



CATOLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Efeito de compostos fenólicos no crescimento e no
comportamento fermentativo de *Saccharomyces*
cerevisiae

por

Duarte Roque da Silva

Outubro de 2024



CATOLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Efeito de compostos fenólicos no crescimento e no
comportamento fermentativo de *Saccharomyces*
cerevisiae

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Duarte Roque da Silva

Orientador: Doutor José António Couto

Outubro de 2024

Dedicatória

Dedicado a João Francisco Roque Soares.

Resumo

A influência de compostos fenólicos na fermentação de mostos vínicos por *Saccharomyces cerevisiae* tem vindo a ser estudada há algum tempo, mas não ao ponto, ainda, de permitir tirar conclusões consensuais. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de compostos fenólicos no crescimento e no comportamento fermentativo de *S.cerevisiae* em condições enológicas simuladas, nomeadamente avaliar o efeito na produção de etanol e glicerol e na composição volátil dos vinhos sintéticos obtidos. Os compostos fenólicos testados foram o ácido cafeico, o ácido gálico e dois taninos, um extraído das películas e outro das sementes das uvas (A e B). Ao contrário da maior parte dos estudos publicados sobre este tema, observou-se que estes compostos estimularam o crescimento da levedura, acelerando a fase exponencial de crescimento e conduzindo a valores mais elevados de biomassa final. O metabolismo de açúcares foi afetado pela presença de compostos fenólicos com reflexo nas quantidades de etanol e glicerol obtidas. Curiosamente, o maior consumo de glucose e frutose não conduziu a uma maior produção de etanol e glicerol. O perfil aromático dos vinhos também foi influenciado pelos compostos fenólicos, notando-se um aumento na produção de ésteres. A produção de álcoois superiores e ácidos gordos, para além do efeito dos compostos fenólicos, foi também influenciada pela composição nutricional do meio, sendo aumentada pela inclusão de extrato de levedura. Podemos concluir que os compostos fenólicos afetam o comportamento fermentativo de *S.cerevisiae* com reflexo na composição química dos vinhos. O maior ou menor impacto dependerá do tipo de composto fenólico, da sua concentração e da composição nutricional do meio.

Palavras chave: fermentação vínica, *Saccharomyces cerevisiae*, compostos fenólicos, perfil aromático

Abstract

The influence of phenolic compounds on the fermentation of wine musts by *Saccharomyces cerevisiae* has been studied for some time, but not yet to the point where consensus conclusions can be drawn. The aim of this work was to investigate the effect of phenolic compounds on the growth and fermentation behaviour of *S.cerevisiae* under simulated oenological conditions, namely to evaluate the effect on ethanol and glycerol production and on the volatile composition of the synthetic wines obtained. The phenolic compounds tested were caffeic acid, gallic acid and two tannins, one extracted from the skins and the other from the seeds of the grapes (A and B). Contrary to most published studies on this subject, it was observed that these compounds stimulated yeast growth, accelerating the exponential growth phase and leading to higher final biomass values. The metabolism of sugars was affected by the presence of phenolic compounds, which was reflected in the quantities of ethanol and glycerol obtained. Interestingly, the higher consumption of glucose and fructose did not lead to a higher production of ethanol and glycerol. The aromatic profile of the wines was also influenced by the phenolic compounds, with an increase in the production of esters. In addition to the effect of phenolic compounds, the production of higher alcohols and fatty acids was also influenced by the nutritional composition of the medium, which was increased by the inclusion of yeast extract. We can conclude that phenolic compounds affect the fermentation behaviour of *S. cerevisiae*, which is reflected in the chemical composition of the wines. The greater or lesser impact will depend on the type of phenolic compound, its concentration and the nutritional composition of the medium.

Keywords: wine fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, phenolic compounds, aromatic profile

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha Família, mãe, pai e irmão em especial por todo o apoio dado durante os momentos melhores e piores da minha vida e por terem sido um pilar fundamental para esta dissertação ter chegado onde chegou, obrigado por nunca me deixarem cair e por todas as vezes que isso parecia acontecer me terem dado um empurrão maior do que eu alguma vez achei que fosse possível.

Agradecer também à restante Família que sabem quem são.

Já que estamos no tema da Família, agradecer à minha segunda família, a Tuna da Universidade Católica Portuguesa do Porto, que se tornou um dos pilares da minha vida, onde criei amizades que se tornaram família e agradecer também a esses em concreto pelo apoio e pela vida que vivemos juntos e certamente iremos continuar a viver, passamos mais uma etapa porque cada vitória individual nossa é uma vitória de todos.

Aos meus amigos de Leça da Palmeira, a Terra mais bonita de Portugal, não tenho palavras para agradecer a vossa companhia já que, como sabemos, a amizade não se agradece, mas obrigado por estarem na minha desde sempre e por saber que ficarão até que ela finde e talvez depois quem sabe.

A todos os Amigos e Amigas que fiz durante o período mais bonito da minha vida, aquele a que muitos chamam faculdade, e a todos os supracitados, um Obrigado por terem feito parte dele e por terem participado naquele que foi o “momento” em que mais cresci na minha vida, digo “momento” porque foi o que pareceu. Obrigado por não me terem deixado criar nenhum arrependimento e sair com a certeza que vivi aquilo que contado parece utópico.

Agradecer também ao Doutor José António Couto por ter aceitado ser meu orientador neste projeto.

Agradecer a Universidade Católica Portuguesa do Porto em especial à Escola superior de Biotecnologia Por ter sido a minha segunda casa durante estes últimos anos.

E finalmente agradecer, nesta dissertação, à cerveja pela motivação e ao whisky pela companhia.

“If I die in a cage (even if it’s on my own mind), I lose a bet (with myself)”

Rick Sanchez ft Duarte Silva

Índice

1	Introdução.....	13
1.1	Compostos fenólicos.....	13
1.1.1	Compostos de natureza não-flavonóide	16
1.1.1.1	Ácidos fenólicos	16
1.1.1.1.1	Ácidos hidroxicinâmicos	17
1.1.1.1.2	Ácidos Hidroxibenzóicos.....	18
1.1.1.2	Taninos	19
1.1.1.3	Estilbenos	20
1.1.2	Compostos de natureza flavonóide	21
1.1.2.1	Flavonóis	21
1.1.2.2	Flavanonas.....	22
1.1.2.3	Flavonas	23
1.1.2.4	Flavan-3-ols	23
1.1.2.5	Antocianinas	24
1.2	O vinho e os compostos fenólicos	25
1.2.1	A vinha.....	25
1.2.1.1	Variedade.....	25
1.2.1.2	Condições climatéricas/terroir	26
1.2.1.3	Cultivo orgânico e convencional	27
1.2.1.4	Bioestimulantes.....	27
1.2.2	Produção de vinho/ Durante vinificação	28
1.2.2.1	Maceração pré-fermentativa	29
1.2.2.2	Fermentação	30
1.2.2.2.1	Estirpes de leveduras e bactérias	30
1.2.2.2.2	Agentes de colagem	30
1.2.2.3	Maceração Pós-fermentativa	31
1.2.2.4	Filtração.....	31
1.2.3	Armazenamento de vinhos	32
1.2.3.1	Temperatura.....	32
1.2.3.2	Barricas	33
1.2.3.3	Vedante	33
2	Materiais e métodos	35
2.1	1º Ensaio	35

2.1.1	Levedura e medição do crescimento microbiano.....	35
2.1.2	Mosto sintético	35
2.1.3	Preparação dos Compostos fenólicos.....	35
2.1.4	Fermentações	36
2.1.5	Análises químicas	36
2.2	2º ensaio.....	38
2.2.1	Mosto sintético	38
2.2.2	Compostos fenólicos utilizados	38
2.2.3	Restante procedimento	38
3	Resultados e Discussão	39
3.1	1º ensaio.....	39
3.1.1	Crescimento microbiano	39
3.1.2	Metabolismo de açúcares	42
3.1.3	Produção de etanal e álcoois superiores	45
3.1.4	Produção de ésteres.....	46
3.1.5	Produção de ácidos gordos	49
3.2	2º ensaio.....	50
3.2.1	Crescimento microbiano	50
3.2.2	Metabolismo de açúcares	52
3.2.3	Produção de etanal e álcoois superiores	54
3.2.4	Produção de ésteres.....	56
3.2.5	Produção de ácidos gordos	58
4	Conclusões gerais.....	60
5	Trabalhos futuros	61
6	Bibliografia.....	62

Lista de tabelas

TABELA 1 – COMPOSTOS NÃO FLAVONÓIDES	14
TABELA 2- COMPOSTOS FLAVONÓIDES.....	15
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE ETANAL NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	45
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	46
TABELA 5- CONCENTRAÇÃO DE ESTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GORDOS NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	47
TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO DE ÉSTERES DE ACETATO DE ÁLCOOIS SUPERIORES NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	48
TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DE ETIL ACETATO NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	49
TABELA 8 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	49
TABELA 9 - CONCENTRAÇÃO DE ETANAL NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	54
TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	55
TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO DE ESTERES NO FINAL DA FERMENTAÇÃO	56
TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO DE ACETATOS NO FINAL DA FERMENTAÇÃO	57
TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO DE ETIL DE ACETATO NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	58
TABELA 14 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	58

Lista de figuras

FIGURA 1 - CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	39
FIGURA 2 – CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	42
FIGURA 3 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	43
FIGURA 4 - CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	43
FIGURA 5 - CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> AO LONGO DE 244 HORAS.....	50
FIGURA 6 - CONSUMO DE AÇÚCAR POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	51
FIGURA 7 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	52
FIGURA 8 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	52
FIGURA 9 - CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	53

1 Introdução

1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem diversas propriedades bioativas e, embora não sejam considerados nutrientes essenciais, a sua ingestão na dieta está associada a efeitos benéficos para a saúde. São metabolitos secundários de origem vegetal, resultantes das vias do ácido chiquímico e do fenilpropanoide (de la Rosa et al., 2019), ou seja, são produtos do metabolismo das plantas que não são essenciais para o seu crescimento ou desenvolvimento básico.

Os compostos fenólicos não estão uniformemente distribuídos nas diferentes partes dos frutos, como por exemplo as uvas. Nas sementes, encontramos flavanóis e ácido gálico, enquanto na polpa predominam ácidos hidroxicinamil tartáricos. Nos vasos fibrovasculares, os compostos presentes são flavanóis e ácidos fenólicos do tipo benzóico. A película do fruto, rica em antocianinas, também contém flavonóis e antocianinas adicionais. Esses compostos fenólicos são armazenados em diferentes partes das células, com destaque para os vacúolos da polpa, onde podem estar ligados a polissacarídeos nos vasos fibrovasculares ou livres no suco vascular da película. Nas películas, eles também podem estar unidos a polissacarídeos das paredes celulares e a proteínas das membranas dos vacúolos. Em relação às sementes, a concentração de compostos fenólicos é mais alta nos tecidos externos. Estudos indicam que esses compostos também são encontrados noutras partes da planta, como órgãos fotossintéticos e de transporte, além do fruto (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

No contexto vinícola, destaca-se a diferença significativa na quantidade de compostos fenólicos entre vinhos tintos e brancos. Os vinhos tintos apresentam concentrações muito maiores, variando entre 1000 e 4000 mg/L, em comparação com os 200-300 mg/L presentes nos vinhos brancos (Mamede & Pastore, 2004). Tal diferença não se deve apenas à presença das antocianinas, mas também aos métodos de produção. No processamento de vinho tinto, as cascas, sementes e engaços (por vezes) são incluídos, contribuindo para a extração de uma maior quantidade de compostos fenólicos. A composição de compostos fenólicos maioritários também varia, destacando-se a catequina e epigallocatequina nos vinhos brancos, e a catequina e ácido gálico nos vinhos tintos. Essas diferenças podem ser influenciadas pela origem e tipo da uva utilizada (Mamede & Pastore, 2004). Os compostos fenólicos podem-se converter em

diversos produtos de reação quando as células das plantas são danificadas, como acontece durante o processamento dos alimentos. Este facto contribui para a complexidade dos compostos polifenólicos presentes nos alimentos (Izawa et al., 2010).

Em resumo, os compostos fenólicos das diferentes partes do fruto têm implicações importantes na qualidade dos vinhos. Essas substâncias não apenas conferem cor, sabores e textura distintos mas também podem oferecer benefícios à saúde.

As tabelas abaixo apresentam uma das hipóteses de esquematização dos principais compostos flavonóides bem como os não flavonóides, as suas subcategorias, alguns dos principais exemplos de cada grupo e alguns alimentos onde se podem encontrar estes compostos.

