

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

Cassandro Davi Emer

Avaliação do ácido kójico no processo de vinificação

**Passo Fundo
Maio de 2022**

Cassandro Davi Emer

Avaliação do ácido kójico no processo de vinificação

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Jorge Alberto Vieira Costa

Linha de pesquisa: Processos Biotecnológicos e não Convencionais na Produção de Alimentos e Ingredientes

Passo Fundo

Mai de 2022

CIP – Catalogação na Publicação

E53a Emer, Cassandro Davi
Avaliação do ácido kójico no processo de vinificação
[recurso eletrônico] / Cassandro Davi Emer. – 2022.
3.2 MB : il. color. ; PDF.

Orientadora: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2022.

1. Vinho – Conservação. 2. Vinho e vinificação.
3. Enzimas – Oxidação. 4. Fermentação. I. Costa, Jorge
Alberto Vieira, orientador. II. Título.

CDU: 663.2

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

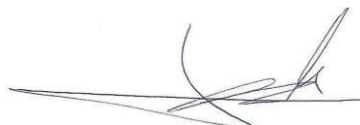
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

“Avaliação do ácido lático no processo de vinificação”

Elaborada por
Cassandro Davi Emer

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador e Presidente – UPF



Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier
Comissão examinadora – UPF



Prof. Dr. Vitor Manfroi
Membro externo - UFRGS

Passo Fundo, RS, Brasil
2022

*“La grandeur des actions
humaines se mesure à
l’inspiration qui les fait naître.”
(Louis Pasteur)*

RESUMO

A busca por alternativas para o dióxido de enxofre (SO₂) em suas mais diferentes utilidades dentro da enologia instiga a avaliação de novos compostos. O ácido kójico tem diversas aplicações dentro da indústria de alimentos e têm sido utilizado recentemente na indústria cosmética, principalmente por sua capacidade de inibição enzimática. Sua presença na dieta das culturas orientais prolonga-se por séculos, dada a sua existência em diversos alimentos fermentados como um subproduto metabólico do processo fermentativo. Este trabalho avalia o efeito do ácido kójico no processo de vinificação como um alternativo ao dióxido de enxofre pré-fermentativo, observando suas consequências nos parâmetros enológicos e sensoriais dos produtos, uma vez que o dióxido de enxofre possui um papel importante, não apenas como agente antioxidante e antimicrobiano durante o processo fermentativo, mas no perfil aromático do vinho final. O experimento deu-se através de um delineamento inteiramente causalizado, em triplicatas, com um tratamento de metabissulfito de potássio (100 mg L⁻¹), dois com concentrações distintas de ácido kójico (100 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹) e um controle. A cinética fermentativa demonstrou um impacto do SO₂ sobre a fase *lag*, não diferindo entre os demais tratamentos. Observou-se distinção entre os ensaios em relação à concentração de ácido málico, tanto após o final da fermentação alcoólica, como durante, sugerindo a metabolização do ácido málico ao início do processo fermentativo nos tratamentos isentos do dióxido de enxofre, sendo a hipótese amparada pelo incremento do teor de ácido láctico. Após um período de 6 meses em condições propícias a processos oxidativos, foram avaliados os principais atributos enológicos dos vinhos, observando diferenciação nos teores de alcoóis superiores e dióxido de enxofre total entre o tratamento com SO₂ e os demais. Ainda, foi constatado um maior valor para aldeídos totais em relação aos demais tratamentos, o que sugere que a presença do SO₂ nas etapas pré-fermentativa e fermentativa pode ter desempenhado um papel de preservação destes compostos em formas sulfonadas, liberando-os na etapa pós-fermentativa. A análise sensorial sugere a capacidade do ácido kójico na inibição da oxidação enzimática ao conservar a qualidade visual dos vinhos, bem como de possibilitar perfil sensoriais próximos ao tratamento com dióxido de enxofre, sem evidenciar notas de frutas em calda, como observado no tratamento controle. Ainda, o tratamento com 100 mg L⁻¹ de ácido kójico obteve destaque nos descritores Apreciação gustativa, Intensidade olfativa e Apreciação Olfativa. O ácido kójico demonstrou potencial como alternativo ao SO₂ pré-fermentativo, abrindo um leque de possibilidades de estudos futuros.

Palavras-chave: Oxidação enzimática. Conservação de vinhos. Antioxidante alternativo. Dióxido de enxofre.

ABSTRACT

The search for alternatives to sulfur dioxide (SO₂) in its most different uses within winemaking instigates the evaluation of new compounds. Kojic acid has several applications within the food industry and has recently been used in the cosmetic industry, mainly for its capacity of enzyme inhibition. Its presence in the diet of oriental cultures goes back centuries, given its existence in various fermented foods as a metabolic by-product of the fermentative process. This work evaluates the effect of kojic acid in the winemaking process as an alternative to pre-fermentative sulfur dioxide, observing its consequences in the oenological and sensorial parameters of the products, since sulfur dioxide has an important role, not only as an antioxidant and antimicrobial agent during the fermentative process, but in the aromatic profile of the final wine. The experiment was carried out using a fully randomized design, in triplicates, with one treatment of potassium metabisulfite (100 mg L⁻¹), two with different concentrations of kojic acid (100 mg L⁻¹ and 200 mg L⁻¹) and a control. The fermentation kinetics showed an impact of SO₂ on the *lag* phase, not differing among the other treatments. A distinction was observed between the trials with regard to the concentration of malic acid, both after the end of the alcoholic fermentation, and during, suggesting the metabolization of malic acid at the beginning of the fermentative process in the treatments free of sulfur dioxide, the hypothesis being supported by the increase in lactic acid content. After a period of 6 months in conditions favorable to oxidative processes, the main oenological attributes of the wines were evaluated, observing differentiation in the levels of higher alcohols and total sulfur dioxide between the treatment with SO₂ and the others. Also, a higher value for total aldehydes was found compared to the other treatments, suggesting that the presence of the SO₂ in the pre-fermentative and fermentative stages may have played a role in preserving these compounds in sulfonated forms, releasing them in the post-fermentative stage. Sensory analysis suggests the ability of kojic acid to inhibit enzymatic oxidation by preserving the visual quality of the wines, as well as providing sensory profiles close to the sulfur dioxide treatment, without showing notes of dried fruits, as observed in the control treatment. Furthermore, the treatment with 100 mg L⁻¹ of kojic acid achieved distinction in the descriptors Taste Appreciation, Olfactory Intensity and Olfactory Appreciation. Kojic acid showed potential as an alternative to pre-fermentative SO₂, opening up a range of possibilities for future studies.

Keywords: Enzymatic oxidation. Conservation of wines. Alternative antioxidant. Sulphur dioxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equilíbrio entre as formas dos sulfitos. Adaptado de Azevedo et al. (2007)	14
Figura 2 – Representação de alguns compostos voláteis de impacto no <i>bouquet</i> de vinhos	19
Figura 3 – Representação de alguns aldeídos de Strecker de interesse enológico	20
Figura 4 – Representação simplificada da formação de adutos com bissulfito	21
Figura 5 – Rota de Elrich. Adaptado de Vuralhan et al. (2003)	22
Figura 6 – Representação molecular do ácido kójico	25
Figura 7 – Processo de oxidação enzimático, adaptado de Li, Guo e Wang (2008)	31
Figura 8 – Fluxograma simplificado	33
Figura 9 – Representação da ficha do teste sensorial	35
Figura 10 – Cinética fermentativa	36
Figura 11 – Estimativa do ácido málico no terceiro dia e após o final da fermentação	37
Figura 12 – Comparação de médias por Tuckey com coeficiente de confiança de 95% em dois estágios do processo de vinificação	38
Figura 13 – Estimativa do ácido láctico no terceiro dia e após o final da fermentação	39
Figura 14 – Análise de correlação entre os teores de dióxido de enxofre total e de alcoóis superiores	41
Figura 15 – Elipses de confiança e pontos médios da Análise de Componentes Principais	43
Figura 16 – Distribuição das variáveis na Análise de Componentes Principais	44
Figura 17 – Histogramas das observações na análise sensorial, junto da distribuição normal com média e variância dos respectivos valores estimados para cada descritor	45
Figura 18 – Médias ajustadas (em rosa: produto significativamente abaixo da média, em azul significativamente acima da média)	46
Figura 19 – Gráfico de barras por linha em relação ao conjunto de variáveis	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análises de parâmetros enológicos realizadas	34
Tabela 2 – Estimativa do teor de dióxido de enxofre após a fermentação alcoólica	39
Tabela 3 – Resultados das análises de parâmetros enológicos 6 meses após a fermentação alcoólica	40
Tabela 4 – Análise de compostos carbonílicos voláteis 10 meses após a fermentação alcoólica, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Introdução	13
2.2	O uso do SO₂ na vinificação	14
2.2.1	Etapa pré-fermentativa	15
2.2.1.1	Alternativas ao SO ₂ na etapa pré-fermentativa	15
2.2.2	Etapa fermentativa	17
2.2.3	Etapa pós-fermentativa	21
2.2.3.1	Alternativas ao SO ₂ na etapa pós-fermentativa	23
2.3	Discussão	24
2.4	Ácido kójico (AK)	25
3	CAPÍTULO 3: ARTIGO EXPERIMENTAL	28
3.1	Título	28
3.2	Resumo	28
3.3	Abstract	28
3.4	Introdução	29
3.5	Material e métodos	31
3.5.1	Vinificação	31
3.5.1.1	Preparo do inóculo	32
3.5.2	Delineamento experimental	32
3.5.3	Controles do mosto e vinho	32
3.5.3.1	Controles de rotina	32
3.5.3.2	Determinação do dióxido de enxofre após a fermentação	32
3.5.3.3	Parâmetros enológicos	33
3.5.3.4	Ácidos orgânicos	33
3.5.4	Determinação de compostos carbonílicos voláteis	34
3.5.5	Avaliação sensorial	34
3.6	Resultados e discussão	36
3.6.1	Cinética fermentativa	36
3.6.2	Degradação do ácido málico	37
3.6.3	Análise de atributos enológicos	38
3.6.4	Avaliação sensorial	42
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49

4.1	Recomendações para trabalhos futuros	49
	ANEXOS	60
	ANEXO A – ARTIGO: BIOGENIC AMINES AND THE IMPORTANCE OF STARTER CULTURES FOR MALOLACTIC FERMENTATION	61
	ANEXO B – ARTIGO: PAIMAGEM: A TOOL FOR IMAGE AREA QUANTIFICATION IN MICROBIOLOGY	62
	ANEXO C – ARTIGO: OCCURRENCE AND IMPACT OF FUNGICIDES RESIDUES ON FERMENTATION DURING WINE PRODUCTION - A REVIEW	63
	ANEXO D – ARTIGO: QUALITY AND PRODUCTIVITY OF CHARDONNAY CONDUCTED IN BI-LATERAL CORDON SUBMITTED TO DIFFERENT WINTER PRUNNING PRACTICES	64

1 INTRODUÇÃO

Há uma tendência mundial que tem priorizado os aspectos de saudabilidade dos alimentos de maneira geral (NUNES et al., 2016). No vinho, a mesma tendência tem se refletido numa crescente demanda de produtos diferenciados pela ausência ou emprego do dióxido de enxofre em doses mínimas (WEBBER et al., 2014).

O dióxido de enxofre é um agente conservante amplamente empregado na vinificação devido a sua atividade antimicrobiana, antioxidante e antioxidásica (RAUHUT, 2009; CRAVERO et al., 2016; CARRETÉ et al., 2002; SUN et al., 2016; CASTRO-MARÍN et al., 2018), além de ter efeito sobre propriedades organolépticas, como estabilidade de cor e complexidade de aromas (MARCHANTE et al., 2019; CHEN et al., 2017).

Há uma presente demanda pela redução do dióxido de enxofre no vinho (BINATI et al., 2020) que está associada a riscos à saúde e percepção negativa do consumidor relacionada à presença do conservante, refletindo numa necessidade de se encontrar novos agentes capazes de reduzir seus teores no produto final (CRAVERO et al., 2016; MARCHANTE et al., 2019).

O ácido kójico tem sido estudado em suas diversas aplicabilidades na indústria alimentícia e, mais recentemente, cosmética, desde o início do século XX. O composto é um produto metabólico de várias espécies do gênero *Aspergillus* (BENTLEY, 2006). O fungo é utilizado no processo de produção de diversos alimentos orientais, especialmente no Japão (BENTLEY, 2006; CHAUDHARY; PATHAK; LAKHAWAT, 2014), como o saké, amazake, shouchu, miso e mirin (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001; BENTLEY, 2006), além de ser considerado um microrganismo GRAS (generally recognized as safe) (SCHUSTER et al., 2002; BEUCHAT, 1987). Além disto, o composto é utilizado na obtenção de inúmeros bioprodutos, como biosurfactantes (ISHAQ et al., 2015), enzimas proteolíticas (LOPES et al., 2011), ácido cítrico (SHOW et al., 2015) e antibacterianos (AL-FAKIH; ALMAQTRI, 2019).

As propriedades de reatividade do ácido kójico, aliadas ao seu histórico de consumo e presença em alimentos, instiga a avaliação de sua aplicabilidade junto ao processo de vinificação, na forma de um alternativo ao SO₂ na etapa pré-fermentativa. A eficácia do agente como alternativo ao SO₂, bem como seu impacto na qualidade sensorial do produto final são aspectos que esta dissertação visa a elucidar. Com base nas propriedades do agente e amparado no pouco em que se foi experimentado com o composto no processo da enologia, torna-se plausível a condução de ensaios a fim de avaliar as capacidades do agente como um alternativo ao dióxido de enxofre, o que corrobora com a tendência atual para a diminuição de sulfitos.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação o emprego do ácido kójico como um alternativo ao dióxido de enxofre pré-fermentativo no processo de vinificação. Em vista de alcançar o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- a) Verificar o efeito da adição do ácido kójico em substituição ao SO₂ na etapa pré-

fermentativa da vinificação sobre parâmetros relacionados à supressão de flora autóctone;

- b) Analisar o efeito do tratamento sobre os parâmetros enológicos usuais, mediante condições favoráveis à oxidação;
- c) Avaliar o efeito do tratamento na percepção sensorial de atributos usuais por um painel treinado;
- d) Caracterizar efeitos relacionados a ausência do dióxido de enxofre durante o processo de fermentação alcoólica.

O projeto de pesquisa enquadra-se na linha de pesquisa de “Processos Biotecnológicos e não Convencionais na Produção de Alimentos e Ingredientes”, dentro do projeto de pesquisa “Desenvolvimento de produtos e processos para a indústria de alimentos” do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

Este trabalho está estruturado em 4 capítulos, a seguir listados e sumarizados: No Capítulo 1, encontra-se a introdução geral, que situa o trabalho de pesquisa, apresenta objetivos e justificativas e a organização da dissertação; O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre o emprego dióxido do enxofre (SO₂) na vinificação, bem como traz os alternativos ao composto propostos na literatura, além de descrever o ácido kójico e o propôl como um alternativo ao SO₂; O Capítulo 3 apresenta o artigo experimental elaborado, que avalia o emprego do ácido kójico no processo de vinificação de branco; O Capítulo 4 aborda as considerações finais. Por fim, os anexos trazem as produções científicas produzidas durante o período do mestrado, não diretamente ligadas com o tema da dissertação.

2 CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO

Existe uma busca mundial que preconiza aspectos de saudabilidade nos alimentos (NUNES et al., 2016), no mundo vitivinícola refletida no emprego de manejos diferenciados na produção da matéria-prima, de forma a minimizar o impacto ambiental (CRAVERO, 2019) e, na etapa de elaboração dos vinhos, pela ausência ou emprego do dióxido de enxofre em doses mínimas (WEBBER et al., 2014). O dióxido de enxofre SO_2 é um agente conservante amplamente empregado na vinificação devido a sua atividade antimicrobiana, antioxidante e antioxidásica (RAUHUT, 2009; CRAVERO et al., 2016; CARRETÉ et al., 2002; SUN et al., 2016; CASTRO-MARÍN et al., 2018), além de ter efeito sobre propriedades organolépticas, como estabilidade de cor e complexidade de aromas (MARCHANTE et al., 2019; CHEN et al., 2017).

A demanda pela redução do dióxido de enxofre no vinho (BINATI et al., 2020) que está associada a riscos à saúde e percepção negativa do consumidor relacionada à presença do conservante, refletindo numa necessidade de se encontrar novos agentes capazes de reduzir seus teores no produto final (CRAVERO et al., 2016; MARCHANTE et al., 2019).

Embora não hajam estudos relacionando o dióxido de enxofre com carcinogenicidade ou efeitos mutagênicos, é sabido que ele exerce influência sobre a saúde humana (GARDE-CERDÁN et al., 2008), uma vez que sulfitos são considerados tóxicos e alergênicos (SUN et al., 2016). Portanto, o uso de sulfitos em alimentos vem sendo questionado, principalmente devido a sua alergenicidade, que pode causar asma, dermatite, urticária, bronco-constricção ou anafilaxia em pessoas sensíveis (VALLY; MISSO; MADAN, 2009). Atualmente, na Europa, existe a necessidade do uso da expressão "Contém sulfitos" nos rótulos dos produtos que excedam a concentração de 10 mg L^{-1} do conservante (COMUZZO; ZIRONI, 2013).

Não muitos anos atrás, a concepção geral era de que o SO_2 deveria ser adicionado ao mosto para controlar as reações de oxidação e restringir o crescimento de bactérias e leveduras autóctones (CARRETÉ et al., 2002), de forma mandatória. Mais recentemente, esse pensamento de inibição da flora autóctone vem sendo questionado, com a busca de estirpes de leveduras com capacidade de caracterização do produto através de um processo de co-inoculação, não apenas como expressão do "terroir microbiológico", mas na busca de uma melhoria na qualidade sensorial (CIANI; COMITINI, 2015). Esta abordagem também vem sendo considerada para obter-se uma diminuição do teor alcoólico dos vinhos (BINATI et al., 2020), que cresceu nas últimas décadas em função das mudanças climáticas e preferência dos consumidores por vinhos com caráter de elevada maturação fenólica (CANONICO et al., 2019).

Adicionalmente, na atualidade, observam-se aspectos relacionados ao surgimento de aromas indesejados durante o processo de envelhecimento de vinhos que podem ter relação com a presença de dióxido de enxofre durante a fermentação alcoólica (BUENO; CARRASCÓN;

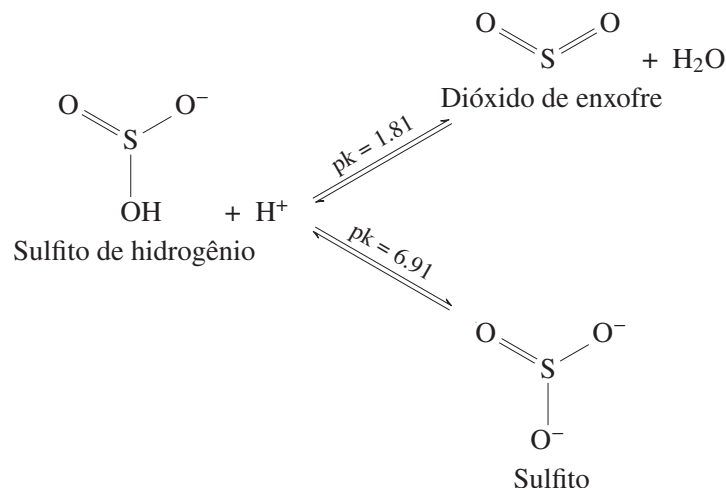
FERREIRA, 2016; FERREIRA et al., 2014), não pelo próprio aporte de aroma do agente quando usado em excesso ou redução do mesmo a ácido sulfídrico ou mercaptano, mas pela combinação com compostos de aromas desagradáveis que são preservados durante a fermentação pela associação ao SO₂ e, posteriormente, liberados durante o envelhecimento do vinho.

Nesta revisão, são abordados aspectos relacionados a características decorrentes da presença do SO₂ durante a vinificação, além da apresentação de trabalhos que buscam alternativas ao agente, tanto nas etapas pré como pós-fermentativa de vinhos. Além disto, na última seção, é apresentado um composto como um possível alternativo ao SO₂ na etapa pré-fermentativa de vinhos.

