UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E GESTÃO VITIVINÍCOLA

DANIEL DE SIQUEIRA FERREIRA

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL AROMÁTICO DE VINHOS ESPUMANTES CUJOS VINHOS BASE FORAM ELABORADOS COM LEVEDURAS *SACCHAROMYCES E TORULASPORA DELBRUECKII*

CAXIAS DO SUL

2018

DANIEL DE SIQUEIRA FERREIRA

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL AROMÁTICO DE VINHOS ESPUMANTES CUJOS VINHOS BASE FORAM ELABORADOS COM LEVEDURAS *SACCHAROMYCES E TORULASPORA DELBRUECKII*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Gestão Vitivinícola da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia e Gestão Vitivinícola.

Orientadora professora: Dra. Regina Vanderlinde
Co-orientadora: Dra. Sandra Valduga Dutra

CAXIAS DO SUL
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Universidade de Caxias do Sul

Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

F383d

Ferreira, Daniel de Siqueira

Determinação do potencial aromático de vinhos espumantes cujos vinhos base foram elaborados com leveduras Saccharomyces e Torulaspora delbrueckii / Daniel de Siqueira Ferreira. – 2018.

115 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Regina Vanderlinde.

Coorientação: Sandra Valduga Dutra.

1. Vinhos espumantes - Serra, Região (RS). 2. Leveduras. 3. Fermentação. 4. Bebidas fermentadas. 5. Compostos aromáticos. I. Vanderlinde, Regina, orient. II. Dutra, Sandra Valduga, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 663.223(816.5)

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)

Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

DANIEL DE SIQUEIRA FERREIRA

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL AROMÁTICO DE VINHOS ESPUMANTES ELABORADOS COM LEVEDURAS *SACCHAROMYCES* E *TORULASPORA DELBRUECKII*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão Vitivinícola da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia e Gestão Vitivinícola.

Orientadora: Drª. Regina Vanderlinde

Co-orientadora: Drª. Sandra Valduga Dutra

DISSERTACÃO APROVADA EM 29 DE JUNHO DE 2018.

_____

Drª. Regina Vanderlinde

Orientadora

_____

Drª. Sandra Valduga Dutra

Co-orientadora

_____

Dr. Julio Meneguzzo

_____

Dr. Vitor Manfroi

_____

Drª. Valdirene Camatti Sartori

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Regina Vanderlinde por ter me acolhido e me dado uma oportunidade de trabalhar, além de dividir seu tempo, conhecimentos e amizade comigo. Agradeço a Sandra Valduga Dutra e Gilberto Carniel, por todo o suporte e aprendizado e a Vanessa Webber, pela oportunidade de trabalho conjunto. Deixo também meu muito obrigado à Fernanda Spinelli, Susi Leonardelli, Verônica Frizzo, Ana Paula Drehmer, que me ajudaram em todas as análises químicas dos vinhos, sem as quais esse trabalho não seria possível. Agradeço ainda aos professores do programa de Mestrado da UCS pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, bem como aos meus colegas de turma por toda a troca de experiência. Também expresso aqui minha gratidão aos professores do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS) -*campus* Bento Gonçalves.

Agradeço aos enólogos Gilberto Simonaggio, meu orientador no estágio de graduação com quem aprendi a ser enólogo, e Alejandro Cardoso por ter cedido além de seu tempo e idéias, o mosto e as leveduras utilizadas neste trabalho. Agradeço ainda aos enólogos Antônio Czarnobay e Miguel de Almeida, por toda experiência compartilhada. À toda equipe do enoturismo da Miolo, pela troca de experiências e apoio. Gostaria de agradecer também aos meus amigos dos grupos Ladaia e Vocatus Vinum pelas discuções em torno dos vinhos e pela amizade. Meu muito obrigado também a ABE, por me possibilitar experiências incríveis em torno do vinho.

Gostaria também de dedicar esse trabalho aos meus pais, pelo suporte emocional e financeiro em toda minha jornada acadêmica, aos meus irmãos, especialmente ao Sávio por todo suporte técnico e a minha esposa Caroline pela paciência, companheirismo, dedicação e por compartilhar comigo a paixão pelos vinhos.

“Se você fosse escolher ou o amor ou o mundo, se escolhesse o mundo magoaria o amor, se escolhesse o amor dominaria os dois porque quem ama domina o Mundo”.

Albert Eistein

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar espumantes elaborados pelo método tradicional, com vinho base de uvas Chardonnay fermentados com leveduras *Saccharomyces e não-Saccharomyces*, provenientes da safra de 2015 da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. Foram analisadas as diferenças entre seis processos de fermentação (tratamentos), compostos por arranjos de duas leveduras: *Saccharomyces cerevisae* e *Torulaspora delbrueckii*, ambas comerciais e aplicadas ao vinho base. Os diferentes tratamentos consistiram em dois tratamentos com culturas puras, uma inoculação sequencial e três co-inoculações em diferentes concentrações de leveduras, totalizando seis tratamentos. Na sequência, os espumantes obtidos, foram avaliados em função do tempo, realizando análises trimestrais durante um ano. Os parâmetros analisados foram: análises clássicas dos vinhos, metanol, etanal, álcoois superiores, ésteres e ácidos voláteis, tirosol, índice de cor, compostos fenólicos totais, ácidos fenólicos, catequinas e epicatequinas. Os espumantes elaborados com 100% de *Saccharomyces cerevisae* apresentaram maiores concentrações em açúcares residuais e título alcoométrico e o menor nível em tirosol. Os álcoois superiores, apresentaram maiores concentrações nos espumantes elaborados com as leveduras *não-Saccharomyces*, apresentando maiores níveis no tratamento com 100% de *Torulaspora delbrueckii* (T6). Apesar de haver uma maior concentração de álcoois superiores no tratamento com leveduras *não-Saccharomyces,* estes ainda se apresentam dentro dos níveis admissíveis para um vinho de qualidade. Em todos os tratamentos, observou-se pequenas diferenças nos resultados de metanol, etanal e nos álcoois hexanol e trans-3-hexan-1-ol. A inoculação sequencial das leveduras *Saccharomyces cerevisae* e *Torulaspora delbrueckii* (na razão de 1:1), resultou em maior concentração de 2-feniletanol em relação aos demais tratamentos. Os ésteres do ácido acético não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, com exceção do acetato de 2-fenil etila, que apresentou diferenças entre a fermentação com inoculação sequencial e a fermentação com 100% *Torulaspora delbrueckii* e do acetato de etila, cuja maior concentração ocorreu nos espumantes onde a fermentação dos vinhos ocorreu com 100% *Torulaspora delbrueckii*. Os ésteres dos ácidos graxos apresentaram, em geral, maiores concentrações nos tratamentos cujas proporções de *Torulaspora delbrueckii* eram maiores. O dietil succinato apresentou a maior concentração no tratamento com a inoculação sequencial (T5) para todos os tempos avaliados. Os ácidos voláteis apresentaram menores concentrações nos tratamentos em que a *Torulaspora delbrueckii* está presente em

maior proporção (co-inoculação 200:1, sequêncial 1:1 e 100% *Torulaspora delbrueckii*). As diferenças entre os tratamentos se revelaram pouco representativas para os compostos fenólicos totais, índice de cor, catequinas, epicatequinas e ácidos fenólicos da série cinâmica. A variável tempo foi a principal responsável pelas variações observadas nestes compostos e as leveduras utilizadas no trabalho, pouco influenciaram nos resultados. Este trabalho permitiu evidenciar diferenças aromáticas entre os espumantes elaborados com leveduras *Saccharomyces e não-Saccharomyces* e novos estudos deverão avaliar outras características dos espumantes como estabilidade proteica e formação de espuma, com o intuito de melhorar o perfil dos espumantes nacionais.

PALAVRAS–CHAVES: Espumantes, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisae*, compostos voláteis, compostos fenólicos.

ABSTRACT

This study had as an objective evaluate sparkling wines produced by the traditional method witch the base wine was made of Chardonnay grapes fermented with *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* yeasts, from the 2015 harvest of Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. Six fermentation processes (treatments), composed of two yeast arrays: *Saccharomyces cerevisae* and *Torulaspora delbrueckii*, both commercial, applied to the base wine. The different treatments consisted of two treatments with pure cultures, one sequential inoculation and three co-inoculations at different concentrations of yeasts. Afterwards, the obtained sparkling wines were evaluated as a function of time, performing analyzes with intervals of three months between them. The parameters analyzed were: classic analyzes of wines, methanol, ethanal, higher alcohols, esters and volatile acids, tyrosol, color index, total phenolic compounds, phenolic acids, catechins and epicatechins. The sparkling wines elaborated with 100% of *Saccharomyces cerevisae* showed higher concentrations in residual sugars and alcoholic strength. The higher alcohols presented higher concentrations at the sparkling wines made with the *non-Saccharomyces* yeasts, presenting higher levels in the treatment with 100% of *Torulaspora delbrueckii* (T6). Although there is a higher concentration of higher alcohols in the treatment with non-Saccharomyces yeasts, they are still within acceptable levels for a quality wine. Small differences in the results of methanol, ethanal and hexanol and trans-3-hexan-1-ol were observed. Sequential inoculation of yeasts *Saccharomyces cerevisae* and *Torulaspora delbrueckii* (1:1) resulted in higher concentration of 2-phenylethanol in relation to the other treatments. The esters of acetic acid did not present significant differences between the treatments, except for 2-phenyl ethyl acetate, which showed differences between the fermentation with sequential inoculation (1:1) and the fermentation with 100% *Torulaspora delbrueckii* and ethyl acetate, whose highest concentration occurred in the sparkling wines where wine fermentation occurred with 100% *Torulaspora delbrueckii*. The fatty acid esters presented, in general, higher concentrations in the treatments whose proportions of *Torulaspora delbrueckii* were larger. Diethyl succinate presented the highest concentration in the treatment with the sequential inoculation (T5) for all evaluated times. Volatile acids had lower concentrations in treatments where *Torulaspora delbrueckii* was present in greater proportion (200:1 co-inoculation, sequential 1:1 and 100% Torulaspora delbrueckii). The differences between the treatments were not very representative for the total phenolic compounds, color

index, catechins, epicatechins and phenolic acids of the cinnamic series. The time variable was the main responsible for the observed variations and the yeasts used in the work had little influence on the results. This work allowed to show the aromatic differences between the elaborated sparkling wines with *Saccharomyces* and *non-Saccharomycese* new studies should evaluate other characteristics of the sparkling wines as protein stability and formation in order to improve the profile of the national sparkling wines.

KEYWORDS: Sparkling, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisae*, volatile compounds, phenolic compounds.

Lista de Figuras

FIGURA 1 - PRODUÇÃO DE UVAS NO RIO GRANDE DO SUL FONTE: IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016). 20

FIGURA 2 - COMERCIALIZAÇÃO DE VINHOS FINOS ELABORADO POR EMPRESAS GAÚCHAS. FONTE: IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016). 21

FIGURA 3 - COMERCIALIZAÇÃO DE ESPUMANTES ELABORADOS POR EMPRESAS GAÚCHAS. FONTE: IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016). 22

FIGURA 4 - IMPORTAÇÃO DE ESPUMANTES E ESPUMOSOS. FONTE: MDIC - SISTEMA ALICEWEB, IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016).23

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE ESPUMANTES (ROBINSON, 2006). 25

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA MÉTODO ASTI (ROBINSON, 2006).....25

FIGURA 7 - UNIDADES DE FERMENTAÇÃO 54

Lista de Tabelas

Tabela 1-Valores de açúcares residuais, teor alcoólico, ph, acidez volátil e total dos vinhos espumantes elaborados com diferentes leveduras aos 3 meses de autólise. 62

Tabela 2 - Resultados do índice de cor compostos fenólicos totais, catequinas e epicatequinas nos vinhos espumantes em diferentes tratamento e tempos de conservação durante um ano de autólise. 63

Tabela 3 - Resultados e ácidos fenólicos nos vinhos espumantes dos diferentes tratamentos durante um ano de autólise. 66

Tabela 4 - Valores metanol e etanal obtidos nos vinhos espumantes elaborados com diferentes leveduras, durante um ano de autólise. 68

Tabela 5 - Resultados dos álcoois superiores dos vinhos espumantes elaborados com diferentes leveduras, durante um ano de autólise. 71

Tabela 6 - Somatório dos álcoois superiores dos vinhos espumantes elaborados com diferrentes leveduras, durante um ano de autólise. 72

Tabela 7 - Resultado dos álcoois com seis átomos de carbono dos vinhos obtidos com diferentes leveduras, durante um ano de autólise. 74

Tabela 8 - Ésteres de ácido acético nos vinhos elaborados com as diferentes leveduras, durante um ano de autólise. 77

Tabela 9 - Resultados obtidos para os ésteres de ácidos graxos nos diferentes tratamentos, durante um ano de autólise. 79

Tabela 10 - Resultados dos ácidos voláteis dos vinhosespumantes elaborados com diferentes leveduras, durante um ano de autólise. 81

Tabela 11 - Resultados dos os ácidos graxos obtidos nos vinhos espumantes nos diferentes tratamentos e tempos de conservação, durante um ano de autólise. 83

Sumário

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

2.1 HISTÓRIA DOS ESPUMANTES 18

2.2 VINHOS E ESPUMANTES NO MERCADO NACIONAL 20

2.3 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ESPUMANTE 23

2.4 LEVEDURAS *SACCHAROMYCES* E *NÃO-SACCHAROMYCES* 26

2.4.1 Taxonomia 26

2.4.2 *Saccharomyces* 28

2.4.3 *Não-Saccharomyces* 29

2.4.3.1 *Candida* 29

2.4.3.2 *Torulaspora delbrueckii* 30

2.5 FATORES DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA 31

2.6 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO 33

2.6.1 Metabolismo do nitrogênio 33

2.7 METABOLISMO DE CARBONO 35

2.7.1 Glicólise 35

2.7.2 Fermentação e respiração 38

2.7.3 Fermentação alcoólica 39

2.7.4 Fermentação gliceropirúvica 40

2.7.5 Desenvolvimento das leveduras durante a fermentação alcoólica 41

2.7.6 Oxigênio e biossíntese de lipídeos 41

2.8 SUBPRODUTOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 43

2.8.1 Etanal 43

2.8.2 Álcoois superiores 43

2.8.3 Ésteres 44

2.8.4 Compostos fenólicos 45

2.9 AUTÓLISE 47

2.10 CO-FERMENTAÇÃO COM LEVEDURAS *NÃO-SACCHAROMYCES* 51

3 MATERIAIS E MÉTODOS 52

3.1 REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO 52

3.2 PREPARO DOS PÉS DE CUBA 54

3.3 PREPARO DOS TRATAMENTOS....55
3.4 TOMADA DE ESPUMA....55
3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE....56
3.5.1 Determinação de teor alcoólico, açúcares redutores (glicose + frutose), pH, acidez volátil e acidez titulável....56
3.5.2 Determinação de etanal (acetaldeído), acetato de etila, acetal, metanol e álcoois superiores (1-butanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol)....57
3.5.3 Determinação de acetatos, ésteres e ácidos graxos....58
3.5.4 Determinação dos Índices de cor....59
3.5.5 Determinação dos compostos fenólicos totais em vinhos....60
3.5.6 Determinação dos teores de tirosol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido cafeico, ácido ferrúlico e ácido coumárico....60
3.5.7 Análise estatística....60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO....61
4.1 ANÁLISES BÁSICAS....61
4.2 COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS....62
4.2.1 Índice de cor....62
4.2.2 Compostos fenólicos totais....64
4.2.3 Ácidos fenólicos....64
4.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS....66
4.3.1 Metanol e etanal....66
4.3.2 Álcoois superiores....69
4.3.3 Tirosol e outros álcoois com seis carbonos: hexanol, trans-3-hexan-1-ol e 2-fenil etanol....72
4.3.4 Ésteres....75
4.3.4.1 Ésteres do ácido acético (acetatos)....75
4.3.4.2 Ésteres dos ácidos graxos....78
4.3.5 Ácidos voláteis....80
4.3.6 Ácidos graxos....82
5 CONCLUSÕES....85
6 PERSPECTIVAS FUTURAS....86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....87

Anexos

Anexo IA- Manual da levedura *Torulaspora delbrueckii (não-Saccharomyces)*.....109

Anexo IB- Manual da levedura *Saccharomyces cerevisae var. baynus*.....111

Anexo II- Resultados totais.....112

1 INTRODUÇÃO

A Serra Gaúcha, região vitivinícola mais importante do Brasil, apresenta aptidão enológica diferenciada para a produção de vinhos espumantes. Nessa região são produzidas anualmente aproximadamente nove milhões de garrafas de vinhos espumantes, que representam mais de 95% de todo o vinho espumante brasileiro. Entre os vinhos produzidos, o espumante é aquele que agrega maior valor ao produto. Este segmento da enologia apresenta elevado interesse socioeconômico, tendo em vista a geração de emprego e renda em toda a cadeia produtiva.

Elaborado em diferentes técnicas (Asti, Charmat, Método Tradicional), com diferentes graus de doçura e categorias (aromáticos ou não), o espumante vem aumentando sua participação no mercado ano após ano. Segundo o IBRAVIN (2014), de 2004 a 2013, a produção de vinhos espumantes cresceu 187% ao passo que, no mesmo período, o processamento de uvas viníferas aumentou 47,8%. O método tradicional é mais adequado para os pequenos produtores de vinho espumante, no entanto, o processo é mais demorado, além de apresentar um caráter artesanal, visto que a segunda fermentação é realizada na garrafa. Mais recentemente alguns produtores tem utilizado o chamado "método Ancestral" que difere do tradicional por ser realizado em um só processo fermentativo, sendo a tomada de espuma realizada antes do final da fermentação alcóolica em garrafa.

Poucos estudos têm sido realizados para investigar o papel de leveduras *não-Saccharomyces* na elaboração de vinhos e os possíveis benefícios para a indústria enológica com o uso dessas leveduras associadas à *Saccharomyces*. A presença e permanência de leveduras *não-Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica proporciona a interação entre as espécies, melhorando o produto final não só por reduzir metabolitos indesejáveis como, também, por acentuar compostos aromáticos agradáveis como acetato isoamílico e 2-feniletanol, além de realçar o sabor e aroma através de metabólitos secundários. Testes com leveduras como a *Torulaspora delbrueckii*, comprovaram que essa espécie impacta positivamente o sabor de algumas bebidas, produzindo baixos níveis de compostos indesejáveis como ácido acético, acetaldeídos e acetoína, ressaltando o aroma varietal por hidrolisar seus precursores além de ser capaz de fermentar bem em mostos com alta concentração de açúcar.

Em fermentações conjuntas, há o aumento de biomassa, levando a uma maior quantidade de polissacarídeos e manoproteínas, o que proporciona uma maior proteção às instabilidades proteicas e tartáricas, aumentando a percepção de doçura, retenção de compostos aromáticos, redução de adstringência, interação com taninos, além de aumentar o corpo do vinho.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi determinar o potencial aromático e sua evolução durante o armazenamento dos vinhos espumantes elaborados com leveduras *Saccharomyces* e *Torulaspora delbrueckii (não*-S*accharomyces*). Mais especificamente, foi avaliada a concentração de compostos como ésteres e ácidos voláteis (compostos aromáticos), compostos fenólicos, além do índice de cor em vinhos espumantes. Procurou-se igualmente estabelecer uma relação entre os aspectos negativos e positivos do uso das duas cepas comerciais no vinho espumante, assim como estudar a evolução dos aromas nos vinhos elaborados em função do tempo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA DOS ESPUMANTES

Antes do século XVII, na região de Champagne (França), as uvas colhidas no outono eram prensadas e levadas a fermentar em tanques. Quando a velocidade da fermentação diminuía, as portas da cantina eram abertas para que o frio do final do outono entrasse, o que ajudava na parada de fermentação. O vinho passava então todo o inverno com açúcar residual, o que lhe conferia um potencial de fermentação. Porém, o vinho era erroneamente presumido como pronto, armazenado em barricas e levado a exportação. A Inglaterra era o principal mercado consumidor, no século XVII, deste delicado vinho produzido na região (JOHNSON & ROBINSON, 2008). Com a chegada da primavera, e o natural aumento da temperatura, os vinhos voltavam a fermentar, fazendo com que as rolhas estourassem.

Enquanto o vinho refermentava na garrafa, o gás liberado era dissolvido no liquido. Se este efeito fosse estimulado pela adição do *liqueour de tirage* (açúcar e levedura), o vinho mudava de caráter. Aquele vinho delicado, leve e elegante se desenvolvia, ganhado força e personalidade por um período de dois anos ou mais (JOHNSON & ROBINSON, 2008).

No século XVII, um abade do mosteiro Hautvillers, Dom Pérignon, iniciou o estudo e padronizaçãoda produção desse novo tipo de bebida, o que lhe rendeu o título de inventor do Champagne. A bebida passa então a não ser mais um vinho que refermentava acidentalmente na garrafa. Foi ele quem definiu as melhores cultivares e técnicas de cultivo, desenvolveu a produção dos *cuvées* com diferentes cultivares e safras. Foi o primeiro a elaborar um *Blanc de Noir* (vinho branco feito de uvas tintas) e a instituir o uso de garrafas mais grossas e resistentes, como as inglesas, para a refermentação do vinho, além do uso de rolhas de cortiça. Graças a sua dedicação, o Champagne passa a ser um produto de exportação (DOMINÉ, 2005).

Na segunda metade do século XVII, a fama do Champagne cresce quando a bebida é introduzida no Palácio de Versalles e em Londres, pelo Marques de Sillery e Marques de St.Évremond, respectivamente. Mesmo com o uso da nova tecnologia de garrafas mais fortes, cerca da metade delas não suportavam a pressão e estouravam, fazendo com que apenas alguns milhares de garrafas fossem produzidos anualmente. Isso tornava produção muito cara e o mercado muito pequeno. Mas ainda na primeira metade do século XVIII, os grandes produtores e apreciadores de vinho acreditavam que os espumantes produzidos em Champagne eram inferiores aos vinhos tranquilos da região. Duas descobertas que se seguiram no século XIX possibilitaram uma melhor compreensão do que seria necessário para controlar o processo: Jean-Antoine Chaptal, ministro e cientista francês, constata que os espumantes só apresentam gás por terem sido rolhados antes que a fermentação fosse completada; André François, farmacêutico francês, descobre como calcular a exata quantidade de açúcar necessária para que a segunda fermentação ocorra sem que a garrafa estoure. Estes novos conhecimentos possibilitaram que os enólogos pudessem calcular corretamente o *liqueour de tirage*, modernizando a indústria (ROBINSON, 2006).

Ainda no início do século XIX, Barbe-Nicole Ponsardin, mais conhecida como viúva Clicquot, procurava uma forma de eliminar os resíduos das leveduras provenientes da segunda fermentação. A *transvasage* e os filtros de *colle*, eram os métodos mais utilizados. A *transvasage*, que consiste em passar o vinho de uma garrafa a outra eliminando a borra, eliminava também um pouco de espuma e com isso se desperdiçava uma boa quantidade de vinho de qualidade. Os filtros de *colle*, além de demorados, afetavam a qualidade podendo ser bem perigosos. Para superar este problema, Barbe-Nicole surge com uma idéia simples, mas

brilhante: ao invés de estocar as garrafas empilhadas deitadas, passa a estocá-las com a boca para baixo, colocando na adega sua mesa da cozinha com buracos no tampo em um determinado ângulo, com o tamanho exato do gargalo de uma garrafa. Seis semanas mais tarde, Barbe-Nicole observou que era possível eliminar todo o sedimento com um gesto rápido de tirar e recolocar a rolha. No processo, após a retirada da rolha com uma faca, em forma de gancho e a expulsão dos sedimentos, o nível das garrafas era completado com o *liqueur d'expédition,* selando as garrafas com rolha novamente. Com essa simples alteração, foi possível acelerar e aumentar a produção. Estava descoberto o método de *remuage* nos pupitres, tal como conhecemos hoje (MAZZEO, 2009).

No início do século XX, ocorre uma nova revolução no processo de produção de espumantes. Eugene Charmat desenvolve, em Bordeaux, um meio de produção mais barato, rápido e com a possibilidade de trabalhar com grandes volumes em tanques fechados (*cuve close*), o método Charmat (ROBINSON, 2006).

2.2 VINHOS E ESPUMANTES NO MERCADO NACIONAL

A produção de vinhos e seus derivados no Brasil concentra-se em poucas regiões, sendo o Rio Grande do Sul o estado de maior produção, onde a cultura das uvas *Vitis labrusca* e híbridas ainda são dominantes. Na safra de 2015 no estado do Rio Grande do Sul (Figura 1), apenas 11% de toda produção de uvas foi de cultivares *Vitis vinífera,* sendo que as cultivares mais processadas no estado foram as *Vitis labrusca,* Isabel e Ives (Bordô).

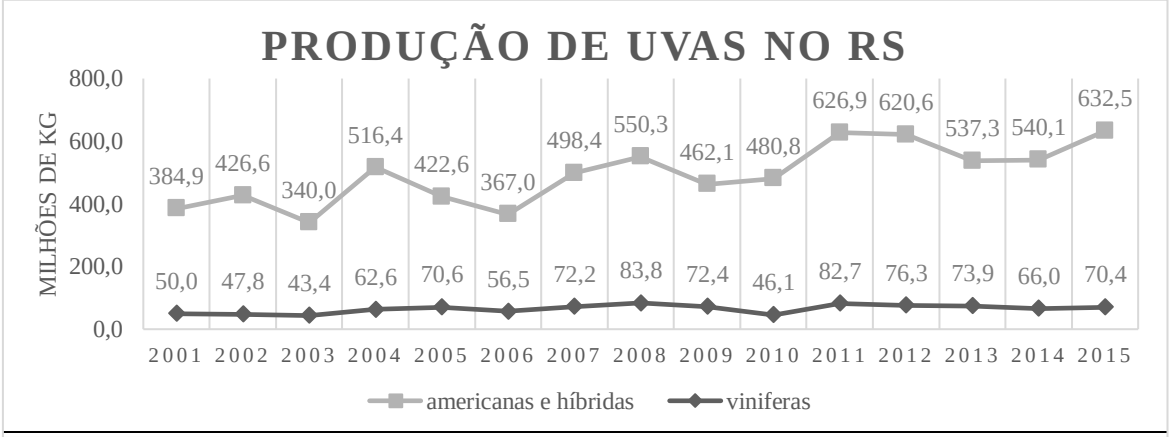


FIGURA 1 - PRODUÇÃO DE UVAS NO RIO GRANDE DO SUL FONTE: IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016).

Em relação à comercialização de vinhos finos produzidos no estado (Figura 2), observa-se uma tendência de estagnação no período de 2004 à 2015. Apesar do crescimento nos tintos nesse período (+41,7%), houve uma queda importante nos brancos (-49,4%) e rosados (-50,0%). A queda na produção dos brancos e rosados pode ser explicada pela mudança de hábito de consumo do brasileiro que vem substituindo o consumo destes, dando preferência aos espumantes.

Já em relação à comercialização de espumantes, observa-se um forte crescimento (+241,8%) nesse mesmo período (Figura 3). Deste crescimento, merece destaque os 614,2% de crescimento na comercialização dos moscatéis, acompanhados do crescimento de 187,5% dos espumantes elaborados pelos métodos charmat e tradicional.

FIGURA 2 - COMERCIALIZAÇÃO DE VINHOS FINOS ELABORADO POR EMPRESAS GAÚCHAS. FONTE: IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016).

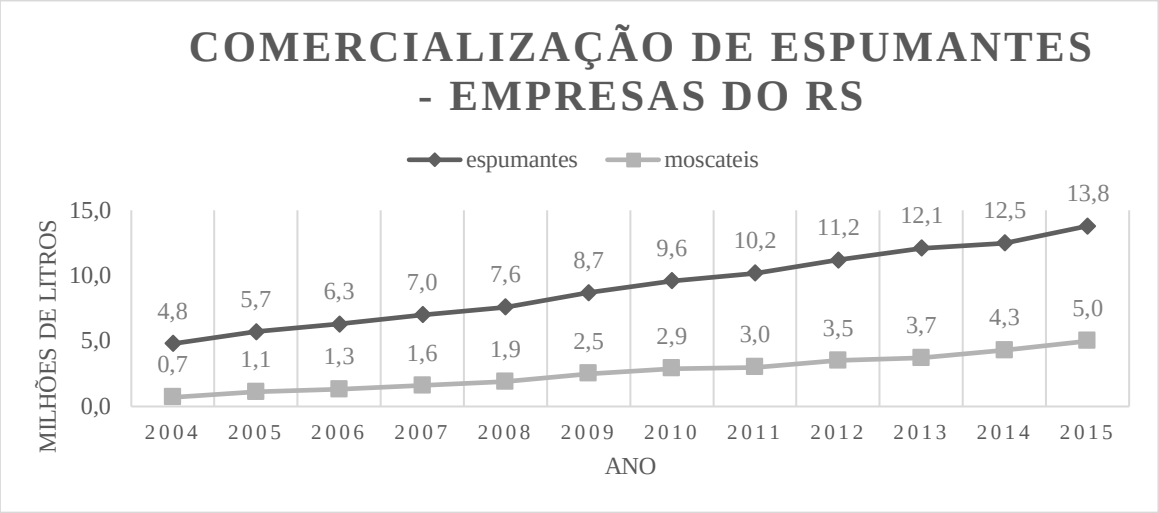


FIGURA 3 - COMERCIALIZAÇÃO DE ESPUMANTES ELABORADOS POR EMPRESAS GAÚCHAS. FONTE: IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016).

No que diz respeito à importação de espumantes, observa-se uma mudança na preferência do brasileiro quanto ao tipo de espumante importado (Figura 4). No período analisado, houve um incremento de 32,2% no volume de espumantes importados. Dentre eles, os do tipo Champagne, que são reconhecidos por sua alta estrutura, peso, complexidade e preço, caíram em 50%. Enquanto os outros estilos mais leves e baratos (Cava, Prosecco, Lambrusco e Asti, por exemplo) tiveram um crescimento de 106% no mesmo período. Este fato acompanha o crescimento de vendas do espumante brasileiro, que de forma geral, é mais leve, frutado, fácil de beber e com preço competitivo. É possível que a diminuição da importação dos Champagne reafirme a tendência do mercado do espumante brasileiro, mostrando que as indústrias vitivinícolas estão no rumo certo.