Tabela 1 – Compostos não flavonóides. Adaptado de (Vasanth, Nair & Robison, 2014)

Compostos fenólicos			Alimentos principais onde se encontram
Ácidos fenólicos	<u>Ácidos hidroxicinâmicos</u>	Ácido cafeico Ácido clorogénico Ácido ferúlico Ácido sinápico Ácido caftárico Ácido neoclorogénico Ácido p-cumárico	Amora, framboesa, morango, groselha-preta, mirtilo, arando, pêra, cereja doce, maçã, laranja, toranja, limão e pêssego
	<u>Ácidos hidroxibenzoicos</u>	Ácido elágico Ácido gálico Ácido gentísico Ácido sirínico	Morango, framboesa, uvas, semente de longan e romã
Taninos		Polímeros de catequina Polímeros de epicatequina Elagitaninos Proantocianidinas Ácidos tânico Galotaninos	Semente/casca de uva, sumo de maçã, morangos, framboesas, romã, nozes, pêssego, amora e ameixa
Lignan		Secoisolariciresinol Matairesinol	Pêra
Estilbenos		Resveratrol trans-Resveratrol	Uvas

Tabela 2- Compostos flavonóides. Adaptado de (Vasanth Rupasinghe, Nair, & Robison, 2014)

Compostos fenólicos			Alimentos principais onde se encontram
Flavonóides	<u>Flavonóis</u>	Miricetina Quercetina Kaempferol Isorhamnetina	Maças, alperces, uvas, ameixas, mirtilos, azeitonas, sabugueiros, groselhas, cerejas, amoras, mirtilos e arando.
	<u>Flavanonas</u>	Naringenina Hesperetina Neohesperidina	Limão, laranja, toranja e tangerina.
	<u>Flavonas</u>	Apigenina Luteolina Tangeretina Nobiletina	Limão, laranja, toranja e tangerina.
	<u>Flavan-3-óis</u>	(+)-Catequina (-)-Epicatequina (-)-Epicatequina 3-galato (-)-Epigallocatequina-3-galato (+)-Galocatequina (-)-Epigallocatequina Procianidinas Prodelphinidinas	Maças, damascos, uvas, pêssegos, nectarinas, framboesas, cerejas, amoras, mirtilos, arando, peras, ameixas e passas
	<u>Antocianinas</u>	Cianidina 3-galactosídeo Cianidina 3-glicosídeo Cianidina 3-arabinosídeo Cianidina 3-xilosídeo Malvidina Delfinidina Pelargonidina	Amoras, groselha-preta, mirtilos, uva preta, sabugueiro, morangos, cerejas, ameixas, arando, romã e framboesa
	<u>Dihidrochalconas</u>	Florretina Floridzina	Maça

1.1.1 Compostos de natureza não-flavonóide

Os não-flavonóides constituem uma categoria de compostos fenólicos mais simples (Vaccari, Soccol & Ide, 2009), constituindo uma extensa família dentro dos polifenóis. Geralmente, eles apresentam estruturas mais elementares do que os flavonóides, consistindo principalmente em ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, além de estilbenos. Essas substâncias podem ser encontradas em quantidades que variam de 60 a 566 mg/L em vinho tinto (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Estes compostos fenólicos têm um papel significativo no processo de oxidação que leva ao escurecimento dos mostos e vinhos. Ainda que não exerçam uma influência direta no paladar dos vinhos, desempenham um papel na formação de fenóis voláteis, o que resulta em modificações nos aromas. Quando obtidos por meio da prensagem direta das uvas, os sumos contêm predominantemente compostos fenólicos não-flavonóides (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

1.1.1.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos representam uma categoria de substâncias não-flavonóides amplamente distribuídas no reino vegetal. Estão presentes em diversas formas, incluindo a forma livre, conjugada solúvel e ligada insolúvel. Estes compostos são encontrados em abundância em vários alimentos, como cereais, leguminosas, frutas, vegetais, oleaginosas, bebidas e ervas. Os supra referidos ácidos demonstram a notável capacidade de atuar como antioxidantes, combatendo diversos tipos de radicais, como o hidroxilo, o anião radical superóxido, vários radicais orgânicos, o peroxinitrito e o oxigênio singlete. Adicionalmente, desempenham funções como antioxidantes de interrupção de cadeias e como agentes redutores. Além disso, desempenham um papel relevante na regulação das vias de sinalização celular. A influência das características estruturais na eficácia da atividade antioxidante dos ácidos fenólicos é um aspeto bastante discutido (Chandrasekara, 2019).

Existem dois agrupamentos principais de ácidos fenólicos com relevância para uvas e vinhos. Estes grupos são os ácidos hidroxibenzóicos, compreendendo sete átomos de carbono, e os ácidos hidroxicinâmicos, constituídos por nove átomos de carbono (Gutiérrez-Escobar,

Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021). Em geral, a atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzóicos (Mamede & Pastore, 2004). Estes ácidos, não se manifestam apenas nas suas formas não conjugadas, mas também sob a forma de derivados conjugados ou esterificados. Por exemplo, os ácidos hidroxicinâmicos no vinho derivam, durante o processo de fermentação, da hidrólise dos ésteres tartáricos hidroxicinâmicos. Estes compostos podem servir como substrato para processos de oxidação e atuam como precursores do acastanhamento que pode ocorrer em vinhos brancos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.1.1.1.1 Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos cinâmicos têm um papel distinto de muitos outros compostos fenólicos pelo facto de não estarem apenas ligados à adstringência, mas também ao escurecimento oxidativo em mostos e vinhos brancos (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

Os ácidos hidroxicinâmicos representam o terceiro grupo mais abundante de polifenóis encontrados em uvas e são o grupo dominante nos mostos e vinhos brancos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021). No entanto, a quantidade de ácidos hidroxicinâmicos nas uvas depende da variedade das mesmas (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003). Alguns estudos foram feitos sobre a quantificação de ácidos hidroxicinâmicos em diversos vinhos, apontando para valores de 100 mg/L em vinhos tintos e 30 mg/L em vinhos brancos, no entanto, outros estudos, encontraram 60 mg/L em vinhos tintos e 130 mg/L em vinhos brancos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021). Os ácidos hidroxicinâmicos considerados mais relevantes são o ácido ferúlico, o ácido p-cumárico e o ácido cafeico. Na polpa das uvas, os compostos fenólicos são liderados pelo ácido cafeico, sendo o ferúlico menos prevalente. Nas células da casca, tanto o ácido cafeico quanto o ácido p-cumárico podem dominar, permitindo a categorização das variedades com base na relação entre esses dois ácidos (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

Ácido cafeico

O ácido cafeico é o principal ácido hidroxicinâmico na dieta humana (Dable-Tupas et al., 2023), sendo um metabolito secundário na formação da lignina nas plantas (Dable-Tupas et al., 2023) e é produzido como parte do seu metabolismo secundário (Dable-Tupas et al., 2023). Este ácido está presente em bastantes plantas, incluindo o café, o tomilho, a salva e a oliveira. Este composto desempenha um papel fundamental no aroma característico do café e exibe propriedades como ação antitumoral (influenciando a vascularização de células tumorais, inibindo assim o crescimento de tumores), efeitos antiplaquetários, prevenção de carcinogénese, antioxidantes e anti-inflamatórios (Sakai et al., 2022) (Dable-Tupas et al., 2023).

1.1.1.1.2 Ácidos Hidroxibenzóicos

No que diz respeito aos ácidos derivados do ácido hidroxibenzóico, destacam-se especialmente os ácidos vanílico, sirínico e salicílico, os quais estão ligados às estruturas das paredes celulares. No entanto, o mais relevante é o ácido gálico, que surge na forma de ésteres de flavanóis. Outros ácidos benzóicos, como o protocatéquico, o gentísico e o p-hidroxibenzóico, encontram-se em menor quantidade nas uvas, maioritariamente na forma de ésteres. Durante o processo de produção e conservação do vinho ocorre uma hidrólise lenta destes ésteres, resultando na presença destes compostos tanto em forma livre como combinada no vinho (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003). Em determinados vinhos que são submetidos ao envelhecimento em barris, é possível detetar elevados níveis de ácido gálico (Mamede & Pastore, 2004).

A quantidade total de ácidos hidroxibenzóicos nos vinhos tintos pode variar consideravelmente, abrangendo desde quantidades não detetáveis até cerca de 218 mg/L (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Ácido gálico

O ácido gálico e suas variações estão amplamente distribuídos por diferentes partes das plantas, abrangendo desde a casca até a semente, passando pela madeira, folhas, frutos e raízes (Fitzpatrick & Woldemariam, 2017). Nas uvas é maioritariamente encontrado nas sementes e caules, podendo também ser extraído de barris de carvalho, geralmente em quantidades que variam entre 10 a 100 mg/L (Wamhoff & W. Gribble, 2012). Este composto destaca-se como um dos ácidos fenólicos mais relevantes nos vinhos tintos, apresentando uma concentração média de cerca de 70 mg/L, enquanto nos vinhos brancos essa concentração pode atingir cerca de 10 mg/L. Este ácido é especialmente importante por ser o precursor de todos os taninos hidrolisáveis (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.1.1.2 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos que têm a capacidade de se ligar a proteínas e outras moléculas poliméricas, como os polissacarídeos, provocando a sensação de adstringência. Este fenómeno acontece devido à precipitação das proteínas, o que resulta na perda do efeito de lubrificação da saliva (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021) (Izawa et al., 2010). Estes compostos podem ser classificados em duas categorias principais: taninos hidrolisáveis e taninos não hidrolisáveis, também conhecidos como taninos condensados (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003) (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021). Os hidrolisáveis formam-se através da ligação de um açúcar, geralmente a glucose, a um composto fenólico como o ácido gálico ou o ácido elágico (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003). Muitas vezes estes taninos, dada a especificidade dos locais onde são encontrados, são considerados marcadores de idade em vinhos envelhecidos em barris. A concentração final de taninos hidrolisáveis pode variar significativamente, situando-se entre 0,4 e 50 mg/L (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Os taninos não hidrolisáveis são abundantes na madeira e podem ser encontrados em vinhos que passaram por envelhecimento ou armazenamento em barris (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003). Os taninos condensados ocorrem também naturalmente nas uvas e são compostos por moléculas de flavonóides, sendo conhecidos como procianidinas. Estes taninos são predominantemente encontrados nas sementes das uvas (Cabrita, Ricardo-da-Silva &

Laureano, 2003). Os taninos condensados naturais geralmente são encontrados em quantidades que variam de 1,2 a 3,3 g/L (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Enquanto os taninos hidrolisáveis, como os taninos gálicos, possuem um hidrato de carbono central e podem ser decompostos por ácidos fracos, os taninos condensados, exemplificados pelas proantocianidinas, formam polímeros complexos e não são facilmente suscetíveis à hidrólise. Ambos são solúveis em água, mas a diferenciação ocorre na composição e na capacidade de hidrólise. A complexidade desses compostos nos alimentos é decorrente de sua diversidade estrutural, exercendo influência na qualidade alimentar quando ocorre dano às células vegetais (Izawa et al., 2010).

À medida que os vinhos envelhecem, as mudanças na estrutura dos taninos afetam a cor e as características sensoriais dos vinhos. Inicialmente, os vinhos jovens possuem taninos com massa molecular média, mas essa massa aumenta à medida que o vinho amadurece (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

Os taninos têm outras vantagens havendo interesse nos mesmos como substâncias bioativas devido à sua capacidade de produzir efeitos benéficos para o organismo quando ingeridos através da alimentação durante longos períodos de tempo. Isto deve-se especialmente às suas propriedades antioxidantes, que protegem os tecidos da ação prejudicial dos radicais livres resultantes do envelhecimento celular e de outros processos fisiológicos. Alguns tipos de taninos têm revelado agora outros efeitos positivos na saúde, dependentes da dose, incluindo a aceleração da coagulação sanguínea, a redução da pressão arterial, a diminuição dos níveis de lípidos séricos e a modulação das respostas imunitárias (Dable-Tupas et al., 2023).

1.1.1.3 Estilbenos

Os estilbenos são compostos que se encontram de diferentes formas em várias plantas. Vários estudos apontam que foram identificados cerca de 1038 tipos de estilbenos em 275 espécies de plantas, predominando essencialmente em 11 famílias das mesmas (Su, Zhou & Li, 2022).

Ao longo do tempo foi-se reconhecendo um grande potencial nestes compostos como componentes de alimentos funcionais e produtos naturais de saúde. Um exemplo notável é o resveratrol, que está presente em mais de 70 espécies de plantas, incluindo uvas, amendoins e

aipo (Su, Zhou & Li, 2022). Diversos estudos sugerem que os estilbenos, especialmente o resveratrol e seus compostos relacionados encontrados no vinho, podem ter efeitos benéficos na saúde humana. Estudos indicam que estas substâncias fruem de propriedades antioxidantes e podem desempenhar um papel na prevenção de doenças cardíacas e até mesmo de certos tipos de cancro (Schröder, 2000). Possuem ainda uma capacidade de diminuição da aglutinação de plaquetas e propriedades anti-inflamatórias (Caliari, 2014).

1.1.2 Compostos de natureza flavonóide

Os flavonóides podem ser encontrados de forma livre ou polimerizados com outros flavonóides, açúcares, compostos não-flavonóides, ou mesmo em combinações desses elementos (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos é atribuível a esta família de compostos presentes nas grainhas, na polpa e na película das uvas. Entre eles, as antocianinas, os flavano-3-óis e as proantocianidinas desempenham um papel primordial na coloração dos vinhos (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

Os flavonóides presentes nas uvas são essencialmente representados pelos flavonóis, embora as antocianinas e flavano-3-óis também sejam extremamente relevantes nas mesmas. É ainda possível encontrar dihidroflavonóis e flavonas nas uvas, sendo as flavonas mais comuns nas folhas das videiras (Vaccari, Soccol & Ide, 2009).

Este tipo de compostos possui uma forte ação anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana, entre outras (Louie et al., 2020).

1.1.2.1 Flavonóis

Os flavonóis representam uma das principais subclasses dos flavonóides (Company, Lloret-Fillol & Costas, 2013). Da família dos flavonóides são os compostos presentes em mais alimentos, tal como cebola, couve, alho-porro e brócolos, no vinho tinto e no chá (Herrero et al., 2012). Na Uva são encontrados na película da mesma (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021). Os principais flavonóis presentes na uva são o kaempferol,

quercetina, isoramnetina e miricetina (Vaccari, Soccol & Ide, 2009) assim como nos restantes alimentos (Herrero et al., 2012).

Os flavonóis são compostos presentes em vinhos brancos e tintos, contribuindo para a cor nos vinhos brancos e sendo mascarados pelas antocianinas nos tintos. A sua tonalidade pode mudar de branco para amarelo, sendo essenciais para a estabilização da cor dos vinhos tintos jovens por meio da copigmentação com as antocianinas. Além disso, desempenham um papel importante na percepção de adstringência e amargor nos vinhos. Em vinhos tintos, a concentração máxima de flavonóis é geralmente cerca de 60 mg/L (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

São substâncias com atividade biológica significativa, incluindo propriedades antioxidantes, ação antimicrobiana, proteção do fígado, efeitos anti-inflamatórios e capacidade de dilatar os vasos. Também se tem considerado o potencial dos flavonóis como agentes com propriedades anticancerígenas (Company, Lloret-Fillol & Costas, 2013).

1.1.2.2 Flavanonas

As flavanonas são compostos encontrados numa seleção limitada de alimentos como o grão-de-bico, cominho, hortelã-pimenta, espinheiro, alcaçuz, sorveira e citrinos. Elas também estão presentes em ervas e especiarias (Pietta, Minoggio & Bramati, 2003).

A Flavanona predominante no vinho é a naringenina, com concentrações de até 25 mg/kg em vinhos tintos e 7,7 mg/kg em vinhos brancos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

As flavanonas, no geral, apresentam uma série de benefícios para a saúde, incluindo atividades antimicrobianas, redução do risco de doenças coronárias, propriedades anti-hipertensivas, antioxidantes, anti-inflamatórias e melhorias no metabolismo lipídico. A naringina, mais concretamente, tem uma ação antioxidante, elimina radicais livres, protege a vitamina E no plasma, reduz o colesterol, combate o stress oxidativo e inflamação, diminui o risco de aterosclerose e estimula a reparação do DNA em células cancerígenas da próstata (Zuiter, 2014).

1.1.2.3 Flavonas

As flavonas são um subgrupo importante de flavonóides que se encontram amplamente distribuídos nas plantas. Destacam-se como metabolitos especializados muito relevantes nas funções de sinalização e defesa das plantas. Além disso, desempenham um papel crucial na alimentação humana, oferecendo benefícios significativos para a saúde (Dable-Tupas et al., 2023).

Esta classe de flavonóides apresenta estruturas de anéis que demonstraram ser eficazes em várias condições patológicas, graças às suas propriedades antioxidantes, antiproliferativas, antitumorais e antimicrobianas. Estas estruturas têm sido amplamente utilizadas para abordagens multifacetadas em doenças complexas, como cancro, inflamação, doenças cardiovasculares, diabetes e distúrbios neurodegenerativos (Singh & Silakari, 2018).

As flavonas são compostos encontrados em diversas partes das plantas, como folhas, flores e frutos, na forma de glicosídeos. Algumas fontes importantes de flavonas incluem aipo, salsa, pimentos vermelhos, camomila e hortelã. Além disso, as cascas e tecidos de frutas cítricas, como laranjas, tangerinas e clementinas, são ricos em flavonas (Dable-Tupas et al., 2023).

São possíveis concentrações de flavonas no vinho que variam entre 0,02 e 1 mg/L (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.1.2.4 Flavan-3-ols

Os flavan-3-óis são uma subclasse de flavonóides amplamente consumida devido à sua presença em alimentos populares como chá, maçãs, pêras, bagas e produtos de chocolate/cacau. Estes compostos desempenham um papel significativo na estrutura e cor dos alimentos, contribuindo para as suas propriedades sensoriais e benefícios potenciais para a saúde (Crowe-White et al., 2022). Nos vinhos, uma parcela significativa da estrutura e coloração é atribuída aos flavonóides. Estes estão presentes nas sementes, polpa e casca das uvas. Os flavan-3-óis são considerados, dentro dos flavonóides, um dos elementos mais influentes em termos de quantidade e impacto (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

Estudos demonstram que o aumento de flavan-3-óis na alimentação pode contribuir para a melhoria da pressão arterial, dos níveis de colesterol e da glicose no sangue (Crowe-White et al., 2022).

1.1.2.5 Antocianinas

As antocianinas são polifenóis naturais de considerável interesse devido à sua ampla distribuição em frutos e vegetais (Reyes et al., 2018).

As antocianinas têm um papel fundamental na determinação da cor das uvas e dos vinhos. Representam uma parte significativa dos flavonóides presentes nas uvas tintas, tanto em termos de quantidade como de importância. Estão localizadas na casca e nas camadas superficiais da pele, bem como na polpa das uvas vermelhas (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003).

A quantidade e a composição de antocianinas nas uvas variam significativamente de acordo com a espécie da uva, a variedade, as práticas de cultivo na vinha e as características específicas do local de cultivo (Vaccari, Socol & Ide, 2009). Nas uvas tintas, as antocianinas são o principal grupo de compostos fenólicos e têm um papel fundamental na produção de vinhos tintos, influenciando significativamente as características sensoriais, especialmente a cor do vinho (Abe et al., 2007). A quantidade de antocianinas varia, normalmente, de 90 a 400 mg/L em vinhos tintos, podendo atingir concentrações superiores a 700 mg/L em vinhos tintos envelhecidos. Além disso, quando as antocianinas interagem com outros compostos fenólicos no vinho ocorre um fenômeno chamado co-pigmentação, que tipicamente estabiliza as antocianinas e, assim, preserva a cor do vinho (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021). Ainda no vinho, a antocianina mais abundante é a malvidina (Cabrita, Ricardo-da-Silva & Laureano, 2003) que demonstra capacidade de diminuir o desenvolvimento de bactérias nocivas (Vaccari, Socol & Ide, 2009).

As antocianinas são eficazes na prevenção de doenças relacionadas com o estilo de vida, tais como hipertensão, aumento dos níveis de açúcar no sangue, doenças cardiovasculares e obesidade. Estes compostos ajudam ainda a evitar o aumento da pressão arterial e dos níveis de glicose no sangue (Yamane, 2018).

1.2 O vinho e os compostos fenólicos

A presença de compostos fenólicos no vinho é crucial para suas características sensoriais e qualidade. Esta é afetada por fatores internos e externos devendo ser estudada a três níveis: na vinha, durante a vinificação e no armazenamento (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.1 A vinha

O teor de fenóis nas uvas é determinado por fatores genéticos, com algumas variedades naturalmente contendo mais compostos fenólicos do que outras. Além disso, a forma como a vinha é gerida tem um impacto direto na concentração de compostos fenólicos nas uvas (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.1.1 Variedade

A uva, especialmente a espécie *Vitis vinifera* L., é conhecida por conter uma alta concentração de compostos fenólicos. Esses compostos podem variar significativamente de acordo com a variedade de uva, sendo a genética um fator importante (Tassoni et al., 2019) (Wojdyło et al., 2018). Algumas variedades, como o híbrido *Vitis vinifera* Regent e a Tempranillo, possuem perfis fenólicos distintos que podem ser usados para identificá-las. Geralmente, uvas tintas têm uma concentração maior desses compostos em comparação com uvas brancas. No entanto, uma análise mais detalhada é necessária para compreender o perfil específico de cada variedade de uva (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Gutiérrez et al., provaram através de vários estudos que, de facto, diferentes tipos de uva e diferentes tipos de casta podem apresentar composições fenólicas diferentes (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.1.2 Condições climáticas/terroir

Inicialmente, o "terroir" foi definido como um conjunto de fatores naturais, incluindo clima, solo e tipo de videira, que influenciam a produção de vinho (Seguin, 1988). Posteriormente, alguns autores passaram a considerar fatores humanos, como práticas vitivinícolas e ecológicas (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Estudos mostraram que a disponibilidade de água na vinha, mais do que a temperatura e a luz solar, desempenha um papel crucial na concentração de compostos fenólicos nas uvas. Um déficit hídrico, especialmente em solos com pouca água, leva a um crescimento mais lento das videiras, uvas menores e, conseqüentemente, maior concentração de compostos fenólicos, melhorando a qualidade das uvas (Van Leeuwen et al., 2004).

Baixas temperaturas e escassez de água também promovem a formação de compostos fenólicos, particularmente antocianinas. Além disso, solos com deficiência de nutrientes, podem causar stresse osmótico nas videiras, o que também pode ter um impacto significativo na produção de compostos fenólicos (Ratiu et al., 2020).

Foram conduzidos alguns estudos práticos com o objetivo de confirmar as duas afirmações anteriores, e foi possível concluir, de acordo com alguns autores, que solos permeáveis, sujeitos a temperaturas elevadas e a uma falta de água, podem resultar num crescimento mais lento das videiras, o que, por sua vez, leva a uvas com concentrações mais elevadas de compostos fenólicos (Ramos et al., 2020) (Cheng et al., 2014).

Investigações adicionais demonstraram ainda que a introdução de radiação ultravioleta potencia a concentração de compostos fenólicos nas películas das uvas e, por conseguinte, no vinho produzido (Del-Castillo-Alonso et al., 2020).

Eventos climáticos como ondas de calor, caracterizados por aumentos significativos de temperatura e baixa humidade, podem impactar diretamente a composição das uvas, afetando a viticultura. Estudos demonstraram que temperaturas elevadas têm um efeito nas uvas, aumentando a concentração de compostos fenólicos, como antocianinas, flavonóis e taninos, em apenas 18 horas de exposição. No entanto, temperaturas acima de 53 °C podem causar a degradação desses compostos, independentemente do tempo de exposição. Portanto, em casos de ondas de calor extremo, uma colheita antecipada pode ser uma decisão sensata, mas mais

pesquisas em vinhas são necessárias para confirmar essas descobertas (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.1.3 Cultivo orgânico e convencional

Estudos comparativos entre a viticultura convencional e a biológica mostraram que esta última resulta em uvas com concentrações mais elevadas de compostos fenólicos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Um estudo realizado no sentido de perceber a diferença de cultivos avaliou os efeitos dessas abordagens nas variedades de uva Bordo e Niagara, constatando que os mostos de uva biológicos continham níveis mais altos de polifenóis totais em comparação com os convencionais. Por exemplo, nas uvas Bordo, as antocianinas nos mostos biológicos foram significativamente maiores (290,26 mg/L) do que nos mostos convencionais (109,71 mg/L). Além disso, a uva biológica apresentou concentrações mais elevadas de catequina e epicatequina, com 33,89 mg/L e 2,72 mg/L, respectivamente, em comparação com 2,06 mg/L e 2,13 mg/L na uva convencional. As procianidinas também foram mais abundantes na uva biológica (20,52 mg/L) em comparação com a convencional (15,77 mg/L) (Dani et al., 2007). Realizaram-se outros estudos que verificaram a conclusão retirada no anterior (De Pascali et al., 2014). Os estudos indicam ainda que o impacto destas práticas pode variar de acordo com a variedade de uva.

1.2.1.4 Bioestimulantes

Os bioestimulantes vegetais são produtos que estimulam os processos de nutrição das plantas, independentemente do seu conteúdo nutricional, com o objetivo de melhorar as características de qualidade da cultura. Na viticultura, esses bioestimulantes são usados para promover o desenvolvimento de substâncias químicas específicas nas uvas, como os compostos fenólicos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Estudos realizados em diferentes variedades de uvas, incluindo Verdejo, Petit Verdot, e Monastrell, investigaram o uso de bioestimulantes, como extratos aquosos de carvalho,

rebentos de videira Moscatel, sarmentos de videira, e outros compostos, para aumentar a concentração de compostos fenólicos nas uvas e, consequentemente, nos vinhos. Os resultados mostraram que essas práticas influenciaram positivamente a composição fenólica dos vinhos. Esses compostos contribuem para a qualidade e sabor dos vinhos, tornando-os mais resistentes à oxidação e aumentando sua atratividade sensorial (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Diferentes bioestimulantes, como eugenol, guaiacol, jasmonato de metilo, quitosano, benztotiadiazol e outros, foram testados e mostraram ter impactos variados na composição fenólica das uvas e dos vinhos. A escolha do bioestimulante e as condições de aplicação podem afetar os resultados (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.2 Produção de vinho/ Durante vinificação

A quantidade de compostos fenólicos nas uvas pode ser influenciada por diversos fatores, que podem ser divididos em internos e externos ao processo de vinificação. O processo de vinificação abrange três fases distintas: pré-fermentativa, fermentativa e pós-fermentativa (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.2.1 Maceração pré-fermentativa

Na fase de maceração pré-fermentativa na produção de vinhos tintos e rosés, as partes sólidas das uvas entram em contacto com o mosto antes da fermentação alcoólica. Esse processo envolve a quebra das células das uvas durante o esmagamento (Casassa & Harbertson, 2014), seguida pela degradação da parede celular por enzimas como aspectinases (Renard, Watrelot & le Bourvellec, 2017). Isto permite a transferência de compostos, especialmente compostos fenólicos, das películas das uvas para o mosto, influenciando as características de sabor, aroma e cor do vinho final.

A maceração é influenciada por vários fatores, sendo a temperatura um deles. A maceração a frio é uma técnica que envolve a maceração das uvas a baixas temperaturas, geralmente entre 4 e 8 °C, antes da fermentação (Aleixandre-Tudo & du Toit, 2018). Isto é feito para evitar o crescimento de leveduras e o início da fermentação, permitindo a extração mais eficaz de compostos fenólicos, como as antocianinas, devido à alta solubilidade desses compostos em meio aquoso e à proteção oferecida pelas baixas temperaturas. Vários autores observaram que a maceração a frio aumenta significativamente a quantidade de compostos fenólicos, especialmente antocianinas, no mosto, contribuindo para as características desejadas do vinho (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Na produção de vinho, durante a maceração, ocorre a extração de compostos fenólicos das cascas das uvas, incluindo ácidos, flavonoides, antocianinas e taninos. As taxas de extração diminuem eventualmente devido à saturação aquosa após prolongamento (Panprivech et al., 2015). Após a maceração, compostos fenólicos diminuem devido à estabilidade dos mais abundantes, requerendo aditivos ou tratamentos enzimáticos. Menos de 50% dos compostos das cascas das uvas tintas são convertidos devido à baixa permeabilidade das células, resultando em métodos pré-fermentativos para aumentar os polifenóis nos vinhos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.2.2 Fermentação

1.2.2.2.1 Estirpes de leveduras e bactérias

O metabolismo das leveduras desempenha um papel essencial na modificação dos compostos fenólicos durante a fermentação alcoólica. Enzimas como a β -glucosidase quebram ligações glicosídicas, libertando compostos fenólicos. Além disso, as antocianinas podem ser atacadas pelas leveduras formando piranoantocianinas, como as vitisininas, com a ajuda da hidroxycinamatodescarboxilase. As antocianinas também são absorvidas nas paredes celulares das leveduras, especialmente em uvas com baixas concentrações de antocianinas (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.2.2.2 Agentes de colagem

No processo de produção de vinho, são usados aditivos conhecidos como agentes de colagem, estes são compostos químicos ou naturais com carga positiva ou negativa. Estes agentes ligam-se às proteínas, taninos e compostos fenólicos suspensos no vinho, resultando numa clarificação e aumento da sua estabilidade (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Estudos têm investigado o uso de agentes de colagem químicos, como a polivinilpolipirrolidona (PVPP), que tem afinidade por polifenóis. O PVPP demonstrou reduzir significativamente os polifenóis, incluindo as antocianinas, em vinhos (Gil et al., 2019).

Agentes de colagem convencionais, geralmente de origem animal, quando usados em excesso, podem prejudicar os compostos fenólicos do vinho, afetando cor, aroma e representando riscos geralmente leves para a saúde. Dado este facto, algumas pesquisas têm-se debruçado na procura de alternativas vegetais como são exemplos os estudos que foram feitos com proteínas de ervilha e batata como agentes de colagem em vinhos (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Os agentes de colagem são cruciais para a clarificação e estabilização do vinho, mas a escolha do agente e a sua dosagem podem afetar significativamente a composição fenólica do vinho, o

que requer considerações específicas para cada caso (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.2.3 Maceração Pós-fermentativa

A duração da maceração e o tipo de meio influenciam a extração de compostos fenólicos na vinificação. A maceração pré-fermentativa extrai antocianinas (da pele) e flavanóis de baixo peso molecular (das sementes). Os flavanóis de alto peso molecular, flavonóides e ácidos fenólicos são mais solúveis em álcool do que em água. A maceração pós-fermentativa é usada para extrair compostos menos solúveis, mas prolongá-la pode causar problemas de sabor (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Em estudos, a maceração pós-fermentativa afetou a concentração de compostos fenólicos em vinhos. A adição de bagaço extra ou maceração prolongada reduziu antocianinas e derivados da antocianina, aumentou taninos, mas pode afetar negativamente as características sensoriais (Casassa, Huff & Steele, 2019). Noutro estudo, a maceração pós-fermentativa melhorou a qualidade do vinho sem degradar suas características sensoriais, com um período ideal de 40-50 dias (Francesca et al., 2014).

A extração de compostos fenólicos na vinificação depende do equilíbrio entre a duração da maceração e o tipo de meio, impactando a qualidade do vinho (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.2.4 Filtração

A filtração desempenha um papel essencial na produção de vinho mas afeta os compostos fenólicos. Os filtros de membrana são amplamente usados devido à sua praticidade e custo acessível (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Alguns estudos provam que a utilização da membrana pode representar um risco para a filtração dos compostos fenólicos no vinho. No entanto, entendeu-se também, na análise de outros estudos, que diferentes tipos de membrana representam diferentes níveis de risco para a alteração da concentração de compostos fenólicos no vinho, tal como a regularidade de

limpeza e manutenção das mesmas (Vernhet & Moutounet, 2002) (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.3 Armazenamento de vinhos

Alguns autores consideram que o envelhecimento do vinho é um processo complexo influenciado por vários fatores, como a temperatura, tipo de contentor e tipo de rolhas. Esses fatores contribuem para mudanças e evolução nos compostos fenólicos ao longo do tempo (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Os compostos fenólicos passam por diversas transformações químicas durante o envelhecimento, como a conversão das antocianinas em pigmentos mais estáveis, afetando cor e adstringência. O envelhecimento é essencial em certos casos para obter a melhor qualidade, mas períodos excessivamente longos podem resultar em reações de oxidação indesejadas (Waterhouse & Laurie, 2006). Vinhos jovens têm mais antocianinas e compostos fenólicos simples, enquanto os mais velhos têm cores mais intensas e mais pigmentos poliméricos. Fatores internos e externos, como composição inicial, aditivos, oxigênio, pH, temperatura, barricas, uva, influenciam essas mudanças químicas (McRae et al., 2012) (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.3.1 Temperatura

A temperatura de armazenamento exerce uma influência significativa no processo de envelhecimento do vinho (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021). Temperaturas mais elevadas, como as frequentemente encontradas no transporte comercial a cerca de 24 °C, aceleram o processo de envelhecimento, conferindo ao vinho um perfil envelhecido mais rapidamente (Butzke, Vogt & Chacón-Rodríguez, 2012).

Por outro lado, temperaturas mais baixas, por volta de 15 °C, preservam melhor as características desejáveis do vinho, incluindo níveis mais elevados de antocianinas, menos aromas oxidados e frutados, bem como um maior teor de taninos. A temperatura de armazenamento é um fator crítico para manter a qualidade e o perfil de sabor do vinho

durante o processo de envelhecimento (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.3.2 Barricas

O tipo de madeira e o processo de tostagem das barricas de carvalho desempenham um papel fundamental na composição do vinho, afetando seus compostos fenólicos e características organolépticas. Diferentes tipos de madeira influenciam de maneira única o teor fenólico do vinho e a reutilização de barris tende a diminuir o teor de polifenóis. A tostagem da madeira também afeta o perfil aromático e a adstringência do vinho, com níveis moderados de tostagem geralmente sendo preferíveis para manter os benefícios do envelhecimento. A temperatura de tostagem desempenha um papel importante na degradação da lenhina e de outros compostos, afetando os resultados finais. Em resumo, a escolha da madeira e do processo de tostagem é essencial na produção de vinho, influenciando significativamente sua composição (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

1.2.3.3 Vedante

O vedante da garrafa de vinho desempenha um papel crucial, controlando a permeabilidade e influenciando a oxidação e a composição química do vinho. Rolhas de cortiça e vedantes sintéticos permitem a entrada de mais oxigênio, resultando em cores mais intensas e menos aromas indesejados. No entanto, a exposição ao oxigênio pode afetar a oxidação de compostos fenólicos, especialmente das antocianinas.

Em resumo, a escolha do vedante é crucial para as características organolépticas do vinho, exigindo um equilíbrio entre a estabilização da cor e a oxidação dos compostos fenólicos. A influência do vedante na evolução do vinho é significativa, variando conforme o tipo de vedante e o vinho utilizados (Gutiérrez-Escobar, Aliaño-González & Cantos-Villar, 2021).

Objetivos

Os compostos fenólicos são biologicamente ativos, afetando muitas funções de células procariotas e eucariotas. Como vimos acima, uvas e vinhos possuem uma grande variedade de compostos fenólicos, muitos dos quais demonstraram possuir atividade biológica. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito dos compostos fenólicos no crescimento e no comportamento fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* em condições enológicas simuladas, nomeadamente avaliar o efeito na produção de etanol e glicerol e de compostos voláteis de fermentação.

2 Materiais e métodos

2.1 1º Ensaio

2.1.1 Levedura e medição do crescimento microbiano

A levedura usada neste trabalho foi a *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 (Portuguese Yeast Culture Collection, Instituto Gulbenkian da Ciência, Oeiras, Portugal). O seu crescimento em mosto sintético foi medido por espectrofotometria – DO 600nm. A levedura foi mantida em rampas de Yeast Malt Agar (YM Agar, Difco, Detroit, IN, EUA) a 4°C.

2.1.2 Mosto sintético

O mosto sintético modificado, previamente descrito por Ciani e Ferraro (1996), era composto por três soluções diferentes (por litro): solução A (500 ml), solução B (250 ml) e solução C (250 ml). A composição final foi a seguinte (por litro): D-glucose, 110 g; D-frutose, 110 g (solução A); ácido tartárico, 6,0 g; ácido málico 3,0 g; ácido cítrico, 0,5 g (solução B); YNB (Difco), 1,7 g; Casaminoácidos sem vitaminas (Difco), 2,0 g; CaCl₂, 0,2 g; arginina-HCL, 0,8 g; L-triptofano, 0,1 g (solução C). O pH de cada solução foi ajustado individualmente antes da mistura final:

pH da solução A: 3,6

pH da solução B: 2,7

pH da solução C: 4,0

As três soluções foram esterilizadas separadamente a 121°C durante 20 minutos e depois misturadas assepticamente. O pH da mistura foi 3,3.

2.1.3 Preparação dos Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos utilizados foram:

- Ácido gálico

- Ácido cafeico
- Taninos:
 - Tanipepin (Martin Viallate, França) - tanino de grainha de uva (TA)
 - Taniraisin (Martin Viallate, França) - tanino extraído da película de uvas (TB)

Os ácidos gálico e cafeico foram obtidos da SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Alemanha) e os taninos da Proenol (VN Gaia, Portugal). Foram preparadas soluções concentradas frescas (10 g/L) destes compostos em água desionizada, as quais foram depois esterilizadas por filtração (0,22 μm).

2.1.4 Fermentações

O mosto artificial (1L) foi dividido em 10 frascos de 100 mL. Em cada frasco, foram adicionados 2,5 mL de um composto fenólico específico de modo a obter 250 mg/L em cada uma das fermentações.

As fermentações em cultura pura de *S. cerevisiae* PYCC 4072 foram efetuadas a 20°C, sem agitação. Cada fermentação foi realizada em duplicado. Os inóculos foram previamente cultivados a 25 °C durante 2 dias em YM (Difco Laboratories, Detroit, IN, USA). A inoculação dos meios foi efetuada de modo a obter uma concentração celular inicial de aproximadamente 10^6 UFC/mL (inóculo de 2% v/v).

O crescimento da levedura foi seguido através de medições de densidade ótica com um comprimento de onda de 600 nm ao longo de 15 dias para cada uma das fermentações.

2.1.5 Análises químicas

Após as fermentações, as células de levedura foram removidas por centrifugação a 8000 rpm e 4 °C durante 15 min. O sobrenadante foi analisado utilizando procedimentos cromatográficos, de acordo com os seguintes métodos:

A glucose, a frutose, o glicerol e o etanol foram determinados por HPLC (Beckman, System Gold). O meio de crescimento foi centrifugado e o sobrenadante, depois de uma diluição de 1/4, foi filtrado através de filtros de nylon com poros de 0,45 μm . A separação foi efectuada

numa coluna Sugar-PackTM (Waters, Milford, EUA) ligada a um detetor de índice de refração. A fase móvel foi 50 mg/L de CaEDTA, com um caudal de 0,5 mL/min e uma temperatura de trabalho de 70 °C (Pérez-Nevado et al., 2006).

A determinação dos acetatos de álcoois superiores (acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de 2-feniletilo e acetato de isoamilo octanoato), dos ésteres etílicos de ácidos gordos (Butanoato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo e dodecanoato de etilo), dos ácidos (ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico e ácido dodecanoico) e o 2-fenil-etanol foi efetuada num Perkin-Elmer Autosystem GC, equipado com um detetor de ionização de chama. 5 mL da amostra, com 3-octanol a 20 µm/L como padrão interno (previamente preparado numa concentração de 50mg/L), foram extraídos sucessivamente com 4, 2 e 2 mL de éter-hexano (1:1 v/v) durante 5 minutos. A fase orgânica (1µl) foi injectada (sem divisão, 0,3 min) numa coluna CP-WAX 58 (FFAP)-CB (Chrompack) de 50 m x 0,32 mm e 0,3 µm de espessura de fase. O programa de temperatura foi de 40 °C (5 min) a 220 °C (20 min) a 2 °C/min. As temperaturas do injetor e do detetor foram fixadas em 250 °C. O gás de arrastamento utilizado foi H₂ a 1-2 mL/min.

Os álcoois superiores (1-propanol, 2-metil-1-propanol, metanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol), o acetato de etilo e o etanal foram analisados num cromatógrafo de fase gasosa Hewlett-Packard 5890, equipado com um detetor de ionização de chama e ligado a um integrador Hewlett-Packard 3396. Adicionaram-se 50 µL de 4-metil-2-pentanol a 10 g/L, como padrão interno, a 5 mL de amostra. A amostra (1 µL) foi injetado (split, 1:60) numa coluna CP-WAX 57 CB (Chrompack) de 50 m x 0,25 mm e 0,2 µm de espessura de fase. O programa de temperatura foi de 40°C (5min) a 180 °C (0 min) a 3 °C/min. As temperaturas do injetor e do detetor foram fixadas em 250 °C. O gás de transporte foi de 1-2 mL/min. Estes dois métodos foram descritos por Moreira et al. (2008).

2.2 2º ensaio

2.2.1 Mosto sintético

O Mosto artificial (1L) foi preparado da mesma forma que no ensaio anterior. A única diferença foi a adição de extrato de levedura (3 g/L) à solução C. Os valores de pH de cada uma das soluções e da mistura foram: composto por três soluções diferentes:

pH solução A: 3,41

pH solução B: 3,46

pH solução C: 3,50

pH solução final: 3,49

2.2.2 Compostos fenólicos utilizados

Os mesmos do ensaio 1 e na mesma concentração.

2.2.3 Restante procedimento

O restante procedimento foi semelhante ao do primeiro ensaio, apenas acrescentando a medição de graus Brix com um refratômetro, de forma a monitorizar o desenrolar das fermentações

3 Resultados e Discussão

3.1 1º ensaio

3.1.1 Crescimento microbiano

A presença de compostos fenólicos demonstrou ter um efeito estimulante no crescimento da levedura, observado tanto na fase exponencial de crescimento quanto na biomassa final obtida (Figura 1).

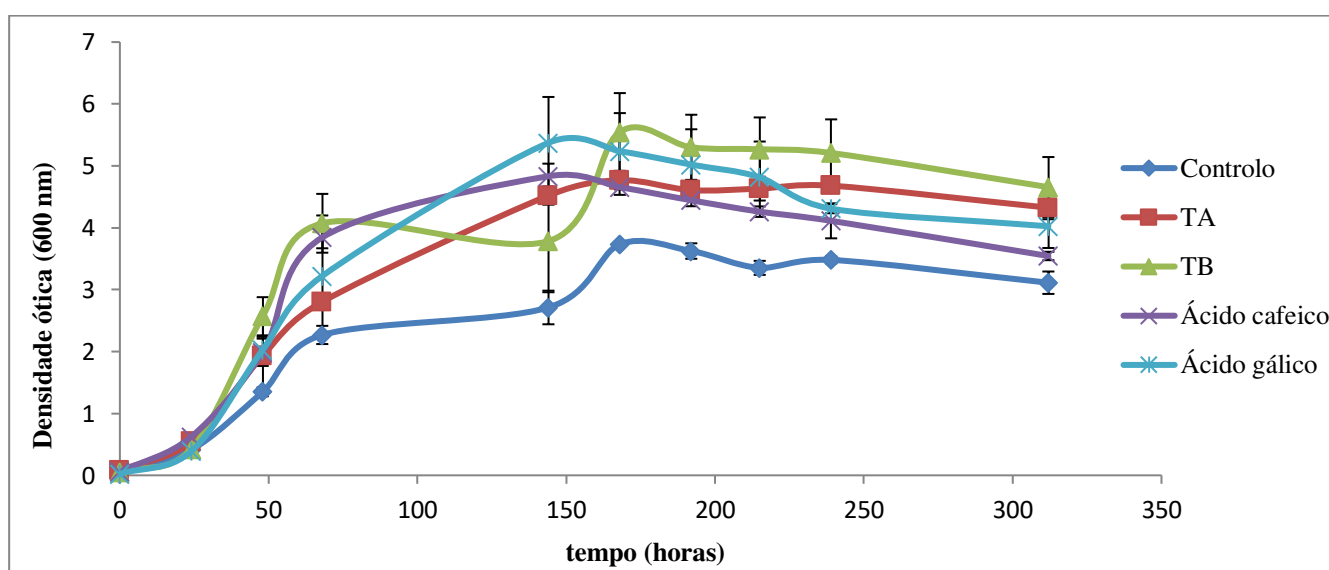


Figura 1 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo de 312 horas no mosto artificial sem (controle) e com a adição de compostos fenólicos.

Esta influência positiva variou de acordo com o tipo de composto fenólico presente, sendo possível colocar estes compostos pela seguinte ordem crescente de efeito: ácido cafeico, ácido gálico, tanino A e tanino B. Entre os taninos, os de maior tamanho (B) tiveram maior efeito. Os taninos extraídos das películas (B) são relativamente grandes, uma vez que tendem a polimerizar mais do que os taninos de outras fontes (constituídos por 4 a 100 monómeros polimerizados). Os taninos de sementes (A) são mais pequenos (2 a 20 monómeros) (Kyrleou et al., 2017). Estes autores verificaram nos seus trabalhos que a média de monómeros da fração polimérica das películas foi duas vezes superior aos valores correspondentes das sementes.

Estes resultados não vão de encontro à maior parte dos trabalhos científicos publicados sobre a ação de compostos fenólicos em microrganismos. De facto, quase todos os trabalhos que existem nesta área, relatam uma atividade essencialmente antimicrobiana em bactérias e algumas espécies de leveduras. Uma exceção é o trabalho de Colombi et al. (2018) onde se observou que, embora os perfis de crescimento celular e de consumo de glicose fossem semelhantes aos do controlo, o ácido sirínico inibiu a conversão de glicose em etanol quando usado a concentrações de 0,1 e 1,0 g/L (Colombi, Zanoni & Tavares, 2018).

Diversos estudos anteriores tentaram estabelecer uma relação entre o tipo de composto fenólico e sua influência no crescimento da levedura. No entanto, a existência de tantas variáveis e resultados divergentes dificulta a obtenção de um consenso. Segundo Adeboye et al. (2014) é possível notar que compostos dentro do mesmo grupo de classificação têm comportamentos diferentes e apesar de se tentar associar à estrutura química de cada composto ainda assim se torna complicado retirar conclusões concretas. O que se pode entender é que a influência do composto na fermentação e no crescimento microbiano depende do tipo de composto e da concentração do mesmo (Adeboye, Bettiga & Olsson, 2014).

Outros estudos corroboraram a ideia de que há diversas variáveis que afetam a forma como os compostos fenólicos podem impactar o crescimento microbiano. No trabalho de Sabel et al. (2017) ficou evidente que os resultados podem variar dependendo do composto, da sua concentração e até mesmo da bactéria ou levedura utilizada. Um exemplo analisado neste estudo foi o ácido gálico, sendo demonstrado que diferentes concentrações desse composto resultam em interações distintas com o crescimento microbiano. Quanto ao ácido cafeico, observou-se uma influência positiva no crescimento microbiano nas concentrações estudadas por Sabel et al. (2017), o que vai ao encontro dos resultados obtidos nesta dissertação relativamente a *S. cerevisiae*. No entanto, muitos outros compostos estudados demonstraram efeitos inibitórios no crescimento microbiano e podem ser utilizados com essa finalidade. Por exemplo, podem servir como finalizadores naturais de fermentação ou, dependendo do seu comportamento com leveduras e outras bactérias, podem ser usados para eliminar bactérias prejudiciais ao vinho, sem alterar ou alterando minimamente o processo de fermentação (Sabel et al., 2017).

O estudo de Sabel et al. (2017) também abrangeu diferentes estirpes e tipos de leveduras e bactérias. A única observação consistente foi que alguns compostos eram mais tóxicos do que

outros, mas os comportamentos eram, de certa forma, imprevisíveis, não permitindo a criação de um padrão consistente (Sabel et al., 2017).

Segundo Nguela et.al (2019), os polifenóis da uva revelam-se como elementos significativos no processo de fermentação, exercendo um impacto direto nas células microbianas. O considerável aumento na duração das fermentações na presença de polifenóis, revela desafios enfrentados pelas leveduras sob a influência destes compostos. Este prolongamento indica dificuldades que retardam o processo fermentativo, demonstrando uma interação complexa entre polifenóis e o metabolismo microbiano. Existem indícios de que os polifenóis podem interagir com a membrana plasmática das células de levedura levando à sua desorganização e desestabilização. Esta interação compromete a integridade e a funcionalidade da membrana, afetando funções celulares essenciais e, por conseguinte, influenciando o desempenho global das leveduras durante a fermentação. A adsorção de polifenóis na superfície externa das células de levedura pode acarretar consequências adversas nas funções de sinalização celular, perturbando as vias regulatórias que controlam o metabolismo. Além disso, o texto aponta a possibilidade de interações físico-químicas entre polifenóis e nutrientes essenciais, como aminoácidos e esteróis. Estas interações podem resultar na diminuição da disponibilidade desses nutrientes para as leveduras, representando um desafio adicional ao seu crescimento (Nguela et al., 2019). O trabalho de Nguela et al. (2019) leva à conclusão de que os polifenóis desempenham um papel crucial na dinâmica da fermentação, originando efeitos que variam desde toxicidade direta até interferências nas vias de sinalização e interações prejudiciais com componentes celulares vitais.

Uma possível explicação para os resultados obtidos relaciona-se como crescimento aeróbico de microrganismos e a consequente formação de radicais livres devido ao contacto entre o oxigénio e compostos orgânicos. Os radicais livres são oxidantes, causam stress oxidativo e promovem o envelhecimento celular (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2014). Muitos compostos fenólicos mostram capacidade para neutralizar os radicais livres, indicando que têm capacidade antioxidante (Hur et al., 2014).

Explorar mais a fundo as interações entre compostos fenólicos e microrganismos em condições específicas, considerando a singularidade dos compostos fenólicos utilizados e suas concentrações é crucial para a compreensão de como podem afetar o processo fermentativo.

3.1.2 Metabolismo de açúcares

As Figuras 2-4 referem-se ao consumo de açúcares e produção de etanol e glicerol.

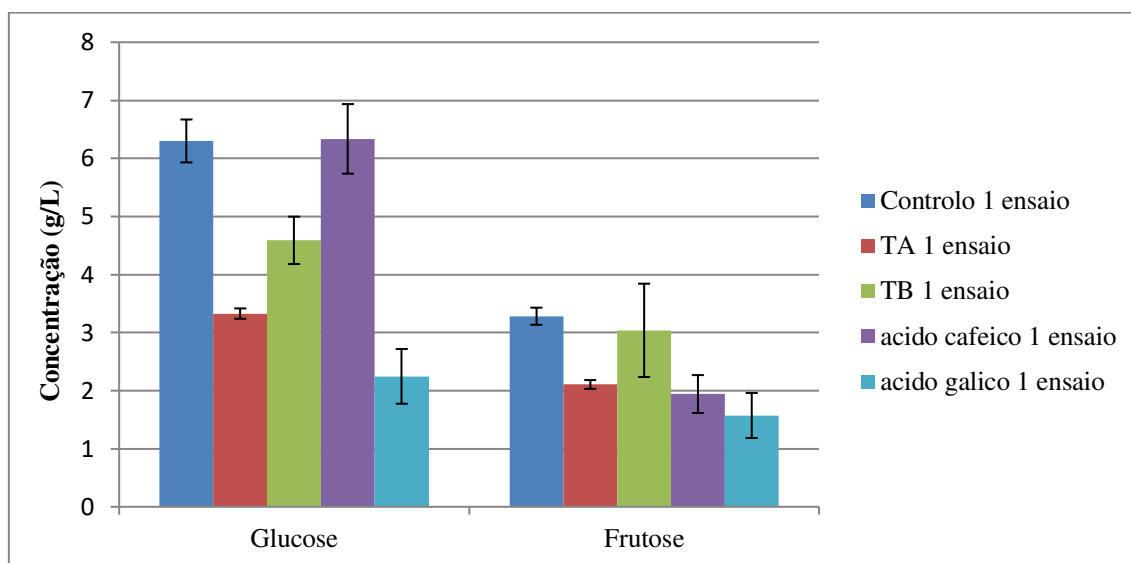


Figura 2 – Concentração de açúcares (glucose e frutose) no final da fermentação por *S.cerevisiae* nas amostras sem (controlo) e com presença de compostos fenólicos.

Verificou-se que os mostos suplementados com compostos fenólicos apresentaram quantidades de açúcares residuais inferiores ao controlo (exceto na glucose no meio com ácido cafeico), o que se verifica tanto para a glucose como para a frutose (Figura 2).

Colombi et al. (2018) observaram uma variação significativa no consumo de açúcar na presença de diferentes concentrações de compostos fenólicos, evidenciado pela diferença no açúcar residual no final da fermentação (Colombi, Zanoni & Tavares, 2018). Segundo estes autores, essa variação pode estar relacionada com a inibição do crescimento celular, o que não foi observado no presente trabalho.

No entanto, o maior consumo de açúcares na presença de compostos fenólicos não conduziu a uma maior produção de etanol (Figura 3); pelo contrário, as concentrações registadas foram inferiores às do controlo. Ao contrário do que poderia ser pensado, a Figura 4 mostra que o metabolismo dos açúcares não foi desviado para a produção de glicerol (valores inferiores na presença de compostos fenólicos).

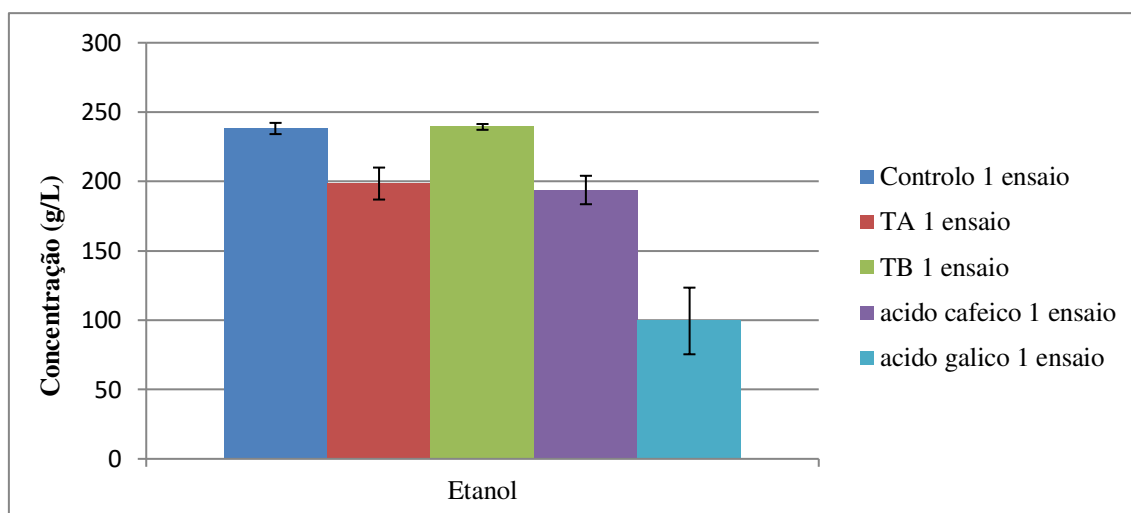


Figura 3 - Concentração de etanol no final da fermentação por *S.cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos

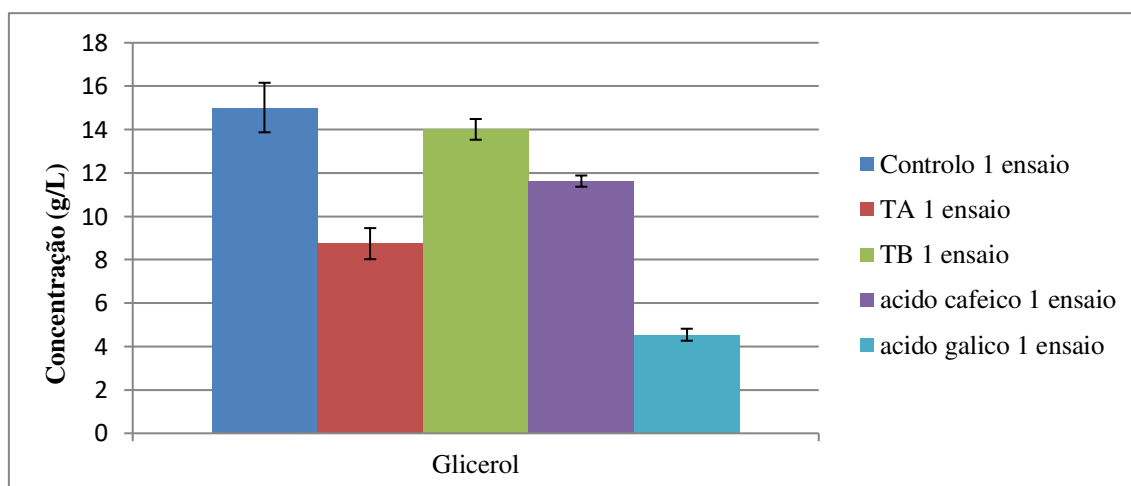


Figura 4 - Concentração de glicerol no final da fermentação por *S.cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos

A fermentação com o ácido gálico destacou-se por ter apresentado a mais baixa concentração de etanol e glicerol apesar do maior consumo de açúcares em comparação com o controle e os outros compostos fenólicos. Os resultados mostram que os compostos fenólicos influenciaram o perfil de fermentação, evidenciando a complexidade das interações entre estes e a levedura durante o processo fermentativo.

Alguns estudos mostram que os compostos fenólicos têm efeitos variados no rendimento de etanol (Adeboye, Bettiga & Olsson, 2014). Os compostos estudados por Colombi et al. (2018) mostraram resultados muito variados numa análise intercompostos mas também numa análise intracompostos a nível de concentração. As concentrações diferentes do mesmo composto

correspondem concentrações diferentes de etanol final, mas não de forma a que se possa encontrar um padrão de comportamento. Também se encontram diferenças entre compostos difíceis de explicar através da sua natureza química (Colombi, Zanoni & Tavares, 2018).

A nível de produção de glicerol, os compostos fenólicos conduzem a rendimentos variáveis Adeboye et al.(2014). Um estudo com ácido gálico demonstrou um comportamento semelhante ao desta dissertação, o que pode provar que de facto este composto, nas concentrações testadas, tende a inibir a produção de glicerol (Adeboye, Bettiga & Olsson, 2014).

Segundo Nguela et al. (2019), os polifenóis comprometem a eficiência da fermentação alcoólica, reduzindo a capacidade das leveduras em transformar em açúcar em etanol, baseando-se nos resultados obtidos que demonstram uma diminuição na taxa de produção de CO₂. Este cenário sugere um impacto negativo dos polifenóis no metabolismo da levedura, interferindo na sua capacidade de conduzir a fermentação alcoólica de maneira eficaz (Nguela et al., 2019).

3.1.3 Produção de etanal e álcoois superiores

As quantidades de etanal, no final das fermentações, foram relativamente elevadas e ainda mais nas fermentações com os compostos fenólicos (Tabela 3). Todos os valores estão acima do limite de percepção (100 mg/L).

Tabela 3 - Concentração de etanal no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (mg/L)

	Etanal
Controlo	307,27± 52,309
TA	624,76*
TB	377,77± 67,524
Ácido cafeico	364,62± 21,778
Ácido gálico	358,99± 125,45

*Não foi encontrado o padrão interno no duplicado.

Tabela 4 - Concentração de álcoois superiores no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (mg/L)

	1-propano l	1-butanol	2-metil- 1-propanol	2-metil- 1-butanol	3-metil- 1-butanol	Metanol	2-fenil- etanol	Soma de álcoois superiore s
Controle	3,1862 ± 0,5221	43,362 ± 3,9863	0,91129 ± 0,05889 6	37,781 ± 0,11088	77,414 ± 5,8654	1,3386Δ	36,510 ± 24,275	199,83 ± 33,532
TA	11,333*	24,114*		53,653*	140,47*	2,3480*	26,818 ± 1,6500	259,90*
TB	3,6013Δ			37,596 ± 4,2267	90,172 ± 7,5107	2,2508 ± 0,44575	33,317 ± 10,611	165,13± 0,97427
Ácido cafeico	4,1337Δ			42,479Δ	69,252 ± 37,123	2,5646 ± 0,20486	38,017 ± 11,931	133,14± 81,809
Ácido gálico				41,143Δ	70,168 ± 29,741	2,6702 ± 0,90261	32,853 ± 9,7388	126,26± 48,191

* Não foi encontrado o padrão interno no duplicado

Δ Não foi possível calcular a média nem o desvio padrão, porque só havia um valor a considerar

As concentrações de álcoois superiores foram, de uma forma geral, mais baixas na presença de compostos fenólicos (Tabela 4). Os valores encontrados ficaram todos abaixo do valor acima do qual se pode esperar um impacto negativo destes compostos na qualidade do vinho (300 mg/L). Os resultados indicam que a presença de compostos fenólicos constitui um fator de contenção da produção de álcoois superiores, o que pode ser positivo para o vinho.

3.1.4 Produção de ésteres

As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores de ésteres etílicos de ácidos gordos e de ésteres de acetato de álcoois superiores obtidos. As concentrações encontradas foram mais elevadas nas fermentações com compostos fenólicos (exceto no caso dos ésteres etílicos de ácidos gordos na presença de ácido gálico), acima do limite de percepção olfativa da maior parte destes compostos, o que contribui para o perfil aromático dos vinhos.

Tabela 5- Concentração de esteres etílicos de ácidos gordos no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Butanoato de etilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Decanoato de etilo	Dodecanoato de etilo	Soma dos esteres
Controlo	133,08± 86,163	172,38± 81,119	198,01± 43,707	93,946± 60,486	35,720± 22,749	633,14 ± 127,75
TA	145,14± 95,656	188,38± 54,235	281,35± 63,182	143,12± 95,383	35,579± 7,5289	793,57 ± 16,204
TB	167,24± 43,386	199,21± 25,265	313,61± 138,35	163,76± 133,27	32,735± 17,680	876,56 ± 357,95
Ácido cafeico	158,15± 9,6690	151,58± 17,646	183,19± 25,499	127,63± 15,821	41,048± 13,914	661,60 ± 63,211
Ácido gálico	116,59± 29,291	124,25± 56,322	165,94± 89,028	120,94± 51,264	30,221± 10,588	557,94 ± 236,49

Tabela 6 - Concentração de ésteres de acetato de álcoois superiores no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Acetato de isoamilo	Acetato de isobutilo	Acetato de 2-feniletilo	Soma de acetatos
Controle	381,23± 268,23	44,489± 25,557	94,653± 2,2282	520,37± 296,02
TA	488,17± 371,28	48,315± 32,013	115,51± 24,690	651,99± 378,60
TB	895,55± 349,40	86,078± 11,694	336,43± 244,59	1319,8± 608,18
Ácido cafeico	483,08± 139,45	66,938± 26,026	170,14± 40,745	720,15± 124,73
Ácido gálico	431,43± 76,762	59,972± 2,4180	175,61± 50,275	667,01± 24,069

Uma tendência semelhante foi encontrada para o acetato de etilo (Tabela 7). De qualquer forma, mesmo na presença de compostos fenólicos, os valores detetados estão abaixo ou próximo do limiar de percepção olfativa deste composto (18 mg/L) (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Tabela 7 - Concentração de etil acetato no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Acetato de etilo
Controle	13779± 1250,4
TA	35753*
TB	19303± 3276,2
Ácido cafeico	16425± 4595,6
Ácido gálico	16798± 3166,9

* Não foi encontrado o padrão interno no duplicado então as médias e os desvios padrão não existem, existe apenas o valor direto obtido com apenas uma amostra

3.1.5 Produção de ácidos gordos

Apesar de alguma variabilidade, a presença de compostos fenólicos levou à obtenção de valores mais baixos de ácidos gordos, o que pode ser positivo dado que estes compostos contribuem com notas descritas como ranço, amanteigado e pungente.

Tabela 8 - Concentração de ácidos no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Ácido hexanoico	Ácido octanóico	Ácido decanoico	Soma dos ácidos
Controle	641,51±	359,55±	64,013±	1095,9±
	423,93	16,930	50,781	419,46
TA	356,86±	398,59±	92,511±	847,96±
	13,294	97,314	37,945	148,55
TB	315,76±	394,08±	57,897±	767,74±
	9,8507	0,60013	21,858	31,108
Ácido cafeico	389,66±	415,10±	79,756±	884,52±
	146,83	189,65	39,722	376,20
Ácido gálico	292,85±	324,36±	54,962±	674,54±
	6,7568	27,137	11,777	49,028

3.2 2º ensaio

Os vinhos sintéticos obtidos no ensaio anterior continham entre 4 a 9 g/L de açúcar o que indica que as fermentações não foram completas. Assim, foi realizado um segundo ensaio suplementando o mosto sintético com extrato de levedura, ou seja, em condições nutricionais mais favoráveis para a levedura.

3.2.1 Crescimento microbiano

A influência dos compostos fenólicos no crescimento microbiano foi muito semelhante ao 1º ensaio, corroborando o efeito de estimulação do crescimento (Figura 5).

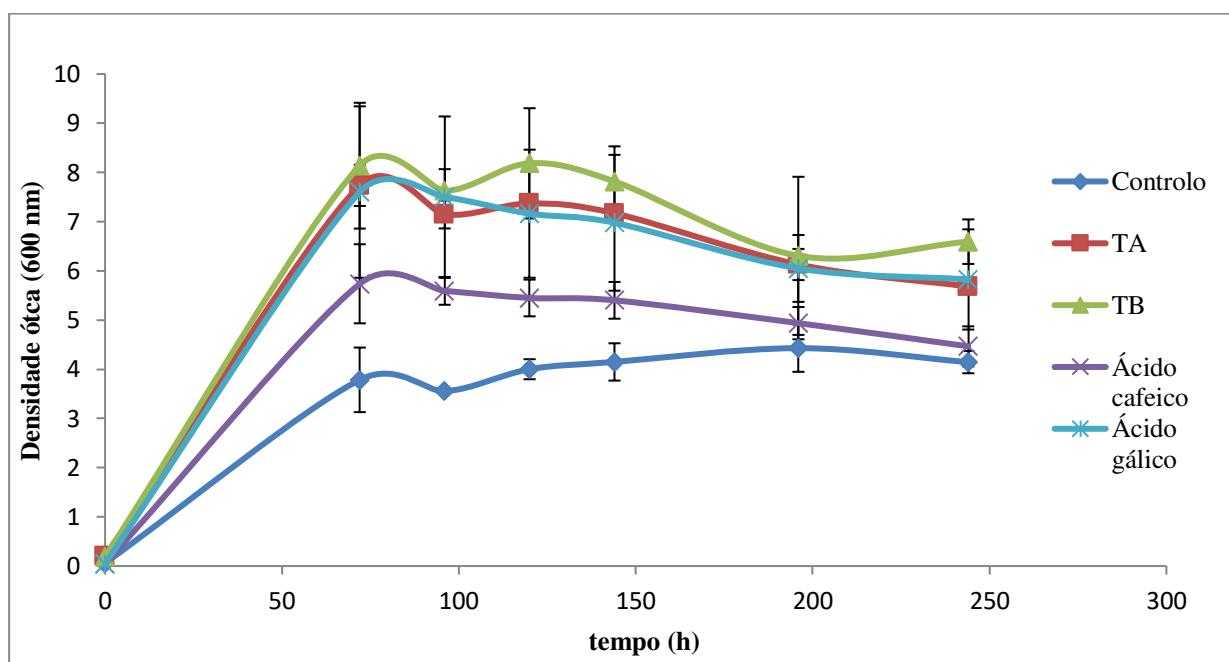


Figura 5 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo de 244 horas no mosto artificial sem (controle) e com a adição de compostos fenólicos.

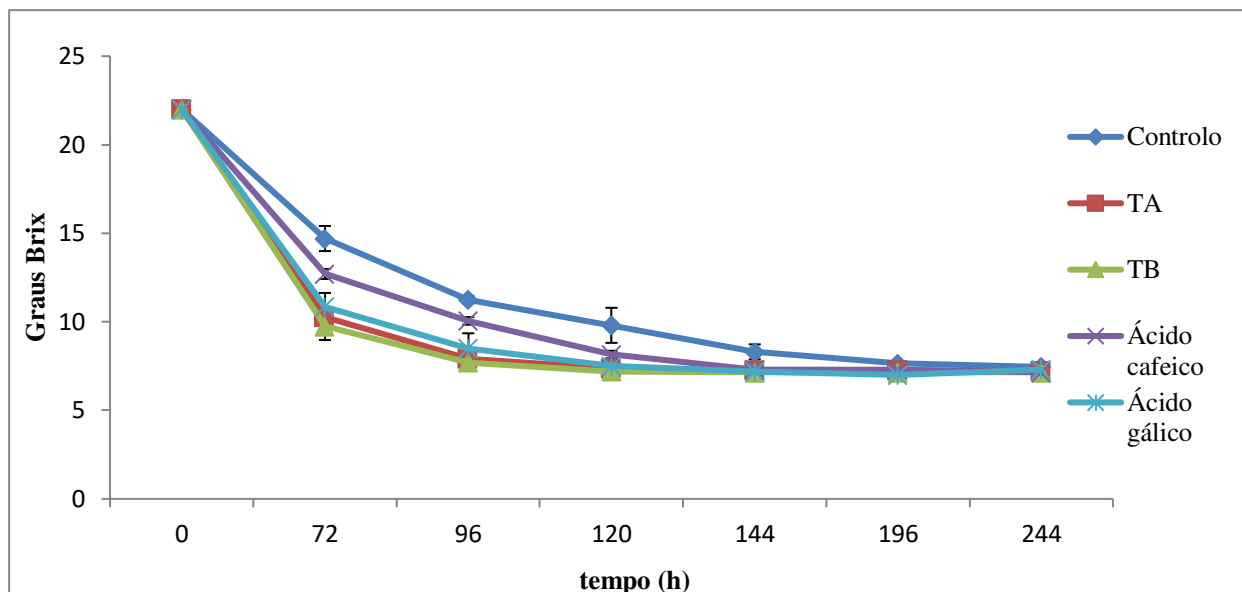


Figura 6 - Consumo de açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* ao longo de 244 horas, refletido em graus Brix, no mosto artificial sem (controlo) e com a adição de compostos fenólicos.

A diferença essencial reside no tempo em que a levedura atinge a fase estacionária e no valor máximo de densidade ótica, sendo mais rápido e mais alto, respetivamente, nas condições do 2º ensaio.

A ordem de influência dos compostos fenólicos, desde aquele que teve menor impacto até ao mais influente, manteve-se a mesma: ácido cafeico, ácido gálico e os taninos A e B.

Este segundo ensaio foi acompanhado pela medição de graus Brix ao mesmo tempo que se media a densidade ótica de forma a verificar quando cessava o consumo de açúcar e se poderia considerar terminada a fermentação (Figura 6). O consumo de açúcares foi mais rápido na presença de compostos fenólicos, em especial no caso dos taninos, o que está relacionado com as curvas de crescimento observadas na Figura 5.

Resumindo, os compostos fenólicos que mais estimulam o crescimento microbiano são os que levam a um consumo mais rápido de açúcar. No entanto, podemos notar que todas as fermentações atingiram valores de graus Brix semelhantes na parte final da fermentação.

3.2.2 Metabolismo de açúcares

Mesmo com o meio enriquecido com o extrato de levedura, não se obtiveram fermentações completas, pelo menos no tempo de realização do ensaio (Figura 7)

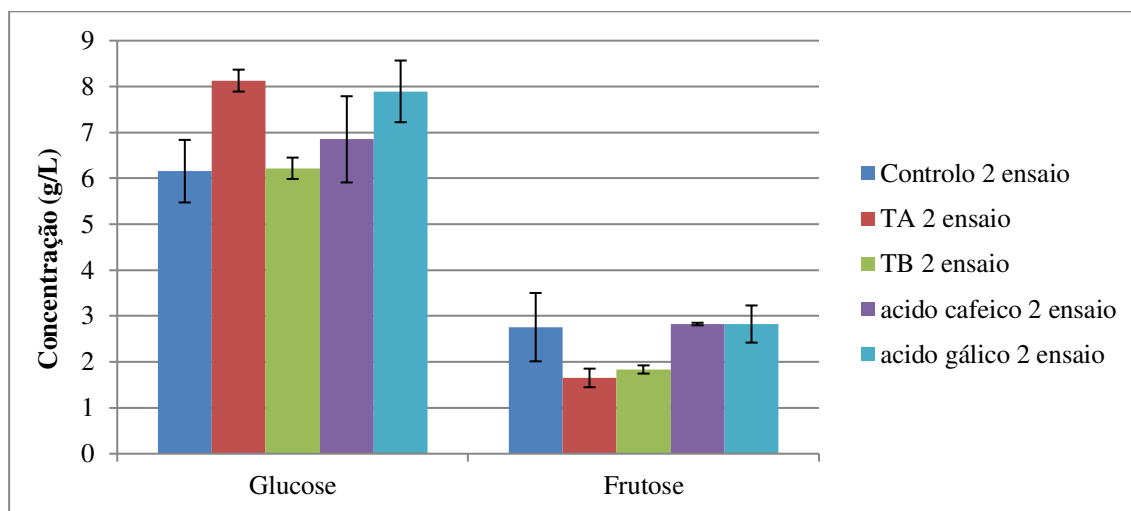


Figura 7 - Concentração de açúcares (Glucose e Frutose) no final da fermentação por *S.cerevisiae* nas amostras sem (controlo) e com presença de compostos fenólicos.

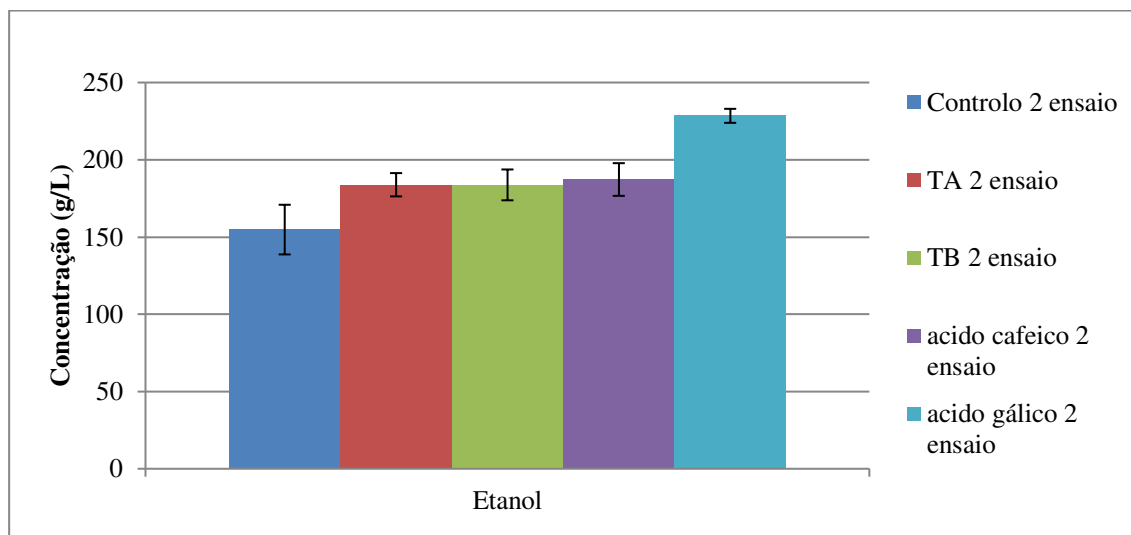


Figura 8 - Concentração de etanol no final da fermentação por *S.cerevisiae* nas amostras sem (controlo) e com presença de compostos fenólicos.

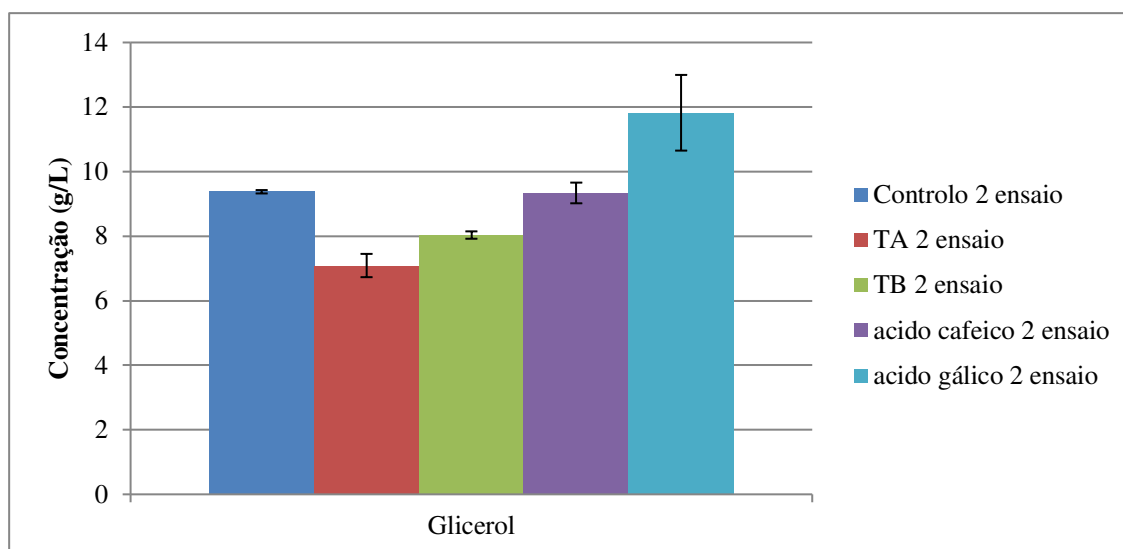


Figura 9 - Concentração de glicerol no final da fermentação por *S.cerevisiae* nas amostras sem (controlo) e com presença de compostos fenólicos.

Esta Figura mostra que o consumo de glucose foi maior nas fermentações que contêm compostos fenólicos do que no controlo. Relativamente à frutose, o consumo nas fermentações com taninos foi superior ao controlo, enquanto que foi inferior com ácido gálico e ácido cafeico. Em relação ao etanol, os valores de concentração finais das fermentações com compostos fenólicos são superiores ao controlo. No que diz respeito ao glicerol, todas as amostras com compostos fenólicos produziram menos do que o controlo, com exceção da amostra com ácido gálico.

Não se confirmou o comportamento de utilização de açúcares do ensaio anterior, o que poderá estar relacionado com a introdução de extrato de levedura. Os resultados indicam que o metabolismo de açúcares é influenciado pela presença de compostos fenólicos, mas também pelas condições nutricionais do meio.

Apesar de se considerar a fermentação terminada com base na medição de graus Brix, se tivesse sido permitido um tempo adicional de fermentação, os valores de açúcar e álcoois poderiam ser diferentes.

Outro ponto digno de nota na análise dos dois gráficos é que, geralmente, a frutose é mais consumida do que a glucose.

A quantidade de composto fenólico adicionado também pode ser alvo de estudo, proporcionando uma variável adicional na otimização do rendimento fermentativo.

3.2.3 Produção de etanal e álcoois superiores

Tal como no ensaio anterior, a quantidade de etanal foi mais elevada na presença de compostos fenólicos (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração de etanal no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controlo) e com presença de compostos fenólicos. (mg/L)

	Etanal
Controlo	197,06± 52,040
TA	454,79± 361,74
TB	357,13± 43,913
Ácido cafeico	262,24± 0,74069
Ácido gálico	373,06± 77,306

As concentrações de álcoois superiores foram mais altas na presença de compostos fenólicos (Tabela 10). No entanto, os valores encontrados ficaram todos abaixo de 300 mg/L, exceto no caso de um dos taninos.

Tabela 10 - Concentração de álcoois superiores no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (mg/L)

	1-propanol	1-butanol	2-metil-1-propanol	2-metil-1-butanol	3-metil-1-butanol	Metanol	2-fenil-etanol	Soma dos álcoois superiores
Controle	2,7691± 1,5826	0	0	0	45,221± 7,9714	10,648± 0,051667	24,945± 3,9318	83,582 ± 13,537
TA	38,325± 46,334 ^α	121,72Δ	2,3899± 1,1169	154,48± 150,17	117,22Δ	9,7981± 2,1683	40,688± 2,3421	365,14 ± 200,63
TB	5,5119± 0,84896	30,348Δ	1,4644Δ	49,385Δ	85,395± 45,420	7,2150± 0,074431	46,110± 4,9904	184,83 ± 98,619
Ácido cafeico	0	0	0	0	60,446± 7,9471	11,800± 1,2120	35,250± 7,2127	107,49 ± 0,47760
Ácido gálico	0	0	0	0	56,262± 4,8431	8,7949± 2,0760	50,922± 5,5701	115,97 ± 1,3489

Δ Não foram encontrados duplicados, sendo utilizado apenas o valor principal.

^α Existe um desvio padrão maior que o valor médio o que pode ser um erro.

Não foi encontrada na literatura informação suficiente que associe uma melhor nutrição da levedura à formação de álcoois superiores, pelo que seria necessário fazer uma investigação mais focada neste ponto para uma obtenção de conclusões mais concretas.

3.2.4 Produção de ésteres

Os valores de ésteres etílicos de ácidos gordos e de ésteres de acetato de álcoois superiores foram mais elevados do que no ensaio anterior, o que pode estar relacionado com a alteração introduzida nas condições nutricionais. A influência dos compostos fenólicos segue a mesma tendência nos 2 ensaios, ou seja, conduzem à obtenção de valores mais elevados de ésteres, especialmente na presença dos taninos (Tabelas 11 e 12), incluindo o acetato de etilo (Tabela 13).

Tabela 11 - Concentração de esteres no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controlo) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Butanoato de etilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Decanoato de etilo	Dodecanoato de etilo	Soma de esteres
Controlo	240,78± 8,4869	378,60± 13,262	512,85± 72,500	111,30± 26,496	40,244± 7,6362	1283,8± 84,883
TA	296,81± 182,75	466,25± 286,10	853,44± 481,17	490,19± 220,48	101,68± 65,596	2208,4± 1236,1
TB	144,61± 20,833	306,36± 24,967	588,29± 2,4336	418,30± 47,494	56,755± 8,5997	1514,3± 75,787
Ácido cafeico	219,27± 64,029	285,35± 43,098	386,14± 24,448	245,67± 33,070	40,707± 3,2533	1177,1± 167,90
Ácido gálico	197,14± 51,972	240,15± 1,3811	402,54± 21,141	351,47± 16,304	49,873± 14,920	1241,2± 73,110

Tabela 12 - Concentração de acetatos no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Acetato de isoamilo	Acetato de isobutilo	Acetato de 2-feniletilo	Acetato de isoamilooctanoato	Soma de acetatos
Controle	1330,4± 92,744	76,278± 3,6265	383,83± 4,1804	0,94722Δ	1791,0± 99,882
TA	2164,6± 1741,5	169,34± 134,53	591,63± 191,02	4,3770± 2,2687	2930,0 ± 2069,3
TB	1310,4± 119,52	104,80± 9,8660	567,14± 57,402	4,2775± 0,084340	1986,62 ± 186,70
Ácido cafeico	1306,7± 61,136	109,63± 23,266	502,65± 66,794	2,8670± 0,18770	1921,8 ± 17,796
Ácido gálico	1207,4± 173,26	83,919± 17,974	649,17± 63,364	4,3666± 0,17598	1944,9 ± 218,83

Δ Não foram encontrados duplicados, sendo utilizado apenas o valor principal. Não foi possível calcular a média nem o desvio padrão, porque só havia um valor a considerar

Tabela 13 - Concentração de etil de acetato no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Acetato de etilo
Controle	15350± 1752,3
TA	29343± 888,80
TB	16667± 496,93
Ácido cafeico	22440± 7331,0
Ácido gálico	19393± 3252,8

3.2.5 Produção de ácidos gordos

Ao contrário do ensaio anterior, a produção de ácidos gordos foi superior na presença de compostos fenólicos (Tabela 14).