2.2 O USO DO SO₂ NA VINIFICAÇÃO

O emprego de sulfitos no processo de vinificação remonta a antiguidade, quando romanos e egípcios realizavam a queima de enxofre para higienizar recipientes nos quais armazenavam a bebida (BUSH; TAYLOR; BUSSE, 1986). Na indústria vitivinícola atual, o dióxido de enxofre é incorporado aos produtos, principalmente, na forma de metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅), de sódio (Na₂S₂O₅), e bissulfito de potássio (KHSO₃). Uma vez dissolvido em meio aquoso, a forma do agente dependerá principalmente do pH (DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2005), nas formas em equilíbrio ilustradas na Figura 1.

Figura 1 – Equilíbrio entre as formas dos sulfitos. Adaptado de Azevedo et al. (2007)



A Organização Mundial da Saúde (OMS) estipula a ingestão diária aceitável do anidrido sulfuroso em 0,7 mg kg⁻¹. A legislação brasileira traz um limite máximo para o teor de SO₂ em vinhos de 250 mg L⁻¹, embora haja uma consulta pública recente que propõe um novo limite de 150 mg L⁻¹ para a bebida (BRASIL, 2021). Porém, mesmo sendo adotado o novo limite proposto, o consumo de meia garrafa de vinho por um indivíduo de 80 kg ultrapassaria o teor de sulfitos ingeridos ao máximo consumo diário recomendado pela OMS.

A alta afinidade do dióxido de enxofre a compostos carbonílicos como acetaldído, ácidos

cetônicos como ácido pirúvico e 2-oxoglutárico, e derivados de açúcares como ácido glucônico, ácido glucurônico, ácido ceto-2-glucônico, ácido diceto-2,5-glucônico, ceto-5-frutose e xilosona (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a; BARBE et al., 2000; LEA; FORD; FOWLER, 2000) fazem com que uma parcela do SO₂ incorporado ao vinho ou mosto se combine imediatamente, formando o que é chamado "SO₂ combinado", enquanto a fração dissociada é chamada "SO₂ livre", composta pela forma molecular (SO₂) e HSO₃⁻ (COMUZZO; ZIRONI, 2013).

Devido às diversas propriedades do dióxido de enxofre, tanto antimicrobianas como antioxidantes, ele é incorporado ao mosto ou vinho em diversas situações, o que se consolida, muitas vezes, num teor elevado no produto final. As subseções que seguem abordarão diferentes facetas da presença do dióxido de enxofre nas etapas do processo de vinificação.

2.2.1 Etapa pré-fermentativa

A pré-fermentativa é a etapa em que mais ocorrem as oxidações por via enzimática, justamente pela presença de enzimas lipoxigenases e polifenoloxidasas (PFO). No processo, enzimas que promovem a oxidação dos ácidos linoléico e linolênico, produzem alcoóis e aldeídos C₆ saturados e insaturados (MORENO; PEINADO, 2012). Esse processo ocorre ainda nas uvas, e é intensificado pelos processos mecânicos que ocorrem em diferentes etapas desde a colheita até a fermentação alcoólica, através da ruptura e exposição do líquido do interior das bagas. As enzimas polifenoloxidasas são responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos a quinonas, e podem ser tanto de origem endógena (tirosinase) como exógena (por exemplo lacase, em função da presença de *Botrytis cinerea*).

A ausência do SO₂ ou outro agente antioxidante durante a etapa pré-fermentativa promoveria um aumento das reações de oxidação, uma vez que o SO₂ atua tanto como sequestrante do oxigênio, como possui uma alta afinidade com as quinonas resultantes da oxidação fenólica, evitando reações de degradação oxidativa (WATERHOUSE; NIKOLANTONAKI, 2015). Ainda, a propriedade do SO₂ de sequestrar peróxido de hidrogênio protege o vinho de oxidações não-enzimáticas catalisadas pela presença de metais como ferro e cobre, referidas como reação de Fenton.

Portanto, a etapa pre-fermentativa requer cuidados, seja através da minimização da exposição ao oxigênio pelo uso de atmosferas inertes, seja pelo emprego a agentes com capacidade de prevenir ou atenuar a ação da oxidação enzimática e não-enzimática.

2.2.1.1 Alternativas ao SO₂ na etapa pré-fermentativa

Diferentes produtos e aditivos foram propostos em alternativa ao dióxido de enxofre na etapa pré-fermentativa, alguns deles (por exemplo, ácido ascórbico e derivados de levedura) são atualmente utilizados na indústria enológica, enquanto outros têm sido testados apenas em escala experimental (COMUZZO; ZIRONI, 2013).

O ácido ascórbico é um dos compostos atualmente empregados na vinificação, especialmente na etapa pós esmagamento das uvas, sendo um poderoso sequestrador de oxigênio (DANILEWICZ; SECCOMBE; WHELAN, 2008). No entanto, a oxidação do ácido ascórbico, na presença de catalisadores metálicos, leva à produção de ácido desidroascórbico e peróxido de hidrogênio (COMUZZO; ZIRONI, 2013). Por esta razão, o ácido ascórbico é normalmente utilizado em combinação com sulfitos, e não como seu substituto, uma vez que o SO₂ é capaz de sequestrar o peróxido de hidrogênio.

A suposta capacidade antioxidante dos derivados da levedura está ligada à sua capacidade de liberação de polissacarídeos, macromoléculas antioxidantes e glutatona (POZO-BAYÓN; ANDÚJAR-ORTIZ; MORENO-ARRIBAS, 2009). A glutatona, um tri-peptídeo com atividade antioxidante, está envolvida em mecanismos de desintoxicação e proteção contra o stress oxidativo e xeno-bióticos (PASTORE et al., 2003), e já foi avaliada como alternativa para a prevenção da oxidação enzimática em vinhos e mostos. Quanto ao seu mecanismo de ação no vinho, a glutatona é capaz de reagir com *o*-quinonas, reduzindo-as de volta aos polifenóis precursores. Comuzzo e Zironi (2013) apresentam diversos aspectos relacionados ao uso da glutatona, demonstrando que, assim como para o ácido ascórbico, há situações em que o excesso do composto o faz passar de preservador a promotor da oxidação de polifenóis (SONNI et al., 2011b).

Sonni et al. (2011a) apresentaram como alternativa ao dióxido de enxofre na etapa pré-fermentativa o uso de lisozima e taninos enológicos. A lisozima é uma hidrolase glicosídica que catalisa a hidrólise de ligações β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e os resíduos de N-acetil-D-glucosamina no peptidoglicano, que é o principal componente da parede celular de bactérias Gram-positivas. Desta maneira, o uso da lisozima não afetaria o crescimento de leveduras, possuindo uma ação seletiva sobre as bactérias ácido lácticas. Em relação à propriedade antioxidante do SO₂, os autores utilizaram galotaninos como o agente substituinte. Os galotaninos são compostos do grupo dos taninos hidrolisáveis, formados quando o ácido gálico, um monômero de polifenol, esterifica e se liga com o grupo hidroxila de um carboidrato de poliálcool. O estudo, ao comparar a abordagem proposta com uma vinificação tradicional com SO₂, resultou em perfis aromáticos distintos na análise por cromatografia gasosa, sugerindo que a presença do SO₂ foi o fator mais influente na evolução de alcoóis e ésteres na maturação dos vinhos, compostos que, de maneira geral, são benéficos e desejáveis ao *bouquet* do vinho.

A proposta de Castro-Marín et al. (2018) foi a substituição do SO₂ pré-fermentativo pela quitosana. A quitosana é um polissacarídeo linear composto de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, já empregado na vinificação como agente clarificante, além de ser um protetor contra a contaminação por microrganismos. Segundo os autores, o emprego da quitosana pode ir além da clarificação, podendo ser usado no mosto como antioxidante e antimicrobiano, e na estabilização final pré-embalagem. O estudo demonstrou um impacto do composto sobre as leveduras, aumentando a fase *lag* da fermentação, além de impactar no conteúdo de ácidos orgânicos, diminuindo a acidez total.

Cravero et al. (2016) avaliaram a aplicabilidade de água eletrolisada (*electrolyzed water* – EW) em uvas por sua eficácia contra uma variedade de microrganismos, observando o impacto dos tratamentos sobre a fermentação dos vinhos. A água eletrolisada é produzida pela eletrólise de água contendo sais de cloro, produzindo uma solução de ácido hipocloroso. Os tratamentos com EW realizados em dois níveis de concentração (40 mg L^{-1} e 400 mg L^{-1} de cloro livre), em combinação com a inoculação de *S. cerevisiae* conduziram a um aumento mais rápido da população de *Saccharomyces* em relação às leveduras apiculadas, em comparação ao tratamento controle. A caracterização química sugere que o tratamento com EW, independentemente do uso do inóculo de leveduras, está associado a uma redução do ácido acético, demonstrando um caráter de inibição seletiva.

O estudo de Garde-Cerdán et al. (2008) observou o impacto do emprego de Campo elétrico pulsado (*Pulsed electric field* – PEF) no mosto de uvas Parellada, posteriormente inoculado com leveduras *S. cerevisiae*, realizando a fermentação sem incorporação de SO_2 . O vinho foi então submetido a duas condições de armazenamento (temperatura ambiente média de 23°C e controlada de 5°C) durante 6 meses. A diferença da temperatura resultou em algumas características aromáticas distintas, observadas por cromatografia gasosa, porém, não foi traçado um comparativo entre os tratamentos com PEF em relação a um tratamento convencional de SO_2 , sendo o escopo do trabalho a possibilidade de conservação em condições controladas de armazenamento.

Outra abordagem foi avaliada por Marchante et al. (2019), que utilizaram extratos de subprodutos (sementes e engaços) da vinificação (extraídos com água pressurizada), aliados ou não com prata coloidal, como alternativos ao SO_2 pré-fermentativo, comparando-os a um tratamento controle de SO_2 . Após a fermentação, todos os tratamentos tiveram um ajuste de SO_2 livre para 25 mg L^{-1} . Os resultados observados pelos autores apresentam um grande potencial dos compostos alternativos, demonstrando um efeito antimicrobiano similar ao tratamento controle com SO_2 . Em relação ao impacto sensorial, foram observadas algumas diferenças em relação ao aporte de amargor nos tratamentos alternativos, possivelmente devido ao conteúdo de flavan-3-ols das sementes utilizadas para obtenção do extrato.

2.2.2 Etapa fermentativa

Nos últimos anos, houve um aumento no interesse da utilização de fermentações com estirpes não-*Saccharomyces*, buscando otimizar o perfil alcoólico e/ou sensorial do vinho (CIANI; COMITINI, 2015). Com uma possível diminuição, ausência ou substituição do SO_2 na etapa pré-fermentativa, há um aumento considerável de possibilidade de estirpes de leveduras para o início da fermentação, uma vez que, atualmente, um dos critérios para a seleção de leveduras autóctones para a vinificação, é a tolerância ao dióxido de enxofre, além da observação das características enológicas, como baixa de acidez volátil.

É importante sempre ter em mente que, antes do início do processo fermentativo, a

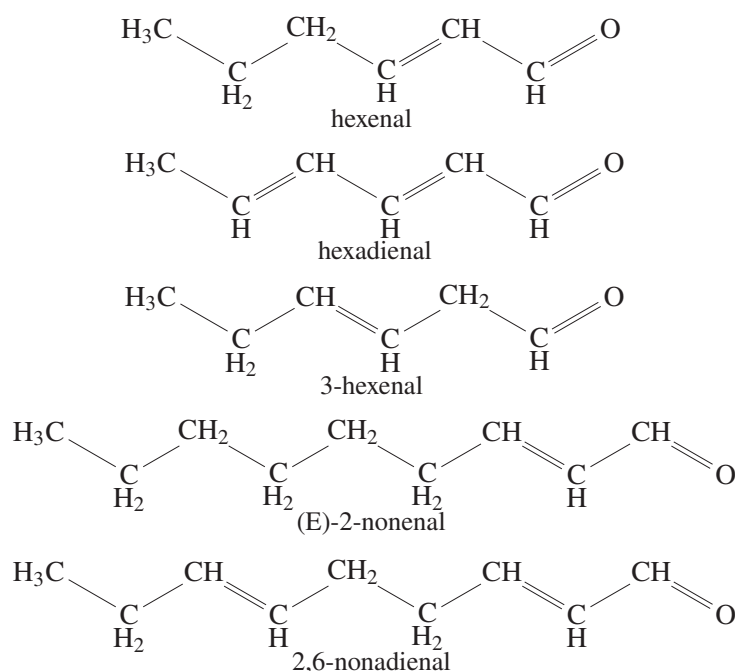
ausência do álcool faz com que o ambiente do mosto seja favorável para o crescimento de diversos tipos de microrganismos, o que pode acarretar num aumento da acidez volátil, o que deprecia o produto, ou mesmo produção de compostos nocivos à saúde dos consumidores. A fim de evitar possíveis problemas nesse aspecto, mesmo nos casos de emprego de leveduras não-*Saccharomyces*, é interessante o emprego da inoculação. Com o desenrolar da fermentação, o aumento do teor alcoólico passa a ser um importante fator de seletividade.

Durante a fermentação alcoólica há formação de compostos com alto grau de afinidade ao SO₂ como produtos intermediários das reações metabólicas, fazendo com que a forma de SO₂ livre diminua significativamente ou torne-se totalmente combinada. Devido a demanda de O₂ por parte dos microrganismos e à formação de CO₂ durante a fermentação, geralmente, a presença do SO₂ como agente sequestrante de O₂ molecular passa a ser secundária.

Quando o mosto é tratado com doses elevadas de SO₂, durante a fermentação alcoólica, o composto irá combinar-se com o acetaldeído, o que acarretará num favorecimento da fermentação glicopirúvica e, conseqüentemente, em um maior conteúdo de glicerol (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a), composto este que aporta características sensoriais e também serve como substrato para microrganismos. O acetaldeído desempenha um papel importante em diversos aspectos, não apenas como um produto intermediário durante o processo fermentativo, mas por suas propriedades organolépticas no vinho. A presença do composto está intimamente ligada a fenômenos de oxidação-redução, e participa de processos de estabilização de cor que ocorrem nos vinhos tintos durante o envelhecimento, facilitando a copolimerização dos compostos fenólicos (antocianinas e catequinas) (ZHANG; KONTOUDAKIS; CLARK, 2019; COMUZZO; ZIRONI, 2013).

Estudos buscam o entendimento do processo de formação de alguns compostos causadores de defeitos aromáticos que surgem durante o período de envelhecimento do vinho e que tem uma relação ao teor de dióxido de enxofre durante o processo fermentativo. Os compostos carbonílicos compreendem uma classe de moléculas estruturalmente diversificada, reativas, e que proporcionam uma gama de notas aromáticas características aos vinhos Bueno, Zapata e Ferreira (2014), alguns sendo responsáveis por desvios de aroma, enquanto outros, com aromas agradáveis, foram identificados como importantes contribuintes para o *bouquet* (MOREIRA et al., 2019). Segundo os resultados de Ferreira et al. (2014), as taxas de formação de compostos carbonílicos durante a oxidação estão, em muitos casos, significativamente correlacionadas com o nível de SO₂ combinado do vinho. No trabalho dos autores, este foi o caso do metional, fenilacetaldeído e 3-metilbutanal, mas estas correlações também foram observadas nos casos de (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, (E)-2-nonenal e 1-octen-3-ona. A Figura 2 apresenta compostos cuja presença em concentrações significativas possuem impacto, de maneira geral, negativo, no vinho.

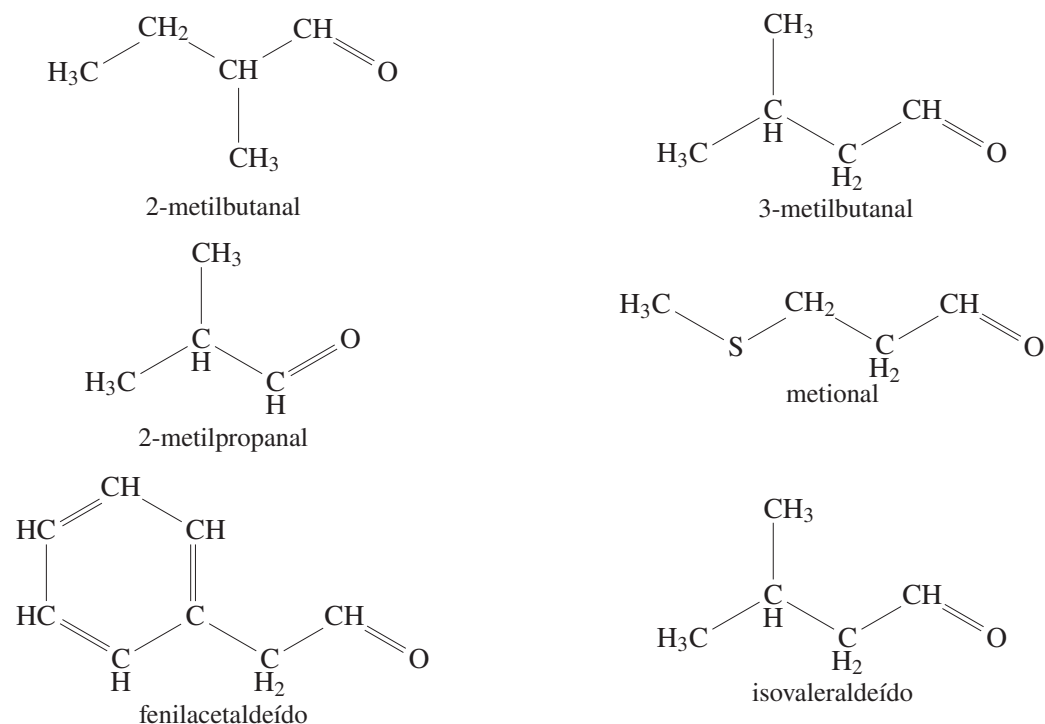
De acordo com Olivero e Trujillo (2011), ácidos graxos voláteis, importantes compostos do aroma do vinho, são biossintetizados durante a fermentação por leveduras e bactérias, e podem

Figura 2 – Representação de alguns compostos voláteis de impacto no *bouquet* de vinhos

ser originados, tanto do metabolismo lipídico, como a partir do catabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa. Alguns compostos resultantes, como aldeídos C₆ (hexenal e 2-hexenal), são poderosos odorantes presentes no mosto de uvas (BAUMES, 2009). Segundo Baumes (2009), os aldeídos C₆ são quase totalmente reduzidos durante a fermentação alcoólica pelas leveduras, o que tornaria difícil que ultrapassassem seu limiar de percepção olfativa no vinho. Porém, o SO₂ livre, incorporado na etapa pré-fermentativa, poderia formar complexos com essas moléculas que expressam notas verdes e vegetais, persistindo à fermentação alcoólica e, posteriormente, sendo lentamente liberadas durante o processo de envelhecimento. Mas deve-se considerar também que durante a fase pré-fermentativa, o SO₂ tem a capacidade de reduzir a atividade das lipoxigenases, reduzindo assim a produção de aldeídos a partir da degradação enzimática dos lipídios.

Aldeídos de Strecker (Figura 3) são compostos oriundos da degradação de Strecker, a partir de um α -aminoácido. No vinho, estes compostos podem ser oriundos, tanto da uvas, como formados por leveduras durante a fermentação alcoólica. Até certo tempo, o entendimento era de que os aldeídos de Strecker eram primariamente originados da oxidação de álcoois superiores formados na fermentação primária (BUENO et al., 2018). Segundo Monforte, Martins e Ferreira (2018), a formação de aldeídos Strecker nos vinhos é sugerida (i) pela degradação do aminoácido precursor pela reação de Strecker com α -dicarbonil ou uma *o*-quinona (OLIVEIRA et al., 2017) (ii) pela oxidação direta do álcool correspondente com um mecanismo de peroxidação ou (iii) pela liberação destes compostos a partir de aductos com dióxido de enxofre - o ácido hidroxialquilsulfônico (BUENO et al., 2018; ZHANG; KONTOUDAKIS; CLARK, 2019). A Figura 4 ilustra, de forma simplificada, a obtenção do metional a partir da degradação da metionina, e o equilíbrio da forma conjugada ao bissulfito. O trabalho de Bueno et al. (2018) demonstrou que o conteúdo de aminoácidos é a fonte mais relevante de aldeídos de Strecker,

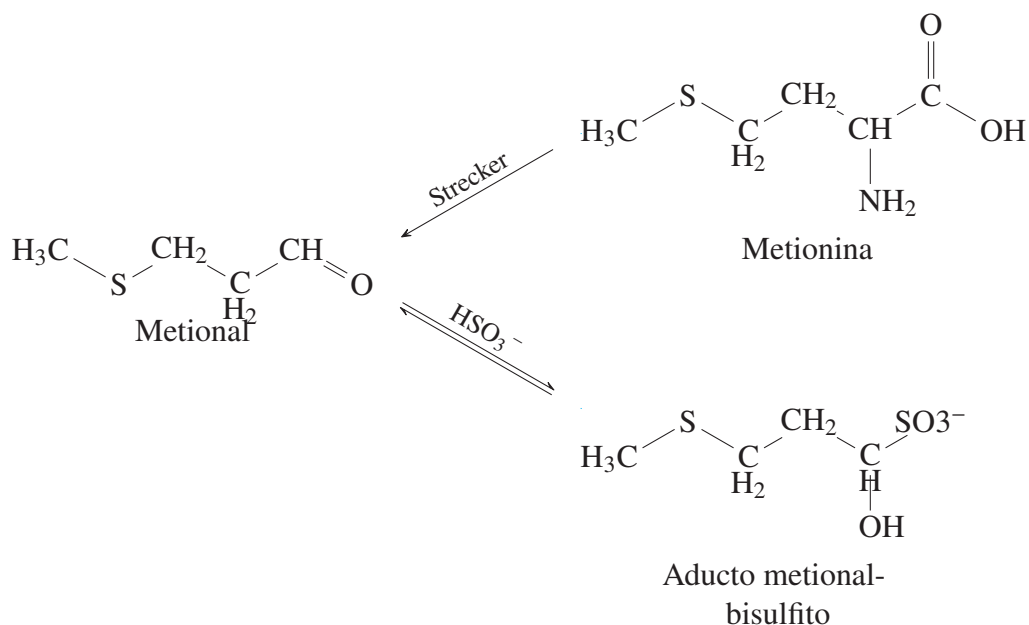
Figura 3 – Representação de alguns aldeídos de Strecker de interesse enológico



sendo então, os compostos originados a partir da oxidação destes aminoácidos. Neste sentido, o resultado apresentado no trabalho de Bueno, Carrascón e Ferreira (2016) leva a considerar como fonte majoritária para a formação dos aldeídos de Strecker (metional, fenilacetaldéido, isobutiraldeído, 2-metilbutanal e isovaleraldeído) a fermentação alcoólica, atrelada ao conteúdo de aminoácidos. A Figura 5 ilustra a participação do fenilacetaldéido na rota de Elrich, incluindo a possibilidade de formação de aducto com bissulfito, esta última, tem sua importância evidenciada no trabalho de Bueno, Carrascón e Ferreira (2016). Estas formações conjugadas, então, durante o processo de envelhecimento do vinho, possibilitariam a liberação dos compostos, com a diminuição do SO_2 (ZHANG et al., 2019; PETROZZIELLO et al., 2018). Portanto, o SO_2 livre durante o processo fermentativo permitiria a formação de aductos com aldeídos de Strecker, em conformações que não poderiam ser reduzidas pelas leveduras.

A presença do SO_2 durante a fermentação alcoólica tem duas facetas que devem ser consideradas. Por um lado, conduz a um aumento da formação de glicerol, o que é, de maneira geral, desejável, e a um aumento da fração combinada de acetaldeído que uma vez liberada, poderia ser participante do *bouquet* e de reações de polimerização responsáveis pela estabilidade de cor em vinhos tintos. Por outro lado, a formação de aductos com compostos prejudiciais ao aroma poderiam refletir num decréscimo da qualidade aromática com o envelhecimento e liberação da forma sulfonada dos compostos, e em relação ao acetaldeído, este pode ser oriundo da própria oxidação do etanol, seja por processos de maturação natural ou abreviados com o uso de micro oxigenação em tanques com difusores ou barricas. Mas um fator crítico que deve também ser levado em consideração é a diminuição do teor de dióxido de enxofre no produto

Figura 4 – Representação simplificada da formação de adutos com bissulfito



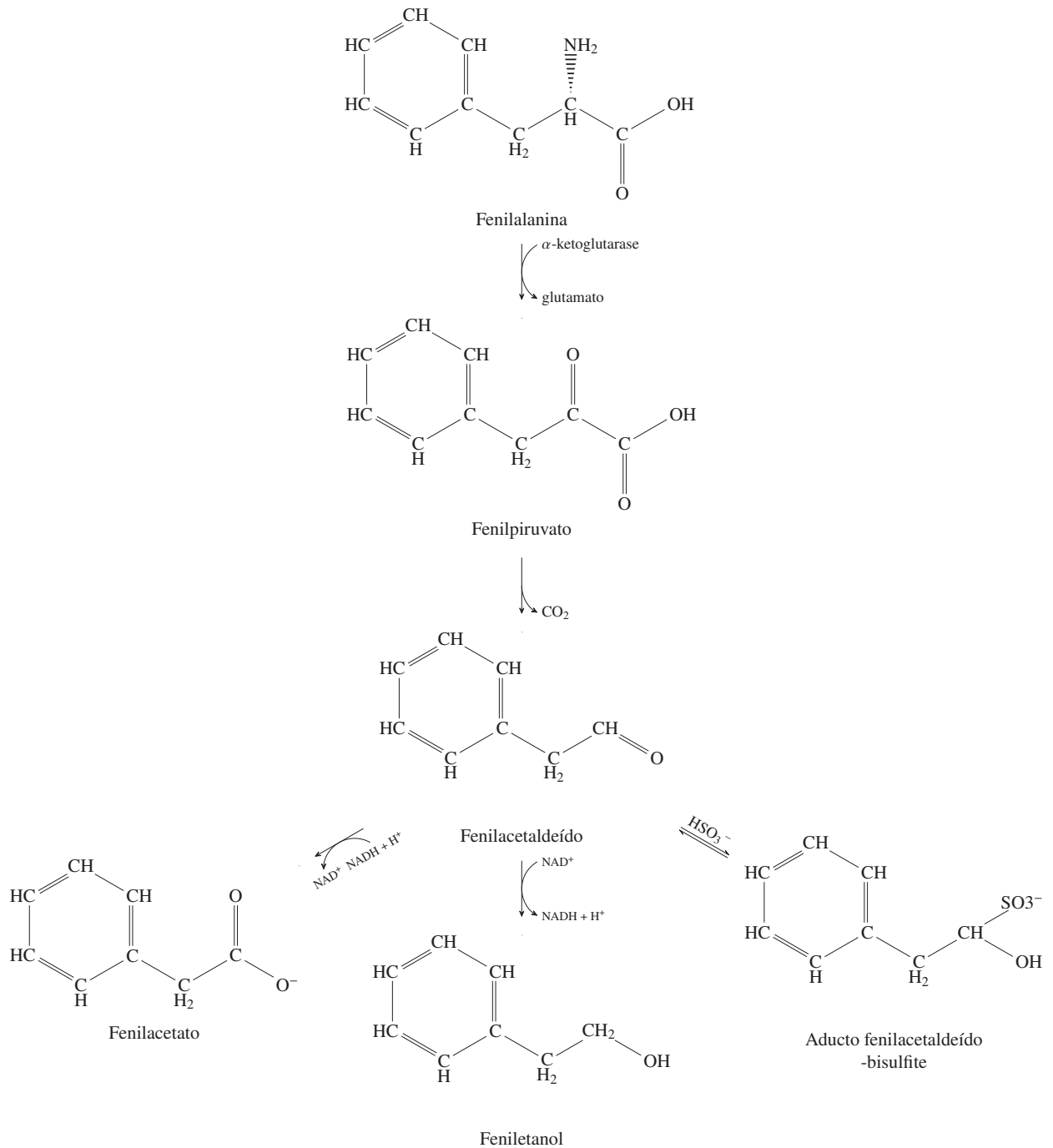
final, o que agregaria o apelo de maior saudabilidade ao produto.

2.2.3 Etapa pós-fermentativa

Os principais aspectos do SO_2 após a fermentação, além da ação como antioxidante, estão ligados à atividade de bactérias ácido lácticas na fermentação malolática, e, posteriormente, com a preservação do produto após o seu envase. Além disto, o composto tem participação na evolução de alcoóis e ésteres na maturação dos vinhos, e a liberação do acetaldeído combinado ao SO_2 passa a fazer parte de reações de polimerização responsáveis pela estabilidade de cor em vinhos tintos.

Em relação a liberação dos aldeídos conforme há oxidação e diminuição do SO_2 , o trabalho de Bueno, Carrascón e Ferreira (2016) apresenta um aumento de metiltiobutanol livre a medida que o teor de SO_2 livre diminui. O estudo ainda demonstra que a formação de fenilacetaldeído está associada à habilidade da levedura de produzir SO_2 . Essa capacidade estirpe-dependente faz com que, além das adições, quantidades de SO_2 possam ser produzidas pelas leveduras durante o processo fermentativo (CORDENTE et al., 2009; NEHME; MATHIEU; TAILLANDIER, 2008; RAUHUT, 2009). Embora não seja parte do escopo do trabalho dos autores, essa capacidade de produção de SO_2 pode, indiretamente, ser deduzida do trabalho de Mayr et al. (2015). No artigo, os autores realizaram uma análise quantitativa de 18 compostos aromáticos vinculados a caracteres depreciativos do *bouquet* de vinhos. No preparo do vinho, o SO_2 foi incorporado somente após a fermentação alcoólica, portanto a presença de SO_2 durante a fermentação estaria apenas vinculada a capacidade da produção da levedura. Ao avaliar a eficácia dos tipos de rolhas sobre a oxidação dos produtos, os autores observaram diferenças significativas na concentração de 2-fenilacetaldeído, 3-metilbutanal, e metional, especialmente no tratamento com rolhas sintéticas. Embora os autores não tenham mencionado as condições da fermentação,

Figura 5 – Rota de Elrich. Adaptado de Vuralhan et al. (2003)



pode ser que, se diferentes leveduras fossem avaliadas por suas capacidades de formação de SO_2 , concentrações dos aldeídos distintas poderiam ser verificadas.

Petrozziello et al. (2018) observaram as alterações na composição de aldeídos e características cromáticas de vinhos da cv. Nebbiolo mediante diferentes níveis de oxigenação, observando a formação de pigmentos poliméricos. Com relação aos aldeídos voláteis (t-2-hexenal, t-2-octenal, metional, t-2-nonenal e fenilacetaldeído) foi observada uma ligeira diminuição no tempo de 60 dias de armazenamento com relação ao conteúdo após a fermentação. Posteriormente, a concentração de aldeídos aumentou, observando-se diferenças significativas entre os tempos

de 60 e 300 dias. Os autores explanam que, com a presença de SO₂, outros aldeídos, além do acetaldeído, podem formar aductos sulfonados reversíveis, que em teoria podem ser liberados à medida que a concentração de SO₂ livre diminui (FERREIRA et al., 2015).

Já há algum tempo, Escudero et al. (2000) avaliaram a composição do aroma pungente de um vinho derivado da oxidação espontânea, atribuindo o aroma à presença de metional. Já o estudo de Culleré, Cacho e Ferreira (2007) avaliou os níveis de aldeídos importantes relacionados com a oxidação, tais como metional, fenilacetaldéido, (E)-2-hexenal, (E)-2-heptenal, (E)-2-octenal, (E)-2-nonenal, metilpropanal, 2-methylbutanal, e 3-methylbutanal em 41 vinhos pertencentes a diversas categorias, encontrando grande parte dos compostos em quantidades acima dos limiares de percepção. O estudo também demonstrou que os aldeídos ramificados realçam as notas de frutas secas e mascaram o papel negativo dos (E)-2-alcenais.

O estudo recente de Arias-Pérez et al. (2021) sugere fortemente que desvios aromáticos ocasionados majoritariamente por aldeídos Strecker surgem em função do aumento da concentração de acetaldeído, liberados de suas combinações de bissulfito pelo composto. As constantes de formação dos aductos de acetaldeído-bissulfito são mais altas que as dos aductos de aldeído de Strecker-bissulfito (ARIAS-PÉREZ et al., 2021; BUENO et al., 2018), de modo que o acetaldeído desloca os outros aldeídos, liberando-os de suas formas sulfonadas.

2.2.3.1 Alternativas ao SO₂ na etapa pós-fermentativa

Chen et al. (2017) avaliaram o uso de lisozima e proantocianidinas oligoméricas como alternativa para diminuição do SO₂ durante a etapa pré-enchimento de *ice wine*. O *ice wine* é um tipo de vinho de sobremesa produzido a partir de uvas congeladas e das quais é realizada uma extração de modo a obter os açúcares e outros sólidos solúveis concentrados, diminuindo o conteúdo de água, que permanece na forma de gelo. A característica deste tipo de vinho é a alta concentração de açúcares no produto final, sendo esta condição um desafio para assegurar a estabilidade microbológica. Os resultados do artigo demonstram o potencial do uso da abordagem proposta, não como substituição, mas de forma aliada ao SO₂, permitindo uma diminuição do teor do agente sulfitante. Os autores também evidenciaram a importância do SO₂ na evolução de esteres e alcoóis durante o processo de envelhecimento.

No artigo de Nunes et al. (2016) os autores avaliaram o uso de filmes de quitosana-genipina como uma alternativa ao dióxido de enxofre pré-enchimento. Foram avaliados tratamentos pré-enchimento com o filme, comparando-os a um tratamento com 40 mg L⁻¹ de SO₂ livre e um controle, sem adições. Com relação ao impacto sensorial, os autores observaram a eficácia dos filmes como um bom antioxidante, preservando as características sensoriais. A eficácia do agente foi atribuída à capacidade de remoção de íon promotores da reação de Fenton nas condições do vinho. Um ponto também levantado foi a capacidade de ocorrência de reações de Maillard e Strecker, citadas pelos autores como possíveis promotoras de efeitos positivos no espectro aromático, porém da mesma forma que podem ser originados compostos aromáticos

que aportam complexidade ao *bouquet*, outros podem ser depreciativos.

2.3 DISCUSSÃO

O desafio de se encontrar um substituto para o dióxido de enxofre em vinhos persiste, especialmente pela restritividade que se impõe em função do composto alternativo ter impacto, muitas vezes negativo, na qualidade sensorial dos produtos. Além disso, como diversos autores observaram, o SO₂ desempenha um papel crucial na formação de esteres e alcoóis durante o processo de maturação de vinhos.

As alternativas apresentadas como aliadas ou substitutas ao SO₂ pós-fermentativo são válidas, mas necessitam de avaliação em prazos longos, uma vez que os vinhos, especialmente tintos com forte concentração fenólica, aportam um caráter longo, e o agente empregado pré-embalagem precisa garantir estabilidade por longos períodos, ainda que, o próprio conteúdo de polifenóis auxilie na sua preservação.

Já o uso do dióxido de enxofre na etapa pré-fermentativa pode ser, em parte, questionado, especialmente quando adotadas práticas que não apenas possibilitariam uma redução do teor final de dióxido de enxofre no produto, mas poderiam contribuir para ganhos no espectro organoléptico. O emprego de doses mínimas ou mesmo ausência do sulfito na etapa pré-fermentativa pode contribuir, no caso dos vinhos brancos, numa menor extração fenólica, quando é realizado um período de maceração, utilizando-se atmosfera inerte. Além disso, como discutido neste trabalho, a ausência do SO₂ durante a fermentação alcoólica pode conduzir a uma menor ocorrência de desvios aromáticos durante o envelhecimento de vinhos, decorrente da liberação de compostos em formas sulfonadas. Logicamente, a sanidade da matéria-prima deve ser um fator primordial para que tais abordagens sejam consideradas.

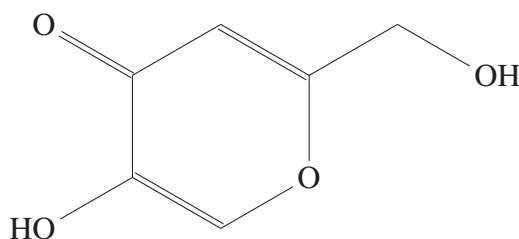
Não menos importante, a redução ou ausência do dióxido de enxofre nas etapas preliminares da vinificação proporcionariam novas possibilidades na busca de microrganismos para a caracterização ou obtenção de atributos específicos nos vinhos, tais como redução do percentual alcoólico, aprimoramento sensorial ou mesmo vínculo ao *terroir* microbiológico. Sem a restritividade do SO₂, a pesquisa na seleção de estirpes por características enológicas e critérios de segurança para realização de processos de co-inoculação ou inoculação sequencial poderia ser expandida, abrindo ainda espaço para o entendimento da interação entre as leveduras. Ainda, um baixo teor de dióxido de enxofre após a fermentação primária favorece a realização da fermentação malolática, que além de impactar nas características sensoriais, favorece a estabilidade microbiológica dos produtos, possibilitando um processo de sulfitagem posterior que, tendo em vista critérios como conteúdo alcoólico e pH, pode minimizar o teor do agente no produto e, ainda assim, garantir a preservação.

2.4 ÁCIDO KÓJICO (AK)

Durante a busca por um antioxidante alternativo para a preservação das características sensoriais de bebidas fermentadas, Noboru (1963) observou que as propriedades do ácido kójico poderia ser um composto potencial e expandiu as pesquisas sobre os efeitos desse composto. Até então, não se conheciam os efeitos da adição do ácido kójico em produtos fermentados. O autor realizou ensaios para estudar os efeitos antioxidantes do AK em vinhos branco e tinto, branco natural mesclado com vinho sintético, cidra e cerveja. Os produtos receberam a adição do composto em concentrações que variaram de 0,004 a 0,008% (m/m) a seguir dos processos de fermentação e clarificação. A partir dos resultados dos ensaios, foi constatado que o ácido kójico proporcionou produtos menos oxidados e com aspectos sensoriais superiores, com aromas e cor preservados, enquanto os produtos sem a adição de AK foram oxidados e tiveram suas características olfativas e visuais deterioradas. Em seu estudo, Noboru (1963) conclui que o ácido kójico adicionado em quantidade de 0,0001 a 0,1 % (m/m) é capaz de prevenir a deterioração por oxidação de vinhos e outras bebidas fermentadas, como cidra e cerveja, e, conseqüentemente, preservar suas características aromáticas e de cor, aumentando assim a qualidade do produto.

O ácido kójico foi isolado pela primeira vez em 1907 pelo pesquisador japonês Kendo Saito (SAITO, 1907) e identificado e denominado no ano de 1913 por Teijiro Yabuta (YABUTA, 1912; BENTLEY, 2006). Trata-se de um ácido orgânico formado por uma cadeia heterocíclica multifuncional e esqueleto contendo oxigênio com importantes centros de reação, que permitem reações em posições variadas de sua cadeia heterocíclica (BRTKO et al., 2004; MOHAMAD et al., 2010; CHAUDHARY; PATHAK; LAKHAWAT, 2014; LAKHAWAT; CHAUDHARY; PATHAK, 2014). Sua estrutura química é determinada como 5-hidroxi-2-hidroxi-4-pirano-4ona (YABUTA, 1924), representada na Figura 6. Quando isolado, o ácido kójico assume forma de cristais prismáticos incolores (MAY et al., 1931), sendo solúvel em água (3,95 g em 100 mL a 20 °C), álcool e acetato de etila, e pouco solúvel em éter, mistura de éter e álcool, clorofórmio e piridina (MOHAMAD et al., 2010; ZOHRI et al., 2018). Seu peso molecular, determinado segundo a fórmula molecular empírica $C_6H_6O_4$, é de $142,11 \text{ g mol}^{-1}$, e seu ponto de fusão varia entre 151 °C e 154 °C (CHAUDHARY; PATHAK; LAKHAWAT, 2014; LAKHAWAT; CHAUDHARY; PATHAK, 2014). O pico máximo de absorção espectrofotométrica do ácido kójico ocorre no intervalo entre os comprimentos de onda de 280 e 284 nm (HAZZAA et al., 2013).

Figura 6 – Representação molecular do ácido kójico



Em relação a sua obtenção, o AK pode ser sintetizado por diversos gêneros de microrganismos, como *Penicillium* spp., *Acetobacter* spp. e *Glucanobacter* spp. (TERADA; SUZUKI; KINOSHITA, 1961; SATO et al., 1967; BENTLEY, 2006), e até mesmo por plantas, como a *Kigelia africana* (EYONG et al., 2012); no entanto, sua principal fonte, na atualidade, é com o emprego de microrganismos do gênero *Aspergillus* spp., principalmente os pertencentes aos grupos *flavus*, *oryzae* e *tamaris* (MOHAMAD et al., 2010; HAZZAA et al., 2013). Desde o século VII, o fungo *Aspergillus* spp. é utilizado na fermentação de substratos sólidos no Japão, processo fundamental para a produção de diversos alimentos, como o saquê (produto alcoólico obtido pela fermentação do arroz), miso (pasta de soja fermentada) shoyu (molho de soja), amazake (uma bebida doce), shouchu (uma bebida destilada) e mirin (um tempero doce e alcoólico). A partir da ocorrência do AK como subproduto no processo de produção destes alimentos típicos orientais, pode-se deduzir que o ácido kójico possui um longo histórico de consumo (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001; KRISHNA, 2005).

Segundo Burdock, Soni e Carabin (2001), o ácido kójico é aprovado para adição em alimentos pelo Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão, pois é considerado uma substância alimentar que ocorre naturalmente. Ainda de acordo com o autor, a ingestão de ácido kójico pela população japonesa pode chegar a 103 mg ao dia com o consumo de miso e molho de soja, sem considerar também outros alimentos típicos orientais que são potenciais fontes do composto.

No organismo humano, o AK é, provavelmente, metabolizado de maneira semelhante às hexoses. Em testes laboratoriais com animais, foram observados efeitos de toxicidade pela ingestão diária de quantidades relativamente altas de AK durante algumas semanas. Segundo Burdock, Soni e Carabin (2001), a dose letal, por via oral, necessária para causar a morte de 50% de uma população estudada (LD50) de camundongos está entre 1000 mg kg⁻¹ e 1500 mg kg⁻¹. O autor ainda cita o relatório escrito por Fujimoto et al. (1998), que alimentou ratos com 4500 mg kg⁻¹ de ácido kójico na dieta por até 80 semanas e constatou uma taxa de sobrevivência da população superior a 90%. Em humanos, nunca houve um incidente relatado de envenenamento por ácido kójico, mesmo havendo um consumo generalizado de longa história de alimentos conhecidos por conter esse composto, especialmente no Japão. Portanto, o ácido kójico em níveis normalmente encontrados nos alimentos não apresenta riscos à saúde (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001; NOHYNEK et al., 2004).

Atualmente, a principal aplicação do ácido kójico é na indústria cosmética, na qual é amplamente utilizado em produtos para cuidados com a pele, principalmente em remove-dores de manchas (CHAUDHARY; PATHAK; LAKHAWAT, 2014). O ácido kójico evita o escurecimento natural da pele inibindo a enzima tirosinase, responsável pela conversão de L-tirosina a dopaquinona, precursora das melaninas, responsáveis pela coloração dos tecidos cutâneos. Essa atividade inibitória se deve pela capacidade do AK de formar quelato com íons de cobre, componente estrutural das tirosinases (CHEN; WEI; MARSHALL, 1991; CABANES; CHAZARRA; GARCIA-CARMONA, 1994; FERRAR; WALKER, 1996; BENTLEY, 2006). A aplicação tópica do ácido kójico também fornece forte efeito fotoprotetor contra radiação UV,

que se deve por sua propriedade quelante com o ferro, presente na pele (MITANI et al., 2001).

Na indústria de alimentos, o ácido kójico é usado como um agente para evitar a escurecimento de produtos processados, como o macarrão, e agrícolas, como vegetais, frutas e crustáceos, durante o armazenamento e processamento. A proteção contra o escurecimento se deve pela mesma propriedade que é explorada nos produtos de remoção de manchas da pele, pela inibição da ação da enzima polifenoloxidase (PPO) (UCHINO et al., 1988; CHEN; WEI; MARSHALL, 1991; SON; MOON; LEE, 2001; BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001). Além da inibição da tirosinase, ele também apresenta alto potencial oxi-redutivo, atuando como um agente redutor e antioxidante (NOBORU, 1963; MCEVILY; IYENGAR; OTWELL, 1992).

Estudos demonstram que o ácido kójico ainda apresenta efeito inibitório em relação à enzima oxidásica lacase, secretada por diversos gêneros de microrganismos (MURAO et al., 1992; IYER; CHATTOO, 2003; BALDRIAN, 2006). A lacase está presente em mostos obtidos de uvas atacadas pela podridão cinzenta, cometida pelo fungo *Botrytis cinerea*, e é uma enzima mais ativa e estável do que a tirosinase. Na presença da lacase, a sulfitação pode não ser suficiente para proteger o mosto de oxidações na etapa pré-fermentativa (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

O AK também é utilizado como material de partida para a síntese dos intensificadores de sabor, como o maltol e etil maltol, utilizados em alimentos (TANIGAKI; OBATA; TOKUYAMA, 1980). Ainda na indústria alimentícia, existe a possibilidade da aplicação do ácido kójico como agente antimicrobiano. Estudos *in vitro*, principalmente com microrganismos patogênicos, comprovam que o ácido kójico é um antimicrobiano natural que inibe o crescimento de bactérias, mais fortemente, bactérias Gram-negativas, além de apresentar uma pequena atividade antifúngica (MORTON et al., 1945; KOTANI et al., 1976; KAYAHARA et al., 1990; BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001; BENTLEY, 2006; LIU et al., 2013; WU et al., 2019). Segundo Wu et al. (2019), o ácido kójico provoca a inativação bacteriana, especialmente em bactérias Gram-negativas, principalmente pelo dano à integridade da membrana celular e, conseqüentemente, pela perturbação da localização das proteínas intracelulares relacionadas à divisão celular. Além disso, foi observado, no estudo, notável interação com o DNA da célula. Segundo o autor, o grupo hidroximetil ($-\text{CH}_2\text{OH}$) livre na posição 2 do AK poderia desempenhar um papel mais significativo na atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas.

3 CAPÍTULO 3: ARTIGO EXPERIMENTAL

3.1 TÍTULO

Evaluation of kojic acid as an alternative to sulfur dioxide in the winemaking process

3.2 RESUMO

A busca de alternativas ao dióxido de enxofre (SO₂) em seus mais diferentes usos instiga a avaliação de novos compostos. O ácido kójico tem várias aplicações na indústria de alimentos e foi recentemente utilizado na indústria cosmética. Sua presença na dieta das culturas orientais continua por séculos. Neste estudo, observamos o efeito do ácido kójico como um alternativo ao dióxido de enxofre no processo de vinificação de uvas Chardonnay (*Vitis vinifera*). As doses utilizadas foram: 100 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹ de ácido kójico, além de um tratamento controle e uma referência com SO₂ (100 mg L⁻¹ de K₂S₂O₅). As amostras foram avaliadas durante o processo fermentativo e depois de um período sob condições de suscetibilidade à oxidação. A cinética fermentativa demonstrou um impacto do SO₂ sobre a fase *lag*, não diferindo entre os demais tratamentos. Observou-se distinção entre os ensaios em relação à concentração de ácido málico, tanto após o final da fermentação alcoólica, como durante, sugerindo a metabolização do ácido málico ao início do processo fermentativo nos tratamentos isentos do dióxido de enxofre, sendo a hipótese amparada pelo incremento do teor de ácido láctico. Após um período de 6 meses em condições propícias a processos oxidativos, foram avaliados os principais atributos enológicos dos vinhos, observando diferenciação nos teores de alcoóis superiores e dióxido de enxofre total entre o tratamento com SO₂ e os demais. Ainda, foi constatado um maior valor para aldeídos totais em relação aos demais tratamentos, o que sugere que a presença do SO₂ nas etapas pré-fermentativa e fermentativa pode ter desempenhado um papel de preservação destes compostos em formas sulfonadas, liberando-os na etapa pós-fermentativa. A análise sensorial sugere a capacidade do ácido kójico na inibição da oxidação enzimática ao conservar a qualidade visual dos vinhos, bem como de possibilitar perfil sensoriais próximos ao tratamento com dióxido de enxofre, sem evidenciar notas de frutas em calda, como observado no tratamento controle. Ainda, o tratamento com 100 mg L⁻¹ de ácido kójico obteve destaque nos descritores Apreciação gustativa, Intensidade olfativa e Apreciação Olfativa. O ácido kójico demonstrou potencial como alternativo ao SO₂ pré-fermentativo, abrindo um leque de possibilidades de estudos futuros.

3.3 ABSTRACT

The search for alternatives to sulfur dioxide (SO₂) in its most different uses instigates the evaluation of new compounds. Kojic acid has several applications in the food industry and was

recently used in the cosmetic industry. Its presence in the diet of oriental cultures continues for centuries. In this study, we observed the effect of kojic acid as an alternative to sulfur dioxide in the winemaking process of Chardonnay grapes (*Vitis vinifera*). The doses used were: 100 mg L⁻¹ and 200 mg L⁻¹ of kojic acid, as well as a control treatment and a reference with SO₂ (100 mg L⁻¹ of K₂S₂O₅). The samples were evaluated during the fermentation process and after a period under oxidation susceptibility conditions. The fermentation kinetics showed an impact of SO₂ on the *lag* phase, not differing between the other treatments. A distinction was observed between the trials with respect to malic acid concentration, both after the end of alcoholic fermentation and during, suggesting the metabolization of malic acid at the beginning of the fermentative process in the sulfur dioxide-free treatments, the hypothesis being supported by the increase in lactic acid content. After a period of 6 months in conditions favorable to oxidative processes, the main oenological attributes of the wines were evaluated, observing differentiation in the levels of higher alcohols and total sulfur dioxide between the treatment with SO₂ and the others. Also, a higher value for total aldehydes was found compared to the other treatments, suggesting that the presence of the SO₂ in the pre-fermentative and fermentative stages may have played a role in preserving these compounds in sulfonated forms, releasing them in the post-fermentative stage. Sensory analysis suggests the ability of kojic acid to inhibit enzymatic oxidation by preserving the visual quality of the wines, as well as providing sensory profiles close to the sulfur dioxide treatment, without showing notes of dry fruit, as observed in the control treatment. Furthermore, the treatment with 100 mg L⁻¹ of kojic acid was outstanding in the descriptors Taste Appreciation, Olfactory Intensity and Olfactory Appreciation. Kojic acid showed potential as an alternative to pre-fermentative SO₂, opening up a range of possibilities for future studies.

3.4 INTRODUÇÃO

O ácido kójico (AK) tem sido estudado em suas diversas aplicabilidades na indústria alimentícia e, mais recentemente, cosmética, desde o início do século XX. O composto é um produto metabólico de várias espécies do gênero *Aspergillus* (BENTLEY, 2006). O fungo é utilizado no processo de produção de diversos alimentos orientais, especialmente no Japão (BENTLEY, 2006; CHAUDHARY; PATHAK; LAKHAWAT, 2014), como o saké, amazake, shouchu, miso e mirin (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001; BENTLEY, 2006), além de ser considerado um microrganismo GRAS (generally recognized as safe) (SCHUSTER et al., 2002; BEUCHAT, 1987). Além disto, o composto é utilizado na obtenção de inúmeros bioprodutos, como biosurfactantes (ISHAQ et al., 2015), enzimas proteolíticas (LOPES et al., 2011), ácido cítrico (SHOW et al., 2015) e antibacterianos (AL-FAKIH; ALMAQTRI, 2019).

A alta reatividade do ácido kójico permite que o mesmo seja utilizado como precursor de diversos derivados e atue com variadas funções, que são exploradas industrialmente pelas áreas de cosmética, farmacêutica, alimentícia, agrícola e química (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019). São atribuídas ao AK e seus derivados propriedades quelante (BEÉLIK,

1956; MOHAMAD et al., 2010), antibacteriana e antifúngica (LIU et al., 2013; WU et al., 2019), antioxidante e antioxidásica (NOBORU, 1963; UCHINO et al., 1988), analgésica e anti-inflamatória (ÖZTÜRK et al., 2001), protetora contra radiações gama e UV (MITANI et al., 2001; MOSLEMI, 2009) e antineoplásica (NOVOTNÝ et al., 1999; YOO et al., 2010).

O ácido kójico tem a fórmula empírica $C_6H_6O_4$ e um peso molecular de $142,11 \text{ g mol}^{-1}$. Cristaliza como partículas prismáticas de acetona, etanol e éter ou metanol e acetato de etila. O ponto de fusão situa-se entre $153 \text{ }^\circ\text{C}$ e $154 \text{ }^\circ\text{C}$, e possui valores de pKa de 7,90 e 8,03. É livremente solúvel em água, etanol e acetona e pouco solúvel em éter, acetato de etila, clorofórmio e piridina (CHAUDHARY; PATHAK; LAKHAWAT, 2014; BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001).

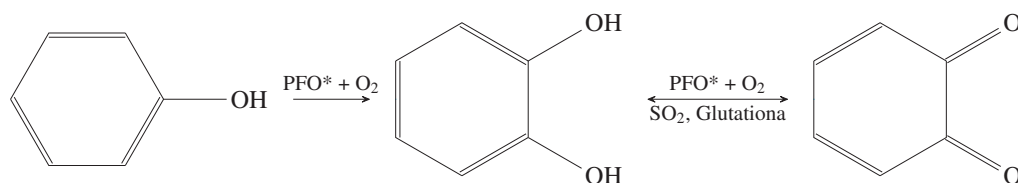
O composto pode ser empregado como antioxidante, bacteriostático, agente quelante de metal, conservante em alimentos (HAZZAA et al., 2013) e antibacteriano (especialmente bactérias Gram-negativas) em alimentos (WU et al., 2019). Em seu uso mais corrente na atualidade, o ácido kójico e alguns de seus derivados são utilizados em preparações cosméticas para promover o clareamento da pele, evitando a formação de melanina pela inibição da tirosinase, enzima responsável pela pigmentação da pele (LAKHAWAT; CHAUDHARY; PATHAK, 2014; HAZZAA et al., 2013).

De acordo com Burdock, Soni e Carabin (2001), o consumo diário médio da população japonesa de ácido kójico é de 103 mg ou $1,71 \text{ mg kg}^{-1}$ (para um indivíduo de 60 kg). A LD_{50} oral para camundongos está entre 1000 mg kg^{-1} e 1500 mg kg^{-1} , mas a utilidade desse valor diminui com o resultado do estudo Fujimoto et al. (1998), em que ratos foram alimentados com 4500 mg kg^{-1} de ácido kójico na dieta por até a 80 semanas, com sobrevida maior de 90%.

Embora muitas aplicações tenham sido mencionadas para o ácido kójico, a sua aplicação em processos de vinificação ainda foi pouco explorada. Na etapa pré-fermentativa, as enzimas presentes naturalmente no mosto de uvas ou pela presença de fungos como *Botrytis*, *Penicillium* e *Aspergillus* podem catalisar a oxidação (Figura 7) de substratos fenólicos (ZOECKLEIN; MACARRÓN, 2000). O resultado é o aparecimento de coloração marrom ou castanha nos vinhos tintos e uma mudança do amarelo para o âmbar nos brancos (ZOECKLEIN; MACARRÓN, 2000; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Em uvas sadias, a oxidação enzimática de compostos fenólicos ocorre na presença de oxigênio durante operações pré-fermentativas, devido à ação da tirosinase da uva. Após o desengace, a tirosinase é parcialmente liberada dos cloroplastos da baga no mosto (DUBERNET, 1974), onde ela pode reagir com os ácidos cinâmicos e seus ésteres tartáricos para formar *o*-quinonas.

As abordagens mais comuns para evitar processos de oxidação são geralmente limitadas a minimizar a exposição do mosto de uva ao oxigênio, e à adição de dióxido de enxofre. De forma antagônica, a limitação da exposição ao O_2 geralmente ocorre a baixas temperaturas para diminuir a velocidade das reações oxidativas, onde o oxigênio torna-se mais solúvel. No entanto, a diminuição ou substituição do SO_2 tem sido uma tendência, devido à crescente preocupação

Figura 7 – Processo de oxidação enzimática, adaptado de Li, Guo e Wang (2008)



* Enzimas polifenoloxidasas

da população mundial por alimentos saudáveis, uma vez que o dióxido de enxofre tem sido relacionado a problemas de saúde (CERBARO et al., 2016). Segundo Vally, Misso e Madan (2009), enquanto a maioria dos indivíduos não asmáticos tolera doses de sulfitos, indivíduos sensíveis reagem negativamente à ingestão com uma variedade de sintomas, incluindo dermatite, urticária, diarreia e broncoconstrição. Sem o uso de SO₂, o risco de deterioração do vinho por microrganismos aumentaria significativamente (GUERRERO; CANTOS-VILLAR, 2015), o que instiga a busca por alternativas que permitam a redução dos seus teores nos produtos finais.

Objetivou-se avaliar a capacidade do ácido kójico em substituição ao SO₂ na etapa pré-fermentativa do processo de vinificação em branco, observando atributos enológicos e sensoriais.

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

3.5.1 Vinificação

Para o processo de vinificação foram utilizadas uvas da variedade Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) provenientes de um vinhedo localizado na comunidade de Lajeado, interior de Veranópolis - RS, Serra Gaúcha, conduzido em sistema latada. Segundo a classificação climatológica de Köppen, o clima da região enquadra-se como Cfb, que corresponde a um clima temperado quente, com temperatura média anual de 17,2 °C, precipitação média anual de 1725 mm (frequência média anual de precipitação de 120 dias), umidade relativa do ar média de 77%, insolação anual média 2200 horas e o índice de horas de frio de 410,2 horas. De acordo com a Classificação Climática Multicritério Geovitícola, a Serra Gaúcha apresenta um clima vitícola úmido, temperado quente e de noites temperadas.

Após a recepção das uvas, foi realizada a prensagem direta em prensa pneumática (Agua Inox, Asti.PP-12, Brasil), sendo descartadas as parcelas iniciais e finais do ciclo de extração do mosto, de modo a evitar a incorporação de sujidades. O ciclo de extração completo atingiu um rendimento aproximado de 0,6 L kg⁻¹. O mosto foi então bombeado para um tanque de polipropileno de 400 L, até atestado. Após um período de transporte do tanque, o mosto, sem adição de clarificantes ou outros coadjuvantes, foi distribuído aleatoriamente em 12 recipientes de 30 L até os 80% do volume total, de forma escalonada, visando obter o máximo de homogeneidade.

Durante o processo de aclimação das leveduras para o preparo do pé-de-cuba (subseção 3.5.1.1), os recipientes foram identificados e a eles foram incorporados os tratamentos (seção 3.5.2). Após o final do processo de preparo do inóculo, frações foram distribuídas igualmente entre os recipientes, representando um teor de 25 g hL^{-1} do inóculo liofilizado.

Durante o processo de vinificação não foi incorporado nenhum suplemento de azoto aos recipientes. Os recipientes foram abertos de uma a duas vezes por dia durante o processo fermentativo para a coleta de amostras e aferição do teor de sólidos solúveis totais e temperatura.

Após o processo fermentativo, os vinhos foram trasfegados para separação das borras grossas. Depois de um período de três a quatro semanas, os recipientes foram transportados para uma câmara fria com temperatura controlada de $-1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 dias, a fim de realizar estabilização tartárica e promover certo grau de clarificação aos vinhos.

3.5.1.1 Preparo do inóculo

Leveduras enológicas comerciais (*Saccharomyces cerevisiae* – Zymaflore X5, Laffort, França) foram aclimatadas segundo o protocolo recomendado, no qual é realizada uma hidratação em uma proporção 1:10 massa/volume em água morna ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) e posterior incremento gradativo de mosto, observando as alterações da temperatura de modo a prevenir deslocamentos superiores a $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.2 Delineamento experimental

Os tratamentos, em triplicatas, foram os seguintes: controle (denominado C), 100 mg L^{-1} de metabissulfito de potássio (denominado SO), 100 mg L^{-1} de ácido kójico (denominado AK1) e 200 mg L^{-1} de ácido kójico (AK2). A dosagem do metabissulfito de potássio é usual na indústria enológica, que costuma variar a incorporação do agente na etapa pré-fermentativa de acordo com o grau de sanidade das uvas. Já as dosagens do ácido kójico foram determinadas baseadas em ensaios preliminares. Um fluxograma simplificado está representado na Figura 8.

3.5.3 Controles do mosto e vinho

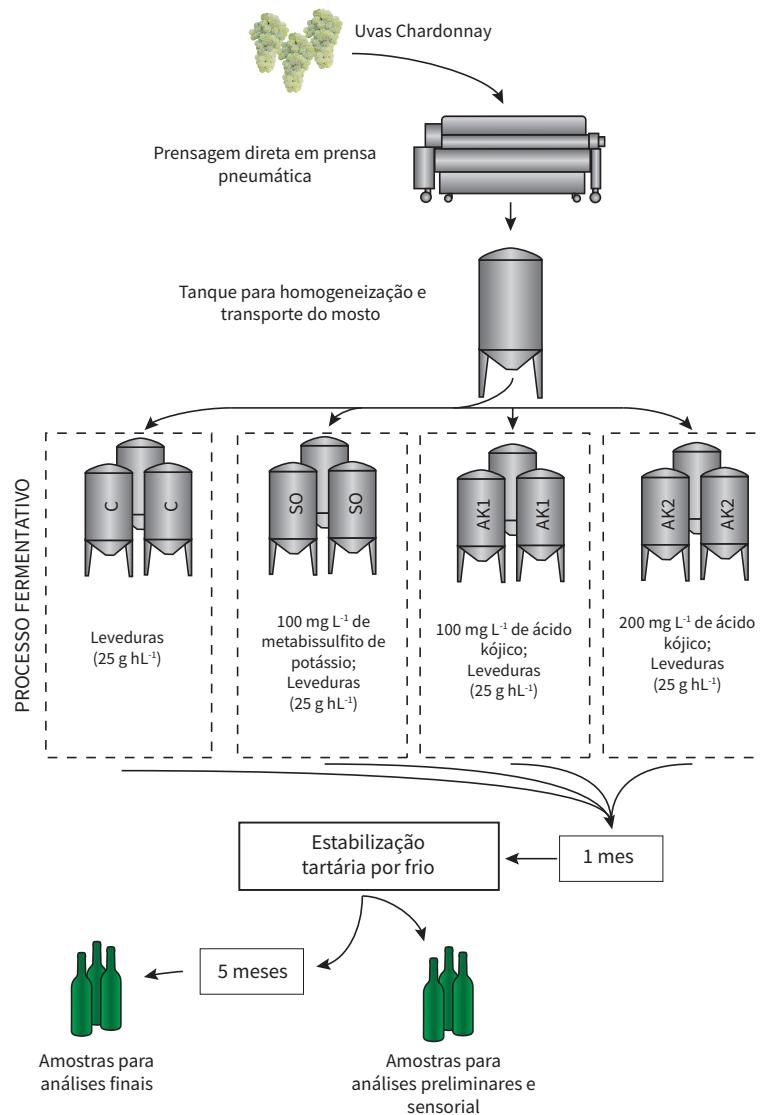
3.5.3.1 Controles de rotina

Durante a fermentação, o teor de sólidos solúveis totais e a temperatura foram aferidas de uma a duas vezes ao dia. Os instrumentos utilizados foram: mostímetro em graus Brix, proveta de 250 mL e termômetro eletrônico ($^\circ\text{C}$).

3.5.3.2 Determinação do dióxido de enxofre após a fermentação

Cerca de dez dias após o término da fermentação alcoólica, as amostras foram submetidas a quantificação do dióxido de enxofre livre e total, utilizando-se a metodologia de iodometria (Ripper) proposta por Zoecklein e Macarrón (2000).

Figura 8 – Fluxograma simplificado



3.5.3.3 Parâmetros enológicos

Foram avaliados diversos parâmetros enológicos, apresentados na Tabela 1, a partir dos vinhos após, aproximadamente, 6 meses do término da fermentação alcoólica. Salienta-se que, a medida que foram removidos volumes das amostras para as análises, os recipientes perdiam mais volume, não sendo atestados, facilitando, assim, o processo de oxidação. Todas as metodologias abordadas para avaliação dos parâmetros enológicos são reconhecidas pela OIV e / ou legislação brasileira.

3.5.3.4 Ácidos orgânicos

O conteúdo de ácidos orgânicos foi avaliado nas amostras coletadas durante a fermentação alcoólica (terceiro dia) e após o final do processo fermentativo. A estimativa deu-se através de cromatografia de troca iônica (Metrohm, 930 Compact IC Flex, Suíça), equipada com detecção

amperométrica e coluna Metrosep Organic Acids 250 / 7.8. A separação dos diferentes ácidos foi realizada utilizando uma mistura como eluente de ácido sulfúrico 0,4 mM + 12% de acetona a um fluxo isocrático de 0,4 por um período de 25 minutos.

3.5.4 Determinação de compostos carbonílicos voláteis

Os compostos voláteis analisados foram isolados através de extração em fase sólida (SPE) e analisada por cromatografia gasosa acoplada a um sistema de detecção de espectrometria de massa (GC-MS), conforme descrito por Lopez et al. (2002). As formas livres de aldeídos foram quantificadas por SPME (*Solid Phase Micro Extration*) seguido de GC-MS, como proposto por Bueno, Zapata e Ferreira (2014).

3.5.5 Avaliação sensorial

Para avaliar as características sensoriais dos vinhos, foi realizada uma análise descritiva quantitativa envolvendo um júri de profissionais da área enológica. Em virtude das restrições impostas pela pandemia de Covid-19, a análise sensorial foi conduzida remotamente, intermediada pelo uso de videoconferência através da plataforma Google Meet. As seções envolveram de 1 a 3 participantes cada, geralmente em horário pós-expediente, sendo solicitado que fossem realizadas antes de ceia. Foram enviados a cada um dos componentes do júri, de um total de 15 pessoas, as amostras dos tratamentos envasadas em garrafas de vidro verde de 375 mL, tendo etiquetadas suas codificações, juntamente com uma garrafa identificada com três asteriscos, na

Tabela 1 – Análises de parâmetros enológicos realizadas

Propriedade analisada	Metodologia	Referência
Acidez fixa	Cálculo da diferença (Total - Volátil)	Mapa IN 24/2005
Acetaldeído	Iodometria	Ribéreau-Gayon et al. (2006b)
Acidez total	Potenciometria	Mapa IN 14/2018 Mapa IN 24/2005
Acidez volátil	Destilação/Alcalinimetria	Mapa IN 24/2005
Alcoóis superiores	Espectrofotometria	Mapa IN 24/2005
Aldeídos	Iodometria	Mapa IN 24/2005
Açúcares totais	Fehling / Rebelein	Mapa Dec 8198/14 OIV 2009, modificado
Dióxido de enxofre livre	Aspiração	OIV 2009
Dióxido de enxofre total	Aspiração	Anvisa RDC 123/16 OIV 2009
Ésteres	Alcalinimetria	Mapa IN 24/2005
Intensidade corante	Espectrofotometria	Glories (1984)
pH	Potenciometria	Mapa IN 24/2005
Ácido málico	Enzimático UV	Regulamento (CE) 2676/90
Álcool	Refratometria	Mapa IN 14/2008 Mapa IN 24/2005
Sulfatos	Mapa IN 24/2005	Mapa IN 14/2008

qual foi envasado um vinho base para espumante da safra 2020, utilizado para aclimação do palato. Ainda, foram incorporadas conjuntamente as fichas de avaliação e duas taças de cristal, formato Bordeaux, de 350 mL.

Figura 9 – Representação da ficha do teste sensorial

FICHA DE AVALIAÇÃO	
NOME: _____	AMOSTRA: _____
Qualidade visual:	<input type="text"/>
Frutas Frescas:	<input type="text"/>
Frutas em calda:	<input type="text"/>
Maracujá:	<input type="text"/>
Dulçor:	<input type="text"/>
Amargor:	<input type="text"/>
Adstringência:	<input type="text"/>
Intensidade olfativa:	<input type="text"/>
Apreciação olfativa:	<input type="text"/>
Intensidade gustativa:	<input type="text"/>
Apreciação gustativa:	<input type="text"/>

Os atributos avaliados nas fichas de análise sensorial foram: descritores (frutas frescas, frutas em calda, maracujá, dulçor, acidez, amargor, adstringência, intensidades olfativa e gustativa), e três variáveis de apreciação global (qualidade visual e apreciação olfativa e gustativa). Os parâmetros foram elencados de modo a possibilitar uma verificação do efeito dos tratamentos sobre aspectos oxidativos, de tipicidade, varietais e de produto. A ficha empregada para cada uma das avaliações está representada na Figura 9.

A análise estatística da avaliação sensorial foi baseada em Lawless, Heymann et al. (2010), com o uso do pacote SensoMineR (HUSSON; LE; CADORET, 2020) no software R (R Core

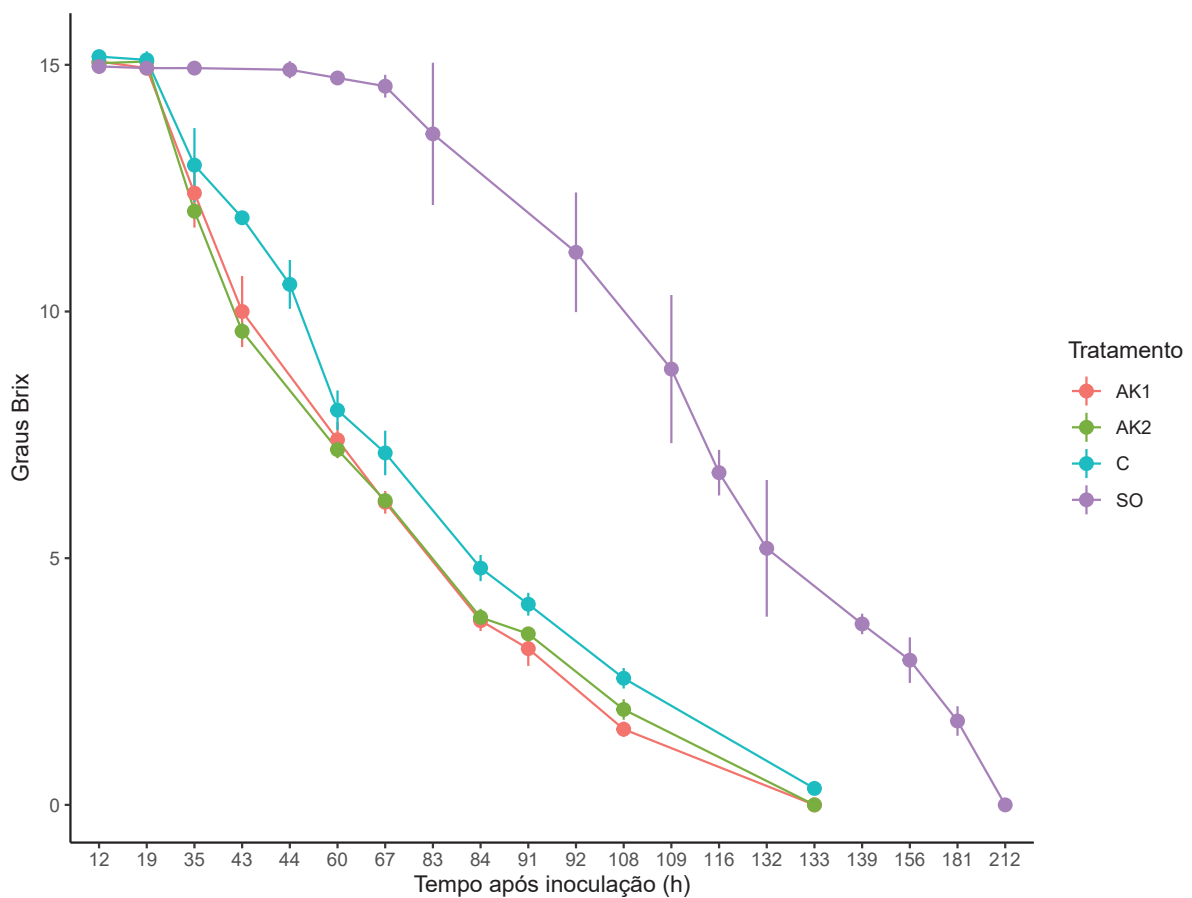
Team, 2021).

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1 Cinética fermentativa

A Figura 10 apresenta o acompanhamento das cinética fermentativa nos tratamentos. É evidente que o tratamento com dióxido de enxofre (SO) teve um tempo de fase *lag* maior aos demais, possivelmente justificado pelo fato de que o processo de aclimação das leveduras deu-se com o uso do mosto sem a presença de sulfitos. O requerimento de adaptação do inóculo ao meio sulfitado persistiu pelas primeiras 48 h, criando um deslocamento entre a curva do tratamento em relação às demais amostras. Os demais tratamentos apresentaram um perfil cinético similar, sendo que em 6 dias após a realização da inoculação, o mostímetro já apresentava valores nulos ou fora de escala, dada a presença do percentual de etanol no meio.

Figura 10 – Cinética fermentativa



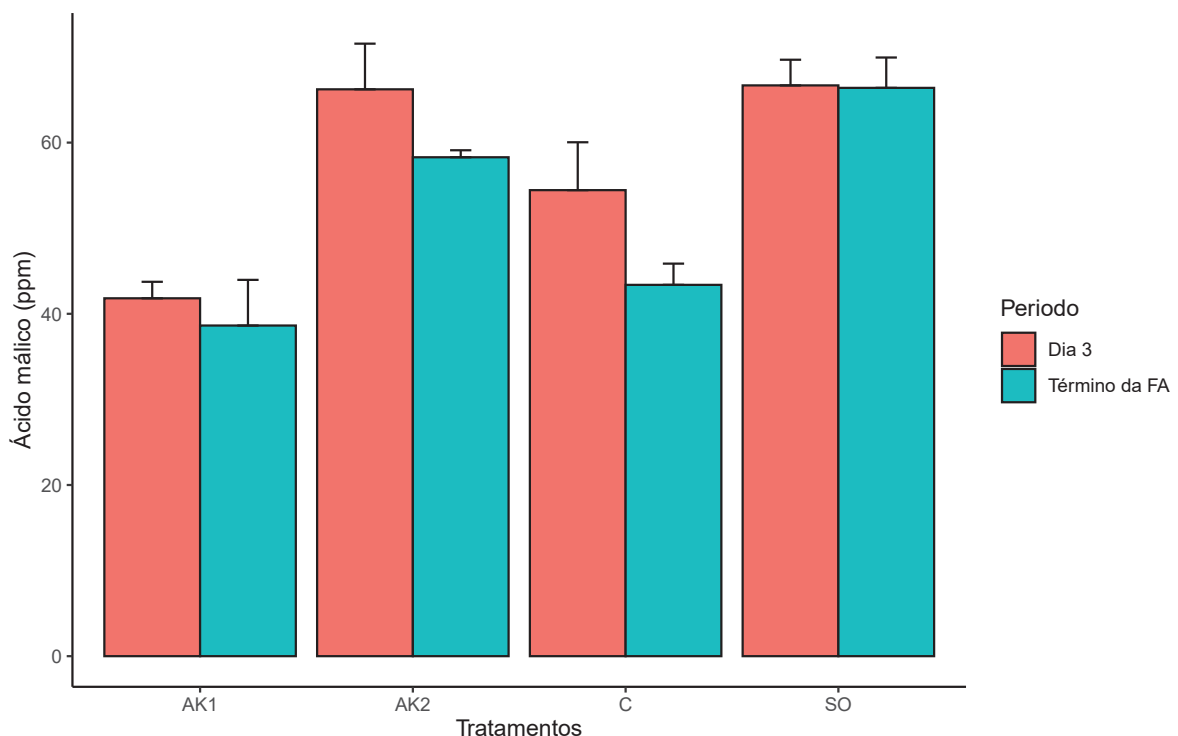
Desconsiderado o deslocamento em virtude do período de aclimação comentado anteriormente, o perfil de decréscimo aferido pelas leituras de sólidos solúveis totais foi similar entre todos os tratamentos.

Sem a implementação de mecanismos de controles de temperatura, o processo fermentativo ocorreu rapidamente, sendo a temperatura aferida durante os controles constante dentro de um intervalo de 23 °C e 25 °C.

3.6.2 Degradação do ácido málico

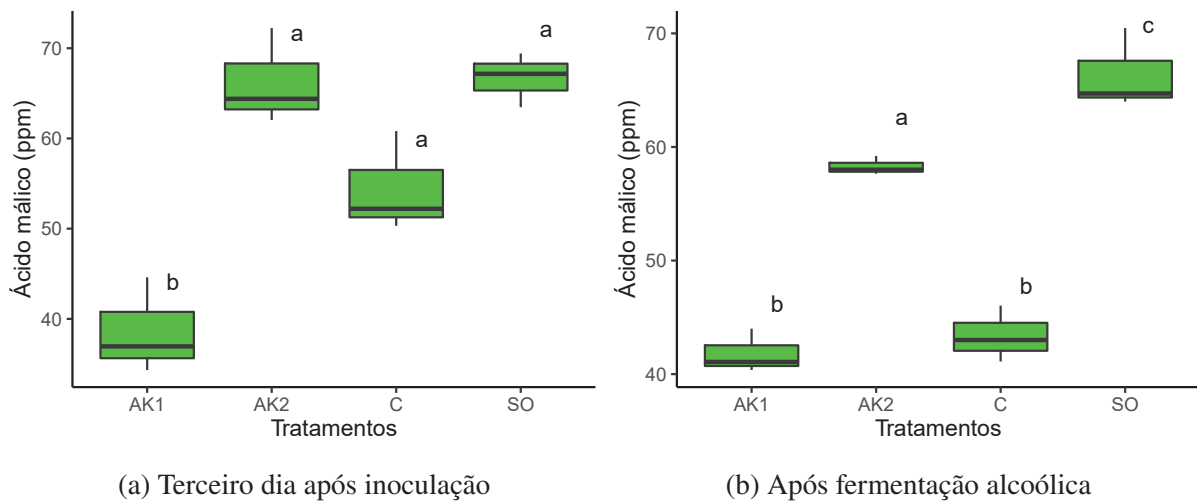
Leveduras e bactérias ácido-láticas estão presentes na superfície das películas da uva e no mosto em níveis muito baixos, mas nos primeiros dias de fermentação podem multiplicar-se, enquanto não forem impostas condições desfavoráveis, tais como a elevação do etanol ou supressão pelo dióxido de enxofre. Ao verificarmos o ácido málico ao final e durante o processo fermentativo (Figura 11), é possível observar que houve uma diminuição do teor do composto, e que já no terceiro dia, o tratamento AK1 já diferia estatisticamente dos demais tratamentos em relação ao teor de ácido málico (Figura 12b). Isto, possivelmente, é justificado pelo baixo poder inibitório do ácido kójico sobre as bactérias Gram-positivas, embora seu papel antimicrobiano sobre bactérias Gram-negativas seja de interesse enológico, uma vez que as acetobactérias são um grupo de bactérias constituído por bacilos Gram-negativos, podendo então, o agente ser utilizado para mitigar problemas de contaminação por podridão ácida na matéria-prima.

Figura 11 – Estimativa do ácido málico no terceiro dia e após o final da fermentação



A condução da fermentação malolática é de interesse na grande maioria dos vinhos, uma vez que busca maior estabilidade com a metabolização do ácido málico e aporta características sensoriais ao produto (LI et al., 2019; LÓPEZ-SEIJAS et al., 2020; BERBEGAL et al., 2017). A possibilidade de um alternativo ao SO₂ na etapa pré-fermentativa com menor impacto sobre as

Figura 12 – Comparação de médias por Tuckey com coeficiente de confiança de 95% em dois estágios do processo de vinificação



bactérias ácido-láticas cria possibilidades do uso de estratégias de co-inoculação e inoculação sequencial de consórcios de leveduras e bactérias, sem abrir mão da proteção que o mosto demanda contra a oxidação enzimática e microrganismos deterioradores. Isto permite, além de um maior controle sobre o processo, uma mitigação da produção de amins biogênicas, já que as bactérias lácticas são consideradas as principais produtoras de amins biogênicas em alimentos fermentados (LICANDRO et al., 2020). Diversos autores afirmam que a fermentação malolática é considerada um fator crucial para a formação de amins biogênicas, especialmente para as de maior importância do ponto de vista toxicológico (SOUFLEROS; BARRIOS; BERTRAND, 1998; MARCOBAL et al., 2006; LONVAUD-FUNEL, 2001; HENRÍQUEZ-AEDO et al., 2016).

O efeito inibitório da presença do SO_2 não apenas aumentou a fase inicial do processo fermentativo – efeito sobre as leveduras inoculadas, bem como teve ação sobre as bactérias ácido-láticas. Ao verificarmos o gráfico dos teores de ácido láctico (Figura 13) observamos o baixo teor do composto ao terceiro dia do processo fermentativo, bem como o menor valor na leitura após o final da fermentação.

3.6.3 Análise de atributos enológicos

Os teores de dióxido de enxofre livre e total estimados após a fermentação são apresentados na Tabela 2. Já na Tabela 3, estão dispostos todos os parâmetros avaliados nas amostras que foram envasadas após, aproximadamente, seis meses do término da fermentação alcoólica. Apesar de aferidos por metodologias diferentes, é entendível o decréscimo dos teores de dióxido de enxofre num período separado por vários meses, especialmente ao levarmos em conta o cenário suscetível a oxidação que os recipientes não atestados propiciam. A taxa da diminuição dos teores de SO_2 ocorrem em função de fatores que incluem a composição do vinho, a quantidade de oxigênio a que o vinho é exposto, as características do recipiente e as condições ambientais sob as quais o vinho é armazenado. A presença do dióxido de enxofre nas amostras nas quais não houve

Figura 13 – Estimativa do ácido láctico no terceiro dia e após o final da fermentação

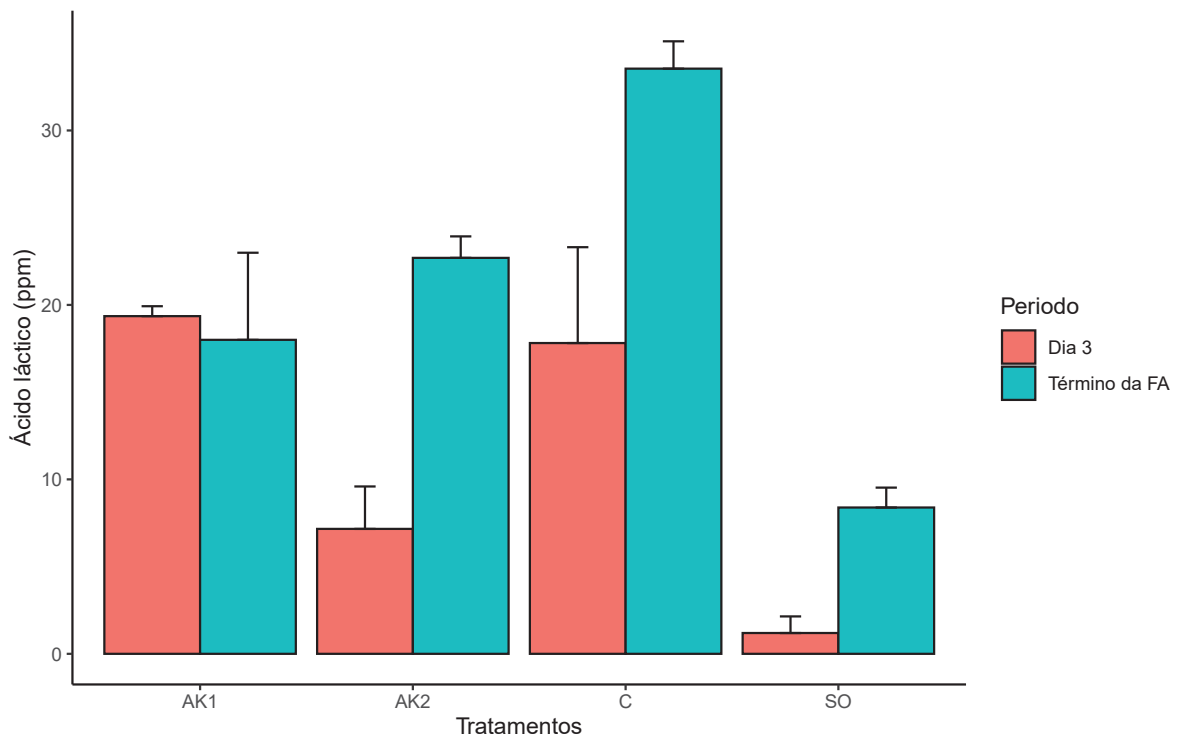


Tabela 2 – Estimativa do teor de dióxido de enxofre após a fermentação alcoólica

Propriedade	AK1	AK2	C	SO
SO ₂ total (mg L ⁻¹)	9,567 _b	11,733 _b	6,267 _b	57,067 _a
SO ₂ livre (mg L ⁻¹)	1,900 _b	2,967 _b	3,400 _b	8,067 _a

Médias indicadas com a mesma letra, por linha, não são significativamente diferentes (Tukey α 0,05).

incorporação do metabissulfito de potássio ocorre pois o composto é um fruto do metabolismo dos microrganismos durante o processo fermentativo.

É sabido que há produção de SO₂ por parte de *S. cerevisiae*, seja selecionada ou espontânea. Estas leveduras são capazes de produzir teores variáveis do composto, dependendo das condições de fermentação e a cepa de levedura. O dióxido de enxofre é um metabolito intermediário no caminho de assimilação do sulfato que incorpora o enxofre à síntese de aminoácidos. Sob certas condições, ela pode ser sintetizada em excesso e depois excretada no meio. Embora o caminho de assimilação do sulfato tenha sido amplamente estudado, pouco se sabe sobre os parâmetros que influenciam a produção de sulfito, e a base molecular responsável pelas diferenças entre as cepas de levedura ainda não foi completamente identificada.

Em relação aos atributos enológicos avaliados na Tabela 3, foram observadas diferenças estatísticas para o atributo de aldeídos totais, muito possivelmente em decorrência da afinidade do dióxido de enxofre presente durante a fermentação aos compostos desta classe gerados durante

Tabela 3 – Resultados das análises de parâmetros enológicos 6 meses após a fermentação alcoólica

Propriedade	AK1	AK2	C	SO
Álcool etílico % (v/v)	10,8 _a	10,8 _a	10,7 _a	10,7 _a
Acidez total (mEq L ⁻¹)	109,70 _a	102,33 _a	102,73 _a	93,03 _a
Acidez volátil (mEq L ⁻¹)	16,23 _a	13,77 _a	18,80 _a	10,97 _a
Acidez fixa (mEq L ⁻¹)	93,47 _a	88,57 _a	83,93 _a	82,07 _a
pH	3,383 _a	3,410 _a	3,417 _a	3,423 _a
Açúcares redutores (g L ⁻¹)	0,60 _a	0,90 _a	0,73 _a	0,93 _a
SO ₂ livre (mg L ⁻¹)	2,33 _a	2,33 _a	3,67 _a	3,33 _a
SO ₂ total (mg L ⁻¹)	8,33 _b	7,33 _b	10,33 _b	25,00 _a
Ácido málico (g L ⁻¹)	0,000 _a	0,013 _a	0,027 _a	0,013 _a
Acetaldeído (mg L ⁻¹)	11,67 _a	16,00 _a	13,00 _a	21,33 _a
Alcoóis superiores (mg L ⁻¹)	313,33 _b	309,00 _b	329,33 _b	440,33 _a
Ésteres (mg L ⁻¹ de acetato de etila)	259,33 _a	257,00 _a	266,67 _a	208,33 _a
Aldeídos (mg L ⁻¹ de aldeído acético)	6,33 _b	8,00 _b	11,33 _b	20,33 _a
Tonalidade em 410nm	0,1883 _a	0,1977 _a	0,1873 _a	0,2220 _a
Tonalidade em 450nm	0,0993 _a	0,1017 _a	0,09700 _a	0,1143 _a
Tonalidade em 480nm	0,0617 _a	0,0637 _a	0,0597 _a	0,0707 _a

Médias indicadas com a mesma letra, por linha, não são significativamente diferentes (Tukey α 0,05).

o bio-processo. Conforme Ferreira et al. (2014), as taxas de formação de compostos carbonílicos durante a oxidação de vinhos estão, em muitos casos, significativamente correlacionadas com o nível de SO₂ combinado do vinho. A publicação de Arias-Pérez et al. (2021) reforça o papel do SO₂ na preservação destes compostos, demonstrando o papel do acetaldeído, que pode surgir durante o processo de maturação de vinhos em virtude da oxidação do etanol. O acetaldeído, devido à sua maior afinidade, desloca os outros aldeídos e os libera de suas formas sulfonadas. Embora sua contribuição final para o aroma do vinho não seja bem compreendida, os aldeídos que têm 8-10 átomos de carbono são considerados como odorantes fortes. Estes compostos incluem (E)-2-nonenal, octanal, nonanal, decanal e (E,Z)-2,6-nonadienal (ESLAHI; FAHIMI; SARDARIAN, 2017). Já a concentração de acetaldeído não diferiu entre os tratamentos.

Outro ponto em que houve diferença foi o valor médio de dióxido de enxofre total, em que um valor superior no tratamento com SO₂ foi observado, embora este seja consideravelmente inferior aos apresentados ao final da fermentação alcoólica (Tabela 2), demonstrando o que já era esperado, que a fração combinada do SO₂ é degradada, especialmente sob condições favoráveis a processos oxidativos.

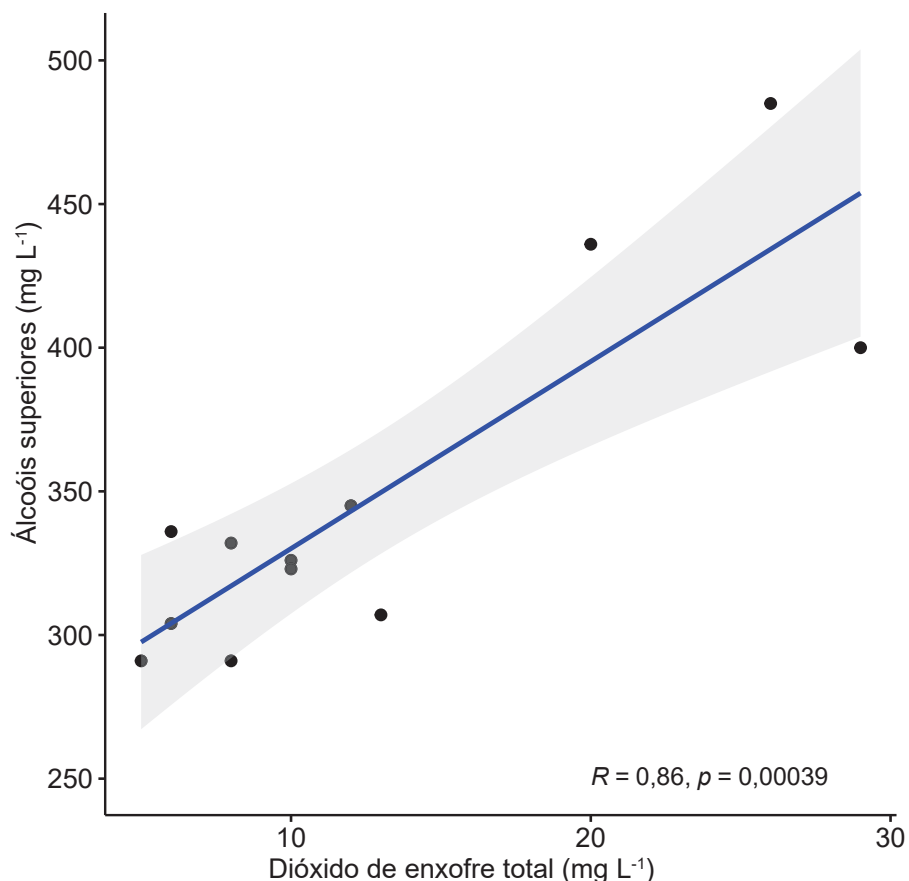
O fato de não haver diferença para o conteúdo de SO₂ livre é interessante, o que demonstra a importância da incorporação desse composto após o final do processo fermentativo, a fim de que a fração do composto com maior grau de reatividade seja presente. Mesmo para o tratamento com o SO₂, imediatamente após o processo fermentativo (Tabela 2), o valor do SO₂ livre já se apresentava insuficiente, já que grande parte do SO₂ se apresenta na forma combinada. Esta

forma não apenas se apresenta ligada ao acetaldeído, composto ao qual tem elevado grau de afinidade, mas a outros aldeídos e classes de compostos que os sulfitos tem afinidade, processo este que pode justificar a diferença para aldeídos totais após o período de 6 meses observada.

Em relação aos valores referentes à acidez, pH e percentual de etanol, estes sugerem que não há um impacto do ácido kójico em relação ao tratamento com dióxido e enxofre e controle. Talvez uma pequena diferença pudesse ser esperada na acidez e pH, uma vez que um ácido foi incorporado ao meio como tratamento, o que não se concretizou nos dados observados.

O conteúdo de alcoóis superiores totais diferiu entre o tratamento com o dióxido de enxofre em relação aos demais, o que é entendível já que o composto desempenha um papel crucial na formação esteres e alcoóis durante o processo de maturação de vinhos (CHEN et al., 2017), embora esta diferença não tenha sido observada na análise de ésteres totais. A correlação entre os compostos foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson (Figura 14).

Figura 14 – Análise de correlação entre os teores de dióxido de enxofre total e de alcoóis superiores



Todos os valores dos teores para sulfatos totais apresentaram-se abaixo de $0,7 \text{ g L}^{-1}$ de K_2SO_4 , sendo o atributo excluído da apresentação.

A análise de compostos voláteis apresentada na Tabela 4 demonstra diferenças estatísticas para o composto metional e isobutiraldeído no tratamento SO, em ambos os casos o distinguindo dos tratamentos com o ácido kójico. Os descritores aromáticos atribuídos para estes compostos,

assim como para o fenilacetaldeído, são de "legumes cozidos" e "frutas secas" (ARIAS-PÉREZ et al., 2021). Já para a damascenona e ionona os descritores variam muito em função da matriz (TOMASINO; BOLMAN, 2021), mas remetem a notas florais e frutadas.

Tabela 4 – Análise de compostos carbonílicos voláteis 10 meses após a fermentação alcoólica, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$

Compostos carbonílicos	AK1	AK2	C	SO
β -damascenona	3,49 _a	2,38 _a	1,94 _a	3,8 _a
β -fenilacetaldeído	14,8 _a	9,5 _a	12,7 _a	13,9 _a
α -ionona	0,26 _a	0,31 _a	0,33 _a	0,3 _a
β -ionona	0,18 _a	0,24 _a	0,24 _a	0,21 _a
isobutiraldeído	6,9 _b	6,7 _b	9,1 _{ab}	13,8 _a
metional	2,9 _b	3,1 _b	2,7 _b	6,2 _a

Médias indicadas com a mesma letra, por linha, não são significativamente diferentes (Tukey α 0,05).

3.6.4 Avaliação sensorial

A distribuição dos valores atribuídos pelos julgadores, para cada uma das variáveis avaliadas, está disposta na Figura 17.

As elipses de confiança na análise de componentes principais (Figura 15) confirmam a proximidade dos perfis sensoriais dos tratamentos com o ácido kójico (AK1 e AK2), sendo o tratamento com a maior concentração de ácido kójico situado mais próximo ao tratamento com o dióxido de enxofre (SO). As dimensões do plano em relação às variáveis (Figura 16) demonstra a separação de grupamentos de por algumas características: relacionados à notas oxidadas (notas de frutas em calda) no terceiro quadrante, notas relacionadas à qualidade visual, adstringência e frescor (notas de frutas em calda) no primeiro quadrante, apreciação olfativa crescendo quase juntamente ao eixo y, e as observações para dulçor, intensidade olfativa e apreciação gustativa no segundo quadrante.

Em relação à análise estatística, a grade disposta na Figura 18 identifica os atributos que apresentaram diferenciação estatística em relação às médias. É possível observar que o atributo referente aos aromas de frutas em calda, que usualmente remete a produtos com algum grau de oxidação, demonstrou diferenciação: o tratamento controle apresentando um valor superior, enquanto os tratamentos AK2 e SO, valores significativamente inferiores à média. Esta observação, aliada ao resultado observado para as notas de frutas frescas, que seriam características antagônicas no quesito do caractere oxidativo, sugere que os tratamentos com o ácido kójico foram capazes de preservar, até certo ponto, as notas de frescor e conter a evolução da característica das notas de frutas em calda, que remetem a oxidação, sendo o tratamento AK2 igualmente eficaz ao SO, neste aspecto.

Figura 15 – Elipses de confiança e pontos médios da Análise de Componentes Principais

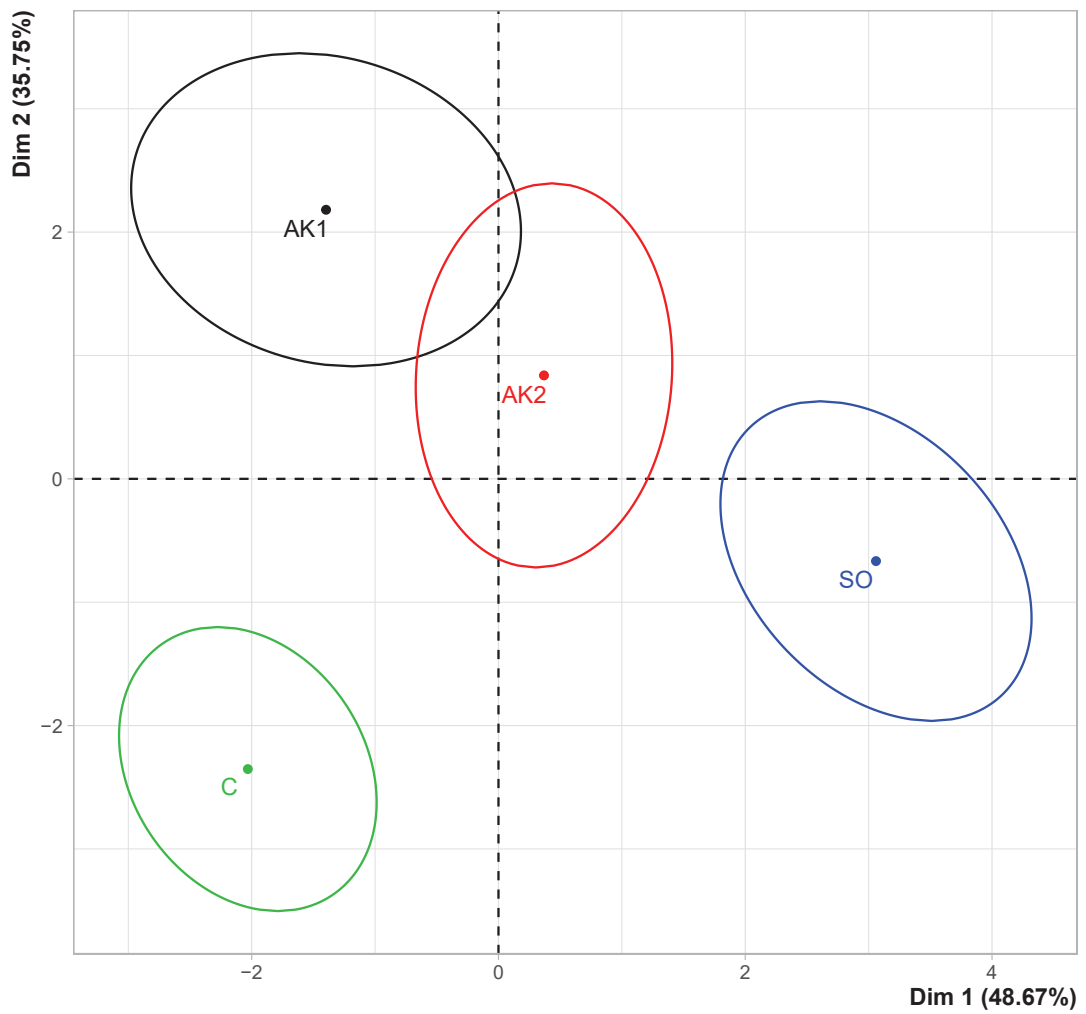


Figura 16 – Distribuição das variáveis na Análise de Componentes Principais

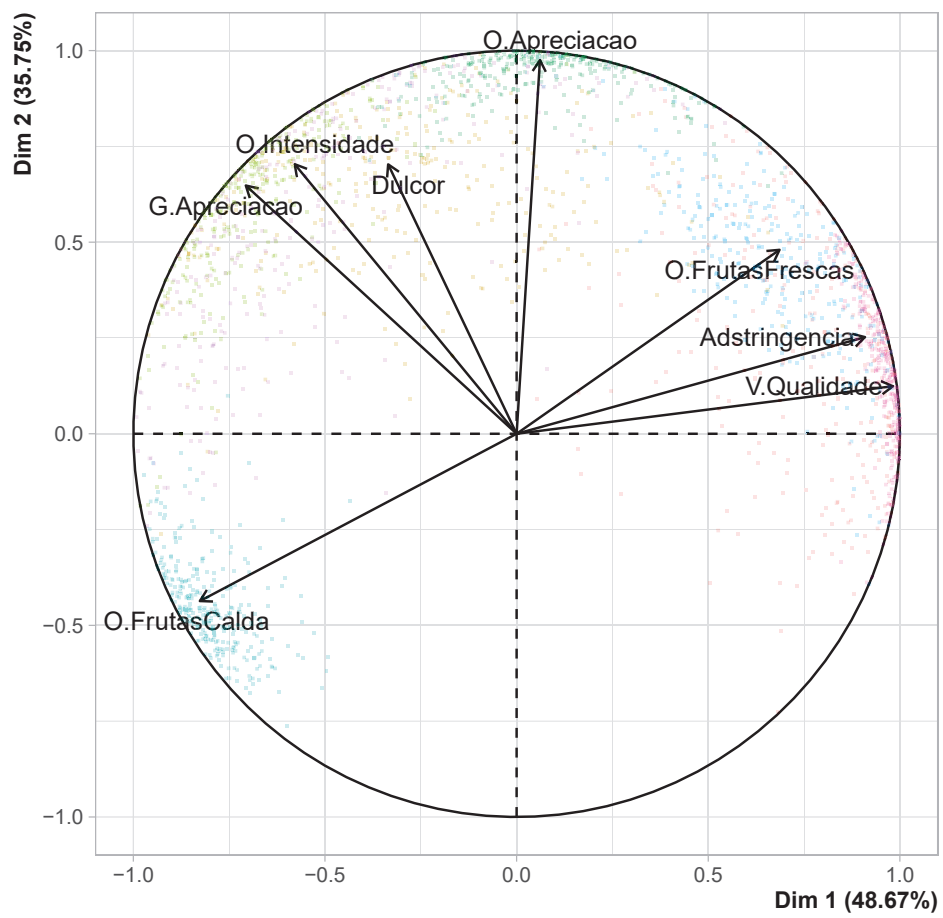


Figura 17 – Histogramas das observações na análise sensorial, junto da distribuição normal com média e variância dos respectivos valores estimados para cada descritor

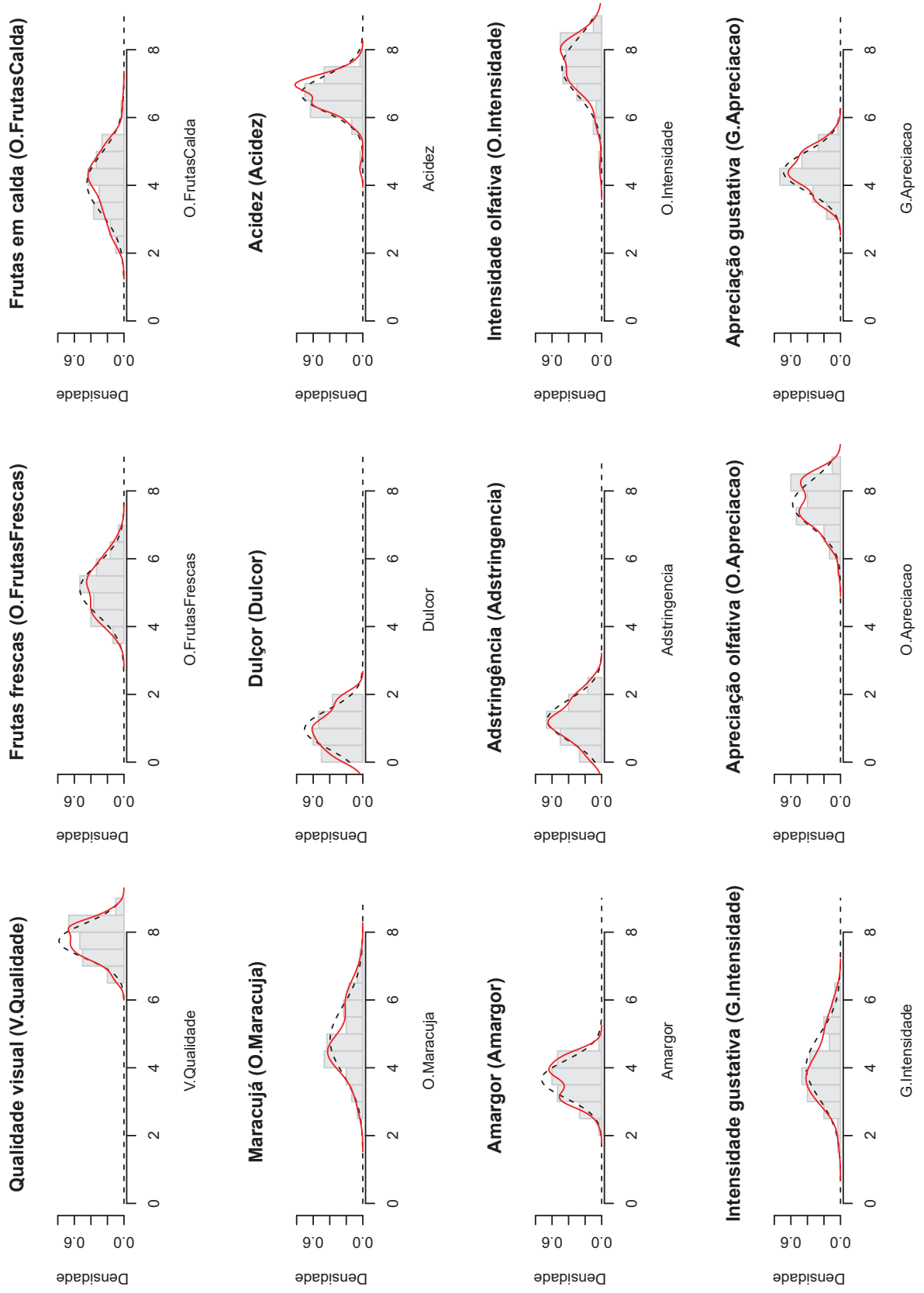


Figura 18 – Médias ajustadas (em rosa: produto significativamente abaixo da média, em azul significativamente acima da média)

	O.FrutasCalda	G.Apreciacao	O.Intensidade	Dulcor	G.Intensidade	O.Apreciacao	Amargor	O.Maracuja	O.FrutasFrescas	Adstringencia	V.Qualidade	Acidez
C	4.873	4.363	7.407	0.8467	3.947	7.127	3.643	4.367	4.64	1.023	7.39	6.533
AK1	4.247	4.867	7.88	1.08	3.967	7.967	3.67	4.86	5.313	1.233	7.547	6.633
AK2	3.527	4.327	7.387	1.22	4.407	7.907	3.573	5.087	4.913	1.193	7.887	6.74
SO	3.573	4.073	7.28	0.7467	3.8	7.47	3.76	4.967	5.52	1.493	8.153	6.893

O atributo de apreciação global enfatiza um valor superior à média para o tratamento AK1, e inferior à média ao SO, embora, para parâmetros gerais, todos os tratamentos terem sido julgados como demandantes de um incremento de qualidade, como produtos comerciais. Isto se dá, muito possivelmente, pela falta de tratamentos de clarificação no mosto e vinho, bem como, de filtração pré-envase. Isto justifica a não observação destas diferenças visuais nas análises de tonalidade (Tabela 3), já que para a condução das leituras são realizadas filtragens às quais as amostras da análise sensorial não foram submetidas, e que eliminam partículas em suspensão que afetam a percepção visual dos vinhos.

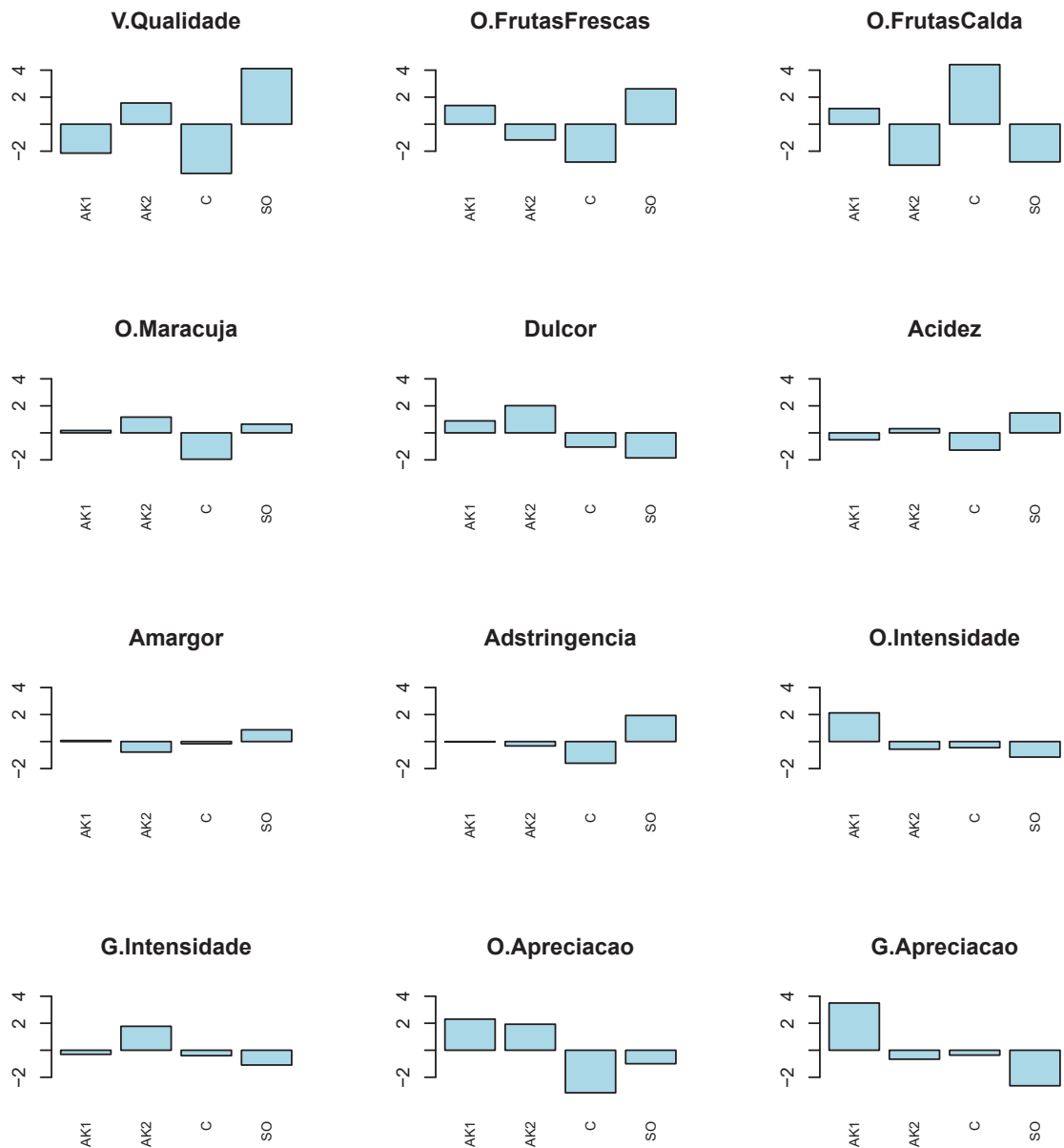
A diferença estatística observada para o dulçor no tratamento AK2 pode estar ligada ao fato de o ácido kójico ser utilizado como material de partida para a síntese de intensificadores de sabor, ou seja, o composto pode ter obtido conformações durante o processo fermentativo que afetem a percepção do palato para esta característica, porém análises de compostos específicos seriam necessárias para afirmações a este respeito.

O tratamento AK1 também demonstrou destaque na avaliação dos atributos referentes a intensidade e apreciação olfativa, enquanto o tratamento controle foi observado negativamente nos atributos de apreciação olfativa, aroma de frutas frescas e qualidade visual.

Embora não tenham sido observadas diferenças nas metodologias de quantificação de ésteres, a diferença observada em aldeídos totais para o tratamento SO pode ter desempenhado um papel negativo na percepção do painel, uma vez que os compostos de 8 a 10 carbonos são considerados forte odorantes. A diferença verificada para o teor de metional também pode ter contribuído negativamente na avaliação dos julgadores. Porém, o tratamento com o dióxido de enxofre (SO) demonstrou-se superior nos atributos de aromas de frutas frescas e qualidade visual, o que leva a concluir que apesar da presença do metional e isobutiraldeído, a ação do agente foi suficiente para preservar os compostos que sobrepujam a característica aromática destes compostos. Para os atributos acidez, amargor, adstringência, intensidade gustativa e aroma de maracujá, não foi observada diferença significativa.

A Figura 19 traz as variações dos julgamentos em relação às médias, em gráficos de barras, de modo a possibilitar uma forma de visualização diferenciada.

Figura 19 – Gráfico de barras por linha em relação ao conjunto de variáveis



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A observação do processo fermentativo serviu como base para sugerir que a presença do ácido kójico não impacta a cinética da fermentação alcoólica. Além disto, a menor inibição do composto sobre as bactérias Gram-positivas permite que sejam exploradas novas estratégias de co-inoculação ou inoculação sequencial de consórcios leveduras/bactérias, visando a degradação do ácido málico em concorrentemente ou imediatamente após a fermentação alcoólica. A capacidade seletiva de supressão de bactérias Gram-negativas e seu papel inibitório sobre enzimas cúpricas possibilitam ao ácido kójico desempenhar um papel estratégico como alternativo ao SO₂ na etapa pré-fermentativa. Estas possibilidades abrem um leque para novas pesquisas, uma vez que devem ser observadas as interações entre os microrganismos, a depleção de compostos nitrogenados e outros compostos podem levar a características sensoriais distintas.

Os resultados observados ajudam a levar ao questionamento do uso do dióxido de enxofre na etapa pré-fermentativa, especialmente quando são levantados alternativos e práticas que não apenas possibilitam uma redução do teor final de dióxido enxofre no vinho, mas podem contribuir para ganhos no espectro organoléptico. Além disto, sem a restritividade do SO₂ na etapa pré-fermentativa, a pesquisa na seleção de leveduras não-*Saccharomyces* pode ser expandida. O cenário, como demonstrado neste trabalho, favorece a fermentação malolática, que além de impactar nas características sensoriais, favorece a estabilidade microbiológica dos produtos.

De uma maneira geral, o ácido kójico se mostra um composto alternativo ao SO₂ pré-fermentativo com potencial para serem realizados mais estudos, especialmente na busca atual por oriundos de métodos de vinificação que preconizam um manejo diferenciado na produção da matéria-prima, que minimizem o impacto ambiental, valorizam o terroir microbiológico e, na etapa de elaboração dos vinhos, minimizam o uso de sulfitos, mas sem abrir mão da segurança e qualidade de produto. Além disto, o uso associado do ácido kójico pré-fermentativo e possibilidade da adição de sulfitos após o final do processo fermentativo permitiria, apesar de não eliminar a presença de sulfitos, uma redução do teor deste no produto final.

4.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A realização dos experimentos durante o período pandêmico dificultou a condução de experimentos durante a realização deste trabalho, especialmente nos possíveis ensaios em menores escalas voltados a avaliação do ácido kójico em mostos problemáticos e otimizações em busca de caracteres específicos.

Em função disto, recomenda-se para trabalhos futuros a avaliação da eficácia do ácido kójico na supressão de bactérias acéticas, de modo a verificar a possível utilização do composto

em mostos acometidos por podridão ácida. Da mesma maneira, a supressão da enzima lacase poderia ser melhor compreendida, de modo a estabelecer doses passíveis de evitar a deterioração de mostos oriundos de uvas afetadas por podridão cinzenta.

Por fim, recomenda-se que adotando o ácido kójico e isentando o mosto de sulfitos na etapa pré-fermentativa, realize-se o emprego de processos de otimização utilizando estratégias de inoculações, seja de leveduras não-*Saccharomyces* ou consórcios de leveduras e bactérias, que aliados a controles de suplementação, podem servir de base para a obtenção de características específicas durante o processo de vinificação.

REFERÊNCIAS

- AL-FAKIH, A. A.; ALMAQTRI, W. Q. A. Overview on antibacterial metabolites from terrestrial aspergillus spp. **Mycology**, Taylor & Francis, v. 10, n. 4, p. 191–209, 2019.
- ARIAS-PÉREZ, I. et al. Insights on the role of acetaldehyde and other aldehydes in the odour and tactile nasal perception of red wine. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 361, p. 130081, 2021.
- AZEVEDO, L. D. et al. Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8670–8680, 2007.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases—occurrence and properties. **FEMS microbiology reviews**, Oxford University Press, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.
- BARBE, J.-C. et al. Role of carbonyl compounds in so₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 48, n. 8, p. 3413–3419, 2000.
- BAUMES, R. Wine aroma precursors. In: **Wine chemistry and biochemistry**. [S.l.]: Springer, 2009. p. 251–274.
- BEÉLIK, A. Kojic acid. In: **Advances in carbohydrate chemistry**. [S.l.]: Elsevier, 1956. v. 11, p. 145–183.
- BENTLEY, R. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Natural product reports**, Royal Society of Chemistry, v. 23, n. 6, p. 1046–1062, 2006.
- BERBEGAL, C. et al. Lowering histamine formation in a red ribera del duero wine (spain) by using an indigenous o. oeni strain as a malolactic starter. **International Journal of Food Microbiology**, Elsevier B.V., v. 244, p. 11–18, 2017. ISSN 01681605. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85007578901&doi=10.1016%2fj.ijfoodmicro.2016.12.013&partnerID=40&md5=8f315237884545a1c88b3cc70ad4e003>>.
- BEUCHAT, L. R. **Food and beverage mycology**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 1987.
- BINATI, R. et al. Contribution of non-saccharomyces yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on lachancea thermotolerans, metschnikowia spp. and starmerella bacillaris strains isolated in italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, 2020.
- BRASIL, M. Portaria sda nº 411, de 30 de setembro de 2021. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária**, 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sda-n-411-de-30-de-setembro-de-2021-350627593a>>.
- BRTKO, J. et al. Kojic acid and its derivatives: history and present state of art. **Central european journal of public health**, CZECH MEDICAL ASSOCIATION JE PURKYNE, v. 12, n. SUPP, p. S16–S17, 2004.

BUENO, M.; CARRASCÓN, V.; FERREIRA, V. Release and formation of oxidation-related aldehydes during wine oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 608–617, 2016.

BUENO, M. et al. Formation and accumulation of acetaldehyde and strecker aldehydes during red wine oxidation. **Frontiers in chemistry**, Frontiers, v. 6, p. 20, 2018.

BUENO, M.; ZAPATA, J.; FERREIRA, V. Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1369, p. 33–42, 2014.

BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CARABIN, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. **Regulatory toxicology and pharmacology**, Elsevier, v. 33, n. 1, p. 80–101, 2001.

BUSH, R. K.; TAYLOR, S. L.; BUSSE, W. A critical evaluation of clinical trials in reactions to sulfites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Elsevier, v. 78, n. 1, p. 191–202, 1986.

CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Wiley Online Library, v. 46, n. 12, p. 982–985, 1994.

CANONICO, L. et al. Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-saccharomyces yeasts under different aeration conditions. **Food microbiology**, Elsevier, v. 84, p. 103247, 2019.

CARRETÉ, R. et al. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the atpase activity of oenococcus oeni. **FEMS Microbiology Letters**, v. 211, n. 2, p. 155–159, 2002.

CASTRO-MARÍN, A. et al. Volatile and fixed composition of sulphite-free white wines obtained after fermentation in the presence of chitosan. **LWT**, v. 93, p. 174–180, 2018.

CERBARO, D. et al. Influência da adição de taninos elágicos na qualidade de vinhos merlot da região da campanha. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Directory of Open Access Journals, v. 3, n. 3, p. 149–160, 2016.

CHAUDHARY, J.; PATHAK, A.; LAKHAWAT, S. Production technology and applications of kojic acid. **Annual Research & Review in Biology**, p. 3165–3196, 2014.

CHEN, J. S.; WEI, C. I.; MARSHALL, M. R. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, ACS Publications, v. 39, n. 11, p. 1897–1901, 1991.

CHEN, K. et al. Use of lysozyme and oligomeric proanthocyanidin to reduce sulfur dioxide and the evolution of volatile compounds in italian riesling ice wine during aging process. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017.

CIANI, M.; COMITINI, F. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. **Current Opinion in Food Science**, Elsevier, v. 1, p. 1–6, 2015.

COMUZZO, P.; ZIRONI, R. Biotechnological strategies for controlling wine oxidation. **Food Engineering Reviews**, Springer, v. 5, n. 4, p. 217–229, 2013.

CORDENTE, A. G. et al. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. **FEMS yeast research**, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 9, n. 3, p. 446–459, 2009.

CRAVERO, F. et al. Post-harvest control of wine-grape mycobiota using electrolyzed water. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 35, p. 21–28, 2016.

CRAVERO, M. C. Organic and biodynamic wines quality and characteristics: A review. **Food chemistry**, Elsevier, 2019.

CULLERÉ, L.; CACHO, J.; FERREIRA, V. An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 55, n. 3, p. 876–881, 2007.

DANILEWICZ, J. C.; SECCOMBE, J. T.; WHELAN, J. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. **American journal of enology and viticulture**, Am Soc Enol Viticulture, v. 59, n. 2, p. 128–136, 2008.

DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in food**. [S.l.]: CRC press, 2005.

DUBERNET, M. Recherches sur la tyrosinase de vitis vinifera et la laccase de botrytis cinerea. **Applications technologiques. These Doctorat**, 1974.

ESCUADERO, A. et al. Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4268–4272, 2000.

ESLAHI, H.; FAHIMI, N.; SARDARIAN, A. R. Chemical composition of essential oils. **Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications**, p. 119–71, 2017.

EYONG, K. O. et al. A new source of kojic acid isolated from kingella africana: A possible precursor for quinine biosynthesis. **Rasayan journal of chemistry**, v. 5, n. 4, p. 477–480, 2012.

FERRAR, P. H.; WALKER, J. R. Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study. **Journal of Food Biochemistry**, Wiley Online Library, v. 20, n. 6, p. 15–30, 1996.

FERREIRA, V. et al. Key changes in wine aroma active compounds during bottle storage of spanish red wines under different oxygen levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 41, p. 10015–10027, 2014.

FERREIRA, V. et al. Oxygen consumption by red wines. part i: consumption rates, relationship with chemical composition, and role of so₂. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 63, n. 51, p. 10928–10937, 2015.

FUJIMOTO, N. et al. Induction of thyroid tumours in (c57bl/6n × c3h/n) f1 mice by oral administration of kojic acid. **Food and chemical toxicology**, Elsevier, v. 36, n. 8, p. 697–703, 1998.

GARDE-CERDÁN, T. et al. Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by pef during ageing without so₂. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 469–476, 2008.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. Ire partie: les équilibres des anthocyanes et des tanins. **OENO One**, v. 18, n. 3, p. 195–217, 1984.

GUERRERO, R. F.; CANTOS-VILLAR, E. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. **Trends in Food Science & Technology**, Elsevier, v. 42, n. 1, p. 27–43, 2015.

HAZZAA, M. et al. High production of kojic acid crystals by isolated aspergillus oryzae var. effusus nrc14. **J Appl Sci Res**, v. 9, n. 3, p. 1714–1723, 2013.

HENRÍQUEZ-AEDO, K. et al. Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of chilean red wines. **LWT - Food Science and Technology**, Academic Press, v. 68, p. 183–189, 2016. ISSN 00236438. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84962594053&doi=10.1016%2fj.lwt.2015.12.003&partnerID=40&md5=0a42385a2cfafdcf676bc0f6dbff7cce>>.

HUSSON, F.; LE, S.; CADORET, M. **SensoMineR: Sensory Data Analysis**. [S.l.], 2020. R package version 1.26. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=SensoMineR>>.

ISHAQ, U. et al. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from aspergillus flavus. **Journal of applied microbiology**, Wiley Online Library, v. 119, n. 4, p. 1035–1045, 2015.

IYER, G.; CHATTOO, B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, magnaporthe grisea. **FEMS Microbiology Letters**, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 227, n. 1, p. 121–126, 2003.

KAYAHARA, H. et al. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. **Agricultural and biological chemistry**, Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, v. 54, n. 9, p. 2441–2442, 1990.

KOTANI, T. et al. Bacteriostatic activities and metal chelation of kojic acid analogs. **Agricultural and Biological Chemistry**, Taylor & Francis, v. 40, n. 4, p. 765–770, 1976.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems – an overview. **Critical reviews in biotechnology**, Taylor & Francis, v. 25, n. 1-2, p. 1–30, 2005.

LAKHAWAT, S.; CHAUDHARY, J.; PATHAK, A. N. Production of kojic acid by aerobic aspergillus fermentation. **BioProcessing Journal**, v. 13, n. 3, 2014.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. et al. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. [S.l.]: Springer, 2010. v. 2.

LEA, A. G.; FORD, G. D.; FOWLER, S. Analytical techniques for the estimation of sulphite binding components in ciders and wines. **International journal of food science & technology**, Wiley Online Library, v. 35, n. 1, p. 105–112, 2000.

LI, H.; GUO, A.; WANG, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food chemistry**, Elsevier, v. 108, n. 1, p. 1–13, 2008.

LI, H. et al. Aromatic property of cherry wine produced by malolactic fermentation of controlled and spontaneous on the bacterial evolution. **International Journal of Food Properties**, Taylor and Francis Inc., v. 22, n. 1, p. 1270–1282, 2019. ISSN 10942912. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85069517029&doi=10.1080%2f10942912.2019.1640736&partnerID=40&md5=554d441e1ac99801292d4a3e27cac4c7>>.

LICANDRO, H. et al. How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products? **Food Control**, Elsevier Ltd, v. 110, 2020. ISSN 09567135. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85074239305&doi=10.1016%2fj.foodcont.2019.106957&partnerID=40&md5=066541cfd0861be95a140173a08b10af>>.

LIU, X. et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of kojic acid grafted chitosan oligosaccharide. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 62, n. 1, p. 297–303, 2013.

LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: Role of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Elsevier, v. 199, n. 1, p. 9–13, 2001. ISSN 03781097. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0035873493&doi=10.1016%2fS0378-1097%2801%2900157-4&partnerID=40&md5=4ec35646c1e8db2fb3f93f3b6d8465fc>>.

LOPES, F. C. et al. Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading aspergillus niger. **Enzyme research**, Hindawi, v. 2011, 2011.

LOPEZ, R. et al. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 966, n. 1-2, p. 167–177, 2002.

LÓPEZ-SEIJAS, J. et al. Evaluation of malolactic bacteria associated with wines from albariño variety as potential starters: Screening for quality and safety. **Foods**, MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 9, n. 1, 2020. ISSN 23048158. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85078897531&doi=10.3390%2ffoods9010099&partnerID=40&md5=53578ff09812328d483bc66d103931ed>>.

MARCHANTE, L. et al. Natural extracts from grape seed and stem by-products in combination with colloidal silver as alternative preservatives to so₂ for white wines: Effects on chemical composition and sensorial properties. **Food Research International**, v. 125, 2019.

MARCOBAL, Á. et al. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. **Journal of Food protection**, International Association for Food Protection, v. 69, n. 2, p. 397–404, 2006.

MAY, O. et al. The production of kojic acid by aspergillus flavus. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 53, n. 2, p. 774–782, 1931.

MAYR, C. et al. Quantitative analysis by gc-ms/ms of 18 aroma compounds related to oxidative off-flavor in wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 13, p. 3394–3401, 2015.

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R.; OTWELL, W. S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, Taylor & Francis, v. 32, n. 3, p. 253–273, 1992.

MITANI, H. et al. Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator. **European journal of pharmacology**, Elsevier, v. 411, n. 1-2, p. 169–174, 2001.

MOHAMAD, R. et al. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, Academic Journals, v. 5, n. 2, p. 24–37, 2010.

- MONFORTE, A.; MARTINS, S.; FERREIRA, A. S. Strecker aldehyde formation in wine: New insights into the role of gallic acid, glucose, and metals in phenylacetaldehyde formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 10, p. 2459–2466, 2018.
- MOREIRA, N. et al. Development and optimization of a hs-spme-gc-ms methodology to quantify volatile carbonyl compounds in port wines. **Food Chemistry**, v. 270, p. 518–526, 2019.
- MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine chemistry and biochemistry**. [S.l.]: Springer, 2009. v. 378.
- MORENO, J.; PEINADO, R. **Enological chemistry**. [S.l.]: Academic Press, 2012.
- MORTON, H. E. et al. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *aspergillus luteo-virescens*. **Journal of bacteriology**, American Society for Microbiology (ASM), v. 50, n. 5, p. 579, 1945.
- MOSLEMI, D. Radioprotective effects of kojic acid against mortality induced by gamma irradiation in mice. **Saudi Med J**, v. 30, n. 4, p. 490–493, 2009.
- MURAO, S. et al. A novel laccase inhibitor, n-hydroxyglycine, produced by *penicillium citrinum* yh-31. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Taylor & Francis, v. 56, n. 6, p. 987–988, 1992.
- NEHME, N.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P. Quantitative study of interactions between *saccharomyces cerevisiae* and *oenococcus oeni* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 685–693, 2008.
- NOBORU, M. **Process for preparing alcoholic beverage**. [S.l.]: Google Patents, 1963. US Patent 3,082,089.
- NOHYNEK, G. J. et al. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4h-pyran-4-one]. **Food and chemical toxicology**, Elsevier, v. 42, n. 1, p. 93–105, 2004.
- NOVOTNÝ, L. et al. Kojic acid—a new leading molecule for a preparation of compounds with an anti-neoplastic potential. **Neoplasma**, v. 46, n. 2, p. 89–92, 1999.
- NUNES, C. et al. Chitosan-genipin film, a sustainable methodology for wine preservation. **Green Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 5331–5341, 2016.
- OLIVEIRA, C. et al. Quinones as strecker degradation reagents in wine oxidation processes. **Food Chemistry**, v. 228, p. 618–624, 2017.
- OLIVERO, S. P.; TRUJILLO, J. P. A new method for the determination of short-chain fatty acids from the aliphatic series in wines by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, n. 1-2, p. 59–66, 2011.
- ÖZTÜRK, G. et al. Synthesis of 4 (1h)-pyridinone derivatives and investigation of analgesic and antiinflammatory activities. **II Farmaco**, Elsevier, v. 56, n. 4, p. 251–256, 2001.
- PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica chimica acta**, Elsevier, v. 333, n. 1, p. 19–39, 2003.

PETROZZIELLO, M. et al. Impact of increasing levels of oxygen consumption on the evolution of color, phenolic, and volatile compounds of nebbiolo wines. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. APR, 2018.

POZO-BAYÓN, M. Á.; ANDÚJAR-ORTIZ, I.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. **Food research international**, Elsevier, v. 42, n. 7, p. 754–761, 2009.

R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2021. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RAUHUT, D. **Usage and formation of sulphur compounds**. [S.l.: s.n.], 2009. 181-207 p.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2006. v. 1.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of Enology, volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2006.

SAEEDI, M.; ESLAMIFAR, M.; KHEZRI, K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Elsevier, v. 110, p. 582–593, 2019.

SAITO, K. Über die säurebildung bei aspergillus oryzae. **Shokubutsugaku Zasshi**, The Botanical Society of Japan, v. 21, n. 240, p. 7–11, 1907.

SATO, K. et al. On the formation of 5-keto-d-fructose and three γ -pyrone compounds from d-sorbitol by acetobacter suboxydans. **Agricultural and Biological Chemistry**, Taylor & Francis, v. 31, n. 7, p. 877–879, 1967.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of aspergillus niger—a review. **Applied microbiology and biotechnology**, Springer, v. 59, n. 4-5, p. 426–435, 2002.

SHOW, P. L. et al. Overview of citric acid production from aspergillus niger. **Frontiers in Life Science**, Taylor & Francis, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2015.

SON, S.; MOON, K.; LEE, C. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 73, n. 1, p. 23–30, 2001.

SONNI, F. et al. Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: Effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. **Food chemistry**, Elsevier, v. 129, n. 3, p. 1193–1200, 2011.

SONNI, F. et al. Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, v. 59, n. 8, p. 3940–3949, 2011.

SOUFLEROS, E.; BARRIOS, M.-L.; BERTRAND, A. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. **American Journal of Enology and Viticulture**, Am Soc Enol Viticulture, v. 49, n. 3, p. 266–278, 1998.

SUN, Y. et al. Effect of added sulphur dioxide levels on the fermentation characteristics of strawberry wine. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 3, p. 446–451, 2016.

TANIGAKI, H.; OBATA, H.; TOKUYAMA, T. The determination of kojic acid using the stopped-flow method. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, The Chemical Society of Japan, v. 53, n. 11, p. 3195–3197, 1980.

TERADA, O.; SUZUKI, S.; KINOSHITA, S. Occurrence of 5-ketofructose during kojic acid formation from sorbose by acetobacter species. **Agricultural and Biological Chemistry**, Taylor & Francis, v. 25, n. 11, p. 871–872, 1961.

TOMASINO, E.; BOLMAN, S. The potential effect of β -ionone and β -damascenone on sensory perception of pinot noir wine aroma. **Molecules**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 26, n. 5, p. 1288, 2021.

UCHINO, K. et al. Kojic acid as an anti-speck agent. **Agricultural and biological chemistry**, Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, v. 52, n. 10, p. 2609–2610, 1988.

VALLY, H.; MISSO, N. L.; MADAN, V. Clinical effects of sulphite additives. **Clinical & Experimental Allergy**, Wiley Online Library, v. 39, n. 11, p. 1643–1651, 2009.

VURALHAN, Z. et al. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Am Soc Microbiol, v. 69, n. 8, p. 4534–4541, 2003.

WATERHOUSE, A. L.; NIKOLANTONAKI, M. Quinone reactions in wine oxidation. In: **Advances in wine research**. [S.l.]: ACS Publications, 2015. p. 291–301.

WEBBER, V. et al. Effect of glutathione addition in sparkling wine. **Food Chemistry**, v. 159, p. 391–398, 2014.

WU, Y. et al. Evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of kojic acid against five food-related bacteria and related subcellular mechanisms of bacterial inactivation. **Food Science and Technology International**, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 25, n. 1, p. 3–15, 2019.

YABUTA, T. Koji acid, a new organic acid formed by *aspergillus oryzae*. **Jour. Coll. Agr. Tokyo**, v. 5, p. 51–58, 1912.

YABUTA, T. Lxxiii. “the constitution of kojic acid, a γ -pyrone derivative formed by *aspergillus oryzae* from carbohydrates. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, Royal Society of Chemistry, v. 125, p. 575–587, 1924.

YOO, D. S. et al. A modulatory effect of novel kojic acid derivatives on cancer cell proliferation and macrophage activation. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, Avoxa-Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH, v. 65, n. 4, p. 261–266, 2010.

ZHANG, X. et al. Determination of 13 volatile aldehyde compounds in wine by gc-qqq-ms: p-benzoquinone to dissociate hydrogen sulfite addition products. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 6, p. 1285–1297, 2019.

ZHANG, X.; KONTOUDAKIS, N.; CLARK, A. Rapid quantitation of 12 volatile aldehyde compounds in wine by lc-qqq-ms: A combined measure of free and hydrogen-sulfite-bound forms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 12, p. 3502–3510, 2019.

ZOECKLEIN, B.; MACARRÓN, E. **Análisis y producción de vino**. Acribia, 2000. (Ciencia y Tecnología de los Alimentos). ISBN 9788420009360. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=OTwGAAAACAAJ>>.

ZOHRI, A.-N. A. et al. Optimization of kojic acid production conditions from cane molasses using plackett-burman design. **European Journal of Biological Research**, v. 8, n. 2, p. 56–69, 2018.

Anexos

ANEXO A – ARTIGO: BIOGENIC AMINES AND THE IMPORTANCE OF STARTER CULTURES FOR MALOLACTIC FERMENTATION

Artigo publicado no Australian Journal of Grape and Wine Research.

DOI: 10.1111/ajgw.12462

Autores: C.D. EMER¹, S. MARQUES , L.M. COLLA e C.O. REINEHR

Abstract

Biogenic amines are compounds produced mainly by microorganisms from the decarboxylation of some amino acids which may cause several health issues in susceptible people. In the winemaking process, one of the factors with the greatest impact on the final concentration of biogenic amines in wine is the malolactic fermentation, which mainly involves the action of lactic acid bacteria. This article gathers scientific literature on the importance of the use of inoculation in winemaking, especially for the potential formation of biogenic amines in spontaneous fermentations, with emphasis on malolactic fermentation. It establishes the set of attributes that influence the formation of biogenic amines in winemaking and aspects related to their toxicity, especially histamine and tyramine. With the growing interest of the market in products with less chemical appeal, the safety of wines, whether from non-conventional or traditional winemaking, must increasingly be observed. Therefore, the importance of using cultivated starter cultures is discussed, along with the safety of organic wines and the presentation of articles that seek to reconcile the production of organic wine with the preservation of the ‘microbiological terroir’ in a safe way, using selected wild yeasts and lactic acid bacteria.

Keywords: biogenic amines, malolactic fermentation, spontaneous fermentation, starter culture, wine.

¹ Graduate Program in Food Science and Technology, University of Passo Fundo, CEP 99052-900, Passo Fundo, RS, Brazil

ANEXO B – ARTIGO: PAIMAGEM: A TOOL FOR IMAGE AREA QUANTIFICATION IN MICROBIOLOGY

Artigo publicado na Revista Brasileira de Computação Aplicada.

DOI: 10.5335/rbca.v12i3.10963

Autores: Cassandro Davi Emer, Angelo Gava, Paulo Ricardo Cechelero Villa

Abstract

Measuring microbial growth is a major subject in microbiology. The growth measurement methodology, although simple, has some disadvantages, such as being a repetitive process, requiring prolonged times, and above all, its results depend on the analyst's observation, and irregular growths are approached subjectively. In this way, the objective was to develop and validate an application that aims to assist in the quantification of areas in microbiology through digital images, in order to provide an alternative to the conventional method. PAImagem was developed to assist the processing of images taken under controlled conditions, with reference points, in order to compensate the perspective and determine scale. The tool was conceived from a design directed by objectives, with Human-Computer Interface quality criteria. The validation of this tool was based on monitoring the growth of *Glomerellacingulata* fungus, carried out with manual measurement and image capture. Data were acquired every 24 hours for 14 days, assessing normal and adverse growth conditions. Through the Pearson coefficient, a high correlation ($R = 0.99$) was observed between the area calculated from the measurement using a ruler, and the one verified by PAImagem. The present tool proved to be of great value for use in researches involving microorganisms, optimizing the time of trials in laboratories.

Keywords: Image area estimate; Microbial growth; Image processing.

ANEXO C – ARTIGO: OCCURRENCE AND IMPACT OF FUNGICIDES RESIDUES ON FERMENTATION DURING WINE PRODUCTION - A REVIEW

Artigo publicado na Food Additives & Contaminants: Part A.

DOI:10.1080/19440049.2021.1894357

Autores: Angelo Gava, Cassandro Davi Emer, Evandro Ficagna, Saulo Fernandes de Andrade, Alexandre Meneghello Fuentesfria

Abstract

Continuous fungicide spraying is required to eliminate fungal pathogens on grapes. However, this practice is associated with several risks, including contamination and environmental imbalance, as well as toxicity to operators and the induction of resistance in pathogens. In addition, a strong correlation has been reported between the presence of fungicides and the occurrence of issues during alcoholic fermentation, resulting in negative impacts on the sensory quality of the final products. Numerous studies have evaluated residue concentrations of phytosanitary products in grapes, juices, and wines, and a significant number of studies have assessed the impact of different agrochemicals on bioprocesses. However, a review compiling the key results of these studies is currently lacking. This review incorporates results obtained in the last decade from research on the presence of fungicide residues, including azoxystrobin, boscalid, captan, copper, fenhexamid, folpet, pyraclostrobin, pyrimethanil and tebuconazole, and their effects on fermentation kinetics. Practical solutions to mitigate these problems, both in vineyards and industry, are also presented and discussed. This review highlights the constant high fungicidal agent concentrations (greater than 1 mg L^{-1} or 2 mg L^{-1}) used throughout the winemaking process, with the impact of residues being of particular concern, especially with regard to their effect on yeast activity and the fermentation process. Thus, the adoption of methodologies that allow winemakers to control and trace these residues is an important step in avoiding or reducing fermentation problems throughout the winemaking process.

Keywords: Fermentation kinetics; agrochemical residues; grape juice; wine; yeast.

ANEXO D – ARTIGO: QUALITY AND PRODUCTIVITY OF CHARDONNAY CONDUCTED IN BI-LATERAL CORDON SUBMITTED TO DIFFERENT WINTER PRUNNING PRACTICES

Artigo publicado na Revista Agrária Acadêmica.

DOI: 10.32406/v3n32020/11-18/agrariacad

Autores: Marco Aurélio de Freitas Fogaça, Cassandro Davi Emer, Geovane Scheeren, Luísa Carolina Wetzstein

Abstract

The objective of this research was to evaluate the yield and the physico-chemical characteristics of the Chardonnay grapevine, conducted in bi-lateral cordon, submitted to different types of pruning systems: Cazenave, Sylvoz and Royat. The variables analyzed were: sprouting and fertility index, mass of clusters and branches, yield per plant, °Brix and total acidity. Sylvoz provided the highest number of shoots, clusters per cane and yield per plant, reducing its dry mass of pruning, while Royat was less productive. The canes produced more clusters than spurs, however, without differing in cluster mass and fertility index. The total acidity in Cazenave and °Brix in Sylvoz were lower in spurs.

Keywords: *Vitis vinifera*. Conduction system. Grapevine management. Cane pruning.