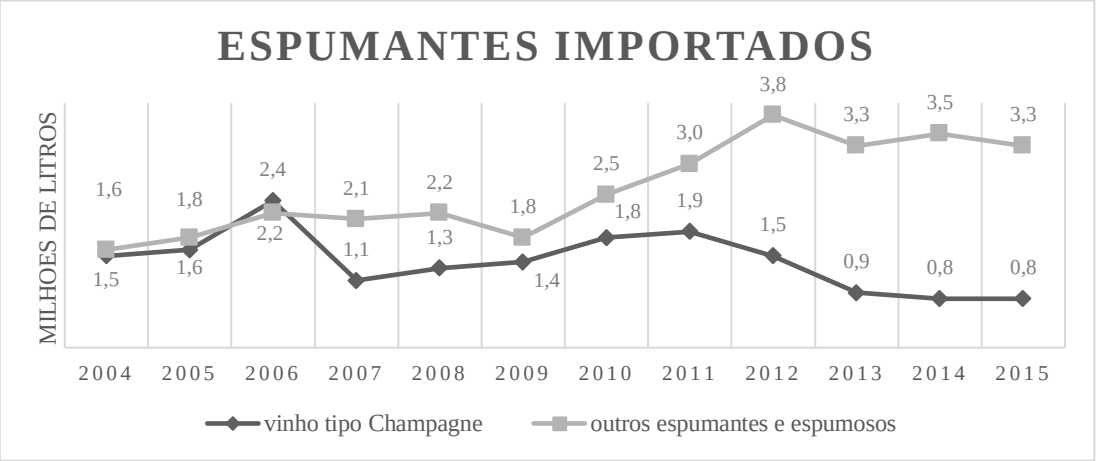


FIGURA 4 - IMPORTAÇÃO DE ESPUMANTES E ESPUMOSOS. FONTE: MDIC - SISTEMA ALICEWEB, IBRAVIN/MAPA/SEAPA - CADASTRO VINÍCOLA (2016).

2.3 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ESPUMANTE

A definição de espumante, segundo a lei 7678/88 do vinho brasileiro (MAPA, 1988) está disposta no artigo 11:

> "Art. 11. Champanha (Champagne), Espumante ou Espumante Natural é o vinho cujo anidrido carbônico provém exclusivamente de uma segunda fermentação alcoólica do vinho em garrafas (método Champenoise/tradicional) ou em grandes recipientes (método Chaussepied/Charmat), com uma pressão mínima de 4 (quatro) atmosferas a 20ºC (vinte graus Célsius) e com teor alcoólico de 10% (dez por cento) a 13% (treze por cento) em volume." (NR)

Como podemos perceberna lei, existem diferentes técnicas para produzir um espumante. O método mais antigo e famoso é o *Traditionnelle* ou *Classique* (tradicional). Este método consiste em adicionar o *liqueur d' tirage* a um vinho base, que se encontra em tanques, engarrafando-o imediatamente, deixando que refermente em garrafas lacradas. Em seguida, essas garrafas são levadas ao envelhecimento (autólise e *sur lie*), deitadas e empilhadas na horizontal. Após o período desejado essas garrafas são levadas aos *pupitres*, ou mais recentemente aos *giropaletes*, para que os sedimentos sejam deslocados até o gargalo, seguindo-se o resfriamento e o congelamento do bico. Desta forma, o sedimento fica preso à tampa e quando esta é retirada, a pressão do liquido expulsa os sedimentos. A garrafa contendo o vinho límpido recebe a correção de volume e doçura através do *liqueur d'expedition* e, por último, a garrafa recebe a rolha e o arame (ROBINSON, 2006).

Na figura 5, apresentamos o método tradicional e as duas possíveis variações: *transversage* e *transferência.* No método *transversage,* o espumante segue o mesmo processo do método tradicional até o momento do degorgement, quando o espumante é colocado em tanques onde recebe a correção final do açúcar (*liqueur d'expedition*) e é novamente engarrafado recebendo a rolha e o arame. Este método é muito utilizado na produção de garrafas em tamanhos especiais. Este artifício é muito usado na região de Champagne, mantendo a tradição de refermentação em garrafas e otimizando o trabalho, que por sua vez, reduz custos (ROBINSON, 2006). A outra variação do método tradicional é o método de *transferência*, que difere do método *transversage* pois segue para o tanque um pouco antes. A transferência é feita logo após o envelhecimento (autólise e *sur lie*), não sendo realizados *remouage* e *degorgement.* Em substituição, é feita uma clarificação utilizando algum coadjuvante, como bentonite, e ocasionalmente uma filtragem. O vinho recebe o *liqueur d'expedition,* e está pronto para seguir para as garrafas usando um filtro de contrapressão. Este método tende a cair no desuso, por apresentar várias das desvantagens do método tradicional, como o custo, sem igualá-lo em qualidade (ROBINSON, 2006).

Ainda na figura 5, observamos o método Charmat, ou método de tanque. Neste método o vinho base recebe o *liqueur d'tirage* e a segunda fermentação ocorre em um tanque lacrado resistente a pressão. Assim que a pressão desejada é alcançada, o vinho espumante é resfriado finalizando a fermentação. O espumante resultante é clarificado, dosado (*liqueur d'expedition*) e por fim engarrafado utilizando um filtro de contrapressão. Algumas empresas mantêm o vinho em contato com as borras após o término da tomada de espuma, utilizando agitadores para movimentá-las de tempos em tempos. Essa variação é chamada de Charmat Longo e proporciona espumantes mais cremosos (ROBINSON, 2006).

O método Asti, consiste em levar um mosto de uvas aromáticas a fermentação em tanque de pressão, inicialmente aberto, até atingir aproximadamente 6% v/v de álcool. Neste momento o tanque é lacrado e o mosto é parcialmente fermentado. Para interromper a fermentação, o tanque é resfriado e o vinho é clarificado e engarrafado com filtros de contrapressão. Com a interrupção da fermentação, sobram açúcares residuais da uva, deixando o produto doce (ROBINSON, 2006). O teor alcóolico típico do produto no Brasil é de 7,5% v/v, atingindo assim a pressão desejada de 4 atmosferas a 20 ^{o}C (MAPA, 1988, art. 12)

As figuras 5 e 6 apresentam as etapas da produção dos diferentes tipos de espumantes.

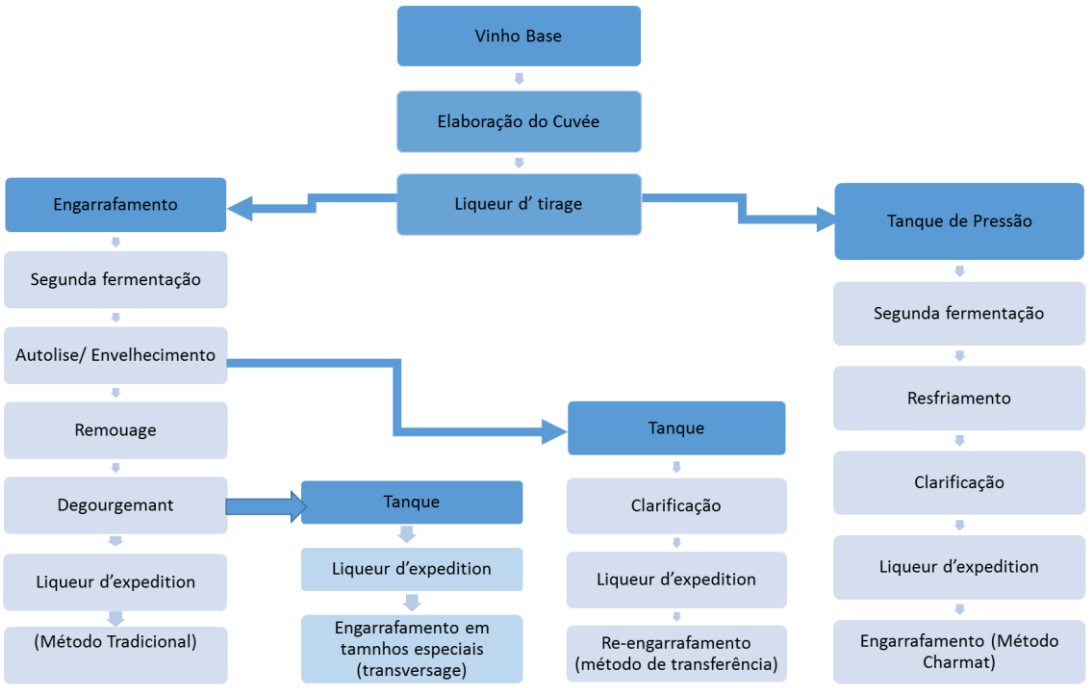


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE ESPUMANTES (ROBINSON, 2006).

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA MÉTODO ASTI (ROBINSON, 2006).

Existem ainda outros três métodos de produção de espumantes: Método Contínuo, Ancestral e Carbonatação. O Método Contínuo, desenvolvido na Rússia, é atualmente usado em Portugal e na Alemanha e utiliza 5 tanques, previamente pressurizados. No primeiro

tanque é adicionado o vinho base, açúcar e leveduras e a segunda fermentação tem início. O aumento de CO_2 aumenta a pressão no tanque e as leveduras não conseguem se multiplicar, sendo necessário adicionar mais células continuamente. O segundo e terceiro tanque são parcialmente preenchidos com "chips" de madeira para acumular e aumentar a área de contato das células mortas com o vinho, para que certa quantidade de autólise ocorra. No quarto e quinto tanque, o vinho aparece sem leveduras e praticamente limpo. Neste sistema o vinho, na média, leva de 3 a 4 semanas para ficar pronto (ROBINSON, 2006). O Método Ancestral, normalmente resulta em um vinho demi-sec, leve, com pressão reduzida e com algum depósito. O vinho deve ser engarrafado com açúcar residual, que termina por fermentar no recipiente. Em alguns casos o vinho e decantado e re-engarrafado utilizando o método de transferência (ROBINSON, 2006). Na Carbonatação, o gás carbônico é injetado diretamente dos cilindros aos tanques sendo engarrafado sob pressão. Resulta em bolhas grandes, mas abundantes, que rapidamente se esvaem. É a maneira mais rápida e barata de se produzir um espumante. Pelas leis Europeias deve conter no mínimo três atmosferas de pressão. (ROBINSON, 2006). No Brasil este produto é classificado como gaseificado e deve conter no mínimo 2,1 e no máximo 3,9 atm. de pressão e o teor alcoólico deve ser superior a 7 e inferior a 14%, segundo a lei 7678/88 (MAPA, 1988, art. 13).

2.4 LEVEDURAS *SACCHAROMYCES* E *NÃO-SACCHAROMYCES*

Leveduras são os microrganismos mais importantes na produção de vinhos. Apesar da grande importância das *Saccharomyces*, existem diversos outros gêneros e espécies presentes durante a vinificação que podem afetar a qualidade positivamente ou negativamente (FLEET and HEARD, 1993; FUGELSANG et al., 1993; DEAK and BEUCHAT, 1996; LOUREIRO and MALFEITO-FERREIRA, 2003). O termo "*não-Saccharomyces"* é atualmente mais empregado para definir as leveduras naturalmente encontradas no mosto, mas que sejam diferentes do gênero *Saccharomyces* (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

2.4.1 Taxonomia

Para as leveduras a classificação de gênero depende da presença ou ausência de uma fase sexual no seu ciclo de vida. Os ascósporos, esporos sexuais, são produzidos e permitem a germinação de novas células por brotamento. A falta de esporos sexuais durante o ciclo de

vida resulta na classificação forma assexual (imperfeita) ou anamorfismo, do contrário é classificada como sexual (perfeita) ou telemorfismo. Porém no que diz respeito a outro critério, como utilização de nitrogênio ou fermentação de açúcares específicos, anamorfismo e telemorfismo são idênticos (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

A reprodução assexual é a forma de reprodução mais comum e a única forma encontrada em mostos e líquidos em fermentação. Inicialmente apresenta um broto na célula mãe e eventualmente uma célula filha quando o broto se separa por completo. Sob condições ótimas de cultivo, uma célula mãe pode dar origem a diversas células filhas. No entanto, sob condições restritivas de fermentação uma célula mãe se multiplica apenas três ou quatro vezes, pois a cada novo broto, a célula mãe perde cerca de 50% de sua membrana celular. Um dos motivos para tal restrição é a diminuta quantidade de oxigênio disponível no mosto, sendo este necessário para a formação de precursores da membrana celular e a pouca disponibilidade deste elemento inviabiliza replicações futuras (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

Dentre as leveduras isoladas em mostos fermentando e em vinhos em envelhecimento, os brotamentos mais comuns são os multilaterais e os polares (leveduras apiculadas). Outro meio de reprodução assexuada que a levedura pode apresentar é o de fissão binária, porém muito menos frequente (FUGELSANG & EDWARDS, 2007). Para as *Saccharomyces,* o brotamento normalmente ocorre nos "ombros" das leveduras. Após a separação, a célula mãe é deixada com cicatrizes dos brotos das células filhas. O brotamento lateral depende da idade da cultura, status fisiológico além de condições físicas e químicas da cultura (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

Em algumas espécies os brotamentos podem alterar a forma das leveduras, como no caso da *Brettanomyces,* que assumem forma retangular ou ogival, com a formação de pseudomisceliuns, ou no caso das espécies *Kloeckera* e *Saccharomycodes,* em que o brotamento ocorre nos dois polos, dando as células mais velhas o formato apiculado, com aparência de um limão (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

Apesar das leveduras serem diferenciadas por taxonomistas por vários nomes de gênero e espécies, vários enólogos utilizam um meio informal de diferenciá-las baseadas na morfologia ou outras características. *Kloeckera apiculada* é comumente referida como levedura apiculada devido ao seu formato de limão. Essa, bem como outras leveduras como: *Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hansenula, Issatchenkia, Kluyveromyces,*

Metschnikowia, Pichia e *Rhodotorula*, são frequentemente chamadas de selvagens, indígenas ou nativas. Isso se deve ao fato de serem normalmente encontradas nos vinhedos ou nas vinícolas. As leveduras também podem ser classificadas, de modo informal, por se apresentarem durante ou após a fermentação de acordo com seu metabolismo. As "leveduras fermentativas" como as *Saccharomyces*, por exemplo, são as que conduzem a fermentação, enquanto as "leveduras de flor" (*Candida, Hansenula e Pichia*) são as que aparecem durante o envelhecimento dos vinhos, e que na presença de oxigênio produzem um filme sobre a superfície e que normalmente estão associadas à deterioração da bebida (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

2.4.2 *Saccharomyces*

Vaughan-Martini e Martini (1998) descreveram as leveduras *Saccharomyces* como células ovóides globosas com brotamentos multilaterais. Essas leveduras formam de um a quatro ascósporos, lisos e de formato elipsoide. As colônias são normalmente lisas, achatadas e opacas. As primeiras espécies encontradas no vinho foram as *S.c.bayanus* e *S. cerevisiae* (forma anamórfica da *Candida robusta)*, fermentam glicose, sacarose e rafinose. Assimilam glicose, maltose, sacarose, rafinose e etanol, porém não assimilam nitratos e não podem utilizar pentoses.

Com o passar do tempo houve muitas mudanças na taxonomia da *Saccharomyces cerevisiae*, Vaughan-Martini e Martini (1998a) descreveram 97 sinônimos. A *S. carlsbergensis* foi reclassificada como *S. uvarum*, passando a *S. cerevisiae race uvarum* e finalmente *S.pastorianus.* Atualmente as leveduras *S.cerevisiae* e *S.c.bayanus* são avaliadas em duas correntes, uma que pressupõem serem duas espécies diferentes (VAUGHAN-MARTINI E MARTINI, 1998a), ou a segunda que postula serem a mesma espécie, porém com diferenças muito sutis para serem classificadas como duas raças diferentes (BOULTON et al., 1996; FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

Na década de 90, a *S.cerevisiae* foi dividida em seis grupos de acordo com a sua taxonomia: *cerevisiae, cheresanus, diastaticus, ellipsoideus, logos* e *oviformis* (NAUMOV, 1996). Cepas definidas com *S. cerevisiae var bayanus* são agora classificadas dentro do grupo

dos *oviformis.* As leveduras predominantes nos vinhos são as dos grupos *ellipsoideus* e *oviformis,* apesar de serem encontradas leveduras dos outros quatro grupos e ainda, mais recentemente, algumas cepas híbridas *(S. cerevisiae* X *S. bayanus* e *S. cerevisiae* X *S. kudriavzevii)* (GONZALEZ, 2006). A diversidade dentro do grupo das *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces* vem sendo demostradas por vários autores (QUEROL et al. 1994; SCHUTZ and GAFNER 1994; VERSAVAUD et al. 1995; SABATE ET AL. 1998; KHAN et al. 2000; LOPES et al. 2002; VAN DER WESTHUIZEN et al. 2002A, B; SCHULLER et al. 2005; VALERO et al. 2007).

Sabate (1998) identificou durante duas safras 60 e 65 cepas com DNA mitocondrial diferentes, sendo que somente 21 destas estavam presentes nas duas safras. Resultados semelhantes foram encontrados por Lopes (2002), na Argentina. Muitos destes estudos mostram a grande diferença de genótipos encontrados em um isolado, o que indica que a diversidade ainda é subestimada. Alguns estudos observaram que apesar da diversidade, apenas algumas cepas dominam o processo de fermentação (VERSAVAUD et al. 1995), enquanto outros mostram que diferentes cepas dominam diferentes estágios da fermentação (SABATE et al.1998).

2.4.3 *Não-Saccharomyces*

As *não-Saccharomyces* são conhecidas por produzirem menores teores de álcoois superiores, como n-propanol e isobutanol, em relação às *Saccharomyces* (ROMANO *et al*., 1992; LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000), sendo que altas concentrações destes álcoois estão associadas à perda de fineza aromática (ROMANO & SUZZI, 1993). No entanto, as *não-Saccharomyces,* tendem a produzir mais glicerol que às *Saccharomyces* (ROMANO *et al*., 1997; HENICK-KLING *et al*., 1998), associado à doçura.

2.4.3.1 *Candida*

Este gênero representa um grande grupo de espécies encontradas no vinho. A forma telemórfica das espécies *Candida* é representada por diferentes gêneros, incluindo *Issatchenkia, Kluyveromyces, Pichia, Metschnikowia, Saccharomyces, Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (DEAK and BEUCHAT, 1996).

Segundo Meyer et al. (1998), suas células podem aparecer com formato globoso, elipsoide, cilíndrico ou mesmo alongado. Normalmente sua reprodução é por brotamento multilateral. Podem fermentar vários tipos de açúcar e assimilar nitratos, dependendo da espécie. A *Candida stellata*, por exemplo, fermenta glicose, sacarose e rafinose, enquanto a *Candida pulcherrima* fermenta glicose mas assimila glicose, galactose, sacarose, maltose, l-sorbose, celobiose, trealose, melezitose, d-xilose, N-acetyl-d-glucosamina, etanol, glicerol, d-manitol, d-glucitol, α-metil-d-glucosida salicin, d-gluconate, succinato e hexadecano.

A *Candida zemplinina* se mostra uma boa produtora de glicerol (CIANI & FERRARO, 1996) e succinato (CAMARASA, GRIVET, & DEQUIN, 2003) compostos que contribuem para ressaltar a doçura e acidez, respectivamente.

2.4.3.2 *Torulaspora delbrueckii*

A levedura *Torulaspora delbrueckii* (também conhecida como *Sccharomyces rosei, Saccharomyces roseus, Saccharomyces fermentati, Saccharomyces delbrueckii*e *Candida colliculosa)* é, de acordo com o Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (2017), um ascomiceto de formato oval e rugoso, gerando colônias de cor branca ou creme, de aspecto liso, sem presença de hifas. Reproduz-se no mosto por brotamento e brotamento multilateral.

De forma geral, a *Torulaspora delbrueckii*se mostra incapaz de fermentar completamente um mosto, porém a sua produção de etanol pode ser considerada elevada para uma *não-Saccharomyces*, chegando em alguns casos a ultrapassar 10% v/v (ALBERTIN, W. et al, 2014). Hansen et al (2001) e os autores Lachance e Kurtzman (2011) observaram que a fraca tolerância a baixos níveis de oxigênio no mosto é um dos fatores que levam à mortalidade dessas leveduras, sendo este mais nocivo do que o efeito da toxidez por etanol. Essa morte precoce pode servir como fonte de nutrientes específicos, como polissacarídeos e manoproteínas, para as *Saccharomyces*, levando à um bom final de fermentação (HERRAIZ *et al*., 1990; PANON, 1997; NGUYEN & PANON, 1998; FLEET, 2003).

A *T. delbrueckii* possui a capacidade de produzir baixos teores de componentes indesejáveis como fenóis voláteis, sulfeto de hidrogênio e ácido acético, além de promover um ganho na complexidade (ALBERTIN, W. et al, 2014). Pacheco et al (2012) afirma em seu trabalho que essa levedura mesmo em mosto com altas concentrações de açúcar produz baixas concentrações de acetoínas, acetaldeídos e acetato de etila e seu potencial para uso enológico

já foi citado em vários trabalhos (CABRERA et al. 1988; HERRAIZ et al. 1990; MORENO et al. 1991; CIANI & FERRARO, 1998; JOLLY et al. 2003).

Por ser osmotolerante já foi isolada em mostos com alta concentração de açúcar e vem sendo estudada para fermentação de vinhos botritizados (LAFON-LAFOURCADE et al. 1981; HENSCHKE & DIXON, 1990; BELY et al. 2008). Sob condições de estresse hiperosmótico a *Torulaspora delbrueckii* continua com sua característica de alta produção de glicerol e baixa produção de ácido acético, porém se faz necessário uma co-fermentação com a *Saccharomyces* para concluir a fermentação (UGLIANO & HENSCHKE, 2009).

A *Torulaspora delbrueckii* se destaca por ter sido uma das primeiras leveduras *não-Saccharomyces* comerciais a ser lançada. Castelli, (1955) sugeriu seu uso para elaboração de vinhos italianos tintos e roses comerciais que possuíssem mostos com baixa concentração de açúcar e acidez. A *Torulaspora delbrueckii* pode produzir outros metabólitos como ácido succicinico (CIANI & MACCARELLI, 1998) e linalol (KING & DICKSON, 2000), sendo este derivado de alcoóis monoterpénicos. Sadoudi et al (2012) constatou que em mostos de Sauvignon Blanc tratados com culturas mixtas de *T. delbrueckii/S. cerevisiae* a concentração de terpenóis é maior do que em culturas puras de *S. cerevisiae*, aumentando a intensidade aromática e o caráter varietal.

Essa levedura pode afetar positivamente os vinhos. Em seu estudo, aplicando uma estratégia de co-inoculação de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*, Jolly et al. (2003b), observou melhores resultados em vinhos de Sauvignon Blanc e Chenin Blanc, aos 5 e 18 meses após a produção, tendo como parâmetro vinhos fermentados com *Saccharomyces cerevisae.* Azzolini et al. (2012) observou que Amarones produzidos com inoculação sequencial de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*, apresentavam um aumento na intensidade aromática, adstringência e doçura, além de uma queda dos aromas vegetais.

2.5 FATORES DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

Com base no seu peso seco, as *Saccharomyces* apresentam de 3 a 5% de fosfato, 2,5% de potássio, 0,5% de enxofre e de 0,3 a 0,4% de magnésio. Além de traços de ferro, zinco, cobre, cloro, manganês e cálcio (MONK, 1994; WALKER, 1998). As leveduras devem então ser suplementadas com fosfato, que será incorporado aos ácidos nucléicos, fosfolipídios, ATP (adenosina-5'-trifosfato) entre outros componentes. O potássio atua como fator de absorção

do fosfato e sua deficiência pode estar associada a fermentações lentas (KUDO et al., 1988). Outros minerais atuam como cofatores enzimáticos (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

As leveduras necessitam ser suplementadas com vitaminas especificas dependendo das condições do meio (OUGH et al., 1989a; MONK, 1994). Biotina, por exemplo, atua na carboxilação do ácido pirúvico, síntese de ácidos nucléicos, ácidos graxos e proteínas. Já o ácido pantoténico é parte essencial da coenzima A, molécula que desempenha importante papel no metabolismo de açúcares e lipídeos, e sua deficiência leva à produção de H_2S. A tiamina envolvida em ações de descarboxilação, pode ser sintetizada por algumas estirpes de leveduras, porém o dióxido de enxofre pode clivar a vitamina deixando-a indisponível. Inositol e ácido nicotínico são usados na divisão celular e na síntese de NAD^+ e $NADP^+$, respectivamente. No entanto existe uma grande variação referente as necessidades nutricionais de leveduras diferentes das *Saccharomyces* (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

Apesar das leveduras crescerem sob condições anaeróbicas, a sua viabilidade na ausência de oxigênio é limitada e seu consumo varia bastante entre as cepas comerciais (JULIEN et al., 2000). O oxigênio exerce importante papel na síntese de esteroides e metabólitos como ergosterol, lanosterol, ésteres graxos insaturados e acetil coenzima A (WALKER, 1998; RIBÉREAU-GAYON et al., 2000). Esteroides de membrana são importantes para manter a permeabilidade e prolongar sua atividade fermentativa (LAFON-LAFOURCADE et al., 1979). Ribéreau-Gayon (2006) afirma que leveduras absorvem 200 $mg.L^{-1}$ e 300 $mg.L^{-1}$ de nitrogênio em ausência completa e presença de oxigênio, respectivamente. Os esteroides também afetam a síntese de compostos voláteis e de sabor dependendo da presença de oxigênio (MAURICIO et al., 1997). Muñoz e Ingledew (1989) observaram que a adição de cascas de leveduras à um mosto em fermentação pode ser uma fonte de fatores de sobrevivência. Brechot et al (1971), observou que os ácidos graxos presentes nas ceras de algumas uvas, pode suprir a necessidade de lipídeos das leveduras durante o crescimento anaeróbico.

As leveduras *não-Saccharomyces*, que crescem comumente na superfície dos vinhos, formando a flor, tem uma necessidade de consumo maior de oxigênio, refletindo seu metabolismo oxidativo (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

2.6 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO

Assim como outros microrganismos, as leveduras precisam, para se desenvolver e multiplicar, de fontes de carbono (açúcar) e nitrogênio (aminoácidos, amônia ou íon amônio) além de outros micronutrientes como vitaminas e minerais (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para que as leveduras conduzam a fermentação, podendo ser assimilado pelas leveduras de fontes como aminoácidos, amônia ou NH_4^+. Nitrogênio na forma inorgânica (NH_4^+) é fixado na forma orgânica produzindo glutamato através de uma reação com α-cetoglutarato catalisada pela glutamato desidrogenase (FUGELSANG & EDWARDS, 2007). O glutamato pode então ser usado pela célula para produzir outros aminoácidos, importantes para o metabolismo, via transaminação do nitrogênio do grupo amino do glutamato a outros esqueletos de carbono, gerando os aminoácidos correspondentes. Arginina é o aminoácido utilizado pela levedura quantitativamente mais importante no mosto (SPAYD & ANDERSEN-BAGGE, 1996; STINES et al., 2000), sendo uma importante reserva de nitrogênio pela sua alta razão nitrogênio:carbono (4N:6C). Este aminoácido é rapidamente assimilado pela levedura no início da fermentação e posteriormente é liberado de volta durante a autólise das células. É catabolizado em produtos intermediários e energia, na forma de ATP, sendo que um dos subprodutos é a ureia, composto que reage com etanol produzindo etil carbamato (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

2.6.1 Metabolismo do nitrogênio

Kunkee (1991) observou que quando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* crescem em um mosto de uva, necessitam de muito nitrogênio assimilável para a síntese de biomassa. Apesar do mosto conter vários componentes nitrogenados, apenas alguns deles podem ser assimilados pelas *Saccharomyces cerevisiae* (HENSCHE & JIRANEK, 1993). Durante a fermentação as leveduras só podem utilizar como fonte de nitrogênio amônia e aminoácidos (BARRE et al, 1998), com exceção de prolina, que só é assimilada em condições aeróbicas (BOULTON et al, 1996). O termo NFA (nitrogênio facilmente assimilável) foi proposto para representar todos os aminoácidos, com exceção da prolina, podendo ser facilmente determinados com o uso de formol index (TAYLOR 1957; AERNY 1996).

O mosto de uva é relativamente pobre em aminoácidos (KUNKEE, 1991), e quando a concentração de NFA é baixa, a nutrição das leveduras atinge níveis críticos, podendo levar a paradas de fermentação (BISSON, 1999; ZAMORA, 2004). Para evitar esses problemas, o mosto normalmente é suplementado com sais de amônia (BARRE et al, 1998), sendo que a necessidade de NFA, para completar a fermentação alcoólica, depende da cepa da levedura (MANGINOTETAL, 1998) e do potencial alcoólico do mosto (BISSON & BUTZKE, 2000). Concentrações inferiores a 130 $mg.L^{-1}$ podem comprometer seriamente o andamento da fermentação, no entanto o excesso de nitrogênio assimilável pode facilitar o crescimento de leveduras de flor ou bactérias, comprometendo a estabilidade microbiológica, podendo levar a produção de etil carbamato e aminas biogênicas, sendo estes cancerígenos e alergênicos, respectivamente (RIBÉREAU-GAYON et al, 2000). Por essa razão a suplementação de nitrogênio deve levar em conta a concentração inicial de NFA e o potencial alcoólico do mosto (BISSON and BUTZKE, 2000).

O íon amônio, NH_4^+, entra na célula por difusão facilitada e a diferença do pH intracelular faz com que o íon amônio libere um próton, formando amônia ($NH_3 + H^+$). Isso causa a acidificação do meio intracelular, sendo necessário mandar o íon H^+ para fora da célula, reação catalisada pela enzima H^+ATPase. Dentro do citoplasma, a amônia é incorporada a um pool de aminoácidos através da enzima glutamato desidrogenase ou glutamina sintetase, formando glutamato ou glutamina respectivamente (HENSCHE & JIRANEK, 1993).

Os aminoácidos, por sua vez, são transportados para dentro da célula por transportadores específicos. Barre (1998) relata a existência de 15 transportadores específicos de aminoácidos na *Saccharomyces cerevisiae*, e todos eles envolvem a entrada de um próton na célula, que deve ser mandado para fora mantendo a homeostasis. Sendo assim, a incorporação tanto de amônio quanto aminoácidos, são considerados transportes ativos, pois consomem ATP via H^+ATPase (ZAMORA, 2009), de forma a manter o gradiente de H^+ entre o meio intra e extracelular.

Os aminoácidos podem ser usados para sintetizar proteínas ou para sintetizar aminoácidos não presentes no mosto (HENSCHE & JIRANEK 1993; RIBÉREAU-GAYON et al. 2000b). Neste último caso, o grupo amino é transaminado a outro aminoácido enquanto o esqueleto de carbono é metabolizado pela célula (ZAMORA, 2009).

A relação entre a composição de aminoácidos das uvas e do perfil aromático do vinho já foi descrita por Hernández-Orte et al. (2002, 2006), visto que os aminoácidos são transformados em álcoois como Hexanol e 2-fenil-etanol.

A falta de NFA pode levar a levedura a usar cisteína e metionina (aminoácidos enxofrados) produzindo então H_2S e mercaptanos que são liberados no mosto, compostos que são agentes redutores. Portanto a suplementação com sais de amônio, não só é recomendada para evitar parada de fermentação, mas também para evitar redução e defeitos aromáticos no vinho (JIRANEK et al, 1995).

2.7 METABOLISMO DE CARBONO

2.7.1 Glicólise

Leveduras metabolizam açúcar para a produção de energia na forma de ATP, e quando este é hidrolisado em ADP (adenosina-5'-difosfato) e Pi (fosfato inorgânico), a energia liberada é acoplada para várias reações e transformações. O metabolismo da glicose segue uma série de passos conhecido como ciclo de Emben-Meyerhof-Parnas, ou glicólise (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

O termo glicólise vem do grego, glucus (doce) e lysis (ruptura). O processo consiste na transformação de uma hexose (glicose ou frutose) em piruvato e ocorre inteiramente no citoplasma. As pentoses só são usadas por leveduras como fonte de ribose e produção de NADPH, enquanto que para bactérias acéticas, por exemplo, são a principal fonte de catabolismo de açúcares (SCHAAF-GERSTEENSCHALÄGER & MIOSGA 1996; HORECKER 2002). A ribose é utilizada na síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos e a NADPH é usado em vários processos, especialmente no anabolismo, como a síntese de lipídeos. Desta forma, o consumo de pentoses pelas leveduras não está associado a produção de energia, mas sim a produção de compostos importantes para a multiplicação celular (ZAMORA, 2009).

Inicialmente as hexoses são transportadas para dentro da célula através de difusão facilitada, sem haver gasto de energia (LAGUNAS, 1993). A glicólise inicia com a fosforilação da glicose (e ou frutose), feita por um conjunto de enzimas chamadas hexokinase, formando glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato (GANCEDO, 1988). Essa ação consome um

ATP, mas mantém o meio intracelular com concentração menor de glicose que o meio externo, mantendo o fluxo de açúcar através da membrana. A enzima fosfoglicose isomerase entra em ação convertendo glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. Estas hexose-fosfatos também são importantes substratos em metabolismos secundários, como a síntese de polissacarídeos usados na construção da parede celular (CABIB et al. 1982).

No próximo passo, a enzima fosfofructokinase fosforiliza novamente a frutose-6-fosfato, transformando-a em frutose-1,6-difosfato e consumindo um ATP. A molécula é então clivada, pela ação da enzima aldolase, e o resultado desta reação são duas trioses fosfato: dihidroxiacetona fosfato (96%), que rapidamente é transformada em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triose fosfato isomerase (HEINISCH & RODICIO 1996).

A enzima gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase transforma o gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato. Essa reação envolve a oxidação da molécula e também a redução do NAD^+ em NADH, mantendo o balanço do redox. Ao mesmo tempo, a fosforilação do substrato forma uma ligação rica em energia entre o grupo do carbono oxidado e o fosfato inorgânico (ZAMORA, 2009).

Sob certa circunstancias a dihidroxiacetona fosfato formada durante a glicólise pode ser reduzida a glicerol através do glicerol-3-fosfato, resultando na oxidação de uma molécula de NADH em NAD^+. Essa reação é importante durante a fermentação, quando a oferta de NAD^+ não é suficiente no interior da célula, de forma a gerar NAD^+ para manter a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em operação, mantendo o fluxo da glicólise. Se não há acetaldeído disponível para ser reduzido, ou se este encontra-se ligado à uma molécula de SO_2, à etanol, a formação de glicerol é então favorecida (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

O próximo passo é a conversão de 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, catalisada pela fosfogliceratokinase, liberando toda energia contida na ligação formada anteriormente. Essa energia é usada pela célula para fosforilar uma molécula de ADP em ATP. Na sequência duas enzimas entram em ação: a fosfoglicerato-mutase e a enolase. A primeira converte o 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato e a segunda enzima desidrata a molécula resultante produzindo fosfoenol piruvato. O fosfoenol piruvato contém uma ligação rica em energia que é usada pela enzima piruvato kinase para fosforilar outra molécula de ADP em ATP. Essa

reação tem como resultado um uma molécula de piruvato, que é o produto final da glicólise (ZAMORA, 2009).

Como consequência da glicólise, cada molécula de hexose consumida gera duas de piruvato, quatro de ATP e uma de NADH. Porém, para que ocorra a fosforilação dessa hexose, dois ATP são consumidos, isso faz com que o ganho real da glicólise seja de dois ATP por hexose. A levedura necessitará ainda restabelecer o potencial de oxirredução do interior da célula e para isso irá consumir o NADH regenerando NAD^+. Esse processo pode ser feito por fermentação ou respiração (ZAMORA, 2009).

Sob condições aeróbicas o piruvato produzido pela glicólise entra no ciclo dos ácidos tri carboxílicos (ciclo de Krebs). O piruvato pode ser usado para produzir acetil-CoA e CO_2, ou ser carboxilado produzindo oxaloacetato. Acetil-CoA e oxalacetato vão reagir formando ácido cítrico como primeiro produto do ciclo de Krebs. Com o giro do ciclo, os dois carbonos do grupo acetil (derivado do piruvato) serão totalmente oxidados a $2CO_2$ e moléculas adicionais de coenzimas NADH e $FADH_2$ são produzidas, além de energia liberada na forma de GTP (guanosina trifosfato) (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

As moléculas NADH e $FADH_2$ produzidas na glicólise e no ciclo dos ácidos tri carboxílicos são reoxidados à NAD^+ e FAD através de uma série de reações da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e fosforilação oxidativa. Essas reações envolvem a transferência de elétrons através de citocromos presentes na membrana mitocondrial interna com o oxigênio como o último receptor de elétron, formando H_2O, devido essa necessidade, essa reação só ocorre sob condições aeróbicas. O fluxo de elétrons do NADH e $FADH_2$ até o O_2 pelos complexos protéicos da membrana mitocondrial é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria, formando um gradiente de prótons. A energia conservada na forma desse gradiente é utilizada pela enzima ATP sintase para a síntese de ATP, de forma que o fluxo de prótons a favor do gradiente de volta à matriz mitocondrial pela ATP sintase gera energia suficiente para fosforilação de ADP a ATP. Por fim, de três moléculas de ATP são geradas para cada molécula de NADH oxidada (duas moléculas de ATP para cada $FADH_2$). Desta forma a célula tem um ganho de 38 ATP para cada molécula de glicose metabolizada sob condições aeróbicas e apenas 2 ATP na glicólise (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

A habilidade da célula reoxidar as coenzimas (NADH e $FADH_2$) é muito reduzida quando o oxigênio não está disponível. Para compensar, o piruvato é reduzido a acetaldeido e então a etanol, o último passo a requerer NADH. Esse mecanismo permite que a célula reoxide o NADH produzido no início do ciclo (FUGELSANG & EDWARDS, 2007), permitindo o fluxo de carbono pela glicólise.

Algumas enzimas do ciclo de Krebs são ativadas em condições anaeróbicas. Essa rota adicional é muito importante para as *Saccharomyces* durante a fermentação, pois desta forma o NADH pode ser reoxidado e outro precursor de funções celulares podem ser sintetizados, como o α-cetoglutarato que é responsável pela assimilação NH_4^+. Dependendo do estado em que a célula se encontra, redutivo ou oxidativo (fermentação e respiração, respectivamente) diferentes produtos podem ser gerados (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

2.7.2 Fermentação e respiração

As leveduras são organismos facultativos anaeróbicos, podendo metabolizar as hexoses de forma aeróbica (respiração) ou anaeróbica (fermentação) (RACKER 1974; BOULTON et al. 1996). Os dois mecanismos se iniciam com a glicólise, produzindo piruvato como metabolito final. Este pode ser transformado em etanal e CO_2, através da enzima piruvato descarboxilase, sendo que no etanal será reduzido a etanol. Este processo é chamado de fermentação alcoólica e ocorre no citoplasma em condições de anaerobiose, regenera NAD^+ (consumido na glicólise) e gera dois ATP (BARNETT & ENTIAN 2005).

O piruvato pode também ser transformado em acetyl coA e CO_2 através da piruvato desidrogenase, reduzindo NAD^+ à NADH devendo haver a incorporando da coenzima A. O ciclo de Krebs pode ter a incorporação da acetil coA produzindo CO_2 e várias moléculas de coenzimas reduzidas, como NADH e $FADH_2$. Essas coenzimas, produzidas tanto pela glicólise quanto pelo ciclo de Krebs, serão reoxidadas na cadeia respiratória, produzindo H_2O através da redução do O_2 (BARNETT & ENTIAN, 2005). Esse processo é chamado de respiração e proporciona um ganho de 36 à 38 ATP por molécula de hexose metabolizada. Este processo é mais vantajoso em termos de ganho energético, porém depende da presença de oxigênio e pode ser inibido pela alta concentração de açúcar (CRABTREE 1929). Segundo Ribéreau-Gayon (2000), a transformação do piruvato em etanal ou acetil coA é um ponto chave para regular o metabolismo da levedura.

Barnett e Entian (2005), citaram o trabalho de Pasteur, que em 1861 observou que a aeração aumenta a síntese de biomassa, diminui a cinética de consumo de açúcar e consequentemente a diminui a produção de etanol, concluindo que a aeração inibe a fermentação. Este fenômeno ficou conhecido como efeito Pasteur, sendo atribuído a diversos fatores.

Para que a respiração ocorra, as mitocôndrias devem conter uma alta concentração de ADP (substrato para a fosforilação oxidativa), o que reduz a concentração de fosfato e ADP no citoplasma (LAGUNAS & GANCEDO, 1983), que por sua vez diminui o transporte de açúcar para dentro da célula (LAGUNAS et al. 1982), explicando a inibição da fermentação. Assim que se inicia a fermentação alcoólica, grandes quantidades de CO_2 são produzidas e este expulsa o O_2, criando uma condição de semi-anaeróbica, que favorece a fermentação. No entanto, mesmo que o oxigênio esteja disponível, as *Saccharomyces cerevisiae*, não irão respirar se a concentração de açúcar for maior que 9 $g.L^{-1}$. Este fenômeno foi descrito em 1929 por Crabtree (MEIJER et al. 1998; RIBÉREAU-GAYON et al. 2000c).

Altas concentrações de açúcar, como encontrada em mosto de uva, favorecem a degradação da mitocôndria das *Saccharomyces cerevisiae*. Paralelo a isso, as enzimas do ciclo de Krebs e os constituintes da cadeia respiratória são reprimidos (POLAKIS et al. 1965; GANCEDO, 1992; BARNETT & ENTIAN, 2005). Por tanto, sob condições naturais de fermentação de vinhos, as leveduras só podem fermentar. As *Saccharomyces cerevisiae* só irão utilizar o mecanismo de respiração em meios com baixa concentração de açúcar e com oxigênio disponível. Essas condições são desejáveis para a produção de leveduras seca ativa (ZAMORA, 2009).

2.7.3 Fermentação alcoólica

Sob condições fermentativas, a *Saccharomyces cerevisiae* majoritariamente direciona o piruvato para a produção de etanol, para regenerar o NAD^+ que foi consumido na glicólise. Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado em etanal pela enzima piruvato descarboxilase, que utiliza magnésio e pirofosfato de tiamina como cofatores (HOHMANN, 1996). Em seguida, a enzima álcool desidrogenase, que utiliza zinco como cofator (CIRIACY, 1996), reduz o etanal em etanol reconvertendo o NADH à NAD^+. Na *Saccharomyces cerevisiae* apesar de existirem três isoenzimas álcool desidrogenase, é a isoenzima I a grande responsável

pela conversão de etanal em etanol (GANCEDO, 1988), que junto com o CO_2 é expulso da célula por difusão simples.

2.7.4 Fermentação gliceropirúvica

Apesar da rota de regeneração de NAD^+ através da produção de etanol ser a mais importante, existe uma alternativa, a fermentação gliceropirúvica, que produz glicerol como produto final (PRIOR & HOHMANN, 1996). Neuberg (1946), foi o primeiro a identificar a evidência deste mecanismo, observando que a fermentação da glicose em presença de sulfito produz muito glicerol. O sulfito combina-se com o etanal, o que impede a regeneração do NAD^+ via álcool desidrogenase. Quando a levedura se encontra em uma situação deste tipo, ela é obrigada a oxidar o NADH de uma forma alternativa, produzindo glicerol e compensando o déficit de NAD^+ (ZAMORA, 2009). A dihidroxiacetona-fosfato, principal produto da reação da aldolase, será reduzida pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase à glicerol-3-fosfato, ao passo que a molécula de NADH é oxidada à NAD^+. A enzima glycerol-3-fosfato fosfatase catalisa a produção de glicerol através da desfosforilação do glicerol-3-fosfato. A produção de glicerol se faz necessária para manter o balanço redox da célula e para que ela ocorra é necessário o consumo de ATP (BARRE et al., 1998).

Zamora (2009), afirma que a fermentação gliceropirúvica, pode ser desencadeada em outras situações e não só na presença de sulfitos. No início da fermentação, as leveduras necessitam de muito substrato para seu crescimento, implicando na necessidade de biossíntese de compostos como proteínas, lipídeos e nucleotídeos. O piruvato é usado como substrato por muitas dessas moléculas, criando um déficit de NAD^+, devendo ser recuperado através da fermentação gliceropirúvica. A produção de glicerol ocorre basicamente nos primeiros momentos da fermentação de um mosto, pois é nesta etapa que as leveduras estão em crescimento populacional havendo uma maior necessidade de biossíntese destes componentes (RIBÉREAU-GAYON et al. 2000c). O glicerol também é produzido pelas leveduras servindo de agente protetor contra a alta pressão osmótica enfrentada pela célula no mosto (PRIOR & HOHMANN, 1996).

Devido a estes mecanismos, o glicerol é o componente mais abundante em um vinho seco, após a água e o etanol. Atingindo concentrações que variam de 6 à 10 $g.L^{-1}$, o glicerol confere qualidade aos vinhos agregando estrutura, volume de boca e doçura (ZAMORA, 2009).

2.7.5 Desenvolvimento das leveduras durante a fermentação alcoólica

No início da fermentação, as leveduras começam a metabolizar açúcar e outros nutrientes presentes no mosto da uva, obtendo assim energia para se manter e se multiplicar (BOULTON et al. 1996; RIBÉREAU-GAYON et al. 2000b). Durante as primeiras horas, as leveduras não estão focando sua atenção em se multiplicar, mas sim em se adaptar as condições do novo meio. Essa fase é chamada de latência (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

A população inicial em um mosto normalmente está ao redor de 10^4 células.mL^{-1}, podendo ser maior em uvas atacadas por podridões. Já no caso de inoculação, a população inicial salta para a ordem de 5.10^6 células.mL^{-1}. Assim que as leveduras se adaptam ao meio, elas iniciam uma nova etapa, a fase de crescimento exponencial de sua população. Nesta fase a população chega a atingir a concentração de $10^7 – 10^8$ células.mL^{-1}, sendo muito influenciada pela temperatura (OUGH, 1964), presença de oxigênio (SABLAYROLLES & BARRE 1986) e pela concentração de nutrientes (LAFON-LAFOURCADE, 1983; SABLAYROLLES et al. 1996). A duração desta fase varia de três a seis dias e o crescimento é interrompido devido à falta de alguns nutrientes.

As leveduras entram em uma nova fase, a estacionária, onde o crescimento da população se mantem estável, o que pode durar de dois a dez dias. Ao final desta etapa, as leveduras entram na fase de declínio, quando a população começa a morrer gradualmente. Isso se deve basicamente a dois fatos: nutrientes não estarem mais disponíveis e a toxidez causada pelo etanol e outras substâncias liberadas durante a fermentação (LAFON-LAFOURCADE et. al., 1984). O sucesso da fermentação alcoólica depende da manutenção de um número suficiente de células viáveis até que todo açúcar seja consumido, caso contrário, haverá parada de fermentação (BISSON, 1999; ZAMORA, 2004).

2.7.6 Oxigênio e biossíntese de lipídeos

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* não necessitam de oxigênio para produzir energia durante a fermentação alcoólica, mas existem rotas de biossíntese em que o oxigênio é fundamental, com os ácidos graxos e esteróis de membrana (RATLEDGE & EVANS, 1989). Durante a fase de multiplicação celular, as leveduras precisam construir membrana celular,

necessitando sintetizar um grande volume de esteroides, ácidos graxos e fosfolipídios durante os primeiros momentos da fermentação alcoólica (RIBÉREAU-GAYON et al., 2000b).

Esteroides são sintetizados através da rota do mevalonato, uma rota que usa oxigênio como substrato. Nesta rota, o lanosterol é o primeiro esteroide formado, sendo na sequência transformado em ergosterol, que é o principal esteroide na membrana das *Saccharomyces cerevisiae* (NES et al., 1993). Na ausência de oxigênio essa rota e totalmente bloqueada.

O processo de síntese de ácidos graxos é catalisado pelo complexo multi-enzimático, ácido graxo sintetase. Essa enzima usa acetil–coA e malonyl-coA como substrato para produção de ácido palmítico, um ácido graxo saturado com 16 carbonos, sendo este usado para produzir outros ácidos graxos (RATLEDGE & EVANS, 1989). Através do alongamento do ácido palmítico é possível gerar ácidos graxos com mais carbonos, como o ácido estereático (ZAMORA, 2009).

Nas *Saccharomyces cerevisiae,* a formação de ácidos graxos insaturados é catalisada pela desnaturase OLE1 (KAJIWARA et al., 2000), uma enzima que é ativada a baixas temperaturas e na presença de oxigênio (NAKAGAWA et al., 2002). Estes ácidos graxos são usados para sintetizar fosfolipídios que serão inseridos na membrana plasmática (ZAMORA, 2009). Portanto, a aeração do mosto durante a fermentação alcoólica se faz necessária para o crescimento da levedura e a sua falta pode levar à parada de fermentação (SABLAYROLLES & BARRE 1986; SABLAYROLLES et al.1996; BISSON, 1999; RIBÉREAU-GAYON et al. 2000b; ZAMORA, 2004).

A membrana plasmática dos microrganismos precisa se manter fluída para funcionar corretamente (RODRÍGUEZ et al., 2007). Rigidez excessiva pode impedir o funcionamento do sistema de transporte (LOS & MURATA, 2004), enquanto a fluidez excessiva pode alterar a organização e a dinâmica da bicamada fosfolipídica (LAROCHE et al., 2001). Além da composição lipídica, outros fatores que afetam a fluidez da membrana plasmática são a temperatura (RODRÍGUEZ et.al., 2007) e a concentração de álcool. (JONES & GREENFIELD, 1987). Na vinificação de vinhos brancos, a *Saccharomyces cerevisiae* precisa se adaptar as condições do meio. A fluidez da membrana é reduzida devido à baixa temperatura e a pouca aeração do mosto, utilizada para preservar aromas (ZAMORA, 2009). Para melhorar a fluidez, a levedura tende a aumentar a concentração de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios (THURSTON et al., 1981; TORRIJA et al., 2003). Com a maior concentração de

ácidos graxos insaturados, o ponto de fusão dos fosfolipídios se torna mais baixo dando mais fluidez (RODRÍGUEZ et al., 2007). Nakagawa (2002) afirma que essa adaptação envolve a indução da enzima ácido graxo desnaturase OLE1, que incorpora insaturações em pontos específicos.

Bertrand e Miele (1984), comentam que sob condições normais de fermentação de vinhos brancos, o processo é conduzido praticamente na ausência de oxigênio com um mosto naturalmente muito pobre em ácidos graxos. Nestas condições a levedura não consegue sintetizar ácidos graxos insaturados, sendo necessário utilizar outra estratégia: incorporar ácidos graxos de cadeia média nos fosfolipídios da membrana (ROZÈS, 1992). O efeito de uma cadeia mais curta é similar ao de uma cadeia longa com dupla ligação (QUINN & CHAPMAN, 1980) e, portanto, acaba por modular a fluidez da membrana. Porém a presença de ácidos graxos de cadeia média no meio pode levar a paradas de fermentação (GENEIX et al., 1983).

Aparentemente a presença de etanol no meio altera consideravelmente a fluidez da membrana (JONES & GREEFIELD, 1987), forçando a *Saccharomyces cerevisiae* a incorporar esteroides e ácidos graxos insaturados para compensar esse efeito e, desta forma, aumentar a tolerância ao álcool (ALEXANDRE et al., 1994).

2.8 SUBPRODUTOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

2.8.1 Etanal

O etanal, ou acetaldeído, é formado pela descarboxilação do piruvato e em sua maior parte, é reduzido a etanol. Também pode ser produzido através da oxidação do etanol por meio de processos químicos ou bioquímicos. A levedura pode liberar pequenas quantidades no vinho alterando seu perfil. O etanal possui um aroma muito característico conferindo ao vinho um caráter oxidativo, por vezes desejado como no caso do Jerez Fino (ZAMORA, 2009).

2.8.2 Álcoois superiores

São chamados de álcoois superiores os álcoois com mais de dois átomos de carbono, que juntamente com seus ésteres desempenham importante papel no perfil aromático dos vinhos, agregando complexidade desde que estejam presentes em baixas concentrações. São produzidos através do metabolismo de aminoácidos ou de açúcares. Formam-se quando ceto-

ácidos correspondentes aos esqueletos de carbono de diferentes aminoácidos são descarboxilados e reduzidos. Sua formação é favorecida em pH elevado, altas temperaturas e aeração do mosto (AMERINE & ROESSLER, 1983; RIBÉREAU-GAYON, 2006). A levedura utiliza os aminoácidos valina, leucina e isoleucina para produzir 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol em concentrações normais entre 50 e 150 $mg.L^{-1}$, 30 e 100 $mg.L^{-1}$ e 80 e 300 $mg.L^{-1}$, respectivamente (RIBÉREAU-GAYON et al, 2003).

São precursores de ésteres acéticos (acetatos) que tem um grande impacto sobre o aroma. Normalmente estão presentes nos vinhos em concentrações que podem variar de 150 a 550 $mg.L^{-1}$, porém, somente em concentrações inferiores a 300 $mg.L^{-1}$, participam da complexidade dos vinhos. Em altas concentrações mascaram outros aromas retirando a fineza do vinho (ZAMORA, 2009).

Entre os principais álcoois superiores estão: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (AMERINE & ROESSLER, 1983; RIBÉREAU-GAYON, 2006).

2.8.3 Ésteres

Os ésteres são considerados os principais contribuintes para o caráter frutado do vinho. Dois grupos principais de ésteres são sintetizados pela levedura: ésteres de acetato e ésteres etílicos de ácidos graxos. Os acetatos (ésteres de acetatos) são obtidos a partir da condensação de álcoois superiores com acetil-CoA, catalisados na célula por enzimas álcool-acyl-transferase (MASON & DUFOUR, 2000). A concentração final destes compostos é o resultado do equilíbrio entre as enzimas álcool-acyl-transferase, que promovem a sua síntese, e as enzimas esterease que promovem a sua hidrólise (FUKUDA et al., 1998).

Os ésteres, em geral, apresentam aromas agradáveis frutados e florais, sendo então altamente desejados nos vinhos, com exceção do acetato de etila, éster majoritário nos vinhos, que em altas concentrações apresenta aromas de solvente, verniz e cola, conferindo defeito olfativo. Podem ser formados por duas vias: a esterificação enzimática durante o processo fermentativo e a esterificação química durante o envelhecimento em sur lie (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

Ésteres etílicos de ácidos graxos são produzidos durante fermentação pelas leveduras através da esterificação de ácidos graxos de cadeia curta (C4-C12), provenientes de metabolismo lipídico (UGLIANO, 2009). No entanto, deve-se considerar que a maioria dos

ésteres produzidos pela levedura durante a fermentação é amplamente hidrolisada durante os dois primeiros anos de armazenamento do vinho, sendo as taxas de hidrólise mais altas quando a concentração inicial é maior (RAMEY & OUGH, 1980; MOIO et. al., 2004).

Os acetatos são considerados os ésteres fugazes do vinho, pois se formam durante a fermentação álcoolica e, com exeção do acetato de etila, tendem a oxidar rapidamente nos meses subsequentes a fermentação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). Isto não se aplica, no entanto, ao acetato de etila, o éster mais abundante produzido durante a fermentação alcoólica, uma vez que este composto é geralmente estável durante o envelhecimento. Como os perfis de éster dominados por altas concentrações de acetato de etila podem potencialmente resultar em vinhos com aromas indesejados semelhantes a esmalte, é preciso ter cautela ao escolher variedades de alta produção de ésteres (UGLIANO, 2009).

Entre estes ésteres estão o acetato de hexila (aroma maçã verde e floral), acetato de 2-feniletila (rosas, mel, frutado, floral), acetato de isoamila (banana, pêra) e acetato de etila (solvente, verniz, cola). Os níveis destes compostos podem variar nos vinhos de microgramas a alguns $mg.L^{-1}$ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Todos os ésteres, exceto o acetato de etila, são muito desejados nos vinhos, contribuindo positivamente para o aroma. Alguns ésteres tais quais, lactato de etila e dietil succinato, não apresentam impacto no aroma em concentrações normais (ZAMORA, 2009).

Alguns destes ésteres podem ser transformados pela levedura, durante a fermentação alcoólica, em ácidos graxos através da síntese de Linnen. Porém, enquanto os ésteres estão relacionados com a qualidade dos vinhos, estes são relacionados aos defeitos, apresentando descritores gerais de aroma de queijo, oleoso e gorduroso. A presença de ácidos graxos de cadeia média no meio, pode levar à paradas de fermentação uma vez que estes ácidos graxos se ligam as paredes celulares das leveduras impedindo as trocas com o meio (GENEIX et al., 1983; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006)

2.8.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como os compostos que possuem um ou mais grupos hidroxilas diretamente ligados a um anel aromático (Fenol). Assim como os ácidos fenólicos são os fenóis que possuemum radical carboxila no lugar de uma hidroxila

(VERMERRIS & NICHOLSON, 2006). Compreendem uma base de um núcleo benzênico ligado a um ou vários grupos hidroxílicos, sendo que os compostos fenólicos são diferenciados em dois grupos: os flavonóides, que apresentam esqueleto C_6-C_3-C_6, e os não flavonóides. Os constituintes fenólicos são de grande importância na enologia pelas características direta ou indiretamente ligadas à qualidade do vinho, especialmente em relação à cor e à adstringência. São os grandes responsáveis pelas diferenças entre vinhos brancos e tintos, sendo que estas moléculas proveem de diferentes partes dos cachos de uva (RIBÉREAU-GAYON, 2006). Estes compostos também são de interesses nutricional e farmacológico (RIBERÉAU-GAYON *et al*., 2003).

No vinho, pode-se encontrar uma grande diversidade de estruturas de compostos fenólicos, desde moléculas simples até polímeros de alta complexidade. Esta variedade de estruturas decorre da elevada reatividade destas moléculas, especialmente durante a fermentação, mantendo uma tendência de estabilidade à medida que o vinho é amadurecido. Os grupos hidroxilos associado às propriedades nucleofílicas dos anéis fenólicos promovem as reações de oxidação, adição, polimerização, condensação e copigmentação durante todo o processo de elaboração e estendendo-se ao processo de envelhecimento do vinho (CHEYNIER *et al*. 2006; ES-SAFI *et al*. 2002).

Os ácidos hidrocinâmicos: ferrúlico, caféico e p-cumárico, são ácidos fenólicos presentes na uva e o vinho. Se encontram nos vacúolos das células e na polpa na forma de ésteres do ácido tartárico (RIBERÉAU-GAYON et al., 2003; CABRITA et al., 2000) e correspondem a classe de compostos não flavonóides. Estes ácidos participam das reações de escurecimento do mosto e do vinho (CHEYNIER et al., 2006; RIBERÉAU-GAYON et al., 2003). Os ácidos fenólicos são incolores quando diluídos em solução alcoólica, mas tornam-se amarelos quando oxidados (RIBERÉAU-GAYON et al., 2006). Na polpa das uvas, onde são os únicos compostos fenólicos existentes, o ácido cafeiltartárico é o mais abundante, sendo o feruriltartárico o que se encontra em menor quantidade. Podem contribuir negativamente ao aroma do vinho como é o caso do ácido coumárico e ácido ferrúlico, que são precursores de fenóis voláteis (vinyl e etil fenóis), quando em presença de certos microorganismos, como a *Brettanomyces* (RIBÉREAU-GAYON & SAPIS, 1965).

O ácido coumárico dá origem aos compostos 4-vinil-fenol e 4-etil-fenol, ao passo que o ácido ferrúlico origina 4-vinil-guaiacol e 4-etil-guaiacol. Os componentes 4-vinil-fenol e 4-

vinil-guaiacol são formados por uma descarboxilação dos ácidos cinâmicos, realizada pela levedura durante a fermentação alcoólica que logo são reduzidos levando a formação do 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, respectivamente (ALBAGNAC, 1975; DUGELAY et al., 1992; CHATONNET et al., 1993). Segundo Chatonnet (1993) o 4-vinil-fenol pode mascarar o odor de frutas, sendo este mais comuns em brancos gerando aromas à tinta guache, e se reduzido a 4-etil-fenol traz aromas animais desagradáveis ao vinho. Os limiares de detecção dos compostos 4-etil-fenol, 4-etil-guayacol, 4-vinil-fenol e 4-vinil-guayacol são, respectivamente, da ordem de 0,6 $mg.L^{-1}$, 0,11 $mg.L^{-1}$, 0,02 $mg.L^{-1}$ e 10 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005).

Aqui incluí também o tirosol ou álcool p-hidroxi-fenil-etil, que assim como os fenóis também possui ações antioxidantes (RIBÉREAU-GAYON & SAPIS, 1965).

As catequinas, polifenóis mais abundantes em vinhos brancos, não são consideradas taninos devido a seu baixo peso molecular e suas interações com proteínas serem bem restritas. Seus isômeros mais estáveis são (+)-catequina e (−)-epicatequina. Diferente das antocianinas e flavonóis, não apresentam forma glicosilada, porém podem fazer ligações com polissacarídeos nas uvas e serem extraídos como complexos durante a vinificação (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

2.9 AUTÓLISE

Durante a produção de espumantes, principalmente os elaborados pelo método tradicional, ocorre um processo de envelhecimento que por muitas vezes é associado à qualidade sensorial do produto. É durante este envelhecimento que a autólise ocorre, onde a levedura libera componentes intracelulares alterando o perfil do vinho (CHARPENTIER & FEUILLAT, 1993).

De forma geral a autólise ocorre ao final da fase estacionária quando a morte da célula acontece (BABAYAN & BEZRUKOV, 1985; CHARPENTIER & FEUILLAT, 1993). Na falta de açúcares, a levedura passa a consumir seus estoques de energia, principalmente glicogênio. Quando as reservas de energia são insuficientes para manter o correto funcionamento da levedura, a célula inicia o processo de autólise iniciando sua degradação (CONNEW, 1998). Ocorre a hidrólise de biopolímeros, sob a ação de enzimas, que irão liberar no vinho componentes como peptídeos, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos, originários do

citoplasma além de manoproteínas e glucanas provenientes da parede celular (ALEXANDRE et al. 2006).

Vários autores descrevem o mecanismo de autólise das leveduras. Arnold (1980), Charpentier e Feuillat (1993) e Charpentier e Freyssinet (1989), propõem que o primeiro passo é a liberação de enzimas hidrolíticas no meio intracelular, degradando as endoestruturas. Inicialmente, essas enzimas não são ativadas devido à ação de inibidores citoplasmáticos específicos e, quando estes são degradados, ativam a ação hidrolítica das enzimas. Há então o acúmulo de hidrolisados, oriundos das macromoléculas, que começam a ser liberados no meio extracelular quando os poros da parede celular são grandes o bastante. E é justamente no meio externo que a degradação de compostos mais polimerizados em compostos de menor peso molecular ocorre (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ & PUEYO, 2009).

Segundo Martínez-Rodríguez e Pueyo (2009), é possível diferenciar os resultados organolépticos de uma autólise natural de uma induzida, que normalmente é realizada utilizando extratos de leveduras produzidos em meio de cultura. Este processo pode ser acelerado, sendo realizado em 48-72 horas, alterando o ambiente por meio de mudanças na temperatura, pressão osmótica e pH, por exemplo. Porém no caso dos espumantes, a autólise ocorre em um meio muito específico: pH entre 3 e 3,5, temperatura baixa (10 à 15ºC), alta pressão de CO_2, e teor alcoólico na faixa de 10 à 12%, condições muito diferentes das ideais sendo estas responsáveis pela longa duração do processo (FORNAIRON-BONNEFOND et al., 2002; ALEXANDRE & GUILLOUX-BENATIER, 2006).

A parede celular corresponde à 15-25% do peso seco total da levedura. A sua força mecânica é dada pelas camadas internas que são formadas de 1,3 glucanas e quitina (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ & PUEYO, 2009). As camadas externas são basicamente formadas por manoproteínas glicolisadas que emanam da superfície e tem função no reconhecimento de outras células (KLIS et al., 2002). A parede celular é multifuncional, sendo sua principal função a proteção do protoplasto, que sem ela poderia se romper devido à alta pressão osmótica interna (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ & PUEYO, 2009). Durante a autólise, polissacarídeos e glicoproteínas são hidrolisados, porém as enzimas na autólise da parede celular são pouco estudadas, se comparadas a outras, como protease, por exemplo. A cinética da glucanase nos espumantes também permanece desconhecida (ALEXANDRE & GUILLOUX-BENATIER, 2006).

Charpentier e Freyssinet (1989) sugerem um mecanismo de degradação da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*: num primeiro momento as glucanas sofrem a ação das glucanases, liberando manoproteínas, que sofrem ação de proteases, seguido pela liberação de glucanas. Ainda assim, a parede celular se mantem inteira, alterando pouca sua forma, tornando-se um pouco menor devido a solubilização de componentes citoplasmáticos (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2001b).

Takeshige (1992), Cebollero e González (2007) observaram que células envelhecidas por 12 meses em vinho apresentam mais corpos esféricos do que as células isoladas de vinhos modelo. Isso indica que após 24 horas de autólise induzida em vinhos modelo há um maior grau de autólise do que o alcançado em 12 meses de envelhecimento em vinho, visto que corpos esféricos são considerados uma forma intermediária no processo autofágico.

Martínez-Rodríguez e Pueyo (2009) afirmam que, durante o envelhecimento em contato com a leveduras, o conteúdo de proteínas cai continuamente, visto que são hidrolisadas em compostos de menor peso molecular, fazendo com que vinhos base tenham mais proteínas do que espumantes. Peptídeos e aminoácidos são em geral os principais componentes em volume liberados durante a autólise, sendo por essa razão o papel da protease a mais estudada, tanto na atividade da autólise, quanto na formação de espumas e na propriedade sensorial (LURTON et al., 1989; ALEXANDRE et al., 2001).

Diferentes tipos de protease já foram relatados, porém a protease A é a principal enzima envolvida no processo (LURTON et al. 1989; OLSEN et al. 1999) apresentando maior atividade no vinho com pH entre 3-3,5. Sua ação pode ser inibida pela presença de pepstatina como mostrado por Lurton (1989). Alexandre (2001) afirma que a protease A é responsável por 60% de todo nitrogênio liberado durante a autólise nos vinhos, sugerindo que outras proteases estão envolvidas no processo.

Em seus estudos, Martínez-Rodríguez e Polo (2000) comentam que a presença de polissacarídeos em espumantes pode ter origem na uva ou na levedura. A arabinose é o açúcar em maior concentração componente dos polissacarídeos nos vinhos bases, enquanto nos espumantes manose e glicose são os principais constituintes dos polissacarídeos perfazendo 43% e 31% respectivamente. Vários autores encontraram evidências que polissacarídeos contendo manose ou glicose em sua estrutura aumentam de 3 a 4 vezes sua concentração durante o envelhecimento em vinhos que são mantidos em contato com as borras das leveduras.

Ações enzimáticas de proteases e glucanases quebram as glucanas liberando manoproteinas (FEUILLAT et al, 2003). Dentre as glicoproteínas, a manoproteína é a mais estudada devido sua ação na estabilização tartárica (MOINE-LEDOUX & DUBOURDIEU, 2000) e sua maior proteção contra a instabilidade proteica (DUPIN et al., 2000). Além disso, Nunez (2006) encontrou evidências que as manoproteínas estão associadas à formação de espuma nos espumantes. A diferença no montante de manoproteínas e outros polissacarídeos liberados durante a autólise dependem de muitos fatores como, por exemplo, tempo, temperatura e tipo de levedura (CARIDI, 2006).

Vários compostos voláteis são formados durante a autólise, sendo que alguns destes tem baixos níveis de percepção (MOLNAR et al., 1981; HIDALGO et al., 2004). Ésteres são os componentes voláteis mais produzidos durante a autólise. Diferentes autores têm relacionado a qualidade dos espumantes à concentração dos ésteres como acetato de feniletila, dietil succinato e octil acetato (LOYAUX et al., 1981; POZO-BAYÓN et al., 2003). Apesar de ser aceito que o contato com leveduras durante o envelhecimento de vinhos altera significativamente o perfil dos espumantes (DELAPRESA-OWENS et al., 1998; FRANCIOLI et al., 2003), o seu impacto nas propriedades sensoriais continua pouco estudado.

Vários autores citam as proteínas do vinho como compostos que tem forte influência na qualidade da espuma formada (MOLAN et al., 1982; BRISSONNET et al., 1991; MALVY et al., 1994; PUEYO et al., 1995; ANDRÉS LACUEVA et al., 1996; LÓPEZ-BARAJAS et al., 1997;; MORENO-ARRIBAS et al., 2000; VANRELL et al., 2002). No entanto, outros componentes como os polissacarídeos melhoram a qualidade da espuma (BRISSONNET et al. 1991; MORENO-ARRIBAS et al., 2000), apesar de Girbau-Sòla (2002b) ter encontrado resultados opostos. Pueyo (1995) e López-Barajas (1997) encontraram efeitos benéficos da glicose na formação de espuma. Recentemente foram mostrados que manoproteínas oriundas da parede celular tem relevância significativa na formação da espuma, sendo que a forma com que ela é extraída altera a estrutura, visto que nem todas as manoproteínas tem o mesmo efeito sobre a formação da espuma (NUNEZ et al., 2006).

Os componentes que atuam de forma negativa na formação da espuma são os lipídeos, dependendo mais da forma física do que da concentração destes, sendo também importante a concentração do etanol (DUSSAUD et al., 1994). Ácidos graxos com 8, 10 ou 12 carbonos de fato prejudicam a formação de espuma, porém os ésteres destes ácidos graxos melhoram a sua

formação (GALLART et al, 2002). Pueyo et al. (1995), relatou que a ausência de ácido linoleico no estado livre (podendo estar ligado a outro tipo de lipídeo) tem uma correlação positiva com a qualidade da espuma. Uma baixa concentração de etanol tem efeito negativo, porém uma alta concentração não necessariamente indica efeitos positivo. Vários autores (MAUJEAN, 1990; PUEYO et al. 1995; LÓPEZ-BARAJAS et al. 1997; GIRBAU-SOLA et al, 2002) concordam que a concentração de SO_2 altera a forma de espuma da mesma forma que o etanol (MOLAN et al., 1982; DUSSAUD et al. 1994; GIRBAU-SOLÁ et al. 2002).

A segunda fermentação é um dos fatores responsáveis pela diminuição na qualidade da espuma do vinho base (GIRBAU-SOLÁ et al., 2002; HIDALGO et al., 2004), apesar de o maior envelhecimento em contato com as leveduras diminui a formação de espuma, porém aumenta sua persistência (ANDRÉS-LACUEVA et al., 1996).

O tipo de uva também impacta na formação e qualidade da espuma. Espumantes elaborados com Chardonnay tem a melhor formação de espuma, porém tem uma das piores estabilidades ao longo do tempo (ANDRÉS-LACUEVA et al., 1996, 1997). A cultivar Xarello também apresenta excelentes propriedades (ANDRÉS-LACUEVA et al., 1996). Quanto a cultivares tinas, estudos com Trepat e Monastrell (GIRBAU-SÒLA et al., 2002) e Garnacha (HIDALGO et al., 2004) mostram uma melhoria na formação da espuma quando utilizadas no vinho base.

O uso de cepas de leveduras com maior ação autolítica leva a uma melhoria na formação de espumas em um período mais curto de tempo (NUNEZ et al., 2005). O efeito que a *Botrytis cinérea* pode causar na formação da espuma também foi estudado por Marchal (et al., 2001) e Cilindre (et al., 2007) e, em ambos os casos, o ataque deste fungo causou uma diminuição na formação da espuma, visto que ele consome a proteína presente no meio.

2.10 CO-FERMENTAÇÃO COM LEVEDURAS *NÃO-SACCHAROMYCES*

O uso de cepas *não-Saccharomyces* produz diferenças metabólicas que impactam significativamente no perfil sensorial do vinho. Porém, estas apresentam um problema prático: apenas algumas cepas são capazes de fermentar por completo um mosto. Então duas técnicas são aplicadas: co-fermentação e fermentação sequencial (UGLIANO & HENSCHKE, 2009). Basicamente a diferença entre as duas técnicas é o momento de inoculação das leveduras. Na fermentação sequencial as leveduras *Saccharomyces* são adicionadas horas ou dias depois do

início da fermentação com as *não-Saccharomyces*. Já na co-fermentação ambas leveduras são inoculadas juntas, podendo variar a proporção de células entre elas.

Co-fermentação de duas leveduras metabolicamente distintas não só afeta a taxa de crescimento como também influencia na formação de metabólitos (EGLINTON et al., 2002; CHERAITI et al., 2005). O sucesso da co-fermentação depende das propriedades fisiológicas de cada levedura, principalmente da compatibilidade entre elas. Quando há incompatibilidade entre leveduras, o metabolismo pode ser alterado. A fermentação sequencial pode favorecer uma levedura mais fraca que a *Saccharomyces.* A *Candida stellata,* por exemplo, gera maior impacto sensorial em um vinho quando em inoculação sequencial, se comparada com co-inoculação (SODEN et al., 2000). Por outro lado, a co-inoculação de uma levedura de fermentação mais fraca em proporções muito maior que uma levedura de fermentação mais forte, pode gerar grandes impactos organolépticos em um vinho (UGLIANO & HENSCHKE, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento teve início em 27 de janeiro de 2015, utilizando 81 litros de um mosto da cultivar Chardonnay, proveniente da safra 2015, doado pela Vinícola Décima, com 19° Brix. Este mosto foi obtido através de prensagem direta das uvas (cacho com engaço), tratado com 40 $mg.L^{-1}$ de SO_2, clarificado com 20 $g.hL^{-1}$ de bentonite e submetido a ação do frio por 24 horas, sendo então retirado do contato com as borras. Posteriormente foi dividido em 6 tanques de inox com capacidade para 15 litros cada, onde as inoculações dos pés-de-cuba foram realizadas. As unidades de fermentação foram submetidas a 6 diferentes tratamentos no processo de fermentação alcoólica:

- T1 - Controle: *Saccharomyces cerevisae var bayanus* (15 $g.hL^{-1}$);
- T2 inoculação conjunta (2:1): *Torulaspora delbrueckii* (30 $g.hL^{-1}$) + *Saccharomyces cerevisae var bayanus* (15 $g.hL^{-1}$);
- T3 inoculação conjunta (20:1): *Torulaspora delbrueckii* (30 $g.hL^{-1}$) + *Saccharomyces cerevisae var bayanus* (1,5 $g.hL^{-1}$);

- T4 inoculação conjunta (200:1): *Torulaspora delbrueckii* (30 $g.hL^{-1}$) + *Saccharomyces cerevisae var bayanus* (0,15 $g.hL^{-1}$);
- T5 inoculação sequencial (1+1): *Torulaspora delbrueckii* (30 $g.hL^{-1}$), seguida por *Saccharomyces cerevisae var bayanus* (30 $g.hL^{-1}$), 72 horas após a primeira inoculação;
- T6 inoculação *não-Saccharomyces*: 100% *Torulaspora delbrueckii* (30 $g.hL^{-1}$).

O mosto em fermentação de cada um dos 6 tanques foi então dividido em 3 garrafões de vidro de capacidade de 4,5 litros cada (figura 7), totalizando assim 18 unidades amostrais. Estes foram fechados com válvula de Müller, contendo solução de SO_2 na concentração de 50 $g.L^{-1}$, evitando assim a contaminação externa.

As leveduras escolhidas para o experimento foram: *Torulaspora delbrueckii:* ZYMAFLORE® Alpha $^{TD\ n.\ Sacch}$ e *Saccharomyces cerevisae var bayanus:* MAURIVIN PDM ® cujas fichas técnicas comerciais se encontram nos anexos IA e IB respectivamente. As doses de leveduras *Saccharomyces* nos tratamentos de co-inoculação (T2, T3 e T4) foram projetadas, conforme descritas acima, com o intuito de dar uma larga vantagem populacional à levedura *Torulaspora delbrueckii*, evitando assim que a *Saccharomyces* assumisse o controle da fermentação logo no início.

A fermentação ocorreu em temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). Após 30 dias do inicio do experimento ocorreu a completa parada de fermentação em todas as unidades, sendo então aplicado uma dose de 50 $mg.L^{-1}$ de SO_2 em todos os tratamentos. Depois de 5 dias, iniciou-se a tomada de espuma (segunda fermentação), realizada com adição de açúcar na concentração 24 $g.L^{-1}$ e 30 $g.hL^{-1}$ de levedura *Saccharomyces cerevisae var bayanus* MAURIVIN PDM ®, seguida da divisão dos vinhos base de cada um dos tratamentos em 6 garrafas de 750 mL. Todas as análises (presentes no item 3.5 deste trabalho) foram realizadas em quatro momentos com intervalos de 3 meses entre si, sendo a primeira análise realizada após 3 meses do inicio da segunda fermentação.

FIGURA 7 - UNIDADES DE FERMENTAÇÃO

3.2 PREPARO DOS PÉS DE CUBA

Foram preparados 2 pés de cuba distintos, sendo um de levedura *não-Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*) e o outro de uma cepa *Saccharomyces cerevisae var bayanus*. Em ambos os casos não houve a adição de nenhum nutriente.

O pé-de-cuba de *Torulaspora delbrueckii* foi preparado pesando-se 16,20 g da levedura, dissolveu-se em 200 mL de água aquecida à 30ºC. Deixou-se descansar por 5 minutos e adicionou-se 160 mL de mosto, tomando o cuidado para que o pé de cuba e o mosto não tivessem uma diferença de temperatura maior que 10ºC. Após 10 minutos adicionou-se 240 mL de mosto, novamente aguardando-se 10 minutos quando então foi dobrado o volume, adicionando-se mais 600 mL de mosto. Na sequência, o volume foi novamente dobrado, com adição de 1200 mL de mosto, que ambientou por 20 minutos, sendo ao final adicionado mais 2400 mL de mosto, obtendo-se um total de 4800 mL. Após 30 minutos o pé de cuba foi dividido em 4 partes iguais (1200 mL cada).

Para o pé-de-cuba de *Saccharomyces cerevisae var bayanus* na dose 15 $g.hL^{-1}$ pesou-se 4,05 g de levedura que foram dissolvidas em 50 mL de água aquecida à 35ºC. Após 5 minutos, foi adicionado 40 mL de mosto, tomando o cuidado para que o pé de cuba e o mosto não tenham uma diferença de temperatura maior que 10ºC. Após 10 minutos, 60 mL de mosto foram adicionados, aguardando outros 10 minutos. O volume foi novamente aumentado com mais 150 mL de mosto. O período de descanso foi de 15 minutos, sendo adicionados 300 mL de mosto e

deixados para ambientar por mais 20 minutos. Ao final deste período, adicionou-se 600 mL de mosto, esperou-se mais 30 minutos e por fim o volume foi dobrado, adicionando-se 1200 mL de mosto. Esperou-se mais 30 minutos para completa ambientação das leveduras e então o pé-de-cuba foi dividido em duas cotas de 1200 mL cada.

3.3 PREPARO DOS TRATAMENTOS

T1 - Controle: inoculou-se 1068 mL do pé de cuba de *Saccharomyces cerevisae* em 12,3 L de mosto, deixando-se homogeneizar por 1 hora sendo dividido em 3 garrafões de 4,5 L cada;

T2 inoculação conjunta (2:1): inoculou-se 1200 mL do pé de cuba de *Torulaspora delbrueckii* juntamente com 1200 mL de pé de cuba *Saccharomyces cerevisae* em 11,7 L de mosto. Deixou-se homogeneizar por 1 hora e então foi divido em 3 garrafões de 4,5 L cada;

T3 inoculação conjunta (20:1): 1200 mL do pé de cuba de *Torulaspora delbrueckii* juntamente com 120 mL de pé de cuba *Saccharomyces cerevisae* foram inoculados em 12,2L de mosto. Homogeneizou por 1 hora e após este período foi dividido em 3 garrafões de 4,5L cada;

T4 inoculação conjunta (200:1): inoculou-se 1200 mL do pé de cuba de *Torulaspora delbrueckii* juntamente com 12 mL de pé de cuba *Saccharomyces cerevisae* em 12,3 L de mosto. Deixou-se homogeneizar por 1 hora sendo após este período dividido em 3 garrafões de 4,5 L cada;

T5 inoculação sequencial (1+1): inoculou-se 1200 mL do pé de cuba de *Torulaspora delbrueckii* em 11,1 L de mosto. Deixou-se homogeneizar por 1 hora e após este período, dividiu-se o volume em 3 garrafões de 4,5 L cada. Após 72 horas, inoculou-se 400 mL de um novo pé de cuba de *Saccharomyces cerevisae* (30 $g.hL^{-1}$) em cada garrafão;

T6 inoculação não *Saccharomyces*, 100% *Torulaspora delbrueckii* (30 $g.hL^{-1}$): inoculou-se 1200 mL do pé de cuba de *Torulaspora delbrueckii* em 11,1 L de mosto. Após homogeneizar por 1 hora e dividiu-se o volume em 3 garrafões de 4,5 L cada.

Ao final da 1ª fermentação, no dia 26 de fevereiro de 2015, os garrafões receberam uma dose de SO_2, na forma de metabissulfito de potássio, na concentração de 50 $mg.L^{-1}$, sendo então levados a câmera fria onde permanecerampor 5 dias à temperatura de 1°C.

3.4 TOMADA DE ESPUMA

Após o término da 1ª fermentação, foi acrescentado 24 $g.L^{-1}$ de açúcar por garrafão, sendo um total de 110 g para cada unidade de T1 à T5 e 96 g para T6 e um novo pé de cuba foi preparado exclusivamente com *Saccharomyces cerevisae var. bayanus,* na concentração de 40 $g.hL^{-1}$. Foram pesados 32,57 g de levedura e hidratados em 300 mL de água morna (35ºC), descansando por 20 minutos. Após este período, foram adicionados 40 g de açúcar e o volume corrigido com água para 500 mL. Depois de um novo descanso de 20 minutos, o pé de cuba foi dividido em 18 alíquotas (28,4 mL para T1 à T5 e 24,7 mL para T6), que foram adicionadas a beckers de 400 mL contendo 160 mL dos vinhos base provenientes dos diferentes garrafões, já corrigidos de açúcar.

Após novos 30 minutos de adaptação, os pés de cuba foram adicionados aos garrafões, sendo estes agitados manualmente para homogeneizar. Após uma hora, iniciou-se o enchimento das garrafas de espumante (750 mL). Cada garrafão resultou em 6 garrafas, totalizando 108 unidades. Cada garrafa foi fechada com um opérculo plástico e uma tampa corona. Levadas a caixas plásticas e mantidas na horizontal, em temperatura ambiente e assim conservadas até o momento das análises.

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE

As análises foram realizadas no Laboratório de Referência Enológica – LAREN da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Estado do Rio Grande do Sul vinculado ao Instituto Brasileiro do Vinho – IBRAVIN, localizado em Caxias do Sul.

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em duplicata em cada uma das 3 repetições, tendo como resultado 6 observações para cada tratamento, num mesmo ponto experimental (mês de coleta), sendo um total de 24 observações, para cada tratamento, ao final de toda a avaliação.

Foram realizadas quatro rodadas de análises com intervalo de 3 meses entre si, sendo que a primeira foi realizada após 3 meses do inicio da tomada de espuma. Nas 4 rodadas avaliou-se as análises básicas, índices de cor, compostos voláteis e compostos não voltáteis.

3.5.1 Determinação de teor alcoólico, açúcares redutores (glicose + frutose), pH, acidez volátil e acidez titulável

A determinação do teor alcoólico, açúcares redutores (glicose + frutose), pH, acidez total, acidez volátil, foi realizada por espectroscopia no infravermelho próximo através do equipamento WineScan (Foss). Porém diferentemente das demais análises deste trabalho, essas foram realizada somente no primeiro momento de abertura das garrafas, aos 3 meses.

3.5.2 Determinação de etanal (acetaldeído), acetato de etila, acetal, metanol e álcoois superiores (1-butanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol)

As determinações do conteúdo de etanal, acetato de etila, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol foram realizadas simultaneamente por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), conforme procedimentos de Bertrand (1981).

Foram preparadas três soluções para calibrar o equipamento, servindo como referência: solução A, solução B e solução C. Para a solução A pesou-se, em um balão de 50 mL, 0,1 g de etanal (2000 $mg.L^{-1}$), 0,2 g de acetato de etila (4000 $mg.L^{-1}$) e 0,1 g de acetal (2000 $mg.L^{-1}$). A solução B foi preparada em outro balão de 50 mL, pesando-se 0,2 g de metanol (4000 $mg.L^{-1}$), 0,1g (2000 $mg.L^{-1}$) de 1- Propanol e 0,15 g (3000 $mg.L^{-1}$) de 2-metil- 1-propanol. A Solução C, foi preparada em um balão de 50 mL pesando-se 0,1g de 2-metil-1-butanol (2000 $mg.L^{-1}$) e 0,2 g de 3-metil-1-butanol (4000 $mg.L^{-1}$).Para o padrão interno, foi preparada uma solução de 4-metil-2-pentanol na concentração de 5000 $mg.L^{-1}$ em solução hidro alcoólica (40% vol.).

Os espumantes que foram analisados foram destilados, separando uma alíquota de 5 mL deste destilado. A esta alíquota foi adicionado 70 µL da solução de padrão interno a 5000 $mg.L^{-1}$, sendo homogeneizada e colocada em um vial e levado ao cromatógrafo sendo apenas 1 µL injetado no aparelho.

As condições cromatográficas utilizadas foram: Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 com Injetor Ir em MORE -> Fast Plunger -> ok, Volume de injeção: 1 µL, Pumps 3, Aquecimento 200 °C (Heater), Pressure:10,3 psi, Total flow (H_2) 104 $mL.min^{-1}$, Modo Split, split ratio 1:50; Gás saver: 120 $mL.min^{-1}$. After 2 min. Coluna 1 - HP-innowax (polietileno glicol) (60m x 0,25mm x 0,25µm); Gás de arraste H2 (2,0 $mg.L^{-1}$); Modo fluxo constante (Mode: Constant flow);Temperatura: 40°C – 5min (40-90°C – 3°C/min e 90-200°C – 5 min);

Post- run 40 min (Tempo da análise 44,28 min); - Detector FID com T = 240°C, H_2 Flow = 40 $mg.L^{-1}$,Ar Flow = 400 $mg.L^{-1}$ e Makeup flow N_2 = 30 $mg.L^{-1}$.(OIV-MA-AS312-03ª).

3.5.3 Determinação de acetatos, ésteres e ácidos graxos

A determinação dos acetatos, ésteres e ácidos graxos foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), conforme procedimentos de Bertrand (1981).

A determinação dos ésteres parte da calibração do aparelho com uma curva padrão e da elaboração de um padrão interno, elemento que será adicionado à amostra. Seis grupos de padrões foram elaborados em balões volumétrico de 50 mL cada para calibrar a curva do aparelho.

No primeiro balão foi pesado 0,05 g de ácido hexanóico (1000 $mg.L^{-1}$), 0,05 g de ácido octanóico (1000 $mg.L^{-1}$), 0,05 g ácido decanóico (1000 $mg.L^{-1}$) e 0,05g ácido dodecanóico (1000 $mg.L^{-1}$). Para o segundo balão foi pesado 0,05 g ácido butírico (1000 $mg.L^{-1}$), 0,05g ácido isobutírico (1000 $mg.L^{-1}$) e 0,05g ácido isovalérico (1000 $mg.L^{-1}$).

No terceiro balão foi pesado 0,05g de Butirato de etila, 0,05 g Hexanoato de etila, 0,05 g de Octanoato de etila, 0,05 g de Decanoato de etila e 0,05 g de Dodecanoato de etila. Para o quarto balão, 0,05 g de Acetato de isoamila, 0,05 g Acetato de hexila e 0,05 g de Acetato de feniletila foram pesados.

No quinto balão foi pesado 0,05 g de 2-fenil-etaanol e 0,05 g de succinato de dietila. E por fim, no sexto balão, 0,05 g de Hexanol, 0,05 g de Cis-3-hexanol e 0,05 g de Trans-3-hexanol foram pesados. Todos os seis balões foram completados com solução hidroalcoolica 50%.

O padrão interno, foi preparado de forma análoga. Primeiro, pesou-se 0,05 g de 3-octanol em um balão de 50 mL e 0,05 g de ácido heptanóico em outro balão de igual volume, que foram completados com solução hidro alcoólica 50% gerando soluções na concentração de 1000 $mg.L^{-1}$. Para atingir a concentração desejada no padrão interno (40 $mg.L^{-1}$ de 3-octanol e 70 $mg.L^{-1}$ de ácido heptanóico), fez-se uma diluição destas soluções obtidas pipetados 4 mL e 7mL

respectivamente em balões de 100 mL que foram completados com solução hidroalcoolica 50%.

Antes de seguir com a análise no cromatógrafo, fez-se a extração dos ésteres do vinho. O processo teve inicio com a retirada do gás da amostra, onde foi utilizado um agitador magnético por 40 minutos. Em seguida, uma alíquota de 50 mL de vinho foi adicionado a um balão volumétrico de 100 mL. O vinho foi então acidificado com 0,3 mL de ácido fosfórico (1/3), adicionou-se 2 mL de cada padrão interno, 3-octanol (40 $mg.L^{-1}$) e ácido heptanóico (70 $mg.L^{-1}$) e mais 4 mL de solução Éter/Hexano (1:1). O balão foi tampado e levado à agitação forte com auxílio de agitador magnético por 5 minutos. Ao fim deste período, fez-se a extração da fase aquosa usando um funil de decantação. A fase retirada por último (turva) foi colocada em um frasco pequeno com um agitador magnético e levada à agitação com velocidade baixa. Na fase recolhida no balão, adicionou-se 2 mL de Éter/Hexano (1:1) e levou-se novamente à agitação por 5 minutos, repetindo-sea operação de decantação. A primeira fase recolhida do funil, recebeu novamente, 2 mL de Éter/Hexano (1:1) e foi levada a agitação por mais 5 minutos, repetiu-se a operação de decantação e o material recolhido foi levado ao congelador. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirou-se a fase transparente e esta foi levada à análise no cromatógrafo.

A análise seguiu em um cromatografo gasoso com detector FID, acoplado comcoluna FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições de análise foram calibradas da seguinte maneira:Injetor em modo pulsed splitless, divisão de 60 $mL.min^{-1}$, tempo de splitless de 0,5min, pressão injetor pulsed de 50KPa, T = 200°C, volume: 2 µL e H_2 de 33,7 KPa; Coluna FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com gás de arraste H2 (2,0 $ml.min^{-1}$; 33,7 Kpa), modo fluxo constante, temperatura:40-220°C – 3°$C.min^{-1}$, 200°C – 30min; Detector FID, com T= 250°C, H_2 (35 Kpa) (100 KPa), Ar = 400 $mL.\ min^{-1}$ e N_2 = 30 $mL.min^{-1}$.

3.5.4 Determinação dos Índices de cor

Para a determinação índice dos Índices de cor, utilizou-se um Espectrofotômetro. Foi feita a leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 420 nm (amarelo), 520 nm (vermelho) e

620 nm (azul) através de uma cubetas de quartzo de 1 mm de caminho ótico. Esta foi preenchida com a amostra de vinho sem diluição, conforme descrito por Riberéau-Gayon et al (2003).

3.5.5 Determinação dos compostos fenólicos totais em vinhos

Para a determinação dos compostos fenólicos totais, utilizando-se um Espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm com cubeta de quartzo de 10 mm. Esta foi preenchida com a amostra de vinho com diluição de 10 vezes, conforme descrito por Riberéau-Gayon et al (2003).

3.5.6 Determinação dos teores de tirosol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido cafeico, ácido ferrúlico e ácido coumárico

Uma alíquota de 1,5 mL foi filtrada usando membrana de éster de celulose com porosidade de 0,45µm e acondicionada em um vial de 2 mL e levada para análise de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) com detectores FLD (Fluorescence Detector) e DAD (Diode Array Detector), com comprimento de onda de 204, 280 e 320 nm. Utilizou-se para análise uma coluna Zorbax SB C_{18} (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) acoplada a uma pré-coluna Zorbax 300 SB C_{18} (12 mm x 4,6 mm; 5 µm). A temperatura da coluna foi mantida a 20°C e o fluxo de eluição dos solventes foi de 1 $mL.min^{-1}$. O volume de injeção de amostra foi de 10 µL.

Foram utilizados três solventes (A, B e C), sendo estes compostos por uma solução 50 $mMol.L^{-1}$ de diidrogenofosfato de amônio (solvente A, canal A), 20% de solvente A diluídos em 80% de acetonitrila (solvente B, canal C) e solução de 0,2 $Mol.L^{-1}$ de ácido ortofosfórico (solvente C, canal D). Este procedimento foi resultado da adaptação dos procedimentos descritos nos trabalhos de Lamuela-Raventos & Waterhouse (1994) e Gómez-Alonson et al. (2007).

3.5.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism® 5 for Windows, version 5.02.

Todos os componentes pesquisados foram submetidos a análise *two-way* ANOVA, confrontando os 6 tratamentos ao longo do tempo. Os componentes também foram submetidos a outro teste estatístico, sendo estes a análise *one-way* ANOVA (não paramétrica) complementada por *Tukey* (com significância de 0,05), como pós-teste. Estas avaliações foram feitas em dois sentidos: primeiro avaliando somente o comportamento de um tratamento

ao longo do tempo (Tn x 3, 6, 9 e 12 meses), e em um segundo momento, avaliando diferentes tratamentos em um mesmo momento (n meses x T1, T2, T3, T4, T5 e T6).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos segundo a composição química dos espumantes em analises básicas, compostos voláteis ecompostos não voláteis.

4.1 ANÁLISES BÁSICAS

As análises básicas dos vinhos espumantes, no tempo inicial de três meses, demonstram um teor alcoólico mais elevado no tratamento que continha somente *Saccharomyces cerevisae* (T1), sendo 0,46% v/v maior que a média dos demais tratamentos, que não apresentaram diferença estatística entre si. O mesmo comportamento ocorreu para os açúcares redutores oe todos os tratamentos que contém *Torulaspora delbrueckii* (T2 à T6), que também não apresentaram diferença estatística, entretanto, o tratamento exclusivo de *Saccharomyces cerevisae* (T1) apresentou uma maior concentração de açúcares residuais (3,70 $g.L^{-1}$ maior que a média dos demais tratamentos). Isso leva a crer que a *Saccharomyces cerevisae* possui a capacidade de produzir mais álcool, com a mesma quantidade de açúcar, do que a *Torulaspora delbrueckii*.

Quanto ao pH, não foi observada nenhuma diferença estatística, mostrando que nenhum dos tratamentos alterou este parâmetro.

A acidez volátil, apesar de apresentar valores bem abaixo dos limiares legais de 1,2 $g.L^{-1}$ (PORTARIA N.º 229, DE 25 DE OUTUBRO DE 1988), demonstrou menores índices nos tratamentos T5 (inoculação sequencial) e T6 (100% *Torulaspora delbrueckii*). Os resultados obtidos estão de acordo com o trabalho de Ugliano & Henschke (2009), que citam a *Torulaspora delbrueckii* como uma baixa produtora de ácido acético. Vale ressaltar que, quando o ácido acético de um vinho ultrapassa a concentração de 0,7 $g.L^{-1}$, as notas caraterísticas de vinagre já começam a impactar no perfil do produto (CORISON et al., 1979).

A acidez total, expressa em $g.L^{-1}$ de ácido tartárico, apresentou maiores valores para os tratamentos T6, T5 e T3. O menor valor ocorreu no tratamento T1 (100% *Saccharomyces cerevisae* que apresentou uma diferença de 1,59 $g.L^{-1}$ em relação ao tratamento T6 (100% *Torulaspora delbrueckii*), sendo que para o vinho espumante, a alta acidez é uma característica desejável. Visto que as manoproteínas ajudam na estabilização do ácido tartárico (MOINE-

LEDOUX & DUBOURDIEU, 2000), e que a quantidade de manoproteínas e outros polissacarídeos liberados durante a autólise dependem, entre outros fatores, também do tipo de levedura (CARIDI, 2006), uma possível explicação para o menor valor de acidez total em T1, seria justamente uma precipitação tartárica, devido a um provável menor aporte de manoproteínas que a levedura *Saccharomyces cerevisae* forneceu ao espumante durante o período.

TABELA 1-VALORES DE AÇÚCARES RESIDUAIS, TEOR ALCOÓLICO, PH, ACIDEZ VOLÁTIL E TOTAL DOS VINHOS ESPUMANTES ELABORADOS COM DIFERENTES LEVEDURAS AOS 3 MESES DE AUTÓLISE.

Tratamento	Açucares redutores ($g.L^{-1}$)	Álcool (% v/v)	pH	Ac. Volátil ($g.L^{-1}$ em ác.acético)	Ac. Total ($g.L^{-1}$ em ác. tartárico)
T1	5,81±1,37 A	12,19±0,16 A	3,28±0,13 A	0,66±0,05 A	4,45±0,22 C
T2	2,08±0,61 B	11,84±0,09 B	3,36±0,02 A	0,62±0,01 A	5,69±0,07 B
T3	1,82±0,48 B	11,76±0,08 B	3,37±0,03 A	0,62±0,02 A	5,78±0,06 AB
T4	3,08±0,70 B	11,80±0,02 B	3,40±0,02 A	0,60±0,02 A	5,77±0,05 B
T5	2,47±0,60 B	11,59±0,12 B	3,41±0,02 A	0,53±0,07 B	5,89±0,02 AB
T6	1,11±0,08 B	11,70±0,01 B	3,33±0,02 A	0,49±0,01 B	6,04±0,03 A

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

4.2 COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Para cada tratamento, foram avaliados o índice de cor (420 nm), as concentrações dos polifenóis totais (280nm), a catequina, a epicatequina, o tirosol, assim como os ácidos fenólicos ferrúlico, caféico e coumárico.

4.2.1 Índice de cor

Nos resultados do índice de cor (Tabela 2) o fator tempo foi extremamente significativo sendo responsável por 91,25 % da variação total para o comprimento de onda 420 nm (amarelo). Este não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, nas análises de 3 meses, porém, conforme esperado, houve aumento de cor principalmente aos 12 meses, devido a

oxidação de compostos fenólicos ao longo do tempo. Observamos que aos 12 meses, T1 (100% *Saccharomyces cerevisae)* é o tratamento que apresenta o menor valor no índice de cor.

TABELA 2 - RESULTADOS DO ÍNDICE DE COR COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, CATEQUINAS E EPICATEQUINAS NOS VINHOS ESPUMANTES EM DIFERENTES TRATAMENTO E TEMPOS DE CONSERVAÇÃO DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Índice de cor (420nm)				
T1	0,010±0,002 Ac	0,012±0,001 ABb	0,013±0,001 Aac	0,029±0,005 Ba
T2	0,010±0,003 Ac	0,026±0,005 Ab	0,012±0,003 Ac	0,036±0,002 ABa
T3	0,011±0,002 Ac	0,023±0,003 ABb	0,012±0,002 Ac	0,037±0,002 Aa
T4	0,011±0,001 Ac	0,021±0,002 ABb	0,013±0,001Ac	0,033±0,003 ABa
T5	0,011±0,002 Ac	0,020±0,001 ABb	0,008±0,002 Ac	0,034±0,004 ABa
T6	0,013±0,002 Abc	0,019±0,001 Bb	0,011±0,004 Ac	0,035±0,001 ABa
Compostos fenólicos totais (280nm)				
T1	8,364±0,082 Abc	9,216±0,014 BCb	9,281±0,023 Ab	10,722±0,053 ABa
T2	8,167±0,185 Bc	9,375±0,225 BCb	9,407±0,436 Ab	10,817±0,306 ABa
T3	8,056±0,188 Bc	9,284±0,450 BCb	9,292±0,329 Ab	10,700±0,344 Aa
T4	8,025±0,303 Bc	9,079±0,190 Cb	9,173±0,203 Ab	10,848±0,315 ABa
T5	8,445±0,062 ABb	9,963±0,238 Aab	9,158±1,195 Ab	11,475±0,305 BCa
T6	8,674±0,125 Ac	9,752±0,123 ABb	10,096±0,290 Ab	11,770±0,218 Ca
Catequinas (mg.L^{-1})				
T1	1,60±0,04 ABb	1,59±0,04 Bb	1,57±0,06 ABb	2,04±0,13 Ba
T2	1,78±0,13 Abc	1,99±0,03 Ab	1,71±0,12 Abc	2,37±0,07 Aa
T3	1,69±0,14 ABb	2,01±0,12 Aab	1,87±0,29 Aab	2,32±0,13 Aa
T4	1,49±0,03 CDa	1,70±0,03 Ba	1,63±0,17 ABa	1,11±0,07 Cb
T5	1,35±0,04 Db	1,61±0,01 Ba	1,42±0,05 BCb	1,16±0,09 Cc
T6	1,42±0,02 CDa	1,36±0,01 Ca	1,14±0,06 Cb	1,06±0,08 Cb
Epicatequinas (mg.L^{-1})				
T1	0,52±0,04 Ab	0,56±0,03 Bb	0,67±0,06 ABa	0,31±0,02 Cc
T2	0,70±0,10 Aa	0,52±0,02 Bb	0,71±0,03 ABa	0,44±0,01 BCb
T3	0,57±0,16 Aa	0,59±0,07 ABa	0,68±0,07 ABa	0,49±0,04 Ba
T4	0,70±0,03 Aa	0,66±0,01 Aa	0,70±0,07 ABa	0,71±0,08 Aa
T5	0,59±0,07 Abc	0,43±0,01 Cc	0,79±0,14 Aa	0,74±0,04 Aab
T6	0,70±0,02 Aa	0,32±0,02 Dc	0,56±0,02 Bb	0,73±0,09 Aa

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

4.2.2 Compostos fenólicos totais

A análise dos compostos fenólicos totais demonstrou que não houve variação significativa entre os tratamentos (Tabela 2), sendo que a variação observada diz respeito ao fator tempo e não às leveduras. Em geral, houve um aumento nos níveis de compostos fenólicos totais aos 6 e 12 meses de conservação dos espumantes.

Para as catequinas (Tabela 2), os tratamentos T4, T5 e T6, que possuem predominância de *Torulaspora delbrueckii*, apresentam os menores valores em todos os testes e tendem a uma diminuição de concentração com o passar do tempo. Já os tratamentos T1, T2 e T3 apresentaram, em geral, um aumento nas concentrações de catequina ao longo do tempo, além disso, T2 e T3 são os que apresentam as maiores concentrações, se comparados aos demais tratamentos.

Em vinhos brancos onde existe um limitado contato com as películas, as catequinas são os principais flavonóides. Estes compostos são os responsáveis pelo amargor e acastanhamento dos vinhos, brancos e tintos (ZOECKLEIN et al., 1995).

As epicatequinas que possuem níveis inferiores às catequinas, apresentaram concentrações inferiores a 0,8 $mg.L^{-1}$ em todos os tratamentos. Os diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas na análise inicial de 3 meses. Os tratamentos T3 e T4 não apresentaram variações significativas ao longo do tempo, enquanto que para o tratamento T1, onde atuou somente a levedura *Saccharomyces cerevisae*, houve uma diminuição da epicatequina, evidenciado a sua combinação com outros polifenóis do vinho.

4.2.3 Ácidos fenólicos

Os resultados das comcentrações dos ácidos hidrocinâmicos: ferrúlico, caféico e p-cumárico são apresentados na Tabela 3.

Ao longo do experimento uma pequena alteração de cor foi observada devido à oxidação destes ácidos, levando ao aumento dos valores de absorbância no comprimento de onda 420 nm aos 12 meses.

Os níveis do ácido ferrúlico se apresentaram bastante inferiores aos do ácido caféico e ácido coumárico, conforme esperado. Segundo Cabrita, et al., (2000), estes ácidos se encontram

na uva na forma de monoésteres, combinados com o ácido tartárico. Na polpa das uvas, onde são os únicos compostos fenólicos existentes, o ácido cafeiltartárico é o mais abundante, sendo o feruriltartárico o que se encontra em menor quantidade.

As concentrações do ácido ferrúlico não apresentaram diferenças entre os tratamentos, exceto por T1 aos 12 meses que se difere dos demais. Pequenas variações foram observadas durante o tempo de conservação com exceção dos tratamentos com 100% *Saccharomyces cerevisae* (T1), inoculação sequencial (T5) e *Torulaspora delbrueckii* (T6), onde houve um aumento de concentração a partir de 6 meses de conservação para todos eles.

O ácido caféico apresentou maior concentração entre os três ácidos estudados e seus níveis variaram entre 0,75 a 4,09 $mg.L^{-1}$. Entre os tratamentos, os espumantes com 100% *Saccharomyces cerevisae* (T1) apresentaram diferença significativa em relação aos espumantes T4, inoculação conjunta (200:1) de *Torulaspora delbrueckii*e e *Saccharomyces cerevisae,* e com os espumantes 100% *Torulaspora delbrueckii (*T6), na avaliação dos 3 meses. O ácido caféico é o que apresenta maiores variações tanto a nível de tratamento quanto a nível de tempo de conservação.

Mostos expostos as enzimas lacase e tirosinase podem transformar os ácidos cafeico e coumárico em quinonas, que tendem a polimerizar e formar componentes de coloração marrom (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), consequentemente aumentando o índice de cor. Este acastanhamento do vinho não foi observado levando a crer que o mosto não sofreu a ação destas enzimas.

Os ácidos coumárico e ferrúlico se degradados, poderiam estar associados a produção de 4-etil-fenol e 4-etil-guayacol, que possuem aromas desagradáveis, normalmente ocasionados por contaminação de *Brettanomyces.* Como não ocorreu diminuição dos valores destes ácidos, presumiu-se que não houve contaminação por *Brettanomyces* e que as leveduras utilizadas no experimento não possuem comportamento similar ao desta cepa.

Para o ácido coumárico somente houve diferença estatística entre os tratamento T2, que apresentou o maior valor, e o T3 com o menor valor, na análise de 3 meses. Em relação ao tempo de conservação houveram flutuações nos valores com a tendência a um aumento nas concentrações em 9 e 12 meses.

TABELA 3 - RESULTADOS E ÁCIDOS FENÓLICOS NOS VINHOS ESPUMANTES DOS DIFERENTES TRATAMENTOS DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Ác. Ferrúlico (mg.L^{-1})				
T1	0,11±0,01 Ac	0,14±0,01 Abc	0,17±0,04 Ab	0,26±0,02 Aa
T2	0,16±0,04 Aa	0,19±0,06 Aa	0,23±0,07 Aa	0,18±0,03 Ba
T3	0,16±0,04 Aa	0,19±0,01 Aa	0,19±0,05 Aa	0,18±0,01 Ba
T4	0,13±0,02 Aa	0,15±0,01 Aa	0,14±0,01 Aa	0,16±0,01 Ba
T5	0,13±0,01 Ab	0,15±0,01 Aab	0,16±0,01 Aa	0,17±0,01 Ba
T6	0,10±0,01 Ab	0,14±0,01 Aa	0,15±0,02 Aa	0,14±0,01 Ba
Ác. Caféico (mg.L^{-1})				
T1	1,31±0,24 Ac	4,13±0,21 ABa	3,29±1,18 Aab	2,01±0,14 Cbc
T2	1,12±0,10 ABb	4,48±0,53 Aa	4,67±2,51 Aa	3,63±0,20 Bab
T3	1,04±0,06 ABCb	4,05±0,05 ABCa	2,62±1,80 Aab	4,09±0,02 Aa
T4	0,93±0,03 BCc	3,48±0,03 Ca	1,55±0,16 Ab	1,59±0,19 CDb
T5	1,12±0,10 ABc	3,51±0,02 BCa	1,67±0,24 Ab	1,85±0,25 CDb
T6	0,75±0,08 Cd	3,51±0,01 BCa	1,08±0,06 Ac	1,47±0,04 Db
Ác. Coumarico (mg.L^{-1})				
T1	0,26±0,04 ABb	0,46±0,03 ABab	0,57±0,19 Aa	0,38±0,03 Bab
T2	0,45±0,22 Aa	0,58±0,25 Aa	0,86±0,43 Aa	1,18±0,14 Aa
T3	0,16±0,02 Bb	0,33±0,25 ABb	0,55±0,30 Ab	1,01±0,03 Aa
T4	0,27±0,02 Abc	0,42±0,00 ABa	0,36±0,01 Ab	0,33±0,03 Bb
T5	0,29±0,07 ABab	0,20±0,01 Bb	0,38±0,08 Aa	0,40±0,07 Ba
T6	0,20±0,02 ABb	0,24±0,02 Bb	0,30±0,01 Aa	0,31±0,02 Ba

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

4.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS

Neste trabalho foram estudados compostos voláteis responsáveis pelas características aromáticas dos espumantes, entre os quais o metanol, etanal, álcoois superiores, ésteres e ácidos.

4.3.1 Metanol e etanal

Todos os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 4), não ultrapassam 57 mg.L^{-1}. Estes valores estão bem abaixo dos 350 mg.L^{-1}, permitidos pela legislação brasileira (PORTARIA N.º 229, DE 25 DE OUTUBRO DE 1988).

O metanol está sempre presente nos vinhos, porém em quantidades pequenas muito abaixo dos níveis que podem causar toxicidade (LD50 = 350 mg.kg^{-1}). Vinhos elaborados de

maneira convencional possuem baixos teores, sendo que para os vinhos brancos os volumes usuais são inferiores a 63 $mg.L^{-1}$ (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Segundo Ribéreau-Gayon (2006), o metanol não é influenciado diretamente pela ação das leveduras no vinho porque é formado exclusivamente pela hidrólise enzimática de radicais metil presentes nas pectinas das películas das uvas durante a fermentação. Nos níveis encontrados nos vinhos não apresenta impacto organoléptico uma vez que possui um elevado limite de percepção olfativa de 500 $mg.L^{-1}$ (CURVELO GARCIA & BARROS, 2015).

O metanol não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos na análise de 3, 9 e 12 meses, indicando que não houve influência do tipo de levedura durante a fermentação alcoólica.

Quando comparamos os resultados de diferentes tratamentos durante os tempos de conservação (autólise) observamos que após 6 meses de conservação alguns tratamentos como o T2, T3 e T6 apresentaram um aumento na concentração de metanol, indicando que o mesmo pode ter sido formado por reações de oxido-redução nos vinhos espumantes. Para os tratamentos T1, T4 e T5 os valores permaneceram estáveis até 12 meses após a fermentação.

Neste estudo, o fator tempo responde por 50,84% da variação observada enquanto o fator levedura representa 11,96%, indicando que, mesmo com pequenas alterações, os níveis de metanol não foram influenciados pela ação das leveduras. Este resultado demostra a coerência deste trabalho visto que o metanol é um composto presente nas pectinas das películas das uvas que durante a fermentação é liberado no meio hidro alcoólico (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Neste estudo, quando comparamos os resultados de etanal, de um mesmo tratamento nos diferentes tempos, não observamos diferenças estatísticas significativas, exceto no T2 que apresentou maior concentração em 3 meses em relação aos 6, 9 e 12 meses. Em relação aos tratamentos observamos uma maior formação do composto no tratamento T5, onde a levedura *Torulaspora delbrueckii* foi inoculada 72 horas antes da *Saccharomyces cerevisae*, evidenciando que esta escolha poderia ser a menos indicada por produzir uma concentração maior de etanal em relação aos demais tratamentos.

O etanal é o aldeído mais abundante, representando 90% dos aldeídos dos vinhos. Sua presença está relacionada à ação das leveduras durante a fermentação alcoólica e também com

a oxidação do vinho durante a sua conservação e envelhecimento, visto que ele é resultante da oxidação do etanol (RIBÉREAU-GAYON, 2003).

Traços de etanal são suficientes para produzir um odor característico lembrando a maçãs recém cortadas, porém doses elevadas, que ultrapassam a 100 $mg.L^{-1}$**,** resulta em um aroma rançoso muito comum nos vinhos oxidados. Este aroma pode desaparecer com a adição de SO_2, visto que estes se combinam rapidamente (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

As concentrações de etanal encontradas neste trabalho foram todas inferiores a 100 $mg.L^{-1}$ e são similares às encontrados por Meneguzzo (2010) que analisou espumantes brasileiros, elaborados com diferentes épocas de maturação das uvas Chardonnay, Riesling Itálico e Pinot Noir.

TABELA 4 - VALORES METANOL E ETANAL OBTIDOS NOS VINHOS ESPUMANTES ELABORADOS COM DIFERENTES LEVEDURAS, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Metanol ($mg.L^{-1}$)				
T1	52,98±1,10 Aa	56,52±1,90 Aa	56,55±1,81 Aa	53,66±0,29 Aa
T2	48,51±1,61 Ab	53,81±0,76 ABa	54,18±1,65 Aa	52,29±1,26 Aa
T3	47,59±0,32 Ab	54,14±0,66 ABa	54,30±1,73 Aa	52,12±0,44 Aa
T4	51,07±6,57 Aa	53,47±0,51 Ba	56,96±0,51 Aa	52,15±0,30 Aa
T5	50,87±1,46 Ab	53,29±0,85 Bb	56,71±0,74 Aa	52,63±0,66 Ab
T6	50,93±2,47 Ab	52,30±0,88 Bab	55,59±0,53 Aa	53,72±0,09 Aab
Etanal ($mg.L^{-1}$)				
T1	66,69±5,42 Ba	62,73±2,81 ABa	64,35±3,74 Ba	60,74±5,41 Aa
T2	67,61±3,44 Ba	57,06±4,12 Bb	59,91±2,14 Bab	58,21±1,51 Ab
T3	60,08±4,82 Ba	61,49±5,90 ABa	61,54±2,93 Ba	57,41±3,64 Aa
T4	72,45±2,87 Ba	70,99±5,13 ABa	64,82±5,47 Ba	68,12±7,00 Aa
T5	89,17±10,49 Aa	78,35±15,24 Aa	90,52±13,28 Aa	82,89±20,18 Aa
T6	70,42±2,52 Ba	71,90±2,84 ABa	76,43±7,45 ABa	71,93±5,25 Aa

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

4.3.2 Álcoois superiores

Os resultados dos álcoois superiores estão representados na Tabela 5.

O 1-propanol apresenta um descritor aromático não desejado de mofo, porém concentrações entre 10 e 50 $mg.L^{-1}$ são normais nos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003) Todos os valores observados neste estudo estão dentro destes níveis, porém muito abaixo de seu limiar de percepção olfativa que é da ordem de 500 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005). Encontramos diferenças significativas entre os tratamentos T1 (somente *Saccharomyces cerevisae*) em relação aos T5 (inoculação de *Torulaspora delbrueckii* 72 horas antes da *Saccharomyces cerevisae)* e T6 (100% da *Torulaspora delbrueckii*), na primeira análise após a fermentação (3 meses). Para todos os outros meses subsequentes, os espumantes do tratamento 1 (*Saccharomyces cerevisae*) apresentaram diferenças significativas em relação aos outros tratamentos que incluíam a levedura *não-Saccharomyces*.

O 2-metil-1-propanol, não apresentou diferenças em relação ao tempo de armazenamento para um mesmo tratamento. Porém, em relação aos diferentes tratamentos, os níveis de 2-metil-1-propanol observados para os espumantes elaborados somente com levedura não *Saccharomyces* (T6), diferem estatisticamente de todos os outros tratamentos, apresentando concentrações cerca de duas vezes maiores que as observadas no tratamento T1 (somente leveduras *Saccharomyces cerevisae),* que apresentou os menores teores.

Para o 2-metil-1-propanol os valores usuais encontrados em vinhos variam de 50 à 150 $mg.L^{-1}$ (RIBÉREAU-GAYON et al, 2003), porém seu limiar de percepção é da ordem de 40 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005). Os tratamentos T1 (100% *Saccharomyces cerevisae*), T2, T3 e T4 (todos de inoculação conjunta), apresentam valores abaixo do limiar de percepção. O tratamento T5 (inoculação sequencial, *Torulaspora delbrueckii* seguida de *Saccharomyces cerevisae* 72 horas depois) apresenta valores ligeiramente superior ao limite de percepção olfativa, já o tratamento T6 (100% *Torulaspora delbrueckii*) apresenta valores acima deste limiar, sendo também o único a apresentar valores dentro da faixa citada por Ribéreau-Gayon (2003).

O composto 2-metil-1-butanol apresenta valores usuais que variam de 30 à 100 $mg.L^{-1}$ (RIBÉREAU-GAYON et al, 2003) e todos os tratamentos, neste estudo, apresentam resultados abaixo de 18 $mg.L^{-1}$, sendo este valor muito abaixo do limite de percepção que é de 65 $mg.L^{-1}$

(SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005). Os espumantes elaborados somente com a levedura *não-Saccharomyces* também apresentaram os maiores teores. Pelo teste *two-way* ANOVA as leveduras são responsáveis por 62,22 % da variação total, enquanto o tempo só responde por 3,81 % da variação. Em relação ao tempo de conservação, apenas encontramos diferença estatística nos espumantes elaborados com *Saccharomyces cerevisae* (T1), sendo que somente a análise dos 12 meses difere das demais. Quando comparamos os tratamentos, os espumantes de *não-Saccharomyces* (T6) diferem dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 nos tempos de 3, 6 e 12 meses, sendo que para os resultados de 12 meses os tratamentos T4 e T5 também apresentam diferenças. Aos 9 meses encontramos diferença entreos espumantes elaborados com 100% de leveduras *não-Saccharomyces* (T6) e os espumantes de *Saccharomyces* (T1).

Em relação ao 3-metil-1-butanol, todos os tratamentos apresentam valores inferiores aos relatados por Ribéreau-Gayon (et al, 2003), que cita valores usuais deste composto na ordem de 80 à 300 $mg.L^{-1}$. No entanto todos os valores obtidos estão acima do limiar de percepção que é de 30 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005).

Os espumantes elaborados com a levedura *não-Saccharomyces* apresentaram teores mais elevados em relação aos outros tratamentos. Não houve diferenças entre os tempos de conservação das amostras, com exceção de uma diminuição na concentração de 3-metil-1-butanol após 12 meses de conservação nos espumantes elaborados com 100% de *Saccharomyces cerevisae* (T1).

Avaliando a soma dos álcoois superiores, apresentados na Tabela 6, não se observou valores médios superiores a 196 $mg.L^{-1}$, estando, portanto bem abaixo dos 300 $mg.L^{-1}$, valor limite para um vinho de qualidade, segundo Ribéreau-Gayon *et al*, (2003). Os tratamentos T1, T2, T3 e T4, onde a levedura *Saccharomyces cerevisae* esteve presente desde o início da fermentação, apresentam valores médios na ordem de 130 $mg.L^{-1}$ ao passo que os tratamentos T5, onde a inoculação inicial foi de *Torulaspora delbrueckii* e T6, onde essa levedura atuou sozinha, apresentam valores médios de 149 $mg.L^{-1}$ e 191 $mg.L^{-1}$, respectivamente, indicando que os teores de álcoois superiores apresentaram maiores concentrações nos vinhos espumantes elaborados com a levedura *não-Saccharomyces.*

Embora as leveduras *não-Saccharomyces* sejam conhecidas por produzirem menores teores de álcoois superiores, como n-propanol e isobutanol, em relação as *Saccharomyces*

(ROMANO *et al.*, 1992; LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000), em nosso estudo observamos o oposto, os níveis de todos os álcoois superiores ficaram mais elevados para os espumantes elaborados com maiores concentrações da levedura *Torulaspora delbrueckii*.

TABELA 5 - RESULTADOS DOS ÁLCOOIS SUPERIORES DOS VINHOS ESPUMANTES ELABORADOS COM DIFERENTES LEVEDURAS, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	**6 meses**	**9 meses**	**12 meses**
1-Propanol (mg.L^{-1})				
T1	23,66±0,42 Ba	24,74±0,06 Ca	24,06±0,57 Ca	24,13±0,42 Ca
T2	27,00±1,93 ABa	29,15±1,76 ABa	28,71±0,34 Ba	28,71±1,93 ABCa
T3	28,98±3,11 ABa	29,09±1,13 ABa	29,39±1,27 Ba	30,27±3,11 ABa
T4	28,35±0,72ABa	28,54±0,74 Ba	28,79±1,99 Ba	27,64±0,72 Bca
T5	30,17±1,66Aa	31,78±2,00 ABa	33,84±2,93 Aa	31,36±1,66 ABa
T6	32,18±0,88Aa	32,06±0,79 Aa	33,82±0,77 Aa	33,03±0,88 Aa
2-Metil-1-Propanol (mg.L^{-1})				
T1	29,93±0,48 Ba	32,59±0,76 Ca	31,48±0,40 Ca	30,72±0,48 Ca
T2	33,65±3,76 Ba	35,19±2,47 Ca	33,95±2,74 Ca	34,71±3,76 BCa
T3	37,66±3,76 Ba	37,27±2,36 BCa	37,16±3,16 BCa	36,37±3,76 BCa
T4	36,37±1,71 Ba	36,90±0,40 BCa	38,64±1,62 BCa	34,28±1,71 Bca
T5	40,88±4,22 Ba	41,67±3,08 Ba	45,16±5,56 Ba	41,86±4,22 Ba
T6	70,02±3,53 Aa	67,26±2,94 Aa	69,68±2,82 Aa	67,30±3,53 Aa
2-Metil-1-Butanol (mg.L^{-1})				
T1	13,76±0,43 Bb	14,88±0,57 Ba	14,77±0,18 Bab	15,19±0,43 Bca
T2	13,82±0,68 Ba	15,21±0,79 Ba	15,00±0,28 ABa	14,96±0,68 Bca
T3	14,64±0,98 Ba	15,15±0,76 Ba	15,07±1,14 ABa	14,81±0,98 Bca
T4	14,29±0,27 Ba	14,53±0,31 Ba	15,24±00,62 ABa	14,23±0,27 Ca
T5	15,40±0,51 ABa	16,25±0,88 ABa	16,45±1,07 ABa	16,18±0,51 ABa
T6	17,89±0,54 Aa	17,23±0,68 Aa	16,89±0,12 Aa	16,99±0,54 Aa
3-Metil-1-Butanol (mg.L^{-1})				
T1	57,66±0,46 Bab	59,99±0,21 ABa	58,63±0,81 CBab	57,27±0,46 Bb
T2	53,08±5,74 Ba	48,58±9,47 Ba	51,81±1,58 Ca	52,04±5,74 Ba
T3	54,08±6,49 Ba	53,24±5,23 Ba	53,04±5,74 CBa	52,89±6,49 Ba
T4	50,46±1,38 Ba	50,09±1,12 Ba	51,35±0,99 Ca	47,97±1,38 Ba
T5	56,75±5,31 Ba	60,02±6,03 ABa	62,43±6,20 Ba	59,11±5,31 Ba
T6	74,95±2,45 Aa	70,91±3,11 Aa	73,33±1,05 Aa	71,59±2,45 Aa

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

TABELA 6 - SOMATÓRIO DOS ÁLCOOIS SUPERIORES DOS VINHOS ESPUMANTES ELABORADOS COM DIFERRENTES LEVEDURAS, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

Soma dos álcoois superiores ($mg.L^{-1}$)	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
T1	125,01 Ba	132,20 Ba	128,94 Ca	127,31 Bca
T2	127,55 Ba	128,12 Ba	129,46 Ca	130,42 Bca
T3	135,36 Ba	134,75 Ba	134,66 Ca	134,34 Bca
T4	129,47 Ba	130,06 Ba	134,03 Ca	124,11 Ca
T5	143,20 Ba	149,73 Ba	157,89 Ba	148,51 Ba
T6	195,03 Aa	187,45 Aa	193,71 Aa	188,92 Aa

Somatório das médias seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

4.3.3 Tirosol e outros álcoois com seis carbonos: hexanol, trans-3-hexan-1-ol e 2-fenil etanol

Todos os valores de tirosol obtidos neste trabalho (Tabela 7), estão abaixo de 11 $mg.L^{-1}$, sendo semelhantes ao encontrado por Stefenon et al., (2014) em espumantes brasileiros da variedade Chardonnay e em *Champagnes* por Vauzour et al., (2010).

Os espumantes elaborados com 100% de *Saccharomyces cerevisae* (T1) apresentaram o menor nível de tirosol na análise de 3 meses, apresentando diferença estatística com os demais tratamentos. Os tratamentos T2 e T3 não diferem entre si, porém tem valores superiores ao T1 e inferiores aos espumantes dos tratamentos T4, T5 e T6, que tiveram a maior influência da levedura *Torulaspora delbrueckii*, aos 3 meses de conservação dos espumantes.

A avaliação individual de cada tratamento em função do tempo, mostrou que houveram variações significativas na evolução deste componente que aumentou nos vinhos elaborados com maior influência de *Saccharomyces cerevisae* (T1, T2 e T3) e diminuiu nos vinhos com maior influência de *Torulaspora delbrueckii* (T4 e T5), exceto para os espumantes do tratamento T6.

O tirosol ou 2-4-hidroxifenol-etil álcool é formado a partir do aminoácido tirosina pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, o que o caracteriza como sendo um composto fenólico produzido a partir de precursores não fenólicos. Apresenta, em vinhos brancos, valores típicos na ordem de 6 à 25 $mg.L^{-1}$ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), podendo estar associado

ao amargor quando em volumes acima de 30 $mg.L^{-1}$ (CLARKE & BAKKER, 2004). Esse composto confere aroma de mel em alguns vinhos (COVAS et al., 2003).

Os valores de hexanol não apresentaram variação significativa entre os tratamentos, com excessão do T5 e T6 na análise dos 9 meses. As leveduras respondem por apenas 7,07 % da variação, sendo este número insignificante. O tempo por sua vez responde por 57,10 % da variação total, sendo muito significativa. Com exceção do T2 que não apresentou diferenças para o tempo de conservação, nos outros tratamentos houve uma redução dos níveis de hexanol após 3 meses de conservação do vinho, indicando que este composto sofreu oxidações, que ocorrem normalmente durante a conservação dos vinhos.

O trans-3-Hexan-1-ol apresentou o mesmo comportamento, não apresentando diferenças entre os tratamentos, exceto entre o T5 e T6 aos 9 meses. Em relação ao tempo de conservação, observamos que para os tratamentos T1 e T3 houve também uma redução nos níveis de trans-3-Hexan-1-ol a partir dos 3 meses. Entretanto, sua presença nos tratamentos T4, T5 e T6 somente foi detectada partir dos 6 meses.

Os álcoois hexanol e o tran-3-hexan-1-ol, possuem aromas desagradáveis de "verde" e herbáceo. Sua formação depende não somente da quantidade de lipídeos insaturados, mas também de enzimas envolvidas no processo (VALENTIN, 1993). Os aldeídos de 6 carbonos, que são muito odorantes no mosto, são praticamente todos reduzidos à hexanol durante a fermentação pela ação das leveduras, e raramente ultrapassam o limite de percepção sensorial (ETIÉVANT, 1991).

O hexanol tem sua origem na uva e gera um aroma herbáceo, lembrando a grama cortada, comum em vinhos elaborados com uvas com baixo grau de maturação. Os valores usuais de hexanol em vinhos variam de 0,3 à 12 $mg.L^{-1}$ e seu limiar de percepção é da ordem de 4 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005).

Em vinhos elaborados com uvas que sofreram prensagem direta (cachos inteiros), a concentração destes componentes é menor devido ao pouco tempo de contato do mosto com as partes sólidas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Como os vinhos espumantes deste trabalhoforam elaborados com prensagem direta do mosto, as concentrações destes componentes são baixas, tanto para o hexanol (abaixo de 1,4 $mg.L^{-1}$) como para o tran-3-hexan-1-ol (menor que 0,2 $mg.L^{-1}$), conforme podemos observar na Tabela 7.

Dentre estes álcoois, apenas o 2-feniletanol (Tabela 7) agrega características interessantes aos vinhos, como aromas florais e de rosas, sendo produzido a partir do aminoácido fenilalanina em concentrações que variam entre 10 e 180 $mg.L^{-1}$ em vinhos finos (RIBÉREAU-GAYON et al, 2003; LILLY *et al.*, 2006). Seu limite de percepção em vinho é de 10 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005).

TABELA 7 - RESULTADO DOS ÁLCOOIS COM SEIS ÁTOMOS DE CARBONO DOS VINHOS OBTIDOS COM DIFERENTES LEVEDURAS, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	**6 meses**	**9 meses**	**12 meses**
Tirosol ($mg.L^{-1}$)				
T1	3,41±0,016 Dc	7,28±0,20 Ca	6,28±0,13 DEb	6,01±0,08 Db
T2	4,33±0,46 Cc	4,92±0,06 Dc	7,27±0,12 Cb	8,23±0,07 Ba
T3	4,67±0,23 Cd	7,81±0,03 Ca	5,77±0,22 Ec	7,12±0,03 Cb
T4	9,54±0,06 ABa	10,18±0,53 Aa	6,74±0,36 CDb	5,87±0,16 Dc
T5	10,20±0,17 Aa	9,69±0,03 Ab	8,23±0,09 Bc	6,11±0,02 Dd
T6	9,43±0,26 Bab	8,82±0,25 Ba	10,13±0,58 Ab	9,41±0,27 Aab
Hexanol ($mg.L^{-1}$)				
T1	1,34±0,09 Aa	1,09±0,07 Ab	1,11±0,03 ABb	1,07±0,06 Ab
T2	1,31±0,15 Aa	1,12±0,09 Aa	1,09±0,05 ABa	1,11±0,05 Aa
T3	1,31±0,13 Aa	1,08± 0,06 Ab	1,11±0,05 Abab	1,10±0,05 Ab
T4	1,26±0,01 Aa	1,05±0,04 Ab	1,12±0,07 ABb	1,09±0,04 Ab
T5	1,29±0,08 Aa	1,06±0,10 Aab	1,04±0,11 Ab	1,16±0,06 Aab
T6	1,32±0,02 Aa	1,21±0,02 Ab	1,22±0,03 Bb	1,13±0,04 Ac
Trans-3-hexan-1-ol ($mg.L^{-1}$)				
T1	0,18±0,04 Aa	0,11±0,01 Ab	0,13±0,01 ABab	0,14±0,01 ABab
T2	0,13±0,03 Aa	0,09±0,01 Aa	0,11±0,01 Aa	0,11±0,03 ABa
T3	0,16±0,05 Aa	0,09±0,01 Ab	0,11±0,01 ABab	0,09±0,01 Bb
T4	<LQ	0,09±0,01 Aa	0,13±0,02 ABa	0,13±0,03 ABa
T5	<LQ	0,12±0,03 Aa	0,15±0,02 Aa	0,18±0,06 Aa
T6	<LQ	0,12±0,01 Aa	0,11±0,02 Ba	0,11±0,02 ABa
2-Fenil etanol ($mg.L^{-1}$)				
T1	14,30±1,28 Ba	7,87±0,61 Bb	2,07±0,05 Ac	2,09±0,14 Ac
T2	13,47±0,80 Ba	8,66±0,90 Bb	1,91±0,08 ABc	2,13±0,24 Ac
T3	15,33±3,25 Ba	9,10±1,02 Bb	1,88±0,17 ABc	1,99±0,22 Ac
T4	17,95±1,00 Ba	10,67±0,74 Bb	1,71±0,07 Bc	2,08±0,18 Ac
T5	46,76±24,01 Aa	33,24±18,64 Aa	1,38±0,04 Cb	2,18±0,19 Ab
T6	16,69±0,64 Ba	12,05±0,07 Bb	1,75±0,10 Bc	1,76±0,43 Ac

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).* <LQ = menor do que o limite de quantificação.

Aos 3 meses todos os tratamentos apresentaram valores acima do limiar de percepção, mas apenas o tratamento T5, onde a levedura *Torulaspora delbrueckii* foi inoculada 72 horas antes da *Saccharomyces cerevisae,* apresentou resultados acima de 45 $mg.L^{-1}$. Os demais tratamentos não se diferenciaram entre si neste período, indicando que a inoculação sequencial favoreceu a formação deste composto aromático. Após 6 meses de conservação, sua concentração diminuiu consideravelmente para todos os tratamentos, e apenas os tratamentos T4, T5 e T6, onde a *Torulaspora delbrueckii* domina, permanecem acima do limiar de detecção olfativa. Após 9 meses de conservação do espumante, todos os tratamentos apresentam valores muito inferiores ao do limiar de percepção, indicando a sua oxidação, atingindo uma estabilidade em torno de 2 $mg.L^{-1}$.

4.3.4 Ésteres

4.3.4.1 Ésteres do ácido acético (acetatos)

Os resultados dos ésteres de ácido acético e do dietil succinato são apresentados na Tabela 8.

O acetato de hexila apresentou concentrações muito abaixo do limiar de percepção que é de 0,7 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005), não apresentando diferenças entre os tratamentos e, em geral, teve seus níveis reduzidos com o tempo de conservação.

Para o acetato de 2-fenil etila, somente os tratamentos T5, no qual a fermentação ocorreu inicialmente com a levedura *Torulaspora delbrueckii* e o T6, onde a fermentação ocorreu totalmente com esta levedura, se diferenciaram entre si. Em relação ao tempo de conservação, conforme esperado, este éster também diminuiu, evidenciando a sua oxidação. Somente o T5 (co-inuculação), aos 3 meses, apresenta valores acima do limiar de percepção (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005).

O acetato de isoamila também não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos nas análises aos 3 e 6 meses, exceto por T4 aos 6 meses, sendo que em relação ao tempo, todos os tratamentos apresentaram uma tendência a diminuir sua concentração, ainda

assim todos se mantiveram acima do limiar de percepção olfativa de 0,03 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005).

Quanto ao acetato de etila, as concentrações são muito superiores aos outros acetatos (Tabela8), uma vez que este é o principal éster do vinho. Ele é formado durante a fermentação alcoólica e também ao longo do tempo pela esterificação entre o ácido acético e o etanol. Sua concentração usual varia de 22,5 à 63,5 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005). Quando comparamos os resultados dos tratamentos T1, T2, T4 e T5 não apresentaram diferenças significativas entre si aos 3 meses de conservação. Observamos que todos os tratamentos se apresentam acima do limiar de percepção olfativa de 7,5 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005). Aos 3 meses, observamos uma concentração mais elevada nos espumantes do tratamento T6 (somente *Torulaspora delbrueckii*) seguida do tratamento T3 (inoculação conjunta 20:1 de *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisae*), entretanto os níveis alcançados estão muito abaixo do limite de 90 $mg.L^{-1}$ citado por Ribéreau-Gayon et al. (2003) como limite de qualidade aos vinhos. Os níveis encontrados estão de acordo com Pacheco et al. (2012), que descrevem a levedura *Torulaspora delbrueckii* como produtora de baixas concentrações de acetato de etila. Em relação ao tempo de conservação, somente os espumantes do tratamento T1 apresentaram um aumento significativo aos 6 meses, mantendo após este tempo, níveis estáveis assim como os outros espumantes.

O dietil succinato (Tabela 8) é um éster do ácido succínico que apresenta aromas frutados característicos de maçã, damasco, pêssego, floral, pera e melão (PEINADO et al., 2004), porém segundo Zamora (2009), em concentrações normais, o dietil succinatonão apresenta impacto no aroma dos vinhos. Diferentes autores têm relacionado a qualidade dos espumantes à concentração de ésteres como acetato de 2-fenil etila e dietil succinato (LOYAUX et al., 1981; POZO-BAYÓN et al., 2003).

TABELA 8 - ÉSTERES DE ÁCIDO ACÉTICO NOS VINHOS ELABORADOS COM AS DIFERENTES LEVEDURAS, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Acetato de Hexila (mg.L^{-1})				
T1	0,08±0,02 Aab	0,10±0,01 Aa	0,06±0,002 Ab	0,06±0,01 Ab
T2	0,08±0,1 Aab	0,09±0,01 Aa	0,06±0,01 Ab	0,06±0,004 Ab
T3	0,08±0,01 Aab	0,08±0,01 Aa	0,06±0,001 Ac	0,06±0,004 Abc
T4	0,08±0,01 Aab	0,08±0,01 Aa	0,06±0,01 Abc	0,06±0,003 Ac
T5	0,10±0,01 Aa	0,09±0,01 Aa	0,07±0,01 Ab	0,06±0,002 Ab
T6	0,10±0,01 Aa	0,08±0,01 Ab	0,07±0,001 Abc	0,06±0,000 Ac
Acetato de Feniletila (mg.L^{-1})				
T1	0,15±0,01 ABa	0,07±0,003 ABb	0,07±0,002 Ab	0,04±0,01 Ac
T2	0,10±0,2 ABa	0,04±0,01 ABb	0,05±0,01 Ab	0,03±0,003Bb
T3	0,09±0,02 ABa	0,05±0,003 ABb	0,05±0,01 Ab	0,04±0,01Bb
T4	0,09±0,01 ABa	0,05±0,003 ABb	0,05±0,002 Ab	0,03±0,002Bc
T5	0,36±0,24 Aa	0,21±0,16 Aa	0,18±0,13 Aa	0,14±0,08Aa
T6	0,08±0,01 Ba	0,04±0,01 Bb	0,04±0,01 Ab	0,02±0,003Bc
Acetato de Isoamila (mg.L^{-1})				
T1	0,27±0,23 Aa	0,35±0,04 Aa	0,20±0,04 Aa	0,26±0,06 Aa
T2	0,34±0,28 Aa	0,16±0,04 ABa	0,30±0,24 Aa	0,14±0,04 ABa
T3	0,20±0,05 Aa	0,15±0,07 ABa	0,10±0,02 Aa	0,13±0,06 Ba
T4	0,16±0,01 Aa	0,06±0,06 Bb	0,13±0,04 Aab	0,05±0,04 Bb
T5	0,41±0,15 Aa	0,30±0,13 Aa	0,23±0,14 Aa	0,12±0,05 Ba
T6	0,37±0,11 Aa	0,15±0,07 ABb	0,12±0,02 Ab	0,06±0,01 Bb
Acetato de etila (mg.L^{-1})				
T1	19,99±3,75 Cb	37,51±2,38 Aa	39,43±8,08 Aa	47,13±5,05 Aa
T2	28,33±2,46 BCa	29,26±1,72 ABa	23,80±18,22 Aa	44,34±11,98 Aa
T3	34,67±3,35 ABab	29,58±4,44 ABab	29,38±1,89 Ab	45,44±10,64 Aa
T4	21,89±3,85 Ca	24,73±1,87 Ba	40,60±11,95 Aa	30,12±11,76 Aa
T5	28,10±5,71 BCa	30,03±0,53 ABa	38,73±12,97 Aa	32,23±5,59 Aa
T6	39,27±1,29 Aa	27,29±4,87 Ba	30,81±11,16 Aa	32,60±4,05 Aa
Dietil Succinato (mg.L^{-1})				
T1	0,84±0,05 Bb	1,72±0,79 ABb	2,64±1,14 Ab	4,89±0,77 Aa
T2	1,20±0,03 Bc	1,68±0,46 Bbc	2,34±0,03 Aab	3,17±0,22 Ba
T3	1,19±0,31 ABbc	1,80±0,17 ABbc	2,33±0,18 Ab	3,21±0,37 Ba
T4	1,44±0,13 ABd	1,97±0,19 Abc	2,54±0,13 Ab	3,60±0,21 Ba
T5	1,75±0,05 Ac	2,81±0,21 Ab	3,22±0,35 Ab	5,22±0,58 Aa
T6	1,57±0,06 ABd	2,28±0,07 ABc	2,80±0,12 Ab	3,60±0,13 Ba

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

O dietil succinato não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, exceto para o T5 (inoculação sequencial de *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisae)*, que se diferenciou dos tratamentos T1, T2 e T3, onde as concentrações da levedura não

Saccharomyces eram menores ou ausente (T1). Em geral a concentração do dietil succinato aumentou durante o tempo de conservação para todos os tratamentos, indicando a liberação deste composto pela autólise das leveduras ou uma possível esterificação química, que se tornou evidente a partir dos 6 meses. Aos 12 meses de conservação todos os tratamentos apresentaram maiores concentrações. Sua concentração está relacionada com a fermentação maloláctica (HERJAVEC et al., 2001; KNOLL et al., 2012), que pode ter ocorrido espontaneamente nos espumantes deste trabalho. Segundo Knoll et al. (2012) a concentração de dietil succinato aumenta durante a fermentação maloláctica e varia conforme a estirpe da bactéria.

4.3.4.2 Ésteres dos ácidos graxos

Os resultados dos ésteres dos ácidos graxos estão representados na Tabela 9.

Vários compostos voláteis são formados durante a autólise nos espumantes, sendo que os ésteres são os mais importantes porque alguns deles tem baixos níveis de percepção (MOLNAR et al. 1981; HIDALGO et al. 2004; TORREA et al., 2011). Apesar de ser aceito que o contato com leveduras durante o envelhecimento de vinhos altera significativamente o perfil dos espumantes (DELAPRESA-OWENS et al. 1998; FRANCIOLI et al. 2003), o seu impacto nas propriedades sensoriais continua pouco estudado.

O butirato de etila, que apresenta aromas frutados de morango, abacaxi, maçã e banana, se apresentou em todos os casos acima do limiar de percepção, que é de 0,02 mg L^{-1} (GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007). Porém não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e entre os tempos de conservação, com exceção de T1 aos 6 meses que é bem maior que T3 e de T1 aos 12 meses que novamente é bem maior que os tratamentos T4, T5 e T6, onde a *Torulaspora delbrueckii* domina.

O hexanoato de etila, que possui aromas de maçã, banana, abacaxi e vinoso, se apresentou em todos os casos acima do limiar de percepção, que é de 0,014 mg L^{-1} (PEINADO et al., 2004), exceto para o T4 que se mostrou abaixo dos limiares de percepção nas análises aos 3, 6 e 12 meses. Em relação ao tempo de conservação houve um aumento nas concentrações para os tratamentos T1 (*Saccharomyces cerevisae* 100%), T2 (T2 inoculação conjunta (2:1 *Saccharomyces cerevisae e Torulaspora delbrueckii*) e T3 (inoculação conjunta 20:1 de *Saccharomyces cerevisae e Torulaspora delbrueckii*).

TABELA 9 - RESULTADOS OBTIDOS PARA OS ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Butirato de etila (mg.L^{-1})				
T1	0,08±0,04 Aa	0,06±0,02 Aa	0,04±0,02 Aa	0,11±0,02 Aa
T2	0,04±0,02 Ab	0,03±0,01 ABb	0,06±0,002 Aab	0,09±0,02 ABa
T3	0,05±0,01 Aa	0,02±0,01 Bb	0,02±0,005 Ab	0,07±0,02 ABa
T4	0,05±0,01 Aa	0,03±0,02 ABa	0,04±0,01 Aa	0,05±0,02 Ba
T5	0,07±0,01 Aa	0,02±0,02 ABb	0,04±0,03 Aab	0,05±0,01 Bab
T6	0,08±0,01 Aa	0,04±0,02 ABb	0,03±0,01 Ab	0,06±0,01 Bab
Hexanoato de etila (mg.L^{-1})				
T1	0,19±0,13 ABb	0,34±0,03 Aab	0,20±0,05 Aa	0,47±0,09 Aa
T2	0,16±0,06 ABb	0,20±0,03 ABab	0,26±0,03 Aab	0,29±0,06 Aab
T3	0,16±0,05 ABb	0,17±0,02 Bb	0,15±0,02 Ab	0,26±0,04 Ba
T4	0,13±0,01 Ba	0,10±0,10 Ba	0,21±0,02 Aa	0,13±0,12 Ba
T5	0,27±0,06 ABa	0,25±0,25 ABa	0,26±0,02 Aa	0,23±0,04 Ba
T6	0,38±0,07 Aa	0,23±0,09 ABab	0,08±0,08 Ab	0,23±0,04 Bab
Octanoato de etila (mg.L^{-1})				
T1	0,29±0,05 Cc	0,72±0,01 Aab	0,52±0,09 Ab	0,89±0,11 Aa
T2	0,54±0,20 BCa	0,58±0,08 Aa	0,41±0,34 Aa	0,76±0,14 ABa
T3	0,55±0,11 BCa	0,49±0,04 Aa	0,62±0,19 Aa	0,65±0,13 ABa
T4	0,50±0,09 BCa	0,44±0,03 Aa	0,54±0,14 Aa	0,42±0,20 Ba
T5	1,03±0,18 Aa	0,82±0,30 Aa	0,93±0,27 Aa	0,86±0,05 Aa
T6	0,85±0,16 ABa	0,56±0,17 Aa	0,50±0,19 Aa	0,55±0,09 ABa
Decanoato de etila (mg.L^{-1})				
T1	0,93±0,09 ABa	0,64±0,18 Aa	0,77±0,51Aa	0,49±0,01 Aa
T2	1,49±0,14 ABa	0,55±0,23 Ab	1,29±0,14 Aa	0,54±0,06 Ab
T3	1,11±0,41 ABa	0,38±0,12 Ab	1,14±0,77 Aa	0,36±0,06 Aab
T4	1,76±0,98 ABa	0,46±0,18 Aab	0,33±0,06 Ab	0,36±0,13 Ab
T5	2,06±0,47 Aa	0,60±0,18 Ab	0,55±0,19 Ab	1,13±0,93 Aab
T6	0,59±0,35 Ba	0,25±0,04 Aa	0,34±0,03 Aa	0,25±0,01 Aa
Dodecanoato de etila (mg.L^{-1})				
T1	0,07±0,005 Ab	0,18±0,02 Aa	0,13±0,04 BCa	0,07±0,00 Ab
T2	0,13±0,10 Aa	0,20±0,04 Aa	0,26±0,03 Aa	0,13±0,02 Aa
T3	0,17±0,10 Aa	0,17±0,02 Aa	0,19±0,07 ABa	0,11±0,02 Aa
T4	0,24±0,21 Aa	0,18±0,03 Aa	0,10±0,01 BCa	0,11±0,03 Aa
T5	0,07±0,00 Aa	0,19±0,02 Aa	0,12±0,02 BCa	0,18±0,10 Aa
T6	0,07±0,00 Ac	0,14±0,00 Aa	0,09±0,00 Cb	0,08±0,01 Ac

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

O octanoato de etila, que possui aroma floral e frutado, lembrando a pêra e a banana (PEINADO et al., 2004) se apresentou bem acima do limiar de percepção, que é de 0,01 mg L^{-1} (SANTOS et al., 2004) em todos os tratamentos, com destaque para T5 que chega a superar os 1 mg.L^{-1}. Os espumantes do T5, na primeira análise, se diferenciaram dos espumantes onde havia *Saccharomyces cerevisae* desde o início da fermentação, porém ficaram semelhantes aos do tratemento T6, onde houve somente a levedura *não-Saccharomyces.* Em relação ao tempo de conservação, de forma geral, não houve diferenças significativas, exceto por T1 que apresenta um aumento nas concentrações.

O decanoato de etila, que apresenta aromas de uva, óleo, pêra e vinoso (PEINADO et al., 2004), possui limiar de detecção na ordem de 0,2 mg.L^{-1}. Todas as análises do experimento se mostram bem acima deste limiar. Os tratamentos com inoculação dos dois tipos de leveduras (T2 à T5), apresentaram valoresentre 1 e 2 mg.L^{-1}. T5 e T6 apresentaram diferenças muito significativas aos 3 meses, sendo T5 quase 4 vezes maior que T6. Em geral, se observou uma redução nas concentrações ao longo do tempo, indicando a oxidação deste componente.

O dodecanoato de etila, cujas aromas são verde, floral e frutado (PEINADO et al., 2004), apresentou variações nas concentrações ao longo do tempo apenas nos tratamentos T1 e T6. Em relação aos tratamentos, a única variação notada foi aos 9 meses, quando o tratamento T2 se mostra semelhante apenas à T3, ao passo que T6 se mostram parecido somente com T1, T4 e T5.

4.3.5 Ácidos voláteis

Os ácidos voláteis determinados neste trabalho (Tabela 10), compreendem os ácidos butírico, isobutírico e isovalérico, que ao contrário dos ésteres, apresentam descritores aromáticos indesejados tais como: manteiga, rançoso e queijo estragado. Estes ácidos são formados em pequenas quantidades pelas leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica. Quando estão presentes em maiores concentrações representam um indício de que ocorreram contaminações bacterianas (RIBÉREAU- GAYON et al., 2006).

No presente estudo, os níveis de ácido butírico apresentaram concentrações abaixo de 1,40 mg.L^{-1} em todos os tratamentos. Porém o tratamento T1, onde a fermentação ocorreu somente com leveduras *Saccharomyces*, apresentou diferença significativa tendo uma

concentração mais elevada em relação aos demais tratamentos. Em relação ao tempo, não houve diferenças significativas, indicando a estabilidade deste composto.

O ácido isobutírico não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos na primeira análise de 3 meses e também não houve diferenças significativas em relação ao tempo de conservação, apesar de todos os tratamentos apresentarem uma queda de concentração na segunda análise. O tratamento T1 é o que apresenta os maiores valores observados aos 3, 9 e 12 meses.

TABELA 10 - RESULTADOS DOS ÁCIDOS VOLÁTEIS DOS VINHOSESPUMANTES ELABORADOS COM DIFERENTES LEVEDURAS, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Ácido Butírico (mg.L^{-1})				
T1	1,35±0,11 Aa	0,99±0,10 Ab	1,28±0,12 Aa	1,15±0,05 Aab
T2	0,89±0,17 Ba	0,70±0,06 Ba	0,95±0,12 Ba	0,81±0,02 Ba
T3	0,87±0,11 Ba	0,62±0,10 Bb	0,91±0,10 BCa	0,84±0,05 Bab
T4	0,88±0,03 Ba	0,50±0,04 Bc	0,79±0,04 BCab	0,74±0,06 Bb
T5	0,75±0,25 Ba	0,49±0,12 Ba	0,48±0,14 Da	0,68±0,13 Ba
T6	0,93±0,01 Ba	0,70±0,07 Bb	0,66±0,06 CDb	0,77±0,08 Bab
Ácido Isobutírico (mg.L^{-1})				
T1	2,23±0,33 Aab	1,42±0,19 ABb	2,45±0,40 Aab	2,91±0,68 Aa
T2	1,22±1,00 Aa	1,21±0,21 Ba	1,95±0,34 Aba	1,96±0,14 ABa
T3	1,48±0,29 Aa	1,13±0,24 Ba	1,84±0,44 Aba	1,94±0,31 ABa
T4	1,42±0,07 Aa	1,05±0,12 Bb	1,39±0,09 Bab	1,14±0,21 Bab
T5	1,80±0,18 Aa	1,45±0,23 ABa	1,35±0,29 Ba	1,76±0,36 Ba
T6	1,97±0,17 Aa	1,80±0,20 Aa	2,08±0,35ABa	1,62±0,06 Ba
Ácido Isovalérico (mg.L^{-1})				
T1	0,64±0,03 Ba	0,59±0,04 Aba	0,61±0,03 ABa	0,56±0,03 ABa
T2	0,64±0,07 Ba	0,54±0,04 Ba	0,58±0,06 ABa	0,52±0,02 Ba
T3	0,65±0,05 Ba	0,52±0,05 Ba	0,60±0,06 ABa	0,54±0,02 Ba
T4	0,67±0,03 ABa	0,52±0,03 Bb	0,56±0,03 Bb	0,53±0,04 Bb
T5	0,79±0,05 Aa	0,61±0,05 ABb	0,57±0,05 ABb	0,64±0,05 Ab
T6	0,75±0,04 ABa	0,66±0,04 Aab	0,69±0,05 Aa	0,58±0,01 ABb

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

O ácido isovalérico apresentou as menores concentrações em relação aos três ácidos estudados. Na análise de 3 meses, houve uma maior concentração no tratamento T5, onde

inicialmente atuou a levedura *não-Saccharomyces*, em relação aos tratamentos T1, T2 e T3, onde houve a presença de *Saccharomyces* desde o início da fermentação. Esta diferença não foi observada nos tratamentos T4, inoculação conjunta dos dois tipos de leveduras, e T6, onde houve somente a *Torulaspora delbrueckii*. Em relação ao tempo de conservação, este composto também não apresentou diferenças significativas, para T1, T2 e T3, porém T4 (200:1), T5 (sequencial) e T6 (100% *Torulaspora delbrueckii*), sua concentração tende a diminuir ao longo do tempo.

4.3.6 Ácidos graxos

Os ácidos da série graxos presentes nos vinhos são os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e dodecanóico (Tabela 11).

O ácido hexanóico (Tabela 11), cujos descritores aromáticos compreendem: azedo, gorduroso e queijo (GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007), apresentou maior concentração nos espumantes do tratamento T1, elaborados somente com *Saccharomyces cerevisae*, que se diferenciaram de todos os outros tratamentos em todos os tempos analisados. Porém, sua concentração ainda se mostra inferior ao limiar de percepção que é de 8 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005). Em geral, após 3 meses de conservação houve uma redução nos teores, indicando uma possível reação de redução ou recombinação no meio.

Para o ácido octanóico, que apresenta descritores de queijo e oleoso (PEINADO et al., 2004; GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007), é novamente o tratamento T1 (100% *Saccharomyces cerevisae*) que apresenta os maiores valores, seguido do tratamento T5, onde as leveduras foram inoculas em sequência iniciando pela *Torulaspora delbrueckii*. Ainda assim, todos os valores estão abaixo do limiar de percepção que é de 8,8 $mg.L^{-1}$ (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005). Os tratamentos T2, T3 e T5 não apresentam variações significativas ao longo do tempo, já para os tratamentos T1, T4 e T6, houve uma redução nas concentrações a partir de 6 meses de conservação.

TABELA 11 - RESULTADOS DOS OS ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS NOS VINHOS ESPUMANTES NOS DIFERENTES TRATAMENTOS E TEMPOS DE CONSERVAÇÃO, DURANTE UM ANO DE AUTÓLISE.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Ácido Hexanóico (mg.L^{-1})				
T1	5,44±0,08 Aa	4,27±0,25 Ab	4,47±0,14 Ab	4,40±0,11 Ab
T2	3,20±0,01 BCa	2,74±0,28 Ba	3,19±0,43 Ba	2,85±0,16 Ba
T3	3,07±0,38 BCa	2,48±0,11 Ba	2,83±0,27 BCa	2,59±0,07 BCa
T4	2,88±0,02 Ca	2,28±0,09 Bb	2,45±0,15 Cb	2,37±0,08 Cb
T5	3,46±0,20 Ba	2,50±0,28 Bb	2,49±0,24 Cb	2,78±0,33 BCab
T6	2,81±0,18 Cab	2,73±0,06 Bab	2,92±0,09 BCa	2,53±0,11 BCb
Ácido Octanóico (mg.L^{-1})				
T1	7,66±0,42 Aa	6,10±0,30 Ab	6,04±0,32 Ab	6,46±0,25 Ab
T2	5,07±0,51 Ba	4,65±0,57 ABa	4,70±0,65 ABa	4,79±0,64 ABa
T3	4,70±0,48 Ba	4,21±0,39 ABa	4,26±0,49 ABa	4,34±0,49 Ba
T4	4,13±0,06 Ba	3,65±0,04 Bb	3,71±0,04 Bb	3,76±0,07 Bb
T5	5,97±1,43 ABa	5,54±1,53 ABa	5,59±1,45 ABa	5,70±1,51 ABa
T6	4,83±0,04 Ba	4,33±0,10 ABb	4,35±0,15 ABb	4,46±0,16 Bb
Ácido Decanóico (mg.L^{-1})				
T1	3,18±0,35 Aa	2,47±0,19 Ab	2,51±0,09 Ab	2,59±0,07 Aab
T2	1,87±0,18 BCa	1,67±0,14 ABCa	1,80±0,15 ABCa	1,62±0,08 Ba
T3	1,85±0,22 BCa	1,52±0,06 BCa	1,66±0,12 BCa	1,54±0,04 Ba
T4	1,82±0,21 BCa	1,38±0,03 BCb	1,43±0,07 Cb	1,51±0,16 Bab
T5	2,60±0,47 ABa	2,20±0,68 ABa	2,18±0,61 ABa	2,36±0,58 Aa
T6	1,72±0,13 Ca	1,47±0,11 BCab	1,42±0,08 Cb	1,58±0,10 Bab
Ácido Dodecanóico (mg.L^{-1})				
T1	0,31±0,03 Aa	0,31±0,03 Aa	0,33±0,07 ABCa	0,11±0,01 Bb
T2	0,27±0,01 ABb	0,31±0,06 Ab	0,44±0,06 Aa	0,11±0,01 Bc
T3	0,29±0,05 Aa	0,26±0,03 ABab	0,34±0,11 ABa	0,10±0,000 Bb
T4	0,27±0,02 ABa	0,25±0,02 ABab	0,21±0,03 BCb	0,11±0,01 Ac
T5	0,27±0,01 ABa	0,30±0,05 Aa	0,25±0,04 BCa	0,31±0,07 Ba
T6	0,18±0,06 Bab	0,20±0,01 Ba	0,16±0,01 Cab	0,10±0,000 Bb

Média e desvio-padrão seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente através do teste de ANOVA, complementada pelo teste de comparação múltiplas de Tukey diferem entre si ($p<0,05$).

O ácido decanóico, que apresenta limiar de percepção olfativa de 6 mg.L^{-1} (SWIEGERS et al., 2005; FRANCIS & NEWTON, 2005), com aromas de gordura e ranço (PEINADO et al., 2004; GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007), apresentou maiores concentrações nos vinhos espumantes dos tratamentos T1 (elaborados somente com *Saccharomyces cerevisae)* e T5 (inoculação sequencial). A menor concentração ocorreu no T6 (100% *Torulaspora delbrueckii)* que apresentou diferença em relação aos tratamentos T1 e T5. Em três tratamentos, T2, T3 e T5 não encontramos diferença significativa ao longo do tempo, já os tratamentos T1, T4 e T6

apresentam, em geral, uma redução nos teores após 3 meses de conservação dos espumantes. Vale ressaltar que nenhum valor ultrapassa o limiar de detecção.

Quanto ao ácido dodecanóico, cujo descritor organoléptico é gorduroso, rancidez e sabão (PEINADO et al., 2004; GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007), em geral apresentou as menores concentrações em relação aos outros ácidos graxos, sendo que os tratamentos T1 (100% *Saccharomyces cerevisae*) e T3 (inoculação conjunta 20:1) de *Torulaspora delbrueckii* + *Saccharomyces cerevisae)* se diferenciaram do T6 (100% *Torulaspora delbrueckii)* na análise dos 3 primeiros meses. Este tratamento apresentou as menores concentrações em todos os tempos. Em geral, observou-se uma redução dos níveis deste ácido aos 12 meses de conservação para todos os tratamentos, exceto por T5 que não varia ao longo do tempo.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho avaliou-se o impacto de diferentes tratamentos, realizados com leveduras *Saccharomyces cerevisae* e *Torulaspora delbrueckii*, em espumantes elaborados pelo método tradicional.

Encontrou-se pequenas variações entre os tratamentos, no que diz respeito aos compostos fenólicos totais, índice de cor, catequinas, epicatequinas e ácidos fenólicos da série cinâmica, sendo a variável tempo a principal responsável pelas variações.

Os álcoois superiores apresentaram níveis esperados para um vinho de qualidade em todos os tratamentos. De forma geral as maiores concentrações foram nos espumantes elaborados com as leveduras *não-Saccharomyces*, apresentando maiores níveis no tratamento com 100% de *Torulaspora delbrueckii* (T6).

Os diferentes tratamentos apresentaram pouco impacto nos resultados observados para o metanol, etanol, pH, etanal e para os alcoóis hexanol e trans-3-hexan-1-ol. Entretanto, para o 2-feniletanol, a inoculação sequencial das leveduras, resultou em valores mais altos nos 6 primeiros meses, se equiparando aos demais tratamentos após 9 meses de conservação.

Os ésteres do ácido acético não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, com exceção do acetato de 2-fenil etila e dietil succinato que se apresentaram mais elevados na inoculação sequencial (1:1)

Os ésteres dos ácidos graxos e a acidez total apresentaram, em geral, maiores concentrações nos tratamentos cujas proporções de *Torulaspora delbrueckii* eram maiores, ao passo que os ácidos voláteis, incluindo o ácido acético, apresentaram uma menor concentração nos mesmos.

Os tratamentos T4 e T5 (co-inoculação 200:1 e sequencial 1:1, respectivamente) foram os que apresentaram os melhores resultados, ressaltando o perfil aromático agradável e diminuindo a concentração de compostos que podem trazer aromas não desejáveis aos vinhos espumantes. A co-inoculação também tem como vantagens a facilidade no preparo do pé de cuba, visto que ambas as leveduras são adicionadas ao mesmo tempo, além de não ser necessário uma grande quantidade da levedura *Saccharomyces*, levando a uma redução de custos quando comparada à inoculação sequencial.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos estudos são necessários para avaliar e compreender melhor as características dos espumantes elaborados com leveduras *Torulaspora delbrueckii* e outras *não-Saccharomyces.* Ensaios comparativos entre diferentes métodos de produção (Charmat e Tradicional) e tempos de autólise mais longos, podem ajudar na compreensão da estabilidade protéica, tartárica, liberação de manoproteinas, formação de espuma e manutenção dos ésteres destes espumantes.

Avaliações sensoriais também se fazem necessárias, sendo realizadas tanto por um corpo técnico quanto pelo público consumidor, podendo facilitar a construção de um produto com maior tipicidade e aceitação do mercado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERNY J. (1996). Revue Suisse Arboric. Hortic, 28 (3), 161.

ALBAGNAC, G. (1975). La d´ecarboxylation des acides cinnamiques substitu´es par les levures. Ann. Technol. Agric., 24, 133–141.

ALBERTIN, W. et al. (2014). Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii*.

ALEXANDRE, H., & GUILLOUX-BENATIER, M. (2006). Yeast autolysis insparkling wine –a review. Aust. J. Grape Wine Res., 12, 119–127

ALEXANDRE, H., et al. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in Saccharomyces cerevisiae and Kloeckera apiculata. FEMS Microbiol. Lett., 124, 17–22

ALEXANDRE, H., et. al. (2001). Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 26, 235–240.

AMERINE, M. A.; ROESSLER, E. B. (1983). Wines: their sensory evolution. São Francisco, USA: W. H. Freeman and Company.

ANDRÉS-LACUEVA, et. al (1996a). Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. J. Agric. Food Chem., 44, 989–995.

ANDRÉS-LACUEVA, et. al (1996b). Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wine (Cava). 1. J. Agric. Food Chem., 44, 3826–3829.

ARNOLD, W.N. (1980). Yeast Cell Envelopes. Biochemistry, Biophysics and Ultraestructure Volume 2. In W.N.Arnold (Ed), Autolysis (pp. 93–103). Boca Raton: CRC Press.

AZZOLINI, M., et al. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. Eur Food Res Technol v.235, p.303–313.

BABAYAN, T.L., & BEZRUKOV, M.G. (1985). Autolysis in yeast. Acta Biotechnol., 5, 129–136.

BARNETT, J.A., & ENTIAN, K.D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. Yeast, 22, 835–894.

BARRE, P., et. al (1998). La levure de fermentation alcoolique. In C. Flanzy (Ed.), Oenologie: fondements scientifiques et technologiques (pp. 454–497). Paris: Tec Doc Lavoisier.

BELY, Marina. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology v. 134, p.201–210.

BERTRAND et al. (1981). Formation des substances au cours de la fermentacion alcoolique. Incidence sur la qualité des vins. Colloque Soc. Fr. Microbiol., Reims, p. 251-267.

BERTRAND, A., & MIELE, A. (1984). Influence de la clarification du moˆut de raisin sur sa teneur en acides gras. Conn. Vigne Vin, 48, 293–297.

BISSON, L.F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic., 50, 107–119.

BISSON, L.F., & BUTZKE, C.E. (2000). Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 51, 168–177.

BOULTON, R.B., et. al (1996). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In R.B. Boulton (Ed.), Principles and Practices of Winemaking (pp. 139–172). New York: Chapman & Hall.

BRECHOT, P., et. al (1971). Acide oleanoique, facteur de croissance anaerobie de la levure du vin. C.R. Acad. Sci. 272: 890–893.

BRISSONET, F. & MAUJEAN, A. (1991). Identification of some foam-active compounds in Champagne base wines. Am. J. Enol. Vitic. 42, 97–102.

CABIB, E., et. al (1982). Synthesis of the Yeast Cell Wall and its Regulation. Ann. Rev. Biochem., 51, 763–793.

CABRERA, M. J., et. al (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by 5 yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. American Journal of Enology and Viticulture, 39, 283–287.

CABRITA, M. J., et al. (2000). Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos Instituto Superior de Agronomia, Universidad Técnica de Lisboa.

CALIARI, V., et al (2014). Aromatic profile of Brazilian Sparkling wines produced with classical and innovative grape varieties. Food Research International v.62, p.965-973.

CAMARASA, C., et. al (2003). Investigation by 13CNMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in Saccharomyces cerevisiae during anaerobic fermentation. Microbiology, 149, 2669–2678.

CARIDI, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. Antonie Van Leeuwenhoek, 89, 417–422.

CASTELLI, T. (1955). Biologia e vino, Humus, 10, 1-5.

CEBOLLERO, E., & GONZÁLEZ, R. (2007). Autophagy: From basic research to its application in food biotechnology. Biotechnol. Adv., 25, 396–409.

CHARPENTIER, C. & FEUILLAT, M. (1993). Wine Microbiology and Biotechnology. In G. H .Fleet (Ed), Yeast autolysis (pp. 225–242).Chur: Harwood Academic Publishers.

CHARPENTIER, C. & FREYSSINET, M. (1989). The mechanism of yeast autolysis in wine. Yeast, 5, 181–186.

CHATONNET, P., et. al (1993a). Synthesis ofvolatilephenols by Saccharomyces cerevisiae in wines. J. Sci. Food Agric., 62, 191–202.

CHATONNET, P., et. al (1993b). Origines et incidences organoleptiques de ph´enols volatils dans les vins. Application à la maîtrise de la vinification et de l'élevage. In: J. Crouzet, C. Flanzy, C. Martin and J. C. Sapis (Eds.), Connaissance aromatique des cépages et qualit´e des vins (pp.279–287). Montpellier: Revue française d'oenologie.

CHERAITI, N., et. al (2005). Redox interactions between Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces uvarum in mixed culture under enological conditions. Applied & Environmental Microbiology, 71, 255–260.

CHEYNIER V. (2001) Groupe polyphénols and evolutions reactions in wine, Polyphénols actualités.

CHEYNIER, V. (2006). Flavonoids in wine. In: Anderson ØM, Markham KR (eds.) Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp 263–318.

CIANI, M., et al. (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology v.28, p.873-882, 2011

CIANI, M., FERRARO, L. (1996). Enhanced glycerol content in wines made with immobilized Candida stellata cells. Appl. Environ. Microbiol. 62:128–132.

CIANI, M., MACCARELLI, F. (1998). Oenological properties of *non-Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World Journal of Microbiology & Biotechnology v.14, p.199-203.

CILINDRE, C., et. al (2007). Influence of Botrytis cinerea infection on Champagne wine proteins (characterized by twodimensional electrophoresis / immunodetection) andwinefoamingproperties. FoodChem.,103, 139–149.

CIRIACY, M. (1996) Alcohol dehydrogenases. In F.K. Zimmerman & K.D. Entian (Eds.), Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications (pp. 213–224). Boca Raton: CRC Press.

CLARKE, R.J.; BAKKER, J. (2004). Wine Flavour chemistry. Blackwell, Oxford.

CONNEW, S. (1998). Yeast autolysis. A review of current rersearch. Aust. NZ Wine Ind. J., 13, 61–64.

CORISON C.A., et al (1979). Must acetic acid and ethyl acetate as mold and rot indicators in grapes. Am J Enol Vitic 30: 130–134.

COVAS, M. I. (2003). Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. Drugs under Experimental and Clinical Research, v. 29, p. 203-206.

CRABTREE, H. D. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. Biochem. J., 23, 536–545.

CURVELO GARCIA, A.S., BARROS, P. (2015). Química Enológica-métodos analíticos. Publindustria, Ediçoes técnicas.

D'INCECCO, N., et al (2004). Release of glycosidically bound flavor compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. Food Microbiology v.21, p.257-265.

DE LA PRESA-OWENS, C., et. al. (1998). Effect of Methode Champenoise process on aroma flavour of four V. vinifera varieties. Am. J. Enol. Vitic., 49, 289–294.

DEAK, T. & BEUCHAT, L.R. (1996). Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Inc., New York, NY.

DOMINÉ, A. (2005). EL Vino. Könemann. Alemanha.

DUGELAY, I., et. al (1992a). Formation of volatilephenols from cinnamic precursors during wine making : the role of cinnamoyl esterase from commercial enzymic preparations. In: P. Schreier & P. Winterhalter (Eds.), Progress in flavour studies (pp. 189–193). Carol Stream Ils.: Allured Publishing Co.

DUGELAY, I., et. al (1993). Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. J. Agric. Food Chem., 41, 2092–2096.

DUPIN, I.V.S., et. al (2000). Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect winefrom protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. J. Agric. Food Chem., 48, 3098–3105.

DUSSAUD, A., et. al (1994). Exogenous lipids and ethanol influences on the foam behavior of sparkling base wines. J. Food Sci., 59, 148.

EGLINTON, J. M., Heinrich, A. J., Pollnitz, A. P., Langridge, P., Henschke, P. A., & de Barros Lopes, M. (2002) Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of Saccharomyces cerevisiae by deleting the ALD6 aldehyde dehydrogenase gene. Yeast, 19, 295–301.

ES-SAfi, N.-E., et. al (2002). Interactions between cyanidin 3-Oglucosideandfurfural derivatives andtheirimpactonfoodcolorchanges. J.Agric.FoodChem., 50, 5586–5595.

ESTEVE-ZARZOSO, B. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. LWT - Food Science and Technology v.49, p.8-13.

ETIÉVANT, P. X. (1991). Wine. In H. Maarse (Ed.),Volatile compounds in foods and beverages (app. 483-587). New York, NY:Marcel Dekker Inc.

FEUILLAT, M. (2003). Yeast macromolecules: Origin, composition, and enological interest. Am. J. Enol. Vitic., 54, 211–213.

FLEET, G.H. (1993). The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. In G.H. Fleet (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology (pp. 1–25). Reading: Hrawood Academic.

FLEET, G.H. (2003). Yeast interactions and wine fl avour. Int. J. Food Microbiol. 86: 11–22.

FLEET, G.H., & HEARD, G.M. (1993). Yeast-growth during fermentation. In G.H. Fleet (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology (pp. 27–54). Reading: Hrawood Academic

FORNAIRON-BONNEFOND, C., et. al (2002). Oxygen Addition and Sterol Synthesis in Saccharomyces cerevisiae During Enological Fermentation. J. Biosci. Bioeng. 93:176–182.

FRANCIOLI, S., et. al (2003). Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. Am. J. Enol. Vitic., 54, 158–162.

FRANCIS, I. L., NEWTON, J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. Aust J Grape Wine Res 11:114–126

FUGELSANG K. C., EDWARDS, C.G. (2007). Wine microbiology. Practical applications and procedures. Springer, Heidelberg.

FUKUDA, K., et. al (1998). Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in Saccharomyces cerevisiae is important for production of isoamyl acetate. Applied and Environmental Microbiology, 64, 4076–4078.

GALLART, M., et al (2002). Influence offattyacids on wine foaming. J. Agric. Food Chem., 50, 7042–7045.

GANCEDO, J.M. (1988). La regulation du metabolisme des sucres chez la levure. In P. Bidan & J.R. Bonneviale (Eds.), Application `a l'œnologie des progr`es r´ecents en microbiologie et en fermentation (pp. 133–143). Paris: OIV.

GANCEDO, J.M. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. Eur. J. Biochem, 206, 297–313.

GENEIX, C., et. al (1983). Effet des acides gras sur la viabilit´e des populations de Saccharomyces cerevisiæ. C.R. Acad Sci., 296, 943–947.

GIOVANI, G., et al (2012). Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by *non-Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. International Journal of Food Microbiology v.160, p.113–118.

GIOVANI, G., ROSI, I. Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomycescerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. International Journal of Food Microbiology v.116, p.19–24, 2007.

GIRBAU-SÒLA, T., et. al (2002a). From aptitude of Trepat and Monastrell red varieties in Cava elaboration. 1. Base wine characteristics. J. Agric. Food Chem., 50, 5596–5599.

GIRBAU-SÒLA, T., et. al (2002b). From aptitude of Trepat and Monastrell red varieties in Cava elaboration. 2. Second fermentation and aging.. J. Agric. Food Chem., 50, 5600–5604.

GOBBI, M. (2010). *Non-Saccharomyces* Yeasts in Controlled Mixed Culture Fermentation in Winemaking: the Role of Metabolic Interactions. Special Abstracts / Journal of Biotechnology 150S, S1–S576.

GÓMEZ-ALONSON et al (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. Journal of Food Composition and Analysis, v. 20, p. 618-626.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J., et. al (2007). Volatile components of Zalema white wines. Food Chemistry, 100(4), 1464-1470.

GONZALEZ A., et. al (2006b). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. FEMS Microbiol Lett 254:123–128

GONZALEZ, A., et. al (2006a). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. Int J Food Microbiol 108:141–146.

GONZALEZ, S. S., et. al (2006a) Natural hybrids from Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus, and Saccharomyces kudriavzevii in wine fermentations. FEMS Yeast Res 6:1221–1223

GONZÁLEZ, S. S., et. al (2006b). Natural hybrids from Saccharomyces bayanus, S. cerevisiae and S. kudriavzevii in wine fermentations. FEMS Yeast Res 6:1221–1234

GRANES, D., et al (2008). Alimentação azotada de leveduras. Revista internet de viticultura e enologia, nº7.

HANSEN, E. H., et. al (2001). The effect of oxygen on the survival of non-Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentation of grape juice with Saccharomyces cerevisiae. J Appl Microbiol 91:541–54

HARRIS, I. et al (2012). Wine and Spirits: understanding style and quality. 2ª edição. WSET. Londres.

HEINISCH, J. J., & RODICIO, R. (1996) Fructose-1,6 biphospohate aldolase, triose phosphate isomerase, glyceraldehide-3-phospkate deshidrogenases and phosphoglycerate mutase. In F.K. Zimmerman & K.D. Entian (Eds.), Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications (pp. 119–140). Boca Raton: CRC Press.

HENICK-KLING, T., et al (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. J. Appl. Microbiol. 84: 865–876.

HENSCHE, P. A. & JIRANEK, V. (1993). Yeast – metabolism of nitrogen compounds. In G.H. Fleet (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology (pp. 77–164). Reading: Hrawood Academic.

HENSCHKE, P. A., & DIXON, G. (1990). Effect of yeast strain on acetic acid accumulation during fermentation of Botrytis affected grape juice. In P. J. Williams, D. M. Davidson, T. H. Lee, (Eds.), Proceedings oftheseventh Australianwineindustry technical conference; 13-17August 1989; Adelaide, SA. (pp. 242-244) Adelaide, SA: Australian Industrial Publishers.

HERJAVEC, S., et al (2001). A Influence of malolactic fermentation on the quality of Riesling wine. Agriculturae Conspectus Scientificus, 66(1), 59-64.

HERNÁNDEZ-ORTE, P., et al (2002). Relationship between varietal aminoacid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study, J. Agric. Food Chem., 50, 2891–2899.

HERNÁNDEZ-ORTE, P., et al (2006) Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. Food Chem., 98, 300–310

HERRAIZ, T., et al (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. Am. J. Enol. Vitic. 41: 313–318.

HIDALGO, P., et. al (2004). Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. J. Agric. Food Chem., 52, 6640–6645

HOHMANN, S. (1996). Pyruvate decarboxylases. In F.K. Zimmerman & K.D. Entian (Eds.), Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications (pp. 187–212). Boca Raton: CRC Press.

HORECKER, B.L. (2002). The Pentose Phosphate Pathway. J. Biol. Chem., 277, 47965–47971.

INGLEDEW, W. M. & KUNKEE, R. E. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. Am. J. Enol. Vitic., 36, 65–76.

JIRANEK, V., et. al (1995). Regulation of hydrogen sulfite liberation in wine-producing Saccharomyces cerevisiae strains by assimilable nitrogen. Appl. Environm. Microbiol., 61, 461–467.

JOHNSON, H., ROBINSON, J. (2008). Atlas Mundial do Vinho. 6ª edição. Nova Fronteira. Rio de Janeiro.

JOLLY, N.P., et al (2003). The use of Candida pulcherrima in combination with Saccharomyces cerevisiae for the production of Chenin blanc wine. S. Afr. J. Enol. Vitic. 24: 63–69.

JOLLY, Neil P. et al (2014). Not your ordinary yeast: *non-Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Research, volume 14, issue 2.

JOLLY, Neil. et al (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. International Journal of Food Microbiology v.163, p. 80–88.

JONES, R.P., & GREENfiELD, P.F., (1987). Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. Yeast, 3, 223–232.

JULIEN, A., et. al (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences. Am. J. Enol. Vitic. 51: 215–222.

MUNOZ, E. & INGLEDEW, W. M. (1989). Am. J. Enol. Vitic.,40 (1), 61.

KAJIWARA, S., et. al (2000). Overexpression of the OLE1 gene enhances ethanol fermentation by Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 568–574.

KHAN, W., et. al (2000). Geographic distribution and evaluation of Saccharomyces cerevisiae strains isolated from vineyards in the warmer inland regions of the Western Cape in South Africa. S Afr J Enol Vitic 21:17–31.

KING, A., & DICKINSON, J. R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii and Kluyveromyces lactis. John Wiley & Sons, Ltd, Yeast 2000; I 6: 499-506.

KLIS, F. M., et. al (2002). Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol. Rev., 26, 239–256.

KNOLL, C., et al (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(3),1143-1153.

KOMANO, H., et. al (1999). Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, monobasic-specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). J. Biol. Chem., 271, 24421–24437.

KUDO, M., et al (1988). Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentation. Am. J. Enol. Vitic. 49: 295–301.

KUNKEE, R. E. (1991). Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. In Proceedings of the International Symposium of Nitrogen in Grapes and Wine,

18–19 de Juny de 1991, Seattle, Washington (pp. 148–155). Davis CA: American Society of Enology and Viticulture.

LABAGNARA, T. et al. Biodiversidade das leveduras do vinho em resposta ao stress ambiental. Internet Journal Of Enology And Viticulture, Enoforum, Arezzo, 2015.

LACHANCE, M.A. & KURTZMAN, C.P. (2011). Lachancea Kurtzman (2003). *The Yeasts, a Taxonomic Study* , Vol. 2, 5th edn (Kurtzman CP, Fell JW & Boekhout T, eds), pp. 511–519. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Wine and brandy. Biotechnology, In H.J. Rehm & G. Reed. (Eds.), Food and Feed Production with Microorganisms, Vol 5, (pp. 81–163). Weinheim: Verlag Chemie.

LAFON-LAFOURCADE, S., & PEYNAUD, E. (1974). Sur l'action antibacterienne de l'anhidride sulfureux sous forme libre et sous forme combin´ee. Conn. Vigne Vin, 8, 187–203.

LAFON-LAFOURCADE, S., et al (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. Appl. Environm. Microbiol., 47, 1246–1249.

LAGUNAS, R. (1993). Sugar transport in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol. Rev., 16, 229–242.

LAGUNAS, R., & GANCEDO, C. (1983). Role of phosphate in the regulation of the Pasteur effect in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem., 137, 479–483.

LAGUNAS, R., et al (1982). Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in Saccharomyces cerevisiae: inactivation of sugar transport systems. J. Bacteriol., 152, 19–25

LAMBRECHTS, M.G., & PRETORIUS, S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma – A Review. South Afric. J. Enol. Vitic., 21, 97–128.

LAMUELA-RAVENTOS & WATERHOUSE (1994). A direct HPLC separation of wine phenolics. American Journal of Enology and Viticulture, v. 45, p. 1-5.

LAROCHE, C., et al (2001). The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of Saccharomyces cerevisiae at different physiological temperatures. Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 249–254.

LILLY, M., et. al (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profile of wine and distillates. Yeast, 23, 641–659

LOPES, C.A., et al (2002). Saccharomyces cerevisiae wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. J Appl Microbiol 93:608–615.

LÓPEZ-BARAJAS, M., et. al (1997). Foaming in grape juices of white varieties. J. Agric.Food. Chem.,45,2526–2529.

LOS, D.A. & MURATA, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim. Biophy. Acta, 1666, 142–157.

LOUREIRO, V. & MALFEITO-FERREIRA, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 86: 23–50.

LOYAUX, D., et. al (1981). The evolution of champagne volatiles during ageing.J. Sci. Food Agric., 32, 1254–1258.

LURTON, L., et. al (1989). Etude de la prot´eolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. Sci. Aliments, 9, 111–124.

LURTON, L., et. al (1995). Influence of the fermentation yeast-strain on the composition of wine spirits. Journal of the Science of Food and Agriculture, 67, 485–491.

MALVY, J., et. al (1994). Influence des protéines sur le comportement de la mousse des vins de Champagne. Sci. Aliments, 14, 87–98.

MANGINOT, C., et al (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of stationary phase. Enz. Micro.Technol.,23, 511–517.

MARCHAL, R., et. al (2001). Effects of Botrytis cinerea infection on Champagne wine foaming properties. J. Sci. Food Agric., 81, 1371–1378.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J., PUEYO, E. (2009). Sparkling Wines and Yeast Autolysis. Moreno-Arribas, M.V. Polo, M.C. (eds.), Wine Chemistry and Biochemistry, Springer Science+Business Media, LLC .

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.J., & POLO, M.C. (2000a). Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. J. Agric. Food Chem., 48, 1081–1085.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.J., & POLO, M.C. (2000b). Recent Res. Devel. Microbiology Volume 4. In S. G. Pandalai (Ed). Enological aspects of yeast autolysis (pp.285–301). Trivandrum: Research Signpost.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.J., et al (2001a). Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. Food Microbiol., 18, 183–191.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.J., et al (2001b). Structural andultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. Int. J. Food Microbiol., 71, 45–51

MASNEUF-POMAREDE, I. (2011). The grape must *non-Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. International Journal of Food Microbiology v.151, p.210–215.

MASON, A.B. & DUFOUR, J. P. (2000). Alcohol acetyl tranferase and the significance of ester synthesis in yeast. Yeast, 16, 1278–1298.

MAUJEAN, A., et al. (1990). Study of the performance and quality of the foam in sparkling wines. II. Perfecting of a measuring techniques for foaming abality, performance and stability of the foam in sparkling wines. Bull. l'OIV, 63, 405–427.

MAURICIO, J.C., & ORTEGA, J.M. (1997). Nitrogen compounds in wine during its biological aging by two flor film yeasts: an approach to accelerated biological aging of dry sherry–type wines. Biotechnol. Bioeng., 53, 159–167.

MAZZEO, T. J. (2009). A Viúva Clicquot: a historia de um império do champagne e da mulher que o construiu. Rocco. Rio de Janeiro.

MEDINA, K. et al (2012). Growth of *non-Saccharomyces* yeasts affects nutriente availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. International Journal of Food Microbiology v.157, p. 245–250.

MEIJER, M., et. al (1998). Glucose repression in Saccharomyces cerevisiae is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. J. Biol. Chem., 273, 24102–24107.

MENEGUZZO, J (2010). Caracterização físico-química e sensorial dos vinhos espumantes da serra gaúcha. UCS, Caxias do Sul.

MOINE-LEDOUX, V. & DUBOURDIEU, D. (2000). Role yeast mannoproteins with regard to tartaric stabilisation of wines. Bull. l'O.I.V, 75, 471–482.

MOIO, L., et al (2004). Effect of antioxidant protection of must on volatile compounds and aroma shelf life of Falanghina (Vitis vinifera L.) wine. J. Agric. Food Chem., 52, 891–897.

MOLAN, P. C., et al (1982). Foaming in winemaking. Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol., 16, 110–113.

MOLNAR, I, et. al (1981). Study of volatile substances produced during the autolysis of champagne yeast. Acta Alimentaria, 10, 27–36.

MONK, P.R. (1994). Nutrient requirements of wine yeast. In: Proceedings of the New York Wine Industry Workshop. T. Henick-Kling (Ed.), pp. 58–64. Geneva, NY.

MORENO, J.J., et al (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. J. Indust. Microbiol. 7: 181–190.

MORENO-ARRIBAS, M.V., POLO, M. C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 45, 265–286.

MORENO-ARRIBAS, M.V., POLO, M. C. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. Springer. Madrid.

MORENO-ARRIBAS, V., et al (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. Food Chem., 70, 309–317.

NAKAGAWA, Y., et. al (2002). Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Comm., 291, 707–713.

NAUMOV, G. (1996). Genetic identification of biological species in the Saccharomyces sensu stricto complex. J Ind Microbiol 17:295–302

NES, D.W., et. al (1993). The structural requirements of sterols for membrane function in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Bioph., 300, 724–733.

NEUBERG, C. (1946). The Biochemistry of Yeast. Ann. Rev. Biochem., 15, 435–472.

NGUYEN, H., & PANON, G. (1998). The yeast Metschnikowia pulcherrima has an inhibitory effect against various yeast species. Sci Aliment 18:515–526

NUNEZ, Y.P., et. al (2005). Effect of accelerated autolysis of yeast on thecomposition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. J. Agric. Food Chem., 53, 7232–7237.

NUNEZ, Y.P., et. al (2006). Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wine. J. Agric. Food Chem., 54, 7898–7903

OLIVEIRA, J. B., VANDERLINDE, R., et al (2012). Caracterização de compostos voláteis em vinhos tintos elaborados com diferentes clones de Syrah no Vale do Submédio São Francisco, XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Gonçalves.

OLSEN, V., et al (1999). Identification and characterization of Saccharomyces cerevisiae yapsin 3, a new member of the yapsin family of aspartic proteases encoded by the YPS3 gene. Biochem. J., 339, 407–411.

OUGH, C.S. (1964). Fermentation rates ofjuice.I. Effects of temperature and composition on white juice fermentation rates. Am. J. Enol. Vitic., 15, 167–177.

PACHECO A., et. al (2012). The emerging role of the yeast Torulaspora delbrueckii in bread and wine production: using genetic manipulation to study molecular basis of physiological responses. in “Structure and Function of Food Engineering”. A. A. Eissa (Ed.), p, 339-370. InTech, Rijeka, Croatia

PANON, G. (1997). Influence of oxygen on fermentation pattern in model media containing mixed or sequential cultures of three cider-producing yeasts: Saccharomyces cerevisiae, var. uvarum, Hanseniaspora valbyensis and Metschnikowia pulcherrima. Sci. Aliments 17, 193-217

PASTEUR, L. (1861). Influence de l’oxyg`ene sur le d´eveloppement de la levˆure et la fermentation alcoolique. Bulletin de la Soci´et´e de Paris(R´esum´e de S´eance du 28 juin 1861), 79–80.

PEINADO, R.A. et al (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermetative cryomaceration. Food Chemistry, v. 84, p. 585-590.

PÉREZ-MAGARIÑO, Silvia, et al. Grape variety, aging on less and aging in bottle after disgorging influence on volatile composition and foamability of sparkling wines. LWT-Food Science and Technology v.61, p.47-55, 2015.

POLAKIS, E.S., et. al (1965). Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. Biochem. J., 97, 298–302.

POZO-BAYÓN, M.A et al. (2009). Chemical ans biochemical features involved in sparkling wine production: From a traditional to an improved winemaking technology. Trends in food Science and technology 20, 289-299.

POZO-BAYÓN, M.A., et. al (2003). Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. Am. J. Enol. Vitic., 54, 273–278.

PRIOR, B.A., & HOHMANN, S. (1996). Glycerol production and osmoregulation. In F.K. Zimmerman & K.D. Entian (Eds.), Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications (pp. 313–338). Boca Raton: CRC Press.

PUEYO, E., et. al (1995). Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). Am. J. Enol. Vitic., 46, 518–524.

QUEROL, A., et al (1994). Population dynamics of natural Saccharomyces strains during wine fermentation. Int J Food Microbiol 21:315–323.

QUINN, A.J., & CHAPMAN, D. (1980). The dynamics of membrane structure. CRC Crit. Rev. Biochem., 8, 1–117.

RACKER, E.(1974). History of the Pasteur effect and its path on biology. Mol.Cell.Biochem.,5,17–23.

RAMEY, D.D; OUGH, C. S. (1980). Volatile ester hydrolysis on formation during storage of model solutions and wines. J. Agric. Food Chem., 28, 928-934.

RATLEDGE, C., & EVANS, C.T. (1989). Lipids and their metabolism. In A.H. Rose & J.S. Harrison (Eds.), The Yeasts (2nd ed.), Vol 3 (pp. 367–455). London: Academic Press.

RAYNAL, C., et al. (2010). Uno strumento innovativo per il controllo della fermentazione: inoculo sequenziale di un lievito *non-Saccharomyces* compatibile con un *Saccharomyces cerevisiae*. Infowine.

RIBERÉAU-GAYON, P. & SAPIS, J.C. (1965). C.R. Acad. Sciences, 261, 1915.

RIBERÉAU-GAYON, P, et al(2006a). Handbook of Enology Vol. 1 The Microbiology of Wine and Vinifications. 2nd Edition, Chichester.

RIBERÉAU-GAYON, P, et al (2006b). Handbook of Enology Vol. 2. The Chemistry of Wine. Stabilization and Treatments. 2nd Edition, Chichester.

RIBEREAU-GAYON, P., et al (2000a). Chemical nature, origins and consequences of the main organoleptic defects. In P. Ribéreau-Gayon (Ed.), Handbook of Enology, Vol 2, (pp. 209–253). Chichester: John Wiley & sons, Ltd.

RIBEREAU-GAYON, P., et al (2000b). Conditions of yeast development. In P. Ribéreau-Gayon (Ed.), Handbook of Enology, Vol 1, (pp. 75–107). Chichester: John Wiley & sons, Ltd.

RIBEREAU-GAYON, P., et al (2000c). Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts. In P. Ribéreau-Gayon (Ed.), Handbook of Enology, Vol 1, (pp. 51–74). Chichester: John Wiley & sons, Ltd.

ROBINSON, J. (2006). The Oxford Companion to Wine. 3ª ed. Oxford University Press. New York, 2006.

RODRÍGUEZ, S., et al (2007). FluidizationofMembrane Lipids Enhances the Tolerance of Saccharomyces cerevisiae to Freezing and Salt Stress. Appl. Environm. Microbiol., 73, 110–116.

ROMANO, P. et. al. (1997). Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. J. Appl. Microbiol., 82, 615-618.

ROMANO, P., et al (1992). Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. J. Appl. Bact. 73, 126-13

ROMANO, P. & SUZZI, G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. InG.H.Fleet (Ed.),Wine Microbiology and Biotechnology (pp. 373–393). Reading: Harwood Academic.

ROZÉS, N. (1992). Contribution `a l'´etude du m´etabolisme lipidique de Saccharomyces cerevisiæ. Application `a la diff´erenciation des levures de vin. Th`ese de Doctorat de l'Universit´e de Bordeaux II, Bordeaux, France.

SABATE, J., et al (1998). Diversity of Saccharomyces strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. Lett Appl Microbiol 26:452–45

SABLAYROLLES, J.M., & BARRE, P. (1986). Evaluation des besoins en oxygen de fermentations alcooliques en conditions oenologiques sil´ees. Sci. Aliments, 6, 373–383.

SABLAYROLLES, J.M. (1996). Efectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck fermentation. J. Fermen. Bioeng., 82, 377–381

SALMON, J. M. (2006). Culturas mistas de leveduras em fermentação alcoólica. Montpellier.

SCHAAF-GERSTEENSCHALÄGER, I., & MIOSGA, T. (1996). The pentose phosphate pathway. In F.K. Zimmerman & K.D. Entian (Eds.), Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications (pp. 271–284). Boca Raton: CRC Press.

SCHULLER, D., et. al (2005). Ecological survey of Saccharomyces cerevisiae strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. FEMS Microbiol Ecol 51:167–177.

SCHUTZ, M., GAFNER., J. (1994). Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. Lett Appl Microbiol 19:253–257.

SODEN, A., et. al (2000). Effects of co-fermentation with Candida stellata and Saccharomyces cerevisiae on the aroma and composition of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research, 6, 21–30.

SPAYD, S.E. & ANDERSEN-BAGGE, J. (1996). Free amino acid composition of grape juice from 12 Vitis vinifera cultivars in Washington. Am. J. Enol. Vitic. 47: 389–402.

STEFENON, C. A., et al (2014). Phenolic composition and antioxidant activity in sparkling wines: Modulation by the ageing on less. Food Chemistry v. 145, p. 292-299.

STINES, A.P., et. al (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of Vitis vinifera L. in Australian vineyards: infl uence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. Aust. J. Grape Wine Res. 6: 150–158

SUÁREZ-LEPE, J.A. & MORATA, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. Trends in Food Science & Technology v.23, p.39-50.

SWIEGERS, J. H., et. al. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 139–173.

TAKESHIGE, K., et. al (1992). Autophagy in yeast demostrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. J. Cell Biol., 19, 301–311.

TAYLOR, W.H. (1957). Formol Titration: An evaluation of its various modifications. Analyst, 82, 488–498.

THURSTON, P.A., et. al (1981). Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. J. Inst. Brew., 87, 92–95.

TORCHIO, F., et al. (2011). Changes in chromatic characterization and phenolic composition during winemaking and shelf-life of two types of red sweet sparkling wine. Food Research International v.44, p. 729-738.

TORREA, D. & ANCIN, C. (2001). Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. Am J Enol Vitic 52:185–190.

TORREA, D., et. al (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Food Chemistry, 127(3), 1072-1083.

TORRIJA, M.J., et. al (2003). Effect of fermentation temperature and Saccharomyces species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int. J. Food Microbiol., 85, 127–136.

UGLIANO, M. & HENSCHKE, P.A. (2009). Yeasts and Wine Flavour. Moreno-Arribas, M.V. Polo, M.C. (eds.), Wine Chemistry and Biochemistry, S\pringer Science+Business Media, LLC.

UGLIANO, M. (2009). Enzymes in Winemaking. Moreno-Arribas, M.V. Polo, M.C. (eds.), Wine Chemistry and Biochemistry, S\pringer Science+Business Media, LLC.

VALENTIN, G. (1993). Etude des enzymes impliqu´ees dans la formation des ald´ehydes `a six atomes de carbone chez le raisin. Doctoral dissertation, University of Montpellier II.

VALERO, E., et al (2007). Biodiversity ofSaccharomyces yeast strains from grape berries of wine producing areas using starter commercial yeasts. FEMS Yeast Res 7:317–329.

VAN DER WESTHUIZEN, T.J., et al (2000a). Geographical distribution of indigenous Saccharomyces cerevisiae strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. S Afr J Enol Vitic 21:3–9

VAN DER WESTHUIZEN, T.J., et al (2000b). Seasonal variation of indigenous Saccharomyces cerevisiae strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. S Afr J Enol Vitic 21:10–16

VANRELL, G., et al (2002). ´Etude des compos´es influenc¸ant la mousse des cavas. Rev. Franc. Oenol., n◦ 196, 30–36.

VAUGHAN-MARTINI, A. & MARTINI, A. (1998). Saccharomyces Meyen ex Rees. In: Kurtzman CP, Fell JW (ed.) The yeast, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam.

VAZQUEZ, F. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. International Journal of Food Microbiology, 155, 43–50.

VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. (2006). Phenolic compound biochemistry, West Lafayette, IN Spring.

VERSAVAUD, A. et al (1995). Genetic diversity and geographical distribution of wild Saccharomyces strains from wine-producing area of Charentes, France. Appl Environ Microbiol 61: 3521–3529.

VIDAL, S. & VUCHOT, P. (2004). Conhecimento e controlo dos compostos aromáticos e fenólicos dos vinhos. Rhone.

WALKER, G. (1998). Yeast physiology and biotechnology. UK: Wiley.

WEBER, V., et al. (2017). Effect of glutathione during bottle storage os sparkling wine.Food Chemistry v.216, p.254-259.

ZAMORA, F. (2004). Las paradas de fermentaci´on. En´ologos, 29, 28–32.

ZAMORA, F. (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. Moreno-Arribas, M.V. Polo, M.C. (eds.), Wine Chemistry and Biochemistry, S\pringer Science+Business Media, LLC.

ZOECKLEIN, B. W., et al (1995). Wine Analysis and Production; Chapman and Hall: New York, 621.

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2004/Lei/L10.970.htm#art8; consultado em 18/05/2016

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1980-1988/L7678.htm ; consultado em 18/05/2016

http://www.sigmaaldrich.com//ifb/fnf_2014/fnf_2014.html?utm_campaign=&utm_medium=email&utm_source=Eloqua#I/zconsultado em 28/05/2016

http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos consultado em 16/05/2016

https://www.laffort.com/images/stories/telechargement/fiches%20commerciales/2%20-%20FC%20-%20ANGLAIS/FC_ANG_Zymaflore_alpha.pdf consultado em 13/10/2017

http://www.uniprot.org/taxonomy/4950 consultado em 13/10/2017

http://www.westerdijkinstitute.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Name=Torulaspora%20delbrueckii&Fields=All&ExactMatch=T consultado em 13/10/2017

ANEXOS

Anexo IA

TORULASPORA DELBRUECKII

YEAST ZYMAFLORE

ZYMAFLORE® *Alpha* TD n.sacch.

... Potential for *biodiversity*

Non-*Saccharomyces* yeast for the production of wines with strong aromatic complexity and generous length and volume on the palate.

Qualified for the elaboration of products for direct human consumption in the field of the regulated use in Oenology. In accordance with the regulation (EC) n° 606/2009.

SPECIFICITIES AND OENOLOGICAL PROPERTIES

Strain of the species *Torulaspora delbrueckii* resulting from *Terroir*-selection. This non-*Saccharomyces* strain brings a great aromatic purity and complexity as well as good mouthfeel. **ZYMAFLORE Alpha** *TD n. Sacch* is an excellent choice for making expressive and full bodied wines. Can produce up to 10% alcohol on average.

ZYMAFLORE Alpha *TDn. Sacch* should be used with a *S.cerevisiae* to reproduce the natural ecosystem of musts in fermentation and to ensure a complete alcoholic fermentation.

FERMENTATION CHARACTERISTICS:

- Alcohol tolerance observed: up to 10% vol.
- Medium nitrogen requirements.
- Large spectrum of fermentation temperature tolerance: 12 - 26 °C.
- Low production of volatile acidity, volatile phenols and H_2S.

AROMATIC CHARACTERISTICS:

- Pof (-) strain: does not possess cinnamate decarboxylase, which is responsible for the formation of aroma masking vinyl-phenols, when unpurified enzymes were used.
- Good revelation of thiol-type varietal aromas (3SH, 3SHA: grapefruit, tropical fruits) in association with a *S.cerevisiae*.

Observation :

- Significant volume and length on the palate.

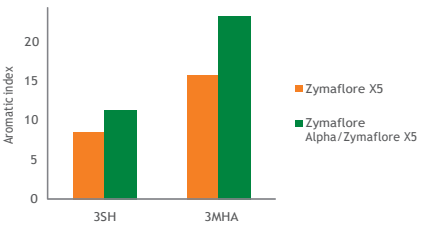
EXPERIMENTAL RESULTS

Colombard, 2009

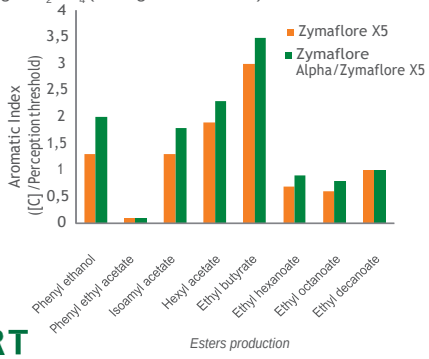
Alcohol: 12.5% vol, 100 NTU, fermentation temperature 16-20°C.

Sequential association of yeasts: 30 g/hL (300ppm) **ZYMAFLORE Alpha** *TD n. Sacch* / 20 g/hL (200ppm) X5 added 24hrs afterwards.

Average fermentation: 15 days/ Average volatile acidity: 0.17 g/L H_2SO_4 (0.21 g/L acetic acid).



Revelation of varietal aromas (thiols)



Esters production

LAFFORT
Tœnologie par nature

PHYSICAL CHARACTERISTICS

Dehydrated yeast (vacuum-packed)

Aspect.....granular

STANDARD ANALYSIS

Humidity (%) .....< 8 % Living cells

SADY UFC/g .....>2.10^{10}

Lactic acid bacteria UFC/g .....<10^5

Acetic acid bacteria UFC/g .....<10^4 Wild yeast

UFC/g .....< 10^5

Coliforms UFC/g .....<10^2

E. coli UFC/g .....None

Staphylococcus UFC/g.....None

Salmonella UFC/25 g .....None

Moulds UFC/g .....<10^3

Lead .....< 2 ppm

Arsenic .....< 3 ppm

Mercury .....< 1 ppm

Cadmium .....< 1 ppm

PROTOCOL FOR USE

SEQUENTIAL ASSOCIATION OF YEASTS:

Important : rehydrate ZYMAFLORE Alpha TD n. Sacch in water at 25-30 °C.

- Dry wines:

Add 30 g/hL (300 ppm) of **ZYMAFLORE Alpha *TD n. Sacch*** to the must, then **24-72 hrs afterwards**, add 20 g/hL (200 ppm) of *S. cerevisiae* (ZYMAFLORE® XPURE, ZYMAFLORE® FX10, ZYMAFLORE® RX60, ZYMAFLORE® X16, ZYMAFLORE® X5…).

- Sweet wines:

Add 40 g/hL (400 ppm) of **ZYMAFLORE Alpha *TD n. Sacch*** to the must, then **5-10 hrs afterwards**, add 20 g/hL (200 ppm) of *S. cerevisiae* (ZYMAFLORE® ST…).

MICROBIOLOGICAL PROTECTION:

Add 5 to 10 g/hL (50 to 100 ppm) of **ZYMAFLORE Alpha *TD n. Sacch*** directly on grape or must (sound harvest): then proceed to yeasting with *S. Cerevisiae* at 20 g/hL (200 ppm) to insure alcoholic fermentation.

IMPLEMENTATION

- Carefully follow the yeast rehydration protocol indicated on the packet.
- Avoid temperature differences exceeding 10°C between the must and the yeast during inoculation. Total yeast preparation time must not exceed 45 minutes.

STORAGE

- Store in original sealed packages, in a cool dry place (4 to 8°C / 39 to 46°F), off the floor, in an odour-free environment.
- Optimal date of use: 2 years.

PACKAGING

500 g vacuum bag. 10 kg box.

LAFFORT

l'œnologie par nature

CS 61 611 – 33072 BORDEAUX CEDEX – Tél. : +33 (0)5 56 86 53 04 – www.laffort.com

ACV-CG - 21.06.17 - The information shown above reflects the current state of our knowledge. It is given without commitment or guarantee since the conditions of use are beyond our control. It does not release the user from legal compliance and safety advice given.

Anexo IB

maurivin™

MAURIVIN PDM

PRODUCT
A pure Active Dry Wine Yeast selected for its medium aromatic characteristics.

TYPE
Saccharomyces cerevisiae (var. bayanus)

FERMENTATION CHARACTERISTICS

RATE OF FERMENTATION
This strain is suitable for low fermentation temperatures due to its inherent vigour. PDM is a steady fermenter at lower temperatures (8-15°C) with a high demand for cooling or refrigeration control. PDM is a rapid rate fermenter at warmer temperatures (20-30°C) with a short lag time.

NITROGEN REQUIREMENT
Fermentation at high temperatures may result in accelerated depletion of free amino nitrogen in the must/juice. In these situations it may be necessary to add free or available nitrogen.

ALCOHOL TOLERANCE
This strain displays very good alcohol tolerance in the range 14-17% v/v.

VOLATILE ACIDITY
Generally less than 0.3g/L.

FOAMING
A low to moderate foaming strain.

FLOCCULATION
PDM has excellent sedimentation properties after alcoholic fermentation.

SO_2 PRODUCTION
PDM is considered a low to moderate SO_2 producer (up to 40 mg/L total SO_2).

CONTRIBUTION TO WINE
PDM produces moderate to low levels of aroma and flavour compounds to the wine. It is a highly desirable yeast strain when the Oenologist requires a subtle but positive aromatic contribution from the yeast.

APPLICATIONS
A general purpose yeast strain recommended for white and red wine production, particularly varietal wines such as Chardonnay, Chenin Blanc, Sauvignon Blanc, Semillon and Riesling, Cabernet, Merlot and Shiraz for example. PDM is also suitable for the production of méthode champenoise wine styles.

USING ACTIVE DRIED WINE YEAST
Please note that no special equipment is required and the procedure can be accomplished in about 30 minutes. Cold water or juice containing preservatives will significantly decrease yeast viability during rehydration. Reconstituting 20g-40g of Maurivin dried yeast per 100 litres of must/juice will achieve a minimum of 5×10^6 viable yeast cells per ml of must/juice. This inoculation density will ensure a rapid onset of fermentation and dominance over wild yeast.

- Rehydrate Maurivin dried yeast by slowly sprinkling it into 5 to 10 times its weight of clean water/juice/must (no SO_2) pre-heated to between 35 to 40°C. Gentle stirring may be used to improve yeast wetting.
- Allow to stand for 15 minutes without stirring.
- Adjust the temperature of the rehydrated yeast solution to within 5°C of the must/juice to be inoculated. This can simply be achieved by adding sufficient quantities of juice/must to the rehydrated yeast suspension at five minute intervals, to give successive 5°C reductions in temperature.
- Use the yeast within 30 minutes of rehydration.
- It is recommended that must/juice be inoculated 15°C or higher to avoid extended lag time.
- When the yeast are fermenting actively, careful temperature control can then be used to maintain the required rate of fermentation.

Anexo II

Resultados totais

Identificação	Garrafa	Buriato de etila (mg.L^{-1})	Acetato de isoamila (mg.L^{-1})	Hexanoato de (mg.L^{-1})	Acetato de hexila ((mg.L^{-1})	Haxanol (mg.L^{-1})	Cis-3-hexan-1-ol (mg.L^{-1})	Trans-3-hexan-1-ol (mg.L^{-1})	Octanoato de etila (mg.L^{-1})	Ácido Isobutírico (mg.L^{-1})	Ácido Butírico (mg.L^{-1})
3 meses	T1	0,08	0,27	0,19	0,08	1,34	-	0,18	0,29	2,23	1,35
	T2	0,04	0,34	0,16	0,08	1,31	-	0,13	0,54	1,22	0,89
	T3	0,05	0,20	0,16	0,08	1,31	-	0,16	0,55	1,48	0,87
	T4	0,05	0,16	0,13	0,08	1,26	-	<LQ	0,50	1,42	0,88
	T5	0,07	0,41	0,27	0,10	1,29	-	<LQ	1,03	1,80	0,75
	T6	0,08	0,37	0,38	0,10	1,32	-	<LQ	0,85	1,97	0,93
6 meses	T1	0,06	0,35	0,34	0,10	1,09	-	0,11	0,72	1,42	0,99
	T2	0,03	0,16	0,20	0,09	1,12	-	0,09	0,58	1,21	0,70
	T3	0,02	0,15	0,17	0,08	1,08	-	0,09	0,49	1,13	0,62
	T4	0,03	0,06	0,10	0,08	1,05	-	0,09	0,44	1,05	0,50
	T5	0,02	0,30	0,25	0,09	1,06	-	0,12	0,82	1,45	0,49
	T6	0,04	0,15	0,23	0,08	1,21	-	0,12	0,56	1,80	0,70
9 meses	T1	0,04	0,20	0,20	0,06	1,11	-	0,13	0,52	2,45	1,28
	T2	0,06	0,30	0,26	0,06	1,09	-	0,11	0,41	1,95	0,95
	T3	0,02	0,10	0,15	0,06	1,11	-	0,11	0,62	1,84	0,91
	T4	0,04	0,13	0,21	0,06	1,12	-	0,13	0,54	1,39	0,79
	T5	0,04	0,23	0,26	0,07	1,04	-	0,15	0,93	1,35	0,48
	T6	0,03	0,12	0,08	0,07	1,22	-	0,11	0,50	2,08	0,66
12 meses	T1	0,11	0,26	0,47	0,06	1,07	-	0,14	0,89	2,91	1,15
	T2	0,09	0,14	0,29	0,06	1,11	-	0,11	0,76	1,96	0,81
	T3	0,07	0,13	0,26	0,06	1,10	-	0,09	0,65	1,94	0,84
	T4	0,05	0,05	0,13	0,06	1,09	-	0,13	0,42	1,14	0,74
	T5	0,05	0,12	0,23	0,06	1,16	-	0,18	0,86	1,76	0,68
	T6	0,06	0,06	0,23	0,06	1,13	-	0,11	0,55	1,62	0,77

Identificação	Garrafa	Decanoato de Etila (mg.L^{-1})	Ácido Isovalérico (mg.L^{-1})	Dietil Succinato (mg.L^{-1})	Acetato de feniletila (mg.L^{-1})	decanoato de etila (mg.L^{-1})	Ácido hexanóico (mg.L^{-1})	2-fenil etanol (mg.L^{-1})	Ácido octanóico (mg.L^{-1})	Ácido decanóico (mg.L^{-1})	Ácido dodecanóico (mg.L^{-1})
3 meses	T1	0,08	0,27	0,19	0,08	1,34	-	0,18	0,29	2,23	1,35
	T2	0,04	0,34	0,16	0,08	1,31	-	0,13	0,54	1,22	0,89
	T3	0,05	0,20	0,16	0,08	1,31	-	0,16	0,55	1,48	0,87
	T4	0,05	0,16	0,13	0,08	1,26	-	<LQ	0,50	1,42	0,88
	T5	0,07	0,41	0,27	0,10	1,29	-	<LQ	1,03	1,80	0,75
	T6	0,08	0,37	0,38	0,10	1,32	-	<LQ	0,85	1,97	0,93
6 meses	T1	0,06	0,35	0,34	0,10	1,09	-	0,11	0,72	1,42	0,99
	T2	0,03	0,16	0,20	0,09	1,12	-	0,09	0,58	1,21	0,70
	T3	0,02	0,15	0,17	0,08	1,08	-	0,09	0,49	1,13	0,62
	T4	0,03	0,06	0,10	0,08	1,05	-	0,09	0,44	1,05	0,50
	T5	0,02	0,30	0,25	0,09	1,06	-	0,12	0,82	1,45	0,49
	T6	0,04	0,15	0,23	0,08	1,21	-	0,12	0,56	1,80	0,70
9 meses	T1	0,04	0,20	0,20	0,06	1,11	-	0,13	0,52	2,45	1,28
	T2	0,06	0,30	0,26	0,06	1,09	-	0,11	0,41	1,95	0,95
	T3	0,02	0,10	0,15	0,06	1,11	-	0,11	0,62	1,84	0,91
	T4	0,04	0,13	0,21	0,06	1,12	-	0,13	0,54	1,39	0,79
	T5	0,04	0,23	0,26	0,07	1,04	-	0,15	0,93	1,35	0,48
	T6	0,03	0,12	0,08	0,07	1,22	-	0,11	0,50	2,08	0,66
12 meses	T1	0,11	0,26	0,47	0,06	1,07	-	0,14	0,89	2,91	1,15
	T2	0,09	0,14	0,29	0,06	1,11	-	0,11	0,76	1,96	0,81
	T3	0,07	0,13	0,26	0,06	1,10	-	0,09	0,65	1,94	0,84
	T4	0,05	0,05	0,13	0,06	1,09	-	0,13	0,42	1,14	0,74
	T5	0,05	0,12	0,23	0,06	1,16	-	0,18	0,86	1,76	0,68
	T6	0,06	0,06	0,23	0,06	1,13	-	0,11	0,55	1,62	0,77

Identificação	Garrafa	Etanal (mg.L^{-1})	Acetato de etila (mg.L^{-1})	Acetal (mg.L^{-1})	Metanol (mg.L^{-1})	1-propanol (mg.L^{-1})	2-metil-1-propanol (mg.L^{-1})	2-metil-1-butanol (mg.L^{-1})	3-metil-1-butanol (mg.L^{-1})
3 meses	T1	66,69	19,99	-	52,98	23,66	29,93	13,76	57,66
	T2	67,61	28,33	-	48,51	27,00	33,65	13,82	53,08
	T3	60,08	34,67	-	47,59	28,98	37,66	14,64	54,08
	T4	72,45	21,89	-	51,07	28,35	36,37	14,29	50,46
	T5	89,17	28,10	-	50,87	30,17	40,88	15,40	56,75
	T6	70,42	39,27	-	50,93	32,18	70,02	17,89	74,95
6 meses	T1	62,73	37,51	-	56,52	24,74	32,59	14,88	59,99
	T2	57,06	29,26	-	53,81	29,15	35,19	15,21	48,58
	T3	61,49	29,58	-	54,14	29,09	37,27	15,15	53,24
	T4	70,99	24,73	-	53,47	28,54	36,90	14,53	50,09
	T5	78,35	30,03	-	53,29	31,78	41,67	16,25	60,02
	T6	71,90	27,29	-	52,30	32,06	67,26	17,23	70,91
9 meses	T1	64,35	39,43	-	56,55	24,06	31,48	14,77	58,63
	T2	59,91	23,80	-	54,18	28,71	33,95	15,00	51,81
	T3	61,54	29,38	-	54,30	29,39	37,16	15,07	53,04
	T4	64,82	40,60	-	56,96	28,79	38,64	15,24	51,35
	T5	90,52	38,73	-	56,71	33,84	45,16	16,45	62,43
	T6	76,43	30,81	-	55,59	33,82	69,68	16,89	73,33
12 meses	T1	60,74	47,13	-	53,66	24,13	30,72	15,19	57,27
	T2	58,21	44,34	-	52,29	28,71	34,71	14,96	52,04
	T3	57,41	45,44	-	52,12	30,27	36,37	14,81	52,89
	T4	68,12	30,12	-	52,15	27,64	34,28	14,23	47,97
	T5	82,89	32,23	-	52,63	31,36	41,86	16,18	59,11
	T6	71,93	32,60	-	53,72	33,03	67,30	16,99	71,59

Identificação	Garrafa	Compostos fenólicos totais à 180 nm	Índice de cor			Catequina (mg.L^{-1})	Epicatequina (mg.L^{-1})	Ácido cafeico (mg.L^{-1})	Ácido ferrúlico (mg.L^{-1})	Ácido coumárico (mg.L^{-1})	Tirosol (mg.L^{-1})
			420 nm	520 nm	620 nm						
3 meses	T1	8,364	0,0102	0,0007	-0,0017	1,60	0,52	1,31	0,11	0,26	3,41
	T2	8,167	0,0104	0,0006	-0,0013	1,78	0,70	1,12	0,16	0,45	4,33
	T3	8,056	0,0110	0,0007	-0,0010	1,69	0,57	1,04	0,16	0,16	4,67
	T4	8,025	0,0114	0,0007	-0,0007	1,49	0,70	0,93	0,13	0,27	9,54
	T5	8,445	0,0110	0,0062	-0,0010	1,35	0,59	1,12	0,13	0,29	10,20
	T6	8,674	0,0133	0,0013	-0,0013	1,42	0,70	0,75	0,10	0,20	9,43
6 meses	T1	9,216	0,0196	0,0071	0,0035	1,59	0,56	4,13	0,14	0,46	7,28
	T2	9,357	0,0257	0,0115	0,0074	1,99	0,52	4,48	0,19	0,58	4,92
	T3	9,284	0,0229	0,0100	0,0059	2,01	0,59	4,05	0,19	0,33	7,81
	T4	9,079	0,0215	0,0070	0,0032	1,70	0,66	3,48	0,15	0,42	10,18
	T5	9,963	0,0203	0,0064	0,0029	1,61	0,43	3,51	0,15	0,20	9,69
	T6	9,752	0,0190	0,0049	0,0018	1,36	0,32	3,51	0,14	0,24	8,82
9 meses	T1	9,281	0,0133	0,0016	0,0000	1,57	0,67	3,29	0,17	0,57	6,28
	T2	9,407	0,0125	0,0009	0,0002	1,71	0,71	4,67	0,23	0,86	7,27
	T3	9,292	0,0119	0,0001	0,0000	1,87	0,68	2,62	0,19	0,55	5,77
	T4	9,173	0,0125	0,0000	0,0000	1,63	0,70	1,55	0,14	0,36	6,74
	T5	9,158	0,0076	0,0000	0,0000	1,42	0,79	1,67	0,16	0,38	8,23
	T6	10,096	0,0114	0,0001	0,0000	1,14	0,56	1,08	0,15	0,30	10,13
12 meses	T1	10,722	0,0287	0,0111	0,0059	2,04	0,31	2,01	0,26	0,38	6,01
	T2	10,817	0,0357	0,0141	0,0077	2,37	0,44	3,63	0,18	1,18	8,23
	T3	10,700	0,0371	0,0155	0,0093	2,32	0,49	4,09	0,18	1,01	7,12
	T4	10,848	0,0331	0,0126	0,0072	1,11	0,71	1,59	0,16	0,33	5,87
	T5	11,475	0,0339	0,0140	0,0083	1,16	0,74	1,85	0,17	0,40	6,11
	T6	11,770	0,0351	0,0138	0,0080	1,06	0,73	1,47	0,14	0,31	9,41