Tabela 14 - Concentração de ácidos no final da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* nas amostras sem (controle) e com presença de compostos fenólicos. (µg/L)

	Ácido hexanoico	Ácido octanóico	Ácido decanoico	Ácido dodecanóico	Soma dos ácidos
Controle	760,64± 68,346	836,97± 127,37	66,511± 14,271		1667,1± 205,85
TA	1285,4± 412,51	1513,2± 470,34	200,85± 73,398	9,9459± 5,2784	3009,5± 961,53
TB	928,95± 319,91	1026,4± 12,362	107,90± 9,3722		2063,3± 341,64
Ácido cafeico	3186,7± 412,83	5196,4± 2148,4	784,86± 110,40		9168,0± 2671,6
Ácido gálico	3726,5± 1315,5	6235,5± 2572,0	716,53± 169,40		10679± 4056,9

É possível concluir que as leveduras, ao serem nutridas com extrato de levedura (a condição principal que difere o segundo ensaio do primeiro), produzem quantidades mais elevadas de ácidos gordos, em alguns casos em níveis próximos do limite de percepção olfativa (10 mg/L) (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Em resumo, tanto os compostos fenólicos quanto a nutrição das leveduras influenciam a produção de ácidos gordos durante a fermentação.

4 Conclusões gerais

Este estudo demonstrou que os compostos fenólicos têm uma influência significativa na fermentação de mosto vínico sintético por *S.cerevisiae*, alterando a cinética de crescimento da levedura, o consumo de açúcares e a produção de metabolitos finais. Os resultados mostraram que os compostos fenólicos estimulam o crescimento da levedura, aumentando a taxa de crescimento e a biomassa final obtida e acelerando a conclusão da fermentação. O metabolismo de açúcares foi afetado pela presença de compostos fenólicos com reflexo nas quantidades de etanol e glicerol obtidas. Observou-se uma diminuição nos níveis de etanol e glicerol, embora não confirmada quando se alteraram as condições nutricionais do mosto. O perfil aromático dos vinhos também foi influenciado pelos compostos fenólicos, notando-se esse efeito de uma forma mais consistente nos ésteres. De facto, a produção tanto de ésteres etílicos de ácidos gordos como de ésteres de acetato de álcoois superiores foi superior na presença de compostos fenólicos. A produção de outros grupos de compostos, tal como os álcoois superiores e ácidos gordos, para além do efeito dos compostos fenólicos, foi consideravelmente influenciada pela composição nutricional do meio. A inclusão de extrato de levedura conduziu a um aumento dos álcoois superiores e ácidos gordos na composição final das fermentações.

Estes resultados sugerem que as condições de fermentação, nomeadamente a composição fenólica dos mostos e o estado nutricional das leveduras, influenciam a composição final do vinho, podendo ter reflexo nos seus atributos sensoriais. No entanto, tirar conclusões gerais afigura-se complexo. Isso dependerá do tipo de composto fenólico, da sua concentração, da composição nutricional do meio e até da espécie/estirpe microbiana.

5 Trabalhos futuros

Estudos adicionais focados nas interações específicas entre compostos fenólicos e o metabolismo da levedura serão essenciais para avançar na compreensão científica e nas aplicações práticas da tecnologia de fermentação. Mais concretamente, fazer experiências com diferentes tipos de levedura, diferentes tipos e concentrações de compostos fenólicos e com diferentes meios.

6 Bibliografia

- Abe, L. T., Mota, R. V., Lajolo, F. M., & Genovese, M. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2), pp. 394-400.
- Adeboye, P. T., Bettiga, M., & Olsson, L. (2014). The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Expr* 4 .
- Aleixandre-Tudo, J., & du Toit, W. (2018). Cold maceration application in red wine production and its effects on phenolic compounds: A review. *LWT* , 200-208.
- Almeida, J., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Liden, G., & Gorwa-Grauslund, M. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* , 340–349.
- Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., & Hanai, S. (1986). Identification of Aromatic Monomers in Steam-Exploded Poplar and Their Influences on Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation Technology*, 64(6), 567–570.
- Butzke, C., Vogt, E., & Chacón-Rodríguez, L. (2012). Effects of heat exposure on wine quality during transport and storage. *Journal of Wine Research*, 23, 15–25.
- Cabrita, M., Ricardo-da-Silva, J., & Laureano, O. (2003). *Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos*. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Caliari, V. (2014). *Influência da Variedade de Uva, do Método de Elaboração e Envelhecimento Sobre Borrás na Composição Química e Sensorial de Espumantes*. Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis. Tese de doutoramento.
- Casassa, L., & Harbertson, J. (2014). Extraction, evolution, and sensory impact of phenolic compounds during red wine maceration. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 83-109.
- Casassa, L., Huff, R., & Steele, N. (2019). Chemical consequences of extended maceration and post-fermentation additions of grape pomace in Pinot Noir and Zinfandel wines from the Central Coast of California (USA). *Food Chemistry*, 300 .

- Chandrasekara, A. (2019). Phenolic Acids. In L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis, *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 535-545). Academic Press.
- Cheng, G., He, Y.-N., Yue, T.-X., Wang, J., & Zhang, Z.-W. (2014). Effects of climatic conditions and soil properties on Cabernet Sauvignon. *Molecules*.
- Colombi, B. L., Zanoni, P. R., & Tavares, L. B. (2018). Effect of Phenolic Compounds on Bioconversion of Glucose to Ethanol by Yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96, 1444-1450.
- Company, A., Lloret-Fillol, J., & Costas, M. (2013). 3.18 - Small Molecule Models for Nonporphyrinic Iron and Manganese Oxygenases. In *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition)* (pp. 487-564).
- Crowe-White, K. M., Evans, L. W., Kuh, G. G., Milenkovic, D., Stote, K., Wallace, T., et al. (2022). Flavan-3-ols and Cardiometabolic Health: First Ever Dietary Bioactive Guideline. In *Advances in Nutrition*, 13(6), (pp. 2070-2083).
- Dable-Tupas, G., Tulika, V., Jain, V., Maheshwari, K., Daison Brakad, D., Nishit Naresh, P., et al. (2023). 11 - Bioactive compounds of nutrigenomic importance. In *Role of Nutrigenomics in Modern-day Healthcare and Drug Discovery* (pp. 301-342). Genevieve Dable-Tupas, Chukwuebuka Egbuna.
- Dani, C., Oliboni, L., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., & Henriques, J. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. In *Food Chem*, 45 (12), (pp. 2574–2580).
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Chapter 12 - Phenolic Compounds. In E. M. Yahia, & A. Carrillo-López, *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 253-271). Faculty of Natural Sciences, Autonomous University of Queretaro, Queretaro, Mexico: Woodhead Publishing.
- De Pascali, S., Coletta, A., del Coco, L., Basile, T., Gambacorta, G., & Fanizzi, F. (2014). Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. In *Food Chemistry*, 161, (pp. 112–119).
- Del-Castillo-Alonso, M., Monforte, L., Tomás-Las-Heras, R., Núñez-Olivera, E., & Martínez-Abaigar, J. (2020). A supplement of ultraviolet-B radiation under field conditions increases

phenolic and volatile compounds of tempranillo grape skins and the resulting wines.

European Journal of Agronomy, 121, 126150.

Fitzpatrick, L., & Woldemariam, T. (2017). 5.16 - Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 5, (pp. 495-510).

Francesca, N., Romano, R., Sannino, C., le Grottaglie, L., Settanni, L., & Moschetti, G. (2014). Evolution of microbiological and chemical parameters during red wine making with extended post-fermentation maceration. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 84–93.

Gil, M., Louazil, P., Iturmendi, N., Moine, V., Cheynier, V., & Saucier, C. (2019). Effect of polyvinylpolypyrrolidone treatment on rosés wines during fermentation: Impact on color, polyphenols and thiol aromas. *Food Chem*, 295, 493–498.

Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review, 26(3). *Molecules* .

Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2012). 4.08 - Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 4, (pp. 159-180).

Hur, S., Lee, S., Kim, Y., Choi, I., & Kim, G. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346-356.

Izawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y., & Kuroda, M. (2010). 4.16 - Human–Environment Interactions – Taste. In *Comprehensive Natural Products II*, 4, (pp. 631-671).

Kyrleou, M., Kallithraka, S., Theodorou, C., Teissedre, P., Kotseridis, Y., & Koundouras, S. (2017). Changes in Tannin Composition of Syrah Grape Skins and Seeds during Fruit Ripening under Contrasting Water Conditions. *Molecules*, 22(9).

Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma – A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, pp. 97-129.

Larsson, S., Quintana-Sainz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. O., & Jonsson, L. J. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, pp. 617–632.

Louie, K. B., Kosina, S. M., Hu, Y., Otani, H., de Raad, M., Kuftin, A. N., et al. (2020). 6.12 - Mass Spectrometry for Natural Product Discovery. In *Comprehensive Natural Products III* (pp. 263-306). Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.

Mamede, M. E., & Pastore, G. M. (2004). *Compostos fenólicos do vinho: Estrutura e ação antioxidante*. (B.CEPPA), 22(2), 21-30.

McRae, J., Dambergs, R., Kassara, S., Parker, M., Jeffery, D., Herderich, M., et al. (2012). Phenolic compositions of 50 and 30 year sequences of Australian red wines: The impact of wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), pp. 10093–10102.

Nguela, J. M., Vernhet, A., Julien-Ortiz, A., Sieczkowski, N., & Sieczkowski, J. -R. (2019). Effect of grape must polyphenols on yeast metabolism during alcoholic fermentation. *Food Chemistry*, 210, pp. 161-175.

Panprivech, S., Lerno, L., Brenneman, C., Block, D., & Oberholster, A. (2015). Investigating the effect of cold soak duration on phenolic extraction during Cabernet Sauvignon fermentation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20, pp. 7974-7989.

Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., & Girio, F. (2006). Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (3), 336–345.

Pietta, P., Minoggio, M., & Bramati, L. (2003). Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. In Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry*, 28 (1), (pp. 257-312). Elsevier.

Ramos, M., Pérez-Álvarez, E., Peregrina, F., & de Toda, F. (2020). Relationships between grape composition of Tempranillo variety and available soil water and water stress under different weather conditions. *Sci. Hortic*, 262, 109063.

Ratiu, I., Al-Suod, H., Ligor, M., Monedeiro, F., & Buszewski, B. (2020). Effects of growth conditions and cultivability on the content of cyclitols in *Medicago sativa*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18, pp. 1-16.

- Renard, C., Watrelot, A., & le Bourvellec, C. (2017). Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*, 60, pp. 43-51.
- Reyes, B. A., Dufourt, E. C., Ross, J., Warner, M. J., Tanquilut, N. C., & Leung, A. B. (2018). Chapter 4 - Selected Phyto and Marine Bioactive Compounds: Alternatives for the Treatment of Type 2 Diabetes. In Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry*, 55, (pp. 111-143). Elsevier.
- Sabel, A., Bredefeld, S., Schlender, M., & Claus, H. (2017). Wine Phenolic Compounds: Antimicrobial Properties against Yeasts, Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria. *Beverages*, 3.
- Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2014). Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *BioMed Research International*, 2014, 404680.
- Sakai, E., Farhana, F., Yamaguchi, Y., & Tsukuba, T. (2022). Chapter 1 - Potentials of natural antioxidants from plants as antiosteoporotic agents. In Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry*, 72, (pp. 1-28). Elsevier.
- Schröder, J. (2000). Chapter Three - The Family of Chalcone Synthase-Related Proteins: Functional Diversity and Evolution. In Atta-ur-Rahman, *Recent Advances in Phytochemistry* (pp. 55-89). Elsevier.
- Seguin, G. (1988). Ecosystems of the great red wines produced in the maritime climate of Bordeaux. *Proceedings of the Symposium on Maritime Climate Winegrowing* (pp. 36-53). Geneva, Estados Unidos: Department of Horticultural Sciences, Cornell University.
- Singh, M., & Silakari, O. (2018). Chapter 4 - Flavone: An Important Scaffold for Medicinal Chemistry. In O. Silakari, *Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules* (pp. 133-174). Elsevier.
- Su, X., Zhou, D., & Li, N. (2022). Chapter 8 - Bioactive stilbenes from plants. In Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry*, 73, (pp. 265-403). International Center for Chemical and Biological Sciences, H.E.J. Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Karachi, Pakistan: Elsevier.

- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, pp. 139-173.
- Tassoni, A., Zappi, A., Melucci, D., & Reisch, B. (2019). Seasonal changes in amino acids and phenolic compounds in fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, pp. 182–193.
- Vaccari, N. F., Soccol, M. C., & Ide, G. M. (2009). Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 8(1), 71-83.
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., & Dubourdieu, D. (2004). Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, pp. 207–217.
- Vasantha Rupasinghe, H., Nair, S. V., & Robison, R. (2014). Chapter 8 - Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions. In Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry*, 42, (pp. 229-266). Elsevier.
- Vernhet, A., & Moutounet, M. (2002). Fouling of organic microfiltration membranes by wine constituents: Importance, relative impact of wine polysaccharides and polyphenols and incidence of membrane properties. *Journal of Membrane Science*, 201, pp. 103–122.
- Wamhoff, H., & W. Gribble, G. (2012). Chapter 3 - Wine and Heterocycles. In A. R. Katritzky, *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 106, (pp. 185-225). Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, Florida: Academic Press.
- Waterhouse, A., & Laurie, F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306–313.
- Wojdyło, A., Samoticha, J., Nowicka, P., & Chmielewska, J. (2018). Characterisation of (Poly)Phenolic constituents of two interspecific red hybrids of Rondo and Regent (*Vitis vinifera*) . *Food Chem*, 239, 94–101.
- Yamane, T. (2018). Chapter 8 - Beneficial Effects of Anthocyanin From Natural Products on Lifestyle-Related Diseases Through Inhibition of Protease Activities. In T. Yamane, *Studies in Natural Products Chemistry*, 58, (pp. 245-264). Elsevier.

Zuiter, A. (2014). Proanthocyanidin: Chemistry and Biology: From Phenolic Compounds to Proanthocyanidins. In *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier.