Quantificação, <sup>3</sup>: Coeficiente de Variação; C<sub>3</sub>C<sub>2</sub>: propanoato de etila; iC<sub>4</sub>C<sub>2</sub>: isobutirato de etila; C<sub>2</sub>C<sub>3</sub>: acetato de propila; C<sub>2</sub>iC<sub>4</sub>: acetato de isobutila; C<sub>4</sub>C<sub>2</sub>: butirato de etila; 2mC<sub>4</sub>C<sub>2</sub>: 2-metilbutirato de etila; iC<sub>5</sub>C<sub>2</sub>: isovalerato de etila; C<sub>2</sub>iC<sub>5</sub>: acetato de isoamila; C<sub>5</sub>C<sub>2</sub>: valerato de etila; C<sub>6</sub>C<sub>2</sub>: hexanoato de etila; C<sub>2</sub>C<sub>6</sub>: acetato de hexila; C<sub>7</sub>C<sub>2</sub>: heptanoato de etila; C<sub>8</sub>C<sub>2</sub>: octanoato de etila; C<sub>2</sub>C<sub>8</sub>: acetato de octila; C<sub>9</sub>C<sub>2</sub>: nonanoato de etila; C<sub>10</sub>C<sub>2</sub>: decanoato de etila; C<sub>12</sub>C<sub>2</sub>: dodecanoato de etila; PhC<sub>2</sub>C<sub>2</sub>: fenilacetato de etila; C<sub>2</sub>PhC<sub>2</sub>: acetato de feniletila; DhCinC<sub>2</sub>: dihidrocinamato de etila; CinC<sub>2</sub>: cinamato de etila.

**Anexo 8.** Perfil cromatográfico para as análises de metoxipirazinas em vinhos da varietal *Cabernet sauvignon* por Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (HS-SPME-GC-MS).



1: 2-metil-3-metoxipirazina (MMP); 2: 3-etil-2-metoxipirazina(EMP); 3: 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP); 4: 3-secbutil-2-metoxipirazina (SBMP); 5: 3-isobutil-2-metoxipirazina deuterada (padrão interno); 6: 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP).