



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA E
GESTÃO VITIVINÍCOLA

LAÉRCIO SPADARI

INFLUÊNCIA DA CEPA DE LEVEDURA NA COMPOSIÇÃO DE
VINHOS ESPUMANTES ELABORADOS PELO MÉTODO
TRADICIONAL

CAXIAS DO SUL/RS

2013

LAÉRCIO SPADARI

**INFLUÊNCIA DA CEPA DE LEVEDURA NA COMPOSIÇÃO DE
VINHOS ESPUMANTES ELABORADOS PELO MÉTODO
TRADICIONAL**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
e Gestão Vitivinícola pela Universidade de
Caxias do Sul – UCS

Orientador Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

CAXIAS DO SUL/RS

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S732i Spadari, Laércio
Influência da cepa de levedura na composição de vinhos espumantes elaborados pelo método tradicional / Laércio Spadari. 2013.
50 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
Orientação: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray.

1. Vinhos espumantes. 2. Leveduras. 3. Bebidas fermentadas. 4. Vinho e vinificação. I. Título.

CDU 2. ed: 663.223

Índice para catálogo sistemático:

1. Vinhos espumantes	663.223
2. Leveduras	663.125
3. Bebidas fermentadas	663.252.4
4. Vinho e vinificação	663.2

Catálogo na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

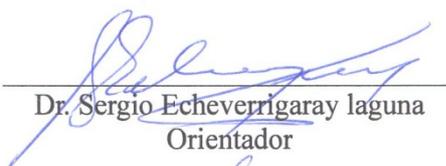
LAÉRCIO SPADARI

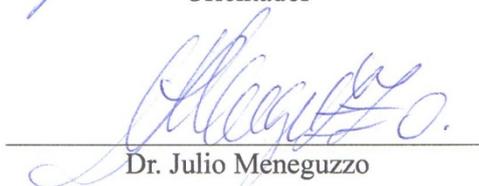
INFLUÊNCIA DA CEPA DE LEVEDURA NA COMPOSIÇÃO DE VINHOS ESPUMANTES
ELABORADOS PELO MÉTODO TRADICIONAL

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.

Orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray laguna

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31 DE JULHO DE 2013.


Dr. Sergio Echeverrigaray laguna
Orientador


Dr. Julio Meneguzzo


Sr. Mauro Celso Zanus


Dr.ª Ana Paula Longaray Delamare


Dr.ª Regina Vanderlinde

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, pela vida e pela constante proteção.

À minha família, pelo apoio, amor, incentivo e compreensão.

À minha noiva Priscila, pela paciência, carinho, compreensão das horas em que estive ausente, dedicando-me aos estudos e pelo apoio encorajando-me nos momentos mais difíceis.

Aos amigos e colegas, pelo companheirismo e alegrias compartilhadas. De forma especial a Vagner Spadari, pela sincera amizade, carinho e apoio.

Ao professor Dr. Sérgio Echeverrigaray pela orientação, amizade e acolhida.

Às professoras Dra. Regina Vanderlinde e Dra. Ana Paula Longaray Delamare, pela colaboração e dedicação.

À Vêneto Mercantil, na pessoa do seu diretor Sr. Leo Leonor Francescato, onde vários colegas contribuíram de maneira decisiva para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Referência Enológica (LAREN) e ao Laboratório Lavin pela realização das análises.

À Universidade de Caxias do Sul, de modo especial aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, que em todas as horas souberam compartilhar seus conhecimentos com sabedoria e dedicação.

À empresa Vinícola Cia Piagentini, especialmente ao enólogo Alejandro Cardozo e toda a sua equipe pelo apoio nas operações necessárias ao experimento e pelas boas discussões enológicas.

À EMBRAPA pela gentileza em permitir a utilização de suas instalações para análise sensorial, em especial ao Dr. Mauro Celso Zanús, que compartilhou suas experiências nesta importante etapa.

Aos colegas enólogos pela participação nas análises sensoriais. Principalmente, aos enólogos Samuel Cervi, Cristiano Zorzan, Neuri Bruschi e Franco Francescato, pelos diversos auxílios, bem como pela realização das tarefas práticas do trabalho.

Aos membros das bancas examinadoras do acompanhamento, da qualificação e da tese, pela disponibilidade e contribuições.

Enfim, a todos os que sempre me ajudaram.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 O VINHO ESPUMANTE ATRAVÉS DA HISTÓRIA	3
2.2 PRINCIPAIS VARIEDADES DE UVAS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS ESPUMANTES NA SERRA GAÚCHA	4
2.2.1 Chardonnay	4
2.2.2 Pinot Noir	5
2.2.2 Riesling Itálico	6
2.3 ELABORAÇÃO DO VINHO BASE.....	6
2.4 ELABORAÇÃO DO VINHO ESPUMANTE (TOMADA DE ESPUMA)	8
2.5 LEVEDURAS PARA VINHOS ESPUMANTES	9
2.6 A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO VINHO E AS BIOTRANSFORMAÇÕES ASSOCIADAS	12
2.7 ANÁLISE SENSORIAL DOS VINHOS ESPUMANTES.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 VINHO BASE	21
3.2 LEVEDURAS UTILIZADAS NA SEGUNDA FERMENTAÇÃO.....	21
3.3 REIDRATAÇÃO, PÉ-DE-CUBA E SEGUNDA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	24
3.4 ANÁLISES DO VINHO BASE E ESPUMANTES	25
3.4.1 Análises físico-químicas	25
3.4.1.1 Análises clássicas	25
3.4.1.2 Análise dos compostos voláteis.....	25
3.4.1.2.1 Determinação de álcoois superiores, etanal, acetato de etila e metanol	25
3.4.1.2.2 Determinação de acetatos, ésteres e ácidos graxos.....	26
3.4.1.2.2 Valor Olfativo Ativo (OAV) e limiares de percepção.....	27
3.4.2 Avaliação sensorial	27

3.4.3 Análises estatísticas	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.2 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO VINHO BASE E DOS ESPUMANTES	28
4.3 AVALIAÇÃO SENSORIAL DO VINHO BASE E DOS VINHOS ESPUMANTES	37
5 CONCLUSÃO.....	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto do cacho da cv. Chardonnay	5
Figura 2 - Aspecto do cacho da cv. Pinot Noir	5
Figura 3 - Aspecto do cacho da cv. Riesling Itálico	6
Figura 4 - Reações de transaminação envolvidas na síntese de glutamato.	15
Figura 5 - Produção de álcoois superiores a partir de aminoácidos (Reação de Ehrlich).	15
Figura 6 - Análise de componentes principais com base na composição de compostos voláteis do vinho base e dos espumantes obtidos a partir dele.....	34
Figura 7 - Análise de componentes principais com base nos compostos voláteis de espumantes obtidos com oito cepas de leveduras	36
Figura 8 - Análise de componentes principais com base nas características organolépticas de espumantes obtidos com oito cepas de leveduras	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais alcoóis superiores e seus aminoácidos precursores.....	16
Tabela 2 – Leveduras selecionadas comerciais secas ativas utilizadas na segunda fermentação.....	21
Tabela 3 - Análises básicas do vinho base e dos espumantes obtidos com oito cepas de leveduras.....	30
Tabela 4 - Compostos voláteis no vinho base e espumantes obtidos com oito cepas de leveduras.....	32
Tabela 5 - Resultados da avaliação sensorial do vinho base e espumantes obtidos com oito cepas de leveduras comerciais.....	38

RESUMO

A Serra Gaúcha apresenta uma excelente aptidão enológica para produzir vinhos espumantes de qualidade. O desenvolvimento de algumas tecnologias, como por exemplo, o uso de leveduras selecionadas, tem contribuído em aportar uma maior complexidade e tipicidade aos espumantes. Neste trabalho foram avaliadas as características físico-químicas, organolépticas e compostos voláteis do vinho base e dos vinhos espumantes naturais elaborados com diferentes cepas de leveduras pelo Método Tradicional. Foram avaliados oito cepas de leveduras secas ativas comerciais, sendo *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore VL3[®], Zymaflore X5[®], Zymaflore X16[®]), e *Saccharomyces cerevisiae* *rf. bayanus* (Blastosel Delta[®], Maurivin PDM[®], Zymaflore Spark[®], La Claire SP665[®], Lalvin EC1118[®]). O vinho base e os vinhos espumantes foram analisados quanto à composição básica conforme a metodologia oficial brasileira. Além disso, foram analisados os compostos voláteis, através de cromatografia gasosa e os vinhos avaliados sensorialmente por uma equipe de onze degustadores qualificados. Os resultados das análises básicas do vinho base e dos espumantes mostraram que, independente da levedura utilizada na tomada de espuma (segunda fermentação), a fermentação foi concluída de forma adequada, apresentando teor alcoólico médio de 12,01% v/v e açúcar residual de 1,78 g/L. Poucas variações foram encontradas entre os espumantes obtidos quanto às análises básicas. Quanto aos compostos voláteis, os vinhos espumantes comparados ao vinho base, apresentaram maior concentração de 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, dietil succinato e dodecanoato de etila, e redução nas concentrações de 3-metil-1-butanol, acetato de isoamila, cis-3-hexen-1-ol, trans-3-hexen-1-ol, decanoato de etila, acetato de feniletila e ácidos graxos. Nas características aromáticas, os espumantes exibiram uma tendência geral de redução na intensidade de frutado, floral e vegetal, e aumento significativo na intensidade de levedura, em relação ao vinho base. Foram detectadas importantes diferenças nos compostos voláteis e nas características organolépticas entre os espumantes obtidos com distintas leveduras. Entre as leveduras avaliadas, os espumantes obtidos com a levedura X5 apresentaram as maiores concentrações de butanoato de etila, acetato de isoamila e hexanoato de etila, compostos responsáveis pelos aromas frutados (pêra, banana, maçã), fato que justifica as suas altas notas de intensidade de aroma, frutados, florais e fineza aromática. Entretanto, os espumantes obtidos com a levedura SP665 exibiram as melhores características considerando os três parâmetros relacionados à espuma, além de intensidade e fineza de aromas e características gustativas favoráveis. Quanto à qualidade global dos espumantes, destacaram-se com as maiores notas as leveduras SP665, X5 e X16. O presente trabalho contribui para a escolha da levedura mais adequada para o enólogo a partir da comparação das características organolépticas, físico-químicas e a composição aromática do vinho base e dos vinhos espumantes. Porém, a elevada variabilidade detectada entre leveduras confirma a necessidade de testes específicos visando à obtenção de espumantes com características sensoriais particulares.

Palavras-chaves: espumante, leveduras, análise química e sensorial.

ABSTRACT

The Serra Gaucha region shows an excellent oenological aptitude for the production of high quality wines and sparkling wines. The development of some technologies, such as the use of selected yeasts has contributed to provide a greater complexity and typicality of sparkling wines. In the present work we evaluate the influence of different yeast strains on the physicochemical characteristics, organoleptic properties and volatile compounds of natural sparkling wines elaborated by the Traditional Method. Eight active dry commercial strain of yeast were evaluated: *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore VL3[®], Zymaflore X5[®], Zymaflore X16[®]), and *Saccharomyces cerevisiae* *rf. bayanus* (Blastosel Delta[®], Maurivin PDM[®], ZymafloreSpark[®], La Claire SP665[®], Lalvin EC1118[®]). The base wine and the sparkling wines were analyzed for their basic composition according to the Brazilian official methodology. Besides, volatile compounds were analyzed through gas chromatography and the organoleptic characteristics evaluated by a team qualified tasters. The results of the basic analyses of the base wine and the sparkling wines showed that independent of the yeast used in the second fermentation, the overall process was concluded in an adequate way, showing an average alcohol content of 12,01% v/v and residual sugar content of 1,78 g/L. The basic analysis showed minimal variation among the sparkling wines obtained with the different yeast strains. A comparison of the volatile compounds of the sparkling wines and the base wine showed an increase of 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, diethyl succinate and ethyl dodecanoate, and a reduction in the concentration of 3-methyl-1-butanol, isoamyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, trans-3-hexen-1-ol, ethyl decanoate, phenylethyl acetate and fatty acids. Considering the organoleptic characteristics, the sparkling wines showed a general tendency of reduction in the intensity of the fruity, floral and vegetable aroma and a meaningful increase in the intensity of yeast aroma, in relation to the base wine. Important differences were detected in the volatile compounds composition and in the organoleptic characteristics among the sparkling wines obtained with different yeasts. Among the evaluated yeasts, the sparkling wines obtained with X5 yeasts showed the highest concentration of ethyl butanoate, isoamyl acetate and ethyl hexanoate, compounds responsible for the fruity aromas (pear, banana, apple), which justify their high notes of aroma, fruity and floral intensity, and overall aromatic quality. The sparkling wine obtained with SP665 showed the best characteristics considering the three parameters related to the foam quality, the intensity and finesse of aromas, and taste characteristics. Sparkling wines obtained with the yeasts SP665, X5 and X16 obtained the highest global quality notes. The present work contributes with the most adequate selection of yeast by winemaker, starting from the comparison of the organoleptic, physicochemical and the aromatic characteristics of the base wine and of the sparkling wines. However, the highest variability detected among sparkling wines obtained with the yeasts evaluated confirms the necessity of specific tests of yeasts in order to obtain sparkling wines with particular sensory characteristics.

Key words: sparkling wine, yeasts, chemical and sensory analyses

1 INTRODUÇÃO

A região da Serra Gaúcha é a principal produtora de vinhos espumantes do Brasil. Atualmente, são produzidos mais de onze milhões de litros de vinho espumante natural (UVIBRA, 2012). Esta região tem se destacado por apresentar fatores determinantes para produção de vinhos espumantes de elevado nível qualitativo.

Segundo Meneguzzo (2010), entre os fatores que determinam a aptidão enológica e a tipicidade do vinho espumante da Serra Gaúcha, destacam-se dois aspectos principais:

1) relacionado ao vinho base, onde interferem a cultivar, a maturação, o aspecto sanitário da uva, além dos fatores naturais de clima e solo, o processo de extração e clarificação do mosto e a fermentação alcoólica;

2) relacionado com a tomada de espuma, onde interferem na aptidão do vinho base para a formação, persistência e combinação do dióxido de carbono e os fatores tecnológicos tais como, linhagem de leveduras, temperatura e tempo de fermentação e autólise das leveduras.

Segundo Zambonelli (2003), a variedade de levedura responsável pela refermentação tem influência marcante na qualidade dos vinhos espumantes já que durante esta segunda fermentação as condições impostas aos microrganismos são particularmente estressantes, porque ela acontece em recipientes fechados que não possibilitam a dispersão de alguns compostos voláteis. Com base nas experiências e de quanto se observou em numerosas ocasiões, Zambonelli e Tini (1980) puderam afirmar que:

- a grande maioria das espécies de leveduras *S. cerevisiae* produzem espumantes de qualidade aceitável com diferentes características;

- as leveduras podem influenciar na qualidade de um espumante tanto quanto a variedade e qualidade da uva utilizada. Portanto, a escolha da cepa de levedura tem relação direta com o tipo de espumante que se pretende obter;

- certos vinhos de aromas próprios muito marcantes, se refermentarem com algumas leveduras, dão origem a produtos desequilibrados e desagradáveis.

A transformação do açúcar em álcool ocorre pela ação das leveduras, sendo que o rendimento e a velocidade do processo dependem, entre outros fatores, da linhagem empregada. O papel desses microrganismos na formação do aroma foi previsto por Pasteur em 1876 e confirmado por diversos pesquisadores que o sucederam. Pode-se afirmar que diferenças entre vinhos obtidos a partir de um mesmo mosto, fermentados por distintas

leveduras, em condições idênticas, devem ser atribuídas aos metabólicos secundários formados durante a fermentação. Entre estes, os álcoois superiores e ésteres desempenham um papel preponderante. As leveduras mais alcoogênicas, principalmente da espécie *S. cerevisiae*, produzem os teores mais elevados de tais produtos. Porém, as concentrações relativas dos diferentes componentes são variáveis em função das linhagens que podem, assim, imprimir um caráter particular ao aroma de diferentes vinhos e espumantes (SILVA e SILVA, 1987).

Diversas marcas comerciais de leveduras secas ativas estão disponíveis ao enólogo. A definição da cepa de levedura a adicionar na tomada de espuma (segunda fermentação) é de grande importância. É tarefa do enólogo escolher a levedura mais adequada para uma fermentação segura e que atenda a tipicidade e qualidade desejada ao seu produto final.

Existem poucos trabalhos desenvolvidos na caracterização de cepas de leveduras na produção de vinhos espumantes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de leveduras nas características físico-químicas e organolépticas de vinhos espumantes elaborados pelo método tradicional, visando oferecer informações avalizadas que contribuam na tomada de decisão dos profissionais encarregados da elaboração de vinhos espumantes. Para tanto, foram determinadas e comparadas as características físico-químicas, organolépticas e composição aromática do vinho base e de espumantes produzidas com oito cepas distintas de leveduras enológicas comerciais na segunda fermentação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O VINHO ESPUMANTE ATRAVÉS DA HISTÓRIA

As evidências químicas mais antigas da produção do vinho datam do período Neolítico (6000 a.C), enquanto que a evidência arqueológica molecular para produção de vinho em grande escala remonta a 5400 a.C.. Em estudos mais recentes, descobertas do DNA de *S. cerevisiae* dentro de uma das jarras de vinho mais antigas conhecidas do Egito, indicam que este organismo foi provavelmente responsável pela fermentação do vinho a pelo menos 3150 a.C. (CAVALIERI et al., 2003).

Foi na França, na cidade de Reims, em torno de 1668 com o monge Dom Pierre Pérignon (1638 – 1715), onde surgiram os primeiros vinhos espumantes. Foi idéia do monge, também, a utilização de rolhas de cortiça no lugar de tampas de madeira, bem como os cortes dos vinhos bases na elaboração de espumantes (RIZZON et al., 2000). Em 1718, com o tratado “Maneira de cultivar o vinhedo e fazer o vinho na Champagne”, publicado pelo cónego Jean Godinot, confirma o fato de que a champagne efervescente começou a ser comercializada em garrafas especiais em torno de 1695 (SCHLEDER, 2010).

No início a atividade passou por algumas dificuldades, tais como: o controle da fermentação e a ruptura das garrafas, que chegava aos 40%. Tais problemas foram resolvidos graças aos estudos realizados por um farmacêutico de Chalons-sur-Marne e aos trabalhos de Louis Pasteur: o primeiro fixou a dose de açúcar antes da tomada de espuma, reduzindo ao mínimo a quebra de garrafas, enquanto o segundo estudou a ação das leveduras (SARACCO e GOZZELINO, 1995).

Aparentemente fácil, a elaboração de espumantes implica a existência de “terroir” adequado, com peculiaridades que garantam uva de maior acidez e de composição complexa (SOUSA, 2005).

No Brasil, o início da produção do vinho espumante ocorreu em 1913 em Garibaldi – RS, no estabelecimento vinícola Manuel Peterlongo. Seguido pelo filho Armando Peterlongo que aprimorou as instalações e o método de elaboração (RIZZON et al., 2000).

2.2 PRINCIPAIS VARIEDADES DE UVAS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS ESPUMANTES NA SERRA GAÚCHA

Muito se fala do solo da Serra Gaúcha, de substrato basáltico, mas o principal fator que determina a qualidade das uvas são as condições climáticas do local. Em geral, elas são desfavoráveis para a perfeita maturação de uvas empregadas na produção de vinhos brancos e tintos, mas muito adequadas quando seu destino é a produção de espumantes (AZEVEDO E VELLOSO, 2006).

Os meses determinantes do ciclo vegetativo das videiras, quando se foca a elaboração de espumantes, são dezembro, janeiro e fevereiro. Durante este período, o número de dias de chuvas bastante elevado reduz a insolação. Ao mesmo tempo, as noites ficam frescas com temperaturas noturnas bem abaixo dos 20°C (MÉVEL, 2006). Estes dois fatores fazem que as uvas não madurem completamente, o que lhes confere elevado teor de acidez e teores moderados de açúcar, um perfil perfeito para uvas destinadas à produção de espumantes. Aliado a isto, a lenta maturação favorece a formação de aromas muito finos e delicados, fator também essencial para a qualidade do espumante (AZEVEDO E VELLOSO, 2006).

Neste sentido, as uvas apresentam nesta região, potencial alcoólico baixo (9,5 a 10,5% v/v), acidez titulável relativamente elevada (75 a 85 meq/L) e pH baixo (3,10 a 3,25), condições necessárias para garantir o frescor aromático e gustativo, fatores importantes para a qualidade desses vinhos (RIZZON et al., 2000).

As cultivares mais utilizadas para a elaboração de vinhos espumantes são a Riesling Itálico e a Chardonnay entre as uvas brancas, e a Pinot Noir entre as tintas. Além dessas, são utilizadas também as cultivares brancas Sémillon e Trebbiano, e em casos mais específicos, a Cabernet Franc, vinificada em branco (RIZZON et al., 2000).

Um aspecto fundamental para a produção de vinho espumante é a qualidade sanitária das uvas utilizadas. Uvas com problemas de podridão comprometem a qualidade do vinho base e, conseqüentemente, do vinho espumante, interferindo no aspecto visual através da oxidação e provocando aromas e gostos desagradáveis (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

2.2.1 Chardonnay

A Chardonnay é originária da Borgonha, França. É uma cultivar de película branca e de maturação precoce. É resistente à antracnose, sensível ao oídio e as podridões e moderadamente sensível ao míldio (GIOVANNINI, 2008).

Apresenta cacho de tamanho pequeno e possui bom potencial de acúmulo de açúcar na baga (Figura 1). Origina um vinho branco equilibrado, com pouco aroma varietal, porém de elevada complexidade, o que torna bastante apreciado pelos consumidores. Para a produção de vinho espumante, a uva deve ser colhida com potencial alcoólico que varia entre 9 a 10% v/v, para garantir o frescor necessário. A Chardonnay contribui com a fineza e a suavidade do vinho espumante (RIZZON et al., 2000).



Figura 1 - Aspecto do cacho da cv. Chardonnay

Fonte: <http://www.vivairauscedo.com/en/catalogo.php> (acesso 03/05/2013)

2.2.2 Pinot Noir

A Pinot Noir é originária da Borgonha, França. É uma cultivar de película tinta, de sabor neutro e de maturação precoce. Apresenta cachos de tamanho pequeno e compacto (Figura 2). É resistente à antracnose, sensível ao oídio, moderadamente sensível ao míldio e altamente sensível às podridões (GIOVANNINI, 2008).



Figura 2 - Aspecto do cacho da cv. Pinot Noir

Fonte: www.vivairauscedo.com/en/catalogo.php (acesso 03/05/2013)

Pinot Noir é utilizada para elaboração de vinho espumante quando vinificada em branco e a sua contribuição maior é no sentido de aumentar a tipicidade do vinho espumante da Serra Gaúcha e dar maior estrutura do mesmo (RIZZON et al., 2000).

2.2.2 Riesling Itálico

É uma cultivar branca, de maturação intermediária, sensível ao míldio e a podridão do cacho. Apresenta cacho pequeno e compacto, e possui bom potencial de acúmulo de açúcar na baga (Figura 3). Origina vinho com aroma varietal pouco pronunciado e aroma secundário suficiente para ser classificado como vinho frutado. Deve ser colhida com um potencial alcoólico de 9 a 10% v/v para apresentar a estrutura ácida necessária para garantir o frescor do vinho espumante. A cultivar Riesling Itálico contribui para a formação de aromas finos, cítricos e leves, específicos do vinho espumante da Serra Gaúcha (RIZZON et al., 2000).



Figura 3 - Aspecto do cacho da cv. Riesling Itálico

Fonte: www.vivairauscedo.com/en/catalogo.php (acesso 03/05/2013)

2.3 ELABORAÇÃO DO VINHO BASE

O vinho que será utilizado para efetuar a segunda fermentação (também chamada de tomada de espuma ou espumatação) é denominado vinho base. Em geral, os vinhos bases tem uma graduação alcoólica não muito elevada (10 a 11,5 % v/v), e com um teor de acidez que permita a obtenção de espumantes com um frescor adequado (80 a 90 meq/L de acidez titulável e pH aproximado de 3,2). Além disso, são parâmetros importantes, o baixo teor de açúcares residuais (menos de 2 g/L), a baixa acidez volátil (inferior a 10 meq/L) e baixo teor de dióxido de enxofre (GIOVANNINI e MANFROI, 2009).

A elaboração do espumante segue procedimentos que visam proteger a acidez e a fineza dos aromas das uvas. Para atingir estes objetivos, a colheita é realizada inteiramente à mão, eliminando-se os cachos com problemas e com enchimento moderado das caixas, para evitar o esmagamento. As uvas são rapidamente levadas à vinícola, sendo protegidas, durante o transporte, contra o sol, das altas temperaturas e da poeira. Na chegada a vinícola as uvas são classificadas pela variedade, pela origem, pelo teor de açúcar e pelo estado sanitário (AZEVEDO E VELLOSO, 2006).

Para a elaboração dos vinhos base é importante observar os estritos critérios de qualidade. Entre eles, o uso de técnicas de vinificação adequadas às características das diferentes uvas, o uso de tratamentos exclusivamente físicos durante o processo, mantendo o caráter absolutamente natural dos vinhos, e a adoção de rígidas normas de higiene. As técnicas de produção do vinho base contemplam a cuidadosa extração do suco das uvas pela prensagem dos cachos, direta e delicada ou mediante prévio desengaçamento e esmagamento, seguido de prensagem. A eliminação de partículas sólidas se faz por simples decantação a baixa temperatura. A fermentação alcoólica é realizada com leveduras selecionadas e sob rigoroso controle de temperatura (AZEVEDO E VELLOSO, 2006).

Na composição do vinho base, no processo de “assemblage” (definido como sendo a mescla dos diferentes vinhos utilizados na produção do vinho base), cada uma das uvas contribui com características bem definidas, dando a cada um dos espumantes personalidade própria. Assim, por exemplo, a Riesling Itálico aporta aromas de frutas cítricas frescas e alguma acidez. A Chardonnay aporta na mescla seus aromas de maçã verde, abacaxi e cítricos maduros, reforçando a complexidade aromática e a acidez, além de preencher o meio de boca, aumentando a persistência final e a Pinot Noir, uva difícil e caprichosa vinificada em branco, colhida precocemente, apresenta excelente acidez e sutil aromas de frutas vermelhas, com toques de especiarias, além de conferir mais corpo e estrutura ao espumante. A degustação é a principal ferramenta neste processo (AZEVEDO E VELLOSO, 2006).

Segundo Fensterseifer (2008), a escolha do “melhor corte” (dadas as características desejadas do espumante) para a definição do vinho base a partir dos diferentes vinhos monovariais disponíveis é um processo que requer ciência e arte, pois não pode ser definido apenas em função de parâmetros analíticos dos diferentes vinhos, requerendo fundamentalmente uma análise sensorial.

Uma das características do vinho base para espumante é apresentar estabilidade adequada, por isso não deve conter quantidade elevada de substâncias proteicas e elementos minerais, especialmente ferro e cobre, que provocam turvações. Recomenda-se reduzir o teor

de potássio e de ácido tartárico e de seus respectivos sais através de refrigeração (RIZZON et al., 2000).

Os vinhos que não realizam a fermentação malolática conservam o caráter mais fresco e aromático. Entretanto, algumas vinícolas buscam a fermentação malolática em função de acidez e de estabilidade microbiológica (FLANZY, 2003).

2.4 ELABORAÇÃO DO VINHO ESPUMANTE (TOMADA DE ESPUMA)

Segundo a atual Legislação do Ministério da Agricultura (MAPA) do Brasil, o Artigo 11 da Lei 7678/88 (Lei do Vinho) menciona o seguinte:

“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 20°C (vinte graus Célsius) e com teor alcoólico de 10% (dez por cento) a 13% (treze por cento) em volume.”

A fermentação da sacarose ou do mosto concentrado adicionados ao vinho seco se consegue tecnologicamente com dois métodos de elaboração: método clássico ou tradicional e o método Charmat, sendo o primeiro de maior relevância em nível mundial (LEPE e LEAL, 2004).

Adiciona-se ao vinho base o licor de “tirage”, uma mistura de leveduras e sacarose, sob temperatura controlada, processo pelo qual o gás carbônico produzido pela fermentação será naturalmente agregado ao vinho, são necessário 24 g/L de açúcar para resultar em 6 atm de pressão a 20°C (SARACCO E GOZZELINO, 1995). As leveduras utilizadas são cepas de *S. cerevisiae*, se recomenda inocular com uma população inicial de 10^6 células/ml (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). A adição do licor de “tirage” deve ser feita antes da colocação do vinho na garrafa, quando ainda estiver no tanque, tendo o cuidado de efetuar uma boa homogeneização (RIZZON et al., 2000).

As garrafas com o vinho base são armazenadas em locais com condições de temperatura constante de 10 a 12 °C, onde ocorrerá a fermentação alcoólica. Depois de concluída a fase de formação de espuma e de permanência do vinho sobre as borras, observa-se na garrafa um depósito formado por células de leveduras e por produtos enológicos. Este depósito deve ser conduzido lentamente para o bico da garrafa para ser retirado posteriormente, essa operação é feita em “pupitres”. A movimentação do depósito é feita

através de pequenos golpes e giros aplicado nas garrafas, o chamado “remuage”. A prática de “dégorgement” é realizada com a finalidade de eliminar a borra depositada na parte interna da tampa da garrafa (CAVAZZANI, 1989).

Esta segunda fermentação dura em média quatro a cinco semanas e, após seu término, o espumante permanece em contato com a levedura por um período mínimo de quatro meses, beneficiando-se de uma série de fenômenos de troca entre as leveduras e o vinho, quando adquire características aromáticas mais complexas, ricas e harmoniosas (FLANZY, 2003).

2.5 LEVEDURAS PARA VINHOS ESPUMANTES

Foi o holandês Antonie Van Leeuwenhoek em 1680, graças ao microscópio fabricado por ele, que primeiro observou as leveduras a partir de um mosto de cerveja, sem estabelecer, no entanto, relação alguma entre as leveduras e a fermentação alcoólica (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). Na França, Antoine Lavoisier (1743-1794) estudou a conversão do açúcar em dióxido de carbono e álcool, e em 1789 publicou a primeira descrição científica deste processo. Em 1813, Louis Pasteur provou conclusivamente que a levedura é o catalisador fundamental na fermentação de vinho. Mais tarde, em 1883, Emil Christian Hansen da Cervejaria Carlsberg obteve a primeira cultura de fermento puro, e poucos anos mais tarde, em 1890, o alemão Müller-Thurgau introduziu o conceito de inocular fermentações de vinho com culturas de leveduras puras. Em 1965, as duas primeiras cepas de leveduras secas comerciais para vinhos foram produzidas por uma vinícola da Califórnia, e a partir dos anos 70, a inoculação de culturas de leveduras puras selecionadas tornou-se uma prática enológica comumente estabelecida para um melhor controle do processo de fermentação alcoólica (PRETORIUS, 2000).

As leveduras são fungos unicelulares (Ascomicetos, Basidiomicetos ou Deuteriomicetos) e englobam cerca de 80 gêneros e 600 espécies. Em termos enológicos, as leveduras mais importantes pertencem ao gênero *Saccharomyces* e geralmente a espécie *S. cerevisiae*. De acordo com Kurtzman e Fell (1999), o gênero *Saccharomyces* é formado por 14 espécies: *S. barnettii*, *S. bayanus*, *S. castelli*, *S. cerevisiae*, *S. dairenensis*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. rosini*, *S. servazii*, *S. spencerorum*, *S. transvaalensis* e *S. unisporus*. Porém, a classificação de leveduras com base nas suas características morfológicas (apiculadas, ovoides, multiplicação por gemação ou bipartição), e propriedades fisiológicas (capacidade para fermentar ou consumir açúcares ou ácidos) é complexa e vem

mutando consideravelmente com a inclusão de dados moleculares e genômicas. Assim sendo, algumas denominações comuns no passado como “oviformis”, “bayanus” e “uvarum” são consideradas obsoletas em documentos mais recentes (PEYNAUD e BLOUIN, 2006). Muitas cepas utilizadas comercialmente na produção de vinhos antigamente denominadas como *S. bayanus* são atualmente identificadas como *S. cerevisiae* ou *S. cerevisiae* *rf. bayanus*, onde *rf* significa “raça fenotípica”.

Na uva sadia a população de leveduras é relativamente baixa, de 1.000 a 100.000 células por baga. As leveduras mais prevalentes em uvas sadias pertencem a grupos não fermentativos ou com baixa capacidade fermentativa como *Rhodotorula sp.*, *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*), *Candida sp.*, *Pichia sp.*, entre outras. A levedura fermentativa *S. cerevisiae* é pouco abundante sobre a uva, porém é praticamente a única espécie responsável pela fermentação alcoólica durante a produção de vinhos (PEYNAUD e BLOUIN, 2006).

As leveduras não têm a finalidade expressa de produzir um tipo particular de vinho, apenas trabalham conforme seu metabolismo. Por isso convém eleger tanto as cepas selecionadas para o mosto que se quer fermentar, como dotadas de propriedades enológicas que sejam de interesse. Esse é o principal objetivo dos trabalhos de seleção de cepas de leveduras (RAINIERI e PRETORIUS, 2000; PRETORIUS, 2000; VALADE, 2005).

O processo simplificado da fermentação alcoólica, segundo Palácios e colaboradores (2007): açúcar + levedura = álcool etílico + CO₂ + calor + outras substâncias

A fermentação alcoólica em condições enológicas se efetua em ambiente anaeróbico ou microaerófilo, com concentrações de oxigênio limitadas (< 10 mg/L de O₂). O mosto de uva é caracterizado por ter uma grande concentração de açúcar fermentescível (glicose e frutose) em concentração de 140 até 260 g/L, dependendo da maturação da uva. O mosto apresenta um pH ácido (2,9 – 3,6), quantidades limitadas de nitrogênio e nutrientes (lipídios, vitaminas) e a presença de inibidores como SO₂ (antioxidante e agente antimicrobiano) em quantidades de 40 a 100 mg/L. O metabolismo de *S. cerevisiae* nessas condições é principalmente fermentativo. A fermentação completa deste mosto por *S. cerevisiae* produz de 8 a 15% v/v de etanol, e outros produtos secundários como glicerol (6 a 8 g/L), ácidos orgânicos, acetatos, succinato e piruvato em quantidades menores (< 1 g/L), e também álcoois superiores e ésteres (FLEET & HEARD, 1993).

Leveduras são os organismos predominantes na fermentação de vinho e participam na produção de aromas e outras propriedades por uma gama de mecanismos e atividades (PRETORIUS et al., 1999).

Dada a sua importância no processo enológico, cepas específicas de *Saccharomyces* foram selecionadas e usadas em inoculações durante décadas. Mais de 200 cepas selecionadas estão disponíveis. Tais cepas comerciais selecionadas em vinícolas ou em vinhedos apresentam atributos específicos, como tolerância a etanol, tolerância de dióxido de enxofre, tolerância a carência de nitrogênio, baixa produção de compostos indesejáveis (como acetatos e H₂S), produção de ésteres, habilidade para dominar condições de fermentação diversas, entre outras (EHSANI, 2007).

Além da escolha da levedura para a produção do vinho base, a definição da cepa da levedura a ser adicionada juntamente com o licor de “tirage” constitui uma etapa decisiva para a qualidade do vinho espumante, visto que, das suas características vai depender o andamento da segunda fermentação alcoólica, conseqüentemente, a qualidade final (RIZZON et al., 2000).

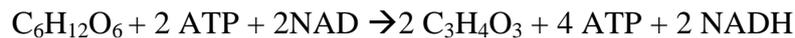
A preparação da levedura para o licor de “tirage” requer a elaboração do pé-de-cuba. Mediante este procedimento se consegue a adaptação das leveduras ao álcool, permitindo a sua sobrevivência na garrafa, mantendo a sua máxima atividade fermentativa. A levedura selecionada para este processo é a espécie *S. cerevisiae*, por sua maior resistência em condições desfavoráveis. Segundo Lepe e Leal (2004), as cepas selecionadas para a “tomada de espuma” ou “segunda fermentação” em garrafa devem ter uma série de características adicionais às exigidas para a primeira fermentação: (i) produção de etanol em meio alcoólico; (ii) mínima produção de acidez volátil; (iii) regularidade na velocidade de fermentação; (iv) tolerância a baixas temperaturas; (v) boa formação de espuma; (vi) boa capacidade de aglomeração e floculação; (vii) correto metabolismo de compostos nitrogenados e enxofrados; (viii) boa capacidade de autofagia e autólise após o término da fermentação; e (ix) baixa aderência ao vidro.

A primeira fermentação reduz a quantidade de nutrientes disponível para as leveduras sendo, portanto, habitual a adição de fosfato diamônico entre 50 e 200 mg/L, assim como vitaminas e outros compostos, antes da segunda fermentação (RANKINE, 2000).

2.6 A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO VINHO E AS BIOTRANSFORMAÇÕES ASSOCIADAS

As leveduras, em particular *S. cerevisiae*, são responsáveis pelas mais importantes transformações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação vínica, dentre as quais a mais evidente é a transformação dos açúcares do mosto em etanol.

Dependendo da disponibilidade de oxigênio e outros fatores, *Saccharomyces* pode degradar açúcares utilizando quatro vias: (i) a respiração, (ii) a fermentação alcoólica, (iii) a fermentação glicero-pirúvica, e/ou (iv) a via das pentoses fosfato (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). As três primeiras vias iniciam-se através de um conjunto de reações denominadas de glicólise ou via de Embden-Meyerhoff. A glicólise ocorre no citosol e leva à formação de piruvato com a geração de ATP:



De forma sucinta, a via glicolítica inicia-se pelo transporte e fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato pela enzima hexoquinase, a isomerização desta para frutose-6-fosfato pela fosfoglucoase isomerase e uma nova fosforilação formando frutose-1,6-fosfato realizada pela fosfofructoquinase. *Saccharomyces* apresenta duas hexoquinases e uma glucoquinase responsáveis pela fosforilação de hexoses. A hexoquinase PII (HXK2) fosforila glicose e frutose e encontra-se predominantemente durante a fase de crescimento na presença de alta concentração de açúcares. Já a hexoquinase PI (HXK1) é parcialmente reprimida por glicose prevalecendo em baixas concentrações de açúcar (PRETORIUS, 2000; RIBEREAU-GAYON et al., 2006). A entrada de hexoses na célula é mediada por conjunto de transportadores estereoespecíficos de membrana denominados de HXT1-HXT18, GAL2, SNF3 e RGT2. Entre estes, os mais importantes no transporte de glicose e frutose são HXT1 a HXT7. Os transportadores HXT variam quanto à especificidade e afinidade pelo substrato, mas de modo geral possuem maior afinidade pela glicose do que pela frutose, fato que afeta a taxa de utilização das duas hexoses presentes nos mostos (WIECZORKE et al., 1999). Entretanto, estudo realizado por Guillaume et al. (2007) mostrou que leveduras enológicas eficientes apresentam um alelo mutado do gene HXT3 que determina um transportador com afinidade aumentada pela frutose.

Na sequência da glicólise, a frutose-1,6-fosfato que quebra pela aldolase formando gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. A triose fosfoisomerase garante o acúmulo

de gliceraldeído-3-fosfato o qual é 1,3-bifosfoglicerato com redução de NAD a NADH pela ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. O 1,3-bifosfoglicerato é desfosforilado pela fosfoglicerato quinase gerando 3-fosfoglicerato e ATP. A continuação a fosfoglicero mutase e a enolase levam à formação de 2-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato, o qual pela ação da piruvato quinase é desfosforilado em piruvato com geração de ATP (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Em sistemas aeróbicos, a levedura realiza a decarboxilação oxidativa do piruvato pela ação da piruvato desidrogenase na presença da coenzima A e NAD, gerando acetil-CoA, NADH e CO₂. Por sua vez, o acetil-CoA entra no ciclo dos ácidos tricarbóxicos sendo completamente oxidado a CO₂. Durante o processo de oxidação do acetil-CoA são geradas três moléculas de NADH e uma de FADH₂. Os elétrons destas moléculas entram na cadeia de transporte de elétrons sendo finalmente transferidos para o oxigênio formando água. Neste processo NAD e FAD são regenerados constantemente voltando ao ciclo. Como um todo, a respiração de um mol de glicose gera 36 a 38 ATP. A utilização preferencial da via respiratória na presença de oxigênio por parte das leveduras é o que se conhece como “efeito Pasteur”. Entretanto, em altas concentrações de açúcares, mesmo na presença de oxigênio, as leveduras optam pela via fermentativa (efeito Crabtree).

Assim sendo, na ausência de oxigênio e/ou presença de altas concentrações de açúcar, a levedura *S. cerevisiae*, direciona o piruvato gerado na glicólise para a produção de etanol, visando fundamentalmente a regeneração de NAD. A produção de etanol envolve duas reações. Na primeira o piruvato é decarboxilado pela piruvato decarboxilase com a participação de tiamina formando acetaldeído e liberando CO₂, e na segunda o acetaldeído é reduzido pela desidrogenase alcoólica gerando etanol e regenerando NAD. Desta forma, na fermentação alcoólica um mol de glicose (180g) leva à produção de dois moles de etanol (92g) e dois moles de gás carbônico (88g) suprindo a célula com 2 ATP e gerando 25,4 cal que se desprendem na forma de calor:



Assim sendo, o gás carbônico pode ser considerado o segundo principal produto da fermentação alcoólica. Dependendo das cepas utilizadas em condições enológicas, pode-se considerar um rendimento médio de 0,4 a 0,5 gramas de CO₂ por grama de açúcar fermentado (PALÁCIOS *et al.*, 2007).

Porém, no início da fermentação, quando as quantidades de piruvato decarboxilase e álcool desidrogenase são limitadas, a levedura realiza a reoxidação de NADH em NAD através da conversão de diidroxiacetona fosfato em glicerol-3-fosfato, o qual é defosforilado gerando glicerol. Neste processo, conhecido como fermentação gliceropirúvica, parte do piruvato reage com o acetaldeído ativo ligado ao pirofosfato de tiamina gerando ácido α -acetoláctico que pode ser transformado em diacetil, acetoina e 2,3-butanediol, compostos que conferem aroma de manteiga no vinho. Assim sendo, segundo Ribereau-Gayon et al. (2006), considerando o limitado efeito benéfico do glicerol e os riscos decorrentes do acúmulo de subprodutos, a via gliceropirúvica deve ser minimizada tanto quanto possível na produção de vinhos.

Outro composto derivado do metabolismo das leveduras durante a fermentação de açúcares é o ácido acético, produzido a partir de acetyl-CoA (VERDHUYN et al., 1990) ou pela oxidação do acetaldeído mediada pela acetaldeído desidrogenase, principalmente ALD6 (BLONDIN et al., 2002).

Além de energia e carbono, supridos pelo metabolismo de açúcares, a levedura necessita de nitrogênio para a síntese de aminoácidos, bases nitrogenadas e outras moléculas que contém nitrogênio. Desta forma, durante a fermentação vínica são gerados diversos produtos derivados do catabolismo e anabolismo de compostos nitrogenados, entre os quais diversos alcoóis superiores e seus ésteres. O desbalanço carbono-nitrogênio é a causa primária de fermentações lentas e paradas de fermentação (JIRANEK et al., 1995).

Os aminoácidos podem ser obtidos diretamente do mosto ou sintetizados pela célula. A síntese de aminoácidos em leveduras se processa de forma similar a outros organismos, com papel essencial do glutamato e da glutamina (ZAMORA, 2009). A NADP⁺-glutamato desidrogenase é responsável pela produção de glutamato a partir de amônia e α -cetogluturato, um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Por outro lado, a glutamina sintase produz glutamina utilizando glutamato e amônio. Reações de transaminação com a participação de piridoxal fosfato como cofator possibilitam a transferência do grupo amino do glutamato para um conjunto de intermediários da glicólise, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do ciclo das pentose fosfato gerando os distintos aminoácidos (Figura 4).

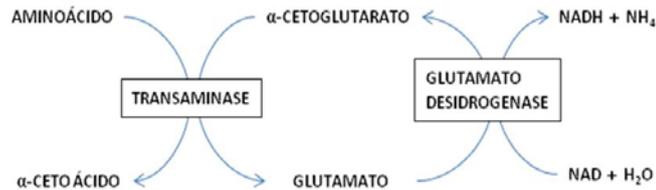


Figura 4 - Reações de transaminação envolvidas na síntese de glutamato.

De acordo com a sua natureza e precursor, a biossíntese de aminoácidos é classificada em seis famílias: (i) glutamina, prolina e arginina derivados do ácido α -cetoglutarico; (ii) metionina, lisina, treonina e isoleucina derivados do oxalacetato via aspartato; (iii) alanina, valina e leucina derivados do piruvato; (iv) serina, glicina e cisteína com 3-fosfoglicerato como precursor; (v) histidina formada a partir de ribose-5-fosfato; e (vi) tirosina, fenilalanina e triptofano que tem o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato como precursores.

Dependendo da disponibilidade de aminoácidos e amônia no mosto, a levedura passa a utilizar o “pool” de aminoácidos, exceto prolina, como fonte de amônia para a síntese de outros aminoácidos e compostos nitrogenados. Neste caso, aminotransferases ou transaminases transferem o grupamento amino dos aminoácidos para o ácido α -cetoglutarico gerando glutamato. Durante o processo de desaminação são gerados ácidos cetônicos que devem ser descarboxilados nos aldeídos correspondentes e reduzidos a alcoóis para serem excretados. Assim através de reações de Ehrlich (Figura 5) são formados diversos alcoóis superiores.

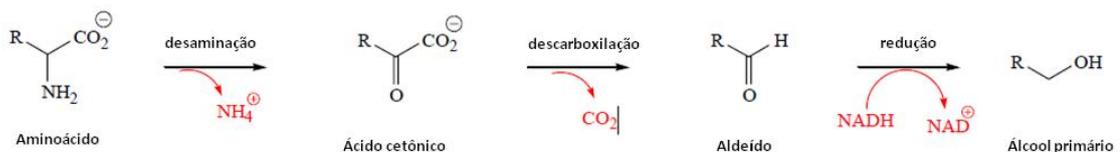


Figura 5 - Produção de álcoois superiores a partir de aminoácidos (Reação de Ehrlich).

Cabe ressaltar que alguns alcoóis superiores, como 1-propanol e 1-butanol, não são derivados do catabolismo de aminoácidos, e que de acordo com dados experimentais, a produção de alcoóis superiores não está diretamente relacionada com a concentração de aminoácidos no mosto (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Tabela 1 - Principais alcoóis superiores e seus aminoácidos precursores (adaptado de RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Álcool superior	Aminoácido precursor	Concentração em vinhos mg/L
Álcool isoamílico (3-metil-1-butanol)	Leucina	80-300
Álcool amílico (2-metil-2-butanol)	Isoleucina	30-100
Álcool isobutírico (2-metil-1-propanol)	Valina	50-150
Feniletanol	Fenilalanina	10-100
Tirosol	Tirosina	20-50
Triptofol	Triptofano	0-1
Butirolactona	Ácido glutâmico	0-5
Metionol	Metionina	0-5
1-Propanol	---	10-50
1-Butanol	---	1-10

Com exceção do feniletanol, que outorga aroma de rosas, os alcoóis superiores apresentam aromas desagradáveis definidos como solvente (álcool isoamílico) ou repolho cozido (metionol). Porém quando acetilados, através da atividade esterásica das próprias leveduras, dão origem a ésteres que podem apresentar aroma agradável como o acetato de isoamila (banana) ou acetato de feniletila (rosas). Além destes, ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média, formados pela condensação de acetil-CoA, são importantes componentes aromáticos com descritores como flores e frutas. Os ésteres são em geral hidrolizados durante o envelhecimento em garrafa, sendo característicos de vinhos jovens.

Assim como outros compostos oriundos da fermentação, a produção de alcoóis superiores, seus ésteres e ésteres de ácidos graxos são altamente dependentes da cepa de levedura, sendo a sua produção objeto do melhoramento genético destes organismos (PRETORIUS, 2000).

Além da energia, carbono e nitrogênio, as leveduras necessitam de enxofre para a síntese de alguns aminoácidos (metionina e cisteína) e outros componentes importantes da estrutura e metabolismo. Em fermentações vínicas as fontes de enxofre utilizadas pelas leveduras são sulfatos, sulfito, enxofre elementar e aminoácidos sulfurados. O sulfito é usualmente adicionado durante a produção de vinhos brancos e tintos como agente antimicrobiano e antioxidante, sendo em parte metabolizado pela levedura. Já o sulfato e aminoácidos estão presentes na uva e, conseqüentemente, nos mostos. Se por um lado o enxofre não representa um sério problema nutricional na vinificação, os compostos voláteis do seu metabolismo estão entre os produtos com menor limiar de detecção podendo, dependendo do composto, apresentar efeito benéfico ou prejudicial em vinhos.

Os principais compostos sulfurados voláteis em vinhos são o sulfeto de hidrogênio, sulfetos, tióis, tiolesteres, alcoóis superiores com enxofre, compostos heterocíclicos sulfurados e tióis voláteis com aromas frutados (ex. 4-mercapto-4-metilpentan-2-one, 3-mercaptohexanol, e 3-mercaptohexil acetato). A presença e concentração destes compostos no vinho depende da variedade, condições edafoclimáticas, tratos culturais, cepa de levedura e condições de fermentação. Segundo Swiegers e Pretorius (2007) é possível através de seleção e melhoramento de leveduras controlar a produção de compostos sulfurados de forma a otimizar as características varietais e reduzir os defeitos associados à produção de alguns destes metabólitos. Um dos produtos de aroma desagradável gerados no metabolismo de enxofre é o gás sulfídrico oriundo de compostos inorgânicos e cisteína. A sua produção é afetada pela composição do meio e pelas características metabólicas da cepa de levedura, especialmente a atividade de sulfato permease, ATP-sulfurilase e sulfito redutase, e a produção de moléculas capazes de sequestrar H₂S como acetilserina e acetilhomoserina (PRETORIUS, 2000; MENDES-FERRREIRA et al., 2010).

Outros compostos sulfatados de relevância em vinhos são os mercaptanos originados pela reação do gás sulfídrico com etanol (etil mercaptano) ou acetaldeído (etanetiol), ou ainda dietildisulfito decorrente da reação entre duas moléculas de etil mercaptano, ou mercaptohexanol e mercaptohexilacetato formados pela reação do etil mercaptano com os ácidos graxos correspondentes (MOREIRA et al., 2002).

Além dos subprodutos do metabolismo, as leveduras participantes da fermentação vínica são responsáveis por diversos processos de biotransformação de precursores presentes nos mostos alterando as características organolépticas dos vinhos produzidos. Apenas como exemplos, diversas espécies de leveduras no-*Saccharomyces* e algumas cepas de *Saccharomyces* produzem β -glicosidases com atividade em baixo pH capazes de liberar os terpenos dos seus respectivos *O*-glicosídeos não voláteis presentes nos mostos de uvas aumentando a intensidade de aromas varietais (HERNÁNDEZ et al., 2003; FIA et al., 2005). Além disso, algumas cepas de *Saccharomyces* são capazes de produzir quantidades substanciais de monoterpenos (geraniol, linalol, citronelol, α -terpineol) (CARRAU et al., 2005) ou biotransformar os monoterpenos (KING e RICHARD DICKINSON, 2000) acrescentando ou alterando características organolépticas aos vinhos.

Por outro lado, leveduras não-*Saccharomyces*, particularmente *Brettanomyces bruxellensis* (SUÁREZ et al., 2007), mas também algumas cepas de *Saccharomyces* (CHATONNET et al., 1993; GRANDO et al., 1993), possuem a capacidade de produzir fenóis voláteis (etil ou vinilfenóis) a partir de ácidos hidroxicinâmico, cumárico e ferúlico

presentes nos mostos. Dependendo da concentração, estes fenóis voláteis podem imprimir características desejáveis ou indesejáveis nos vinhos.

As leveduras durante a fase de crescimento multiplicam-se durante 6 ou 7 gerações, gerando uma população máxima de aproximadamente 120 a 130x10⁶ células por mL, para um inoculo inicial de 10⁶ células por mL (FLANZY, 2003). Porém, durante a fase adiantada da fermentação, e particularmente, ao término da mesma, as leveduras entram num declínio metabólico que acaba em morte da maior parte da população. As deficiências nutricionais e o estresse imposto pelo acúmulo de etanol e outros compostos induz a um processo de reciclo de constituintes celulares denominado de autofagia. A autofagia, definida como um processo intracelular que envolve a degradação de componentes citoplasmáticos, inclusive organelas, em lisossomos/vacúolos, apresenta um complexo sistema de regulação e é induzida principalmente por deficiência no suprimento de nitrogênio (KLIONSKY, 2005; FARRÉ et al., 2009). Se inicialmente a autofagia garante a sobrevivência celular, com o passar do tempo e mantidas as condições de deficiência nutricional e estresse, a autofagia leva à morte celular e autólise das leveduras. Quando a célula de levedura sofre autólise libera no meio uma ampla gama de compostos intracelulares pré-processados pelo sistema autofágico, além de componentes de membrana celular e parede (manoproteínas e glucanos) que contribuem de forma importante nas características organolépticas dos espumantes (SARACCO e GOZZELINO, 1995; LEPE e LEAL, 2004; ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006).

2.7 ANÁLISE SENSORIAL DOS VINHOS ESPUMANTES

As características de um vinho, sejam qualidades ou defeitos, estão evidentemente ligadas à sua composição química e às substâncias que ele contém por sua natureza de bebida fermentada a base de uva (PEYNAUD e BLOUIN, 2010).

Os mecanismos da percepção sensorial entre um determinado estímulo e a resposta do degustador constam de três passos. O estímulo aciona o órgão do sentido, é convertido em sinal nervoso e é transmitido ao cérebro. Tendo uma experiência prévia memorizada, o cérebro interpreta, organiza e integra as novas sensações em percepção. Por fim, uma resposta é formulada, fundamentada nas percepções do degustador (MIELE e MIOLO, 2003).

A avaliação sensorial do vinho espumante pressupõe a passagem por quatro etapas distintas: apreciação através dos sentidos – visão, olfato, gosto, tato e audição; descrição das

sensações percebidas; comparação dessas sensações com a de outros vinhos e julgamento através de um parecer. A avaliação sensorial do vinho espumante, devido à presença do dióxido de carbono, é mais complexa em comparação aos vinhos brancos tranquilos. As borbulhas além do prazer visual e gustativo que despertam, contribuem com a fineza aromática detectada tanto através do olfato como no gosto (MIELE E MIOLO, 2003).

No exame visual, o vinho espumante elaborado pelo processo champenoise apresenta cor amarela-palha com pouca intensidade, e encontra-se límpido e brilhante na maioria dos casos. O vinho espumante libera uma quantidade elevada de bolhas de dióxido de carbono, elas potencializam o aroma e o gosto e também protegem o vinho de oxidações. Em relação a espuma deve-se observar sua cor, reflexos, suas características e persistência (TONET, 2007). Avalia-se a qualidade da espuma pela sua fineza, pela persistência da liberação e pelo alinhamento do cordão de bolhas na parede do copo (PEYNAUD e BLOUIN, 2010).

O aroma do vinho espumante pode ser percebido por via nasal direta e através da boca, na via retro nasal. A olfação representa a fase da degustação mais complexa e mais interessante. É através das sensações olfativas que estão os critérios mais importantes do julgamento da qualidade dos vinhos espumantes. Em relação ao aroma do vinho espumante, a sua qualidade se expressa na presença de aromas primários, originados da própria uva, de aromas secundários, produzidos pelas leveduras na fermentação alcoólica e na tomada de espuma e por aroma terciário, originário da autólise das leveduras, que contribuem na complexidade aromática e que são considerados verdadeiros marcadores qualitativos (LONA, 1999; HERNANDEZ, 2003).

Na análise gustativa, os sabores do vinho base devem se destacar. A harmonia acidez/açúcares/gás carbônico se verifica quando nenhum dos três componentes se destaca (LONA, 1999). A presença de gás carbônico influencia diretamente nos equilíbrios fundamentais dos sabores (PEYNAUD e BLOUIN, 2010).

A persistência é expressa em relação ao tempo da sensação gosto-olfativa na boca, medida em segundos depois de ter ingerido o vinho. A sensação final deixada pelo vinho espumante é devida aos estímulos produzidos pela reação química da saliva com o resto de vinho que fica na boca. Esta sensação é positiva quando se percebe um aroma fino, frutado e suave, formando um conjunto harmônico perfeito (CAVAZZANI, 1989).

A taça ideal para avaliação do vinho espumante apresenta a forma de tulipa ou “flutê” (LONA, 1999). Os modelos oficiais da Associação Francesa de Normas Técnicas (AFNOR) e Instituto Nacional de Apelação de Origem (INAO) podem ser utilizados. As taças utilizadas para avaliação sensorial do vinho espumante devem ter volume suficiente para evitar a perda

do dióxido de carbono e um aumento rápido da temperatura; altura suficiente, importante para avaliar a migração das borbulhas para a superfície (perlage); borda superior inclinada para dentro na parte superior, para favorecer a concentração do aroma (MIELE E MIOLO, 2003).

A avaliação sensorial científica deve ser realizada em uma sala adequada sem odores que interfiram (como perfumes, pinturas) e sem ruídos tanto internos como externos. A luminosidade deve ser luz branca semelhante à luz do dia. A temperatura não deve ser nem muito quente nem muito fria, de 18 a 20 °C é a mais adequada. A mesa deve ser branca. Os degustadores devem estar isolados para evitar comentários e gestos e garantir o silêncio no ambiente. Os degustadores não devem fumar e ingerir café antes das avaliações (MIELE E MIOLO, 2003).

Para que a avaliação sensorial dos vinhos espumantes permita a comparação dos mesmos e o tratamento estatísticos dos resultados, são utilizadas fichas de degustação onde os degustadores atribuem nota na escala de 1 a 5, a cada um das principais descritores: visuais, olfativos e gustativos. A nota da qualidade global (1 a 100) é independente das notas parciais.

Uma vez realizada a avaliação sensorial, as fichas são processadas e os valores obtidos são explorados estatisticamente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 VINHO BASE

A elaboração do vinho base e os experimentos foram realizados na Vinícola Cia Piagentini. Foi utilizado um vinho base branco, safra 2012, elaborado com as variedades Chardonnay e Pinot Noir oriundas da Serra Gaúcha.

Para a escolha do vinho base foram observados os principais parâmetros para elaboração de vinhos espumantes de alta qualidade. O “assemblage” do vinho base foi realizado após o término da fermentação alcoólica, sendo a composição final de 70% Chardonnay e 30% Pinot Noir.

Não foi realizada a fermentação malolática ao vinho base. Foi realizada a estabilização protéica com a adição de 50 g/hL de bentonite enológica (Pentagel[®] - Perdomini IOC) durante oito dias, também foi submetido a estabilização tartárica à frio por dez dias a temperatura controlada de - 3°C.

Previamente à inoculação das leveduras, o vinho base passou por uma filtração em módulos filtrantes de 0,4 micras, a fim de remover leveduras e bactérias indesejáveis.

Todo o processo de produção do vinho base seguiu as rotinas da vinícola na qual os experimentos foram conduzidos.

3.2 LEVEDURAS UTILIZADAS NA SEGUNDA FERMENTAÇÃO

Tabela 2 – Leveduras selecionadas comerciais secas ativas utilizadas na segunda fermentação

Identificação	Nome comercial	Produtor	Espécie*
VL3	Zymaflore VL3 [®]	Laffort	<i>S. cerevisiae</i>
X5	Zymaflore X5 [®]	Laffort	<i>S. cerevisiae</i>
X16	Zymaflore X16 [®]	Laffort	<i>S. cerevisiae</i>
Delta	Blastosel Delta [®]	Perdomini- IOC	<i>S. cerevisiae</i> <i>rf. bayanus</i>
PDM	Maurivin PDM [®]	Maurivin	<i>S. cerevisiae</i> <i>rf. bayanus</i>
Spark	Zymaflore Spark [®]	Laffort	<i>S. cerevisiae</i> <i>rf. bayanus</i>
SP 665	La Claire SP665 [®]	Perdomini- IOC	<i>S. cerevisiae</i> <i>rf. bayanus</i>
EC1118	Lalvin EC1118 [®]	Lallemand	<i>S. cerevisiae</i> <i>rf. bayanus</i>

* *rf* - raça fenotípica

Segundo seus fabricantes as leveduras possuem as seguintes características:

- Zymaflore VL3[®]

Cepa com excelente capacidade para revelar os aromas varietais do tipo tióis (Sauvignon blanc, Albarino e Verdejo). É indicada para a elaboração de vinhos brancos varietais e elegantes. Apresenta boa tolerância ao álcool (até 14,5% v/v), elevadas necessidades de nitrogênio, amplo intervalo de temperaturas de fermentação (15 - 21°C), baixa produção de acidez volátil e boa aptidão para envelhecimento sobre borras. É classificada como *S. cerevisiae*.

- Zymaflore X5[®]

Selecionada por meio de uma nova tecnologia de cruzamento desenvolvida pelo Laboratório SARCO da Laffort Oenologie em colaboração com a Universidade de Bordeaux. Excelente cepa na revelação de aromas varietais do tipo tióis e uma boa produção de aromas fermentativos. Indicada para a elaboração de vinhos brancos frescos e complexos, Demonstra forte cinética fermentativa e tolerância ao álcool (até 16% v/v), mesmo em mostos de baixa turbidez e a baixas temperaturas. Produz baixos teores de acidez volátil e de H₂S. É recomendada para variedades brancas aromáticas como Pinot Gris, Riesling, Gewürztraminer e Sauvignon Blanc. É classificada como *S. cerevisiae*.

- Zymaflore X16[®]

Estirpe proveniente de cruzamento, conjugando uma excelente produção de ésteres fermentativos, conservando um perfil aromático fino e nítido e uma segurança fermentativa mesmo em condições difíceis com baixa turbidez e temperatura. Levedura para vinhos brancos modernos e aromáticos com forte produção de aromas fermentativos. Apresenta uma cinética de fermentação particularmente rápida, com boa tolerância ao álcool (até 16% v/v), baixas necessidades de nitrogênio, baixa produção de acidez volátil e de H₂S. Cepa pof (-): não possui cinamate descarboxilase, responsável pela formação de vinis-fenóis, “mascaradores” de aromas ou responsáveis por notas pesadas. É classificada como *S. cerevisiae*.

- Blastosel Delta[®]

Levedura com alta tolerância ao álcool (até 18% v/v), com baixa exigência nutricional, ampla temperatura de fermentação (12 - 35 °C), é caracterizada por baixa produção de acidez volátil e de acetaldeído, assim como de SO₂ e H₂S. As características fermentativas, nutricionais e

aromáticas sugerem a sua utilização tanto na elaboração de vinhos brancos quanto na tomada de espuma na garrafa ou em autoclave. É classificada como *S. cerevisiae* *rf. bayanus*.

- Maurivin PDM[®]

Selecionada por suas características aromáticas médias, é adequada para fermentação a baixas temperaturas devido a seu vigor inerente e é um fermentador rápido a temperaturas mais elevadas (20 - 30°C). Apresenta uma tolerância alcoólica no intervalo de 15 - 17% v/v, acidez volátil inferior a 0,3 g/L. É uma cepa de formação de espuma baixa a moderada, tem propriedades excelentes de sedimentação após a fermentação alcoólica. É considerada média produtora de SO₂ (até 40mg/L SO₂ Total), produz níveis moderados a baixos de compostos aromáticos e de sabor no vinho. É uma cepa de levedura para fins gerais, recomendada para a produção de vinhos brancos e tintos, e também é adequada para produção de vinhos espumantes pelo Método Champenoise. É classificada como *S. cerevisiae* *rf. bayanus*.

- Zymaflore Spark[®]

Cepa especificamente selecionada por sua destacável fineza aromática e sua resistência fermentativa as condições mais difíceis. Adequada para fermentação de vinhos brancos, rosados e tintos em condições extremas, na tomada de espuma e nas refermentações de mosto/vinhos em situação de parada de fermentação. Apresenta alta tolerância ao álcool (até 17% v/v), ampla temperatura de fermentação (10 - 32°C), baixas necessidades de nitrogênio, baixa produção de acidez volátil e de H₂S, fase de latência muito curta. É classificada como *S. cerevisiae* *rf. bayanus*.

- La Claire SP 665/P[®]

Cepa de levedura isolada e selecionada na região de Champagne, França. Elegância, fineza e complexidade aromática são características organolépticas exaltadas por esta cepa. Levedura produtora de elevados níveis de acetatos, ésteres e álcoois superiores, com alta tolerância ao álcool (até 18° v/v), ampla temperatura de fermentação (10 - 30 °C), elevada resistência ao SO₂, produção baixa de SO₂, produção insignificante de acidez volátil, produção insignificante de H₂S, boa produção de glicerina, possui fator Killer e baixa necessidade de nutrientes. Levedura selecionada para vinhos brancos, espumantes e para o tratamento de fermentações difíceis ou interrompidas. É classificada como *S. cerevisiae* *rf. bayanus*.

- Lalvin EC1118®

Fermenta bem a baixas temperaturas, flocula bem, formando borras compactas. É adequada para a elaboração de vinhos base para espumantes, para a tomada de espuma (segunda fermentação), para reiniciar paradas fermentativas e também para a elaboração de vinhos com uvas de colheita tardia. É também muito utilizada para fermentação em barricas de carvalho. Sob condições de baixos níveis de nutrientes, no entanto, produz muito SO₂ (até 30 ppm) e, como consequência, pode inibir a fermentação malolática. Fermenta relativamente rápido e tem excelentes propriedades organolépticas. Sua toxicidade alcoólica é de 18% v/v. Tolerar temperaturas de 4 a 35°C, porém não é tolerante às fermentações alcoólica e malolática simultaneamente. É classificada como *S. cerevisiae* *rf. bayanus*.

3.3 REIDRATAÇÃO, PÉ-DE-CUBA E SEGUNDA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Para a reidratação das leveduras, foi utilizado o preparador de leveduras (Superstart® - Laffort), na dosagem de 30 g/hL, este produto aporta durante a reidratação da levedura, os elementos essenciais que constituem a membrana, melhoram a fluidez, a resistência ao álcool e o bom funcionamento dos transportadores de açúcares.

As preparações dos pés de cuba e a suas inoculações foram realizadas seguindo os processos enológicos tradicionais, com inóculos entre 2 a 3x10⁶ cel/mL determinada por contagem microscópica.

Para a segunda fermentação, o nitrogênio prontamente assimilável (NPA) foi corrigido para 180 mg/L, com fosfato de amônia e tiamina (Thiazote® - Laffort).

Foi adicionado ao vinho base 20 g/hL (Bioarom® - Laffort), que é um bioproduto de levedura com alto poder redutor (glutation), para proteção de aromas. Também foram adicionados 24 g/L de açúcar (sacarose) no vinho base, para obter uma pressão final natural de seis atmosferas e 5 g/hL de bentonite (Pentagel® - Perdomini IOC).

A segunda fermentação e o período de envelhecimento sobre as borras ocorreram em ambiente climatizado, onde foi controlada a temperatura no intervalo de 12 a 14°C.

Após a maturação de seis meses sobre as borras, o espumante passou pelo processo de “remuage” onde foi colocado em pupitres de madeira durante 20 dias. Posteriormente a parte superior da garrafa foi submersa em uma solução hidroalcoólica na temperatura de aproximadamente -20°C para que o precipitado congelasse, facilitando a remoção. Em seguida, as garrafas foram novamente fechadas com tampas metálicas. Nesta etapa não foi

adicionado o licor de expedição para não interferir nas características organolépticas do vinho espumante.

Foram elaborados 15 garrafas de espumante para cada cepa distinta de levedura e também foram engarrafadas 15 garrafas do vinho base, totalizando 135 garrafas.

3.4 ANÁLISES DO VINHO BASE E ESPUMANTES

3.4.1 Análises físico-químicas

As análises clássicas foram realizadas no Laboratório Lavin e as análises dos compostos voláteis foram realizadas no Laboratório de Referência Enológica (LAREN) da Secretaria de Agricultura e Agronegócio do Estado do Rio Grande do Sul.

3.4.1.1 Análises clássicas

As análises clássicas foram realizadas segundo as recomendações estabelecidas pela legislação vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL 2005).

Foram analisadas as variáveis básicas: Densidade (g/ml), Álcool (% v/v), Acidez total (meq/L), Acidez volátil (meq/L), Acidez fixa (meq/L), pH, Extrato seco (g/L), Açúcares redutores (g/L), Extrato seco reduzido (g/L), Relação álcool/extrato seco, Cinzas (g/L), Absorbância (420_{nm}), SO_2 livre (mg/L) e SO_2 total (mg/L).

3.4.1.2 Análise dos compostos voláteis

3.4.1.2.1 Determinação de álcoois superiores, etanal, acetato de etila e metanol

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).

A análise partiu do destilado de 100 mL de vinho, sendo que sobre uma alíquota de 5 mL foram adicionada 70 μ L de uma solução 5 g/L de 4-metil-2-pentanol (padrão interno). O cromatograma obtido foi comparado com o cromatograma de uma solução dos padrões envolvidos, segundo o método do padrão interno.

Para esta análise, 1,0 μ L da amostra foi injetada no cromatógrafo no modo “split” com divisão 60 mL/min a 220 °C. Foi utilizada uma coluna capilar CPWax 57CB de 60 m de

comprimento, 250 μm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme. O gás vetor foi hidrogênio 5.0 em fluxo de 2,0 mL/min e nitrogênio, como gás auxiliar, a 37 mL/min. As condições de temperatura do forno foram: 40 °C por 5 min; 40 a 100 °C a 3 °C /min; 100 a 220 °C a 7 °C /min; 220 °C por 10 min. A combustão foi mantida com fluxo de ar sintético em 400 mL/min e hidrogênio 5.0 em 35 mL/min. A temperatura do detector foi controlada em 230 °C. Uma solução estoque dos padrões, em solução hidroalcoólica 50 % v/v na concentração de 1,0 g/L, foi preparada e conservada sob refrigeração. O controle foi feito com solução estoque diluído em 2:10 e a linearidade e a repetibilidade do método observadas conforme procedimento da análise descrito anteriormente.

3.4.1.2.2 Determinação de acetatos, ésteres e ácidos graxos

A determinação do conteúdo de 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). Em 50 mL da amostra foram adicionados 1 mL de 3-octanol e 1 mL de ácido heptanóico, ambos a 50 mg/L como padrões internos, sendo a mistura acidificada com 0,3 mL de ácido fosfórico 1:3. Nestas condições, foram submetidas três extrações líquido/líquido sucessivas na ordem volumétrica 4:2:2 de uma mistura dos solventes orgânicos éter/hexano (1:1). A fase orgânica foi mantida em contato com a amostra por meio da agitação intensa em agitador magnético durante 5 min. Os extratos de cada extração foram então recolhidos através da separação das fases em funil de separação e colocados em "vial" para serem analisados em CG-DIC. O cromatograma resultante permitiu identificar e quantificar ésteres.

Os picos cromatográficos obtidos foram comparados com aqueles encontrados no cromatograma da solução de padrões (concentrações conhecidas) das substâncias envolvidas, conforme método do padrão interno. Uma solução estoque dos padrões, em solução hidroalcoólica 50 % v/v em concentrações próximas a 1,0 g/L, foi preparada e conservada sob refrigeração. O cromatograma padrão foi obtido pela diluição da solução estoque em 1:100, seguindo o procedimento de análise descrito anteriormente.

Para esta análise, 2,0 μL da amostra foram injetados no cromatógrafo no modo "splitless" com divisão 60 mL/min a 240 °C. Foi utilizada uma coluna capilar CP Inowax de 30m de comprimento, 250 μm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme. O gás vetor foi hidrogênio 5.0 em fluxo de 2,0 mL/min e nitrogênio, como gás auxiliar, a 37 mL/min. As condições de temperatura do forno foram: 40 °C por 5 min; 40 a 230 °C a 3°C

min; 230 °C por 20 min. A combustão foi mantida com fluxo de ar sintético em 400 mL/min e hidrogênio 5.0 em 35 mL/min. A temperatura do detector foi de 230 °C.

3.4.1.2.2 Valor Olfativo Ativo (OAV) e limiares de percepção

O valor olfativo ativo é definido como a relação entre a concentração de um composto e o seu limiar de percepção. Este valor é geralmente utilizado para avaliar a contribuição sensorial de um dado composto (GUTH, 1997).

No presente trabalho foram empregados os limites de percepção citados por Lambrechts e Pretorius (2000) e por Louw et al (2010) no caso do dietil succinato.

3.4.2 Avaliação sensorial

As análises sensoriais foram realizadas seis meses após a tomada de espuma na sala de degustação do Laboratório de Análise Sensorial da Embrapa (CNPUV) de Bento Gonçalves - RS. O vinho base e os espumantes foram avaliados por um painel de onze degustadores experimentados. A avaliação foi realizada através de análise sensorial utilizando metodologia de análise quantitativa descritiva (LAWLESS e HEYMANN, 1998). Os vinhos foram avaliados imediatamente após a abertura das garrafas. Os degustadores avaliaram um conjunto de descritores que incluíram características visuais, olfativas e gustativas. A intensidade de cada atributo foi ranqueado numa escala de 0 a 5, onde: 0 – indicador não percebido, 1- muito baixo, 2- baixo, 3- intermediário, 4- elevado e 5- muito elevado. Os degustadores outorgaram uma nota (0 a 100) para qualidade global considerando a percepção organoléptica geral. Durante o experimento, as notas e opiniões dos degustadores permaneceram confidenciais. Os vinhos foram servidos no mesmo tipo de taça. Cada degustador avaliou o vinho base e duas amostras de cada espumante em esquema de blocos casualizados.

3.4.3 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico através do programa SPSS 12.0 for Windows. Após a constatação da distribuição normal dos resultados, os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e comparadas as médias pelo teste de Tukey ao nível de 0,05 de significância. Além destes, foi realizada a análise de Componentes Principais (CP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO VINHO BASE E DOS ESPUMANTES

O vinho base, obtido a partir de mistura de vinhos Chardonnay e Pinot Noir safra 2012, apresentou teor alcoólico de 11,43 % (v/v), baixa concentração de açúcares redutores residuais (1,2 g/L), acidez total e volátil relativamente baixas, 84,57 e 5,5 meq/L, respectivamente, e concentração relativamente baixa de dióxido de enxofre livre (26,23 mg/L). Estes e outros parâmetros apresentados na Tabela 3 são semelhantes àqueles encontrados por Poerner et al. (2010) numa avaliação de vinhos base Chardonnay e Pinot Noir da Serra Gaúcha, indicando que o vinho base utilizado no presente trabalho representa aqueles típicos da região. O vinho base empregado encontra-se dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para vinhos brancos finos secos (BRASIL, 1998) e nas normas do MERCOSUL (2002).

Após a adição de açúcar, leveduras e coadjuvantes para início da segunda fermentação ou tomada de espuma, o vinho apresentou 24,1 g/L de açúcares totais, com consequente aumento do extrato seco e densidade, 10,80 % (v/v) de álcool, sem importantes alterações no pH, e redução na acidez total e volátil e na concentração de dióxido de enxofre total e livre (Tabela 3).

Os espumantes obtidos, independente das leveduras utilizada na segunda fermentação, apresentaram teor alcoólico médio de 12,01 % (v/v) e açúcar residual de 1,78 g/L (Tabela 3), indicando que em todos os casos a segunda fermentação foi concluída de forma adequada. De um modo geral, apesar de baixas concentrações, os espumantes apresentaram maior acidez volátil do que o vinho base, particularmente naqueles conduzidos com as leveduras VL3, Delta e EC1118. A comparação entre os espumantes mostrou diferenças significativas no pH, com valores menores nos espumantes obtidos com as leveduras Delta, PDM, Spark, SP665 e EC1118, e acidez total com valores mais elevados para os espumantes obtidos com as leveduras X16, Delta, PDM, Spark e SP665.

O pequeno aumento de acidez total durante a segunda fermentação pode ser atribuído à produção de ácidos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, particularmente ácido succínico (RIBERAU-GAYON et al, 2006), enquanto o aumento na acidez volátil pode estar relacionado com a produção de ácido acético pela levedura ou pelo processo de hidrólise dos

ésteres ao longo do envelhecimento do espumante (LAMBRECHTS e PRETORIOUS, 2000; RIBERAU-GAYON et al., 2006).

Por sua vez, a diminuição na concentração de dióxido de enxofre livre observada nos espumantes avaliados pode ser atribuída à conjugação do SO_2 com diversos compostos, principalmente aldeídos e cetonas, nas condições de baixo pH, alta concentração de etanol e relação redox encontrada durante a segunda fermentação e envelhecimento dos espumantes (RIBERAU-GAYON et al., 2006).

De um modo geral, poucas variações foram encontradas entre os espumantes obtidos com as oito leveduras avaliadas quanto as análises básicas, fato também observado por Torrens et al. (2010).

Tabela 3 - Análises básicas do vinho base e dos espumantes obtidos com oito cepas de leveduras.

	Densidade relativa	Álcool % v/v	Açúcares totais (g/L)	Extrato seco total (g/L)	Extrato seco reduzido (g/L)	Relação álcool/ESRed (g/L)	pH
Vinho base	0,9920 ± 0,0002 ^B	11,43 ± 0,10 ^B	1,2 ± 0,1 ^{BC}	18,50 ± 1,73 ^B	18,30 ± 1,67 ^A	5,00 ± 0,36 ^{AB}	3,21 ± 0,02 ^A
Base com açúcar	1,0019 ± 0,0001 ^A	10,80 ± 0,10 ^C	24,1 ± 0,1 ^A	42,20 ± 1,73 ^A	19,01 ± 1,67 ^A	4,50 ± 0,31 ^B	3,20 ± 0,01 ^A
VL3	0,9919 ± 0,0002 ^{BC}	12,06 ± 0,15 ^A	1,8 ± 0,1 ^B	20,30 ± 1,53 ^B	19,50 ± 1,47 ^A	4,90 ± 0,30 ^{AB}	3,21 ± 0,00 ^A
X5	0,9916 ± 0,0001 ^E	12,07 ± 0,15 ^A	1,8 ± 0,1 ^B	19,50 ± 2,08 ^B	18,70 ± 2,03 ^A	5,20 ± 0,45 ^A	3,21 ± 0,01 ^A
X16	0,9917 ± 0,0001 ^{DE}	12,06 ± 0,10 ^A	1,8 ± 0,1 ^B	19,80 ± 1,73 ^B	19,00 ± 1,67 ^A	5,10 ± 0,36 ^{AB}	3,18 ± 0,02 ^B
Delta	0,9919 ± 0,0002 ^{BC}	12,01 ± 0,10 ^A	1,7 ± 0,1 ^B	20,00 ± 2,08 ^B	19,30 ± 2,03 ^A	5,00 ± 0,44 ^{AB}	3,15 ± 0,00 ^C
PDM	0,9917 ± 0,0001 ^{DE}	11,99 ± 0,10 ^A	1,8 ± 0,1 ^B	19,40 ± 1,73 ^B	18,60 ± 1,67 ^A	5,20 ± 0,37 ^A	3,16 ± 0,01 ^C
Spark	0,9918 ± 0,0001 ^{CDE}	11,97 ± 0,15 ^A	1,8 ± 0,1 ^B	19,80 ± 1,53 ^B	19,00 ± 1,47 ^A	5,00 ± 0,32 ^{AB}	3,15 ± 0,00 ^C
SP665	0,9917 ± 0,0001 ^{DE}	12,01 ± 0,15 ^A	1,7 ± 0,1 ^B	19,70 ± 1,73 ^B	19,00 ± 1,67 ^A	5,10 ± 0,33 ^{AB}	3,15 ± 0,00 ^C
EC1118	0,9919 ± 0,0001 ^{BC}	11,95 ± 0,10 ^A	1,8 ± 0,1 ^B	19,90 ± 1,53 ^B	19,10 ± 1,48 ^A	5,00 ± 0,33 ^{AB}	3,16 ± 0,01 ^C
	Acidez total (meq/L)	Acidez volátil (meq/L)	Acidez fixa (meq/L)	SO ₂ livre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	Cor (abs 420nm)	Cinzas (g/L)
Vinho base	84,57 ± 0,15 ^A	5,50 ± 0,50 ^E	79,07 ± 0,35 ^A	26,23 ± 2,52 ^A	148,30 ± 6,56 ^A	0,071 ± 0,001 ^A	1,8 ± 0,1 ^{AB}
Base com açúcar	82,33 ± 1,15 ^C	4,83 ± 0,32 ^F	77,50 ± 1,47 ^B	15,80 ± 3,00 ^B	109,57 ± 8,08 ^B	0,065 ± 0,002 ^B	1,7 ± 0,1 ^B
VL3	82,13 ± 0,06 ^C	7,20 ± 0,26 ^{AB}	74,73 ± 0,29 ^D	9,90 ± 3,00 ^C	114,80 ± 10,00 ^B	0,067 ± 0,001 ^B	2,0 ± 0,1 ^A
X5	82,00 ± 0,00 ^C	6,30 ± 0,26 ^{CD}	75,70 ± 0,26 ^{CD}	7,07 ± 2,52 ^C	107,47 ± 8,08 ^B	0,070 ± 0,003 ^{AB}	1,7 ± 0,1 ^B
X16	83,30 ± 0,00 ^B	6,87 ± 0,29 ^{BC}	76,43 ± 0,29 ^{BC}	8,47 ± 2,08 ^C	111,70 ± 10,00 ^B	0,066 ± 0,002 ^B	1,9 ± 0,1 ^A
Delta	83,30 ± 0,00 ^B	7,67 ± 0,55 ^A	75,63 ± 0,55 ^{CD}	10,70 ± 3,00 ^C	121,50 ± 9,00 ^B	0,064 ± 0,005 ^B	1,8 ± 0,0 ^{AB}
PDM	82,67 ± 0,58 ^{BC}	6,10 ± 0,26 ^D	76,57 ± 0,84 ^{BC}	7,37 ± 2,08 ^C	115,00 ± 10,00 ^B	0,065 ± 0,001 ^B	1,8 ± 0,2 ^{AB}
Spark	83,27 ± 0,12 ^B	6,80 ± 0,26 ^{BC}	76,47 ± 0,32 ^{BC}	10,70 ± 3,00 ^C	124,60 ± 10,00 ^B	0,061 ± 0,002 ^B	1,8 ± 0,1 ^{AB}
SP665	83,30 ± 0,10 ^B	6,90 ± 0,26 ^{BC}	76,40 ± 0,20 ^{BC}	7,87 ± 2,08 ^C	122,43 ± 9,02 ^B	0,063 ± 0,002 ^B	1,8 ± 0,1 ^{AB}
EC1118	82,00 ± 0,00 ^C	7,23 ± 0,32 ^{AB}	74,77 ± 0,32 ^D	7,73 ± 2,52 ^C	120,67 ± 9,50 ^B	0,064 ± 0,003 ^B	1,8 ± 0,0 ^{AB}

* Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A concentração (mg/L) de 27 compostos aromáticos no vinho base e os espumantes (segunda fermentação) obtidos com as oito leveduras encontra-se na Tabela 4. Como pode ser observado, apenas não foram detectadas diferenças significativas no conteúdo de acetato de hexila, ácido butírico e ácido hexanóico. Por outro lado, diferenças significativas entre o vinho base e os espumantes foram constatadas para cis-3-hexen-1-ol, trans-3-hexen-1-ol, acetato de feniletila, docecanoato de etila, e os ácidos graxos (ácido octanóico, decanóico e dodecanóico).

Dependendo da levedura empregada na segunda fermentação, os espumantes apresentaram variação no conteúdo de etanal (acetaldeído) com concentrações inferiores ao vinho base no caso das leveduras X5, X16 e Delta. A variação na concentração de etanal em vinhos obtidos com distintas leveduras tem sido atribuída a diferenças na atividade de álcool desidrogenase (PÉREZ-COELHO et al., 1999) e a diminuição deste composto à sua associação com sulfito (ANTONIELLI et al., 1999). Cabe observar que os vinhos com maior concentração de etanal foram aqueles com menor concentração de acetato de etila, resultando uma correlação negativa e significativa entre estes compostos ($R = -0,560^{**}$). Esta relação pode estar associada à reação de Fisher correspondente à esterificação espontânea do acetaldeído com ácido acético. O acetaldeído em baixas concentrações é considerado um componente aromático favorável, porém, em altas concentrações pode contribuir negativamente para as características aromáticas do vinho (LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000). Segundo Rizzon (2000), os teores de etanal em espumantes devem variar de 60 mg/L a 70 mg/L. As concentrações evidenciadas nos espumantes obtidos no presente trabalho foram inferiores ao limiar de percepção em vinhos (100 mg/L) (LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000), com valor olfativo ativo (OAV) entre 0,3577 e 0,7680.

Variação significativa foi detectada na concentração de metanol entre os espumantes, com valores relativamente baixos quando comparados com aqueles citados por Louw et al. (2010) em um conjunto de vinhos Chardonnay. Por outro lado, as concentrações de 1-propanol foram relativamente elevadas em relação a vinhos Chardonnay jovens (LOUW et al., 2010), porém muito inferiores ao limiar de percepção de 306 mg/L (LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000).

Tabela 4 - Compostos voláteis no vinho base e espumantes obtidos com oito cepas de leveduras.

	Etanal	Metanol	1-propanol	2-metil-1-propanol	2-metil-1-butanol	3-metil-1-butanol	Acetato de etila	Butanoato de etila	Acetato de isoamila
Vinho Base	65,13 ± 6,56 ^A	24,30 ± 2,11 ^{BC}	44,61 ± 2,16 ^{AB}	9,42 ± 0,62 ^D	8,80 ± 0,29 ^B	74,39 ± 1,50 ^A	14,74 ± 4,77 ^C	0,35 ± 0,01 ^A	2,88 ± 0,03 ^A
VL3	64,73 ± 3,64 ^A	28,47 ± 2,47 ^{BC}	37,50 ± 0,78 ^B	12,16 ± 0,88 ^{ABCD}	14,48 ± 0,81 ^{AB}	60,47 ± 2,34 ^B	41,20 ± 8,29 ^A	0,32 ± 0,00 ^B	0,74 ± 0,05 ^C
X5	40,46 ± 19,21 ^{BC}	26,72 ± 3,44 ^{BC}	44,54 ± 1,85 ^{AB}	14,98 ± 2,46 ^{ABC}	15,16 ± 1,07 ^A	62,03 ± 2,72 ^B	36,25 ± 0,61 ^{AB}	0,30 ± 0,02 ^B	0,90 ± 0,05 ^B
X16	35,77 ± 1,27 ^C	25,01 ± 1,12 ^{BC}	39,52 ± 3,37 ^B	13,36 ± 0,49 ^{ABCD}	12,58 ± 3,57 ^{AB}	67,33 ± 1,95 ^{AB}	35,77 ± 1,27 ^{AB}	0,28 ± 0,01 ^{CDE}	0,74 ± 0,01 ^C
Delta	43,59 ± 2,00 ^{BC}	22,05 ± 4,56 ^C	36,42 ± 1,78 ^B	11,21 ± 2,13 ^{CD}	11,46 ± 4,12 ^{AB}	61,59 ± 6,57 ^B	43,59 ± 2,00 ^A	0,29 ± 0,01 ^{CD}	0,72 ± 0,00 ^C
PDM	68,02 ± 2,62 ^A	25,00 ± 3,39 ^{BC}	40,81 ± 3,67 ^B	11,77 ± 0,80 ^{BCD}	11,28 ± 0,91 ^{AB}	61,06 ± 1,57 ^B	29,66 ± 11,70 ^{ABC}	0,28 ± 0,01 ^{CDE}	0,73 ± 0,02 ^C
Spark	65,22 ± 2,27 ^A	31,60 ± 2,97 ^{ABC}	41,85 ± 4,31 ^{AB}	14,96 ± 1,04 ^{ABC}	12,67 ± 0,38 ^{AB}	63,73 ± 2,59 ^{AB}	17,17 ± 4,58 ^C	0,30 ± 0,01 ^{BC}	0,63 ± 0,04 ^D
SP665	57,72 ± 1,24 ^{AB}	33,22 ± 7,09 ^{AB}	46,56 ± 8,63 ^{AB}	15,51 ± 1,97 ^{AB}	13,90 ± 2,43 ^{AB}	68,13 ± 8,58 ^{AB}	20,03 ± 4,06 ^C	0,26 ± 0,02 ^E	0,61 ± 0,03 ^D
EC1118	76,80 ± 0,88 ^A	39,90 ± 2,37 ^A	51,89 ± 3,90 ^A	16,04 ± 1,44 ^A	14,60 ± 1,47 ^{AB}	65,94 ± 3,53 ^{AB}	23,96 ± 1,52 ^{BC}	0,26 ± 0,01 ^{DE}	0,60 ± 0,02 ^D
	Hexanoato de etila	Acetato de hexila	Hexanol	2-fenil etanol	Dietil succinato	Acetato de feniletila	Octanoato de etila	Decanoato de etila	Dodecanoato de etila
Vinho Base	1,00 ± 0,03 ^A	0,07 ± 0,00 ^A	0,37 ± 0,01 ^{AB}	7,87 ± 0,36 ^{AB}	0,21 ± 0,01 ^C	0,15 ± 0,00 ^A	1,08 ± 0,01 ^A	0,49 ± 0,03 ^A	0,02 ± 0,01 ^B
VL3	0,89 ± 0,09 ^{ABCD}	0,07 ± 0,00 ^A	0,32 ± 0,06 ^{AB}	7,45 ± 2,13 ^B	2,13 ± 0,41 ^{AB}	0,06 ± 0,01 ^B	1,05 ± 0,10 ^{AB}	0,17 ± 0,01 ^{BC}	0,07 ± 0,00 ^A
X5	0,95 ± 0,06 ^{AB}	0,05 ± 0,03 ^A	0,28 ± 0,01 ^B	7,39 ± 0,74 ^B	1,79 ± 0,07 ^B	0,07 ± 0,00 ^B	1,03 ± 0,06 ^{AB}	0,18 ± 0,02 ^{BC}	0,07 ± 0,00 ^A
X16	0,94 ± 0,03 ^{AB}	0,07 ± 0,00 ^A	0,32 ± 0,05 ^{AB}	8,02 ± 1,41 ^{AB}	1,92 ± 0,21 ^B	0,07 ± 0,01 ^B	1,09 ± 0,04 ^A	0,18 ± 0,01 ^{BC}	0,05 ± 0,03 ^A
Delta	0,87 ± 0,01 ^{BCD}	0,07 ± 0,00 ^A	0,36 ± 0,01 ^{AB}	9,16 ± 0,22 ^{AB}	2,12 ± 0,01 ^{AB}	0,07 ± 0,01 ^B	1,06 ± 0,02 ^{AB}	0,19 ± 0,01 ^B	0,07 ± 0,00 ^A
PDM	0,92 ± 0,00 ^{ABC}	0,07 ± 0,00 ^A	0,32 ± 0,02 ^{AB}	9,14 ± 0,51 ^{AB}	2,02 ± 0,06 ^{AB}	0,07 ± 0,00 ^B	1,09 ± 0,02 ^A	0,19 ± 0,02 ^{BC}	0,07 ± 0,00 ^A
Spark	0,79 ± 0,06 ^D	0,07 ± 0,00 ^A	0,38 ± 0,03 ^A	10,41 ± 1,07 ^A	2,45 ± 0,17 ^A	0,06 ± 0,00 ^B	0,93 ± 0,06 ^B	0,14 ± 0,00 ^C	0,07 ± 0,00 ^A
SP665	0,80 ± 0,04 ^{CD}	0,07 ± 0,00 ^A	0,33 ± 0,01 ^{AB}	8,64 ± 0,27 ^{AB}	2,07 ± 0,07 ^{AB}	0,06 ± 0,01 ^B	0,94 ± 0,04 ^B	0,15 ± 0,01 ^{BC}	0,07 ± 0,00 ^A
EC1118	0,83 ± 0,03 ^{BCD}	0,07 ± 0,00 ^A	0,33 ± 0,03 ^{AB}	8,61 ± 0,99 ^{AB}	2,10 ± 0,14 ^{AB}	0,06 ± 0,00 ^B	1,00 ± 0,04 ^{AB}	0,17 ± 0,02 ^{BC}	0,07 ± 0,00 ^A
	Cis-3-hexen-1-ol	Trans-3-hexen-1-ol	Ác. isobutírico	Ác. butírico	Ác. isovalérico	Ác. hexanóico	Ác. octanóico	Ác. decanóico	Ác. dodecanóico
Vinho Base	0,09 ± 0,00 ^A	0,10 ± 0,01 ^A	1,00 ± 0,09 ^{BC}	1,89 ± 0,23 ^A	0,75 ± 0,02 ^{ABC}	5,47 ± 0,26 ^A	6,77 ± 0,52 ^A	1,93 ± 0,12 ^A	0,32 ± 0,01 ^A
VL3	0,00 ± 0,01 ^B	0,04 ± 0,01 ^B	1,78 ± 0,39 ^A	2,32 ± 0,46 ^A	1,00 ± 0,25 ^A	5,38 ± 1,02 ^A	5,53 ± 0,09 ^B	0,63 ± 0,04 ^B	0,11 ± 0,01 ^B
X5	0,00 ± 0,00 ^B	0,03 ± 0,02 ^B	0,61 ± 0,47 ^C	1,70 ± 0,19 ^A	0,52 ± 0,06 ^C	4,98 ± 0,23 ^A	5,69 ± 0,19 ^B	0,75 ± 0,09 ^B	0,11 ± 0,01 ^B
X16	0,01 ± 0,01 ^B	0,04 ± 0,01 ^B	1,11 ± 0,15 ^{BC}	2,04 ± 0,21 ^A	0,75 ± 0,12 ^{ABC}	5,54 ± 0,63 ^A	5,81 ± 0,16 ^B	0,69 ± 0,05 ^B	0,11 ± 0,00 ^B
Delta	0,01 ± 0,01 ^B	0,05 ± 0,01 ^B	1,29 ± 0,04 ^{AB}	2,30 ± 0,07 ^A	0,85 ± 0,02 ^{AB}	6,15 ± 0,06 ^A	5,75 ± 0,14 ^B	0,72 ± 0,06 ^B	0,11 ± 0,00 ^B
PDM	0,00 ± 0,00 ^B	0,04 ± 0,02 ^B	0,85 ± 0,11 ^{BC}	2,00 ± 0,11 ^A	0,58 ± 0,03 ^{BC}	5,48 ± 0,36 ^A	5,73 ± 0,23 ^B	0,75 ± 0,07 ^B	0,10 ± 0,00 ^B
Spark	0,01 ± 0,00 ^B	0,05 ± 0,00 ^B	1,27 ± 0,16 ^{AB}	2,17 ± 0,15 ^A	0,80 ± 0,08 ^{ABC}	6,26 ± 0,49 ^A	5,31 ± 0,08 ^B	0,59 ± 0,01 ^B	0,10 ± 0,00 ^B
SP665	0,00 ± 0,01 ^B	0,03 ± 0,03 ^B	0,99 ± 0,04 ^{BC}	1,86 ± 0,08 ^A	0,69 ± 0,02 ^{BC}	5,60 ± 0,10 ^A	5,40 ± 0,07 ^B	0,65 ± 0,03 ^B	0,10 ± 0,00 ^B
EC1118	0,00 ± 0,01 ^B	0,05 ± 0,01 ^B	1,13 ± 0,12 ^{BC}	1,88 ± 0,23 ^A	0,72 ± 0,07 ^{ABC}	5,45 ± 0,38 ^A	5,36 ± 0,11 ^B	0,68 ± 0,04 ^B	0,11 ± 0,01 ^B

Concentrações expressas em mg/L. * Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Entre os alcoóis superiores, variação significativa foi evidenciada para 2-metil-1-propanol (isobutanol) com maior concentração nos espumantes em relação ao vinho base, e com variação entre espumantes (Tabela 4). O 2-metil-1-propanol é formado pela reação de Ehrlich a partir da valina (LAMBRECHTS e PRETORIOUS, 2000; RIBERAU-GAYON et al., 2006; HAZELWOOD et al., 2008), variando de acordo com o metabolismo de cada cepa de levedura. As concentrações observadas nos espumantes foram muito inferiores ao limiar de percepção em solução hidroalcoólica (75 mg/L) e vinhos (500 mg/L) (LAMBRECHTS e PRETORIOUS, 2000), tendo portanto baixa contribuição nas características aromáticas. Da mesma forma, as variações observadas nas concentrações de 2-metil-1-butanol (álcool amílico), 8,8 a 15,16 mg/L, e 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 60,47 a 74,39 mg/L, não devem afetar de maneira importante as propriedades organolépticas já que são inferiores aos limiares de percepção, 65 mg/L (solução hidroalcoólica) para álcool amílico e 300 mg/L em vinhos para álcool isoamílico (LAMBRECHTS e PRETORIOUS, 2000).

O acetato de isoamila, associado a aromas frutados (banana, pêra), apresentou redução significativa nos espumantes em relação ao vinho base (Tabela 4), o espumante elaborado com a levedura X5 apresentou a maior concentração (0,90 mg/L). Mesmo assim, as concentrações finais foram superiores ao limiar de percepção (0,26 mg/L) com valor olfativo ativo (OAV) entre 2,3 e 3,5. Da mesma forma, foi detectada redução significativa (aproximadamente 3 vezes) na concentração dos ésteres decanoato de etila e acetato de feniletila. Também houve uma pequena redução no hexanoato de etila (maçã), onde a levedura X5 apresentou, novamente, a maior concentração (0,95 mg/L). Em conjunto, esta redução pode ser responsável pela diminuição das notas florais e frutadas nos espumantes.

Por outro lado, apesar de não significativa, os espumantes obtidos com as leveduras Delta, PDM, Spark, SP665 e EC1118 (*S. cerevisiae* *rf. bayanus*) apresentaram maior concentração de 2-fenil etanol, importante componente aromático (rosas e florais), quando comparados ao vinho base e espumantes obtidos com as três cepas de *S. cerevisiae* (Tabela 4). Associação entre as subespécies de *Saccharomyces*, a produção de 2-fenil etanol e de alcoóis superiores tem sido constatada por diversos autores, sendo dependente da cepa de levedura (RIBERAU-GAYON et al., 2006). A produção de 2-fenil etanol está associada ao metabolismo da fenilalanina (LAMBRECHTS e PRETORIOUS, 2000; RIBERAU-GAYON et al., 2006; HAZELWOOD et al., 2008).

Para obter uma visão geral das variações detectadas na composição de componentes aromáticos, foi realizada uma análise multivariada (Componentes Principais). Conforme pode ser evidenciado na Figura 6, os vinhos espumantes, independente da levedura empregada,

apresentam diferenças importantes na composição de compostos voláteis quando comparados com o vinho base, sendo claramente separados deste pelo Componente Principal 1 (CP 1).

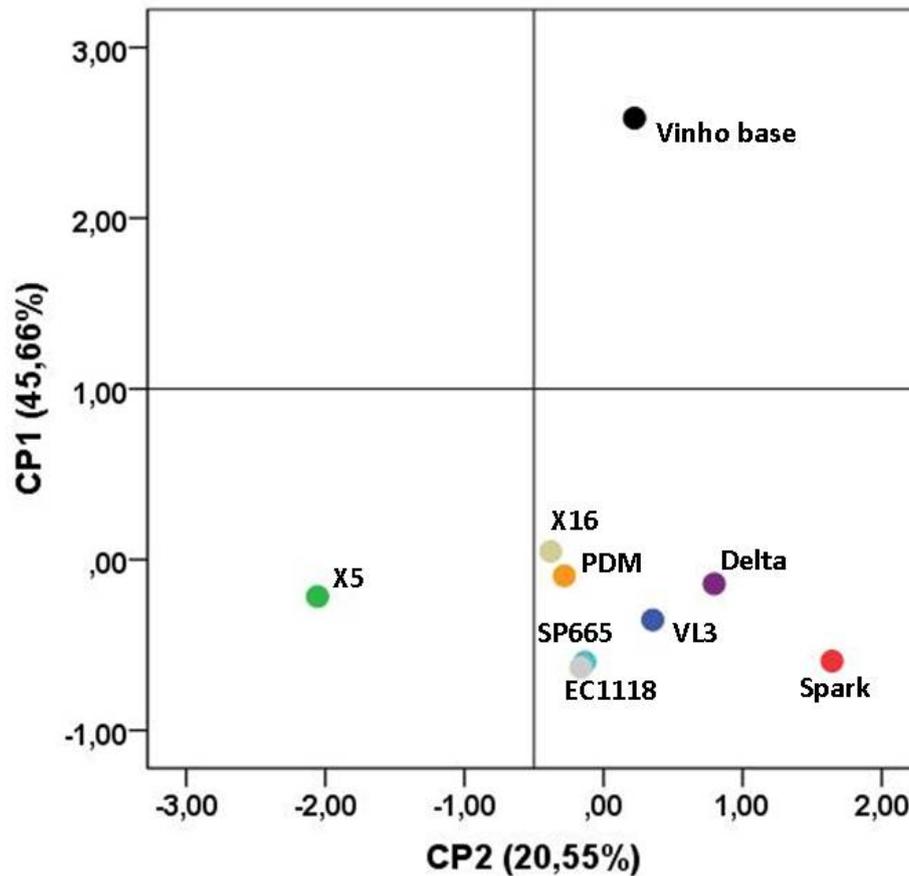


Figura 6 - Análise de componentes principais com base na composição de compostos voláteis do vinho base e dos espumantes obtidos a partir dele. Os dois primeiros componentes acumulam 66,22% da variância total.

As diferenças mais importantes que levaram à separação do vinho base e os espumantes foram a redução da concentração de: acetato de isoamila de 2,88 para 0,71 mg/L; de cis-hexen-1-ol e trans-hexen-1-ol de 0,09 para 0,005 mg/L e 0,10 para 0,04 mg/L, respectivamente; decanoato de etila de 0,49 para 0,17 mg/L; acetato de feniletila de 0,15 para 0,06 mg/L, e dos ácidos graxos (C₈ - C₁₂) que em conjunto tiveram uma redução de 9,02 para 6,36 mg/L. Por outro lado, os espumantes apresentaram um aumento na concentração de dietil succinato da ordem de 10 vezes (0,21 para 2,07) e dodecanoato de etila de 0,02 para 0,07 mg/L.

A redução na concentração de ésteres, particularmente acetatos, durante o envelhecimento de vinhos e produção de espumantes foi evidenciada em diversos trabalhos

(CHISHOLM et al., 1995; RIBEREAU-GAYON et al., 2006; RIU-AUMATELL et al., 2006), e tem sido atribuída à lenta hidrólise espontânea dos ésteres fugases (ésteres do ácido acético) até os mesmos atingirem o equilíbrio de massas (FERREIRA et al., 1995). A redução na concentração de ésteres está relacionada com a perda de características frutais geralmente constatadas na comparação entre o vinho base e os espumantes (TORRENS et al., 2010).

A diminuição da concentração de ácidos graxos e seus ésteres nos espumantes (C_8 - C_{12}) têm sido constatada durante o envelhecimento de vinhos (DIAZ-MAROTO et al., 2005) e pode ser atribuída à adsorção e/ou utilização dos mesmos pelas leveduras ou pela absorção nas borras de leveduras. A redução na concentração de ácidos graxos pode ter uma contribuição positiva nas características do espumante, já que os mesmos apresentam uma correlação negativa com a formação e estabilidade da espuma (GALLART et al., 2002).

O aumento da concentração de dietil succinato durante a segunda fermentação de espumantes tem sido constatado em diversos trabalhos (RIBEREAU-GAYON et al., 2006; RIU-AUMATELL et al., 2006). O dietil succinato é produzido por uma reação de esterificação espontânea entre o ácido succínico e o etanol a qual é dependente da concentração destes dois compostos e das condições físico-químicas do sistema (temperatura, pH, oxigênio, etc.), e segundo Bautista et al. (2007), é favorecido pela presença da borra. Assim sendo, a concentração de dietil succinato aumenta ao longo do tempo de envelhecimento de vinhos e espumantes, sendo considerado por vários autores como um marcador de envelhecimento (RIU-AUMATELL et al., 2006). Em termos organolépticos, o dietil succinato é considerado um constituinte de aroma suavemente frutado que lembra melão (JORDAN et al., 2002). Entretanto, as concentrações obtidas no presente trabalho, tanto no vinho base quanto nos espumantes, são muito inferiores ao limiar de percepção (200 mg/L) (LOUW et al., 2010).

A comparação da composição de compostos voláteis entre os espumantes obtidos com as oito leveduras avaliadas permitiu a separação de quatro grupos, formados por: Grupo 1 - leveduras SP665 e EC1118; Grupo 2 - leveduras Spark; Grupo 3 - leveduras X5 e Grupo 4 - levedura VL3, X16, Delta e PDM (Figura 7).

Os grupos 1 e 2 separaram-se do restante (grupos 3 e 4) pelo componente principal 1 sendo caracterizados por menor concentração de ésteres etílicos (hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila) com média de 1,93 mg/L comparado com 2,15 mg/L dos Grupos 3 e 4; menor concentração de acetato de etila (20,39 versus 37,29 mg/L); menor concentração de acetato de isoamila (0,61 versus 0,77 mg/L) e maior concentração de metanol com média de 34,91 mg/L contra 25,45 mg/L. Já o espumante obtido com a Spark (Grupo 2) apresentou

concentração média menor de 1-propanol e 2-metil-1-propanol e maior concentração de ácido butírico e butanoato de etila do que os espumantes obtidos com as leveduras SP665 e EC1118, porém nem todas significativas (Tabela 4).

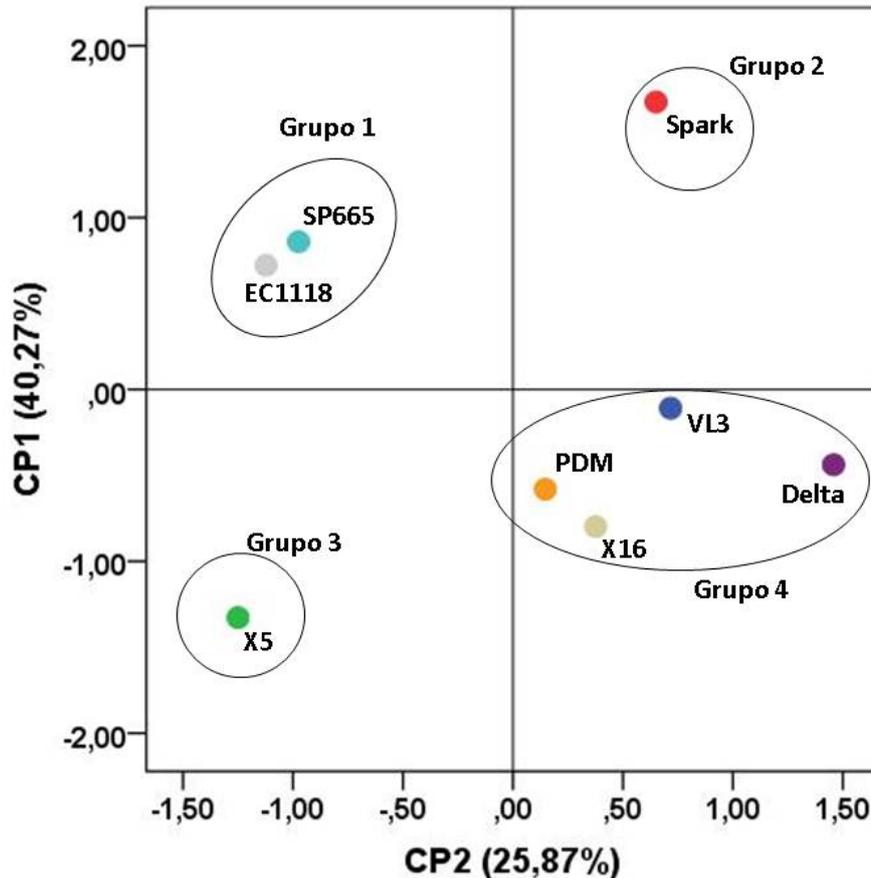


Figura 7 - Análise de componentes principais com base nos compostos voláteis de espumantes obtidos com oito cepas de leveduras. Os dois primeiros componentes acumulam 66,14% da variância total.

Os espumantes obtidos com a levedura X5 (Grupo 3) exibiram concentração relativamente alta de 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, acetato de isoamila e hexanoato de etila, e baixa concentração de hexanol, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, dietil succinato e ácido hexanóico.

Sabidamente as leveduras, através do seu metabolismo e durante o processo autofágico/autolítico afetam de forma significativa a concentração de compostos aromáticos nos vinhos e espumantes (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Assim sendo, distintos genótipos de *Saccharomyces*, com diferenças metabólicas e de autofagia/autólise, imprimem características organolépticas próprias nos vinhos por eles fermentados (FLEET, 2003; TORRENS et al., 2008; MOLINA et al., 2009; POZO-BAYON et al., 2009).

Uma comparação entre os espumantes obtidos com as cepas “prise de mousse”, classificadas tradicionalmente como *S. cerevisiae* *rf. bayanus* (leveduras Delta, PDM, Spark, SP665 e EC1118) e as cepas de *S. cerevisiae* recomendadas para fermentação de brancos (VL3, X5 e X16), observa-se apenas uma pequena diferença na concentração de hexanoato de etila, ácido hexanóico e 2-fenil etanol. Estes dados discordam até certo ponto daqueles obtidos por outros autores que apontam claras diferenças entre vinhos fermentados com *S. cerevisiae* *rf. bayanus* e *S. cerevisiae* (ANTONELLI *et al.*, 1999; MASNEUF *et al.*, 2002; COLORETTI *et al.*, 2006). Entretanto, a grande variação entre cepas de cada uma destas subespécies quanto à produção dos distintos metabólitos (LAMBRECHTS e PRETORIOUS, 2000), associado a dificuldades de identificação em nível de subespécie e a ocorrência de híbridos naturais e artificiais, impede qualquer conclusão geral sobre a contribuição particular de *S. cerevisiae* *rf. bayanus* e *S. cerevisiae* em vinhos.

4.3 AVALIAÇÃO SENSORIAL DO VINHO BASE E DOS VINHOS ESPUMANTES

Conforme descrito previamente, o vinho base e os espumantes obtidos com oito leveduras comerciais foram submetidos a degustação a cegas por parte de um painel formado por onze degustadores com experiências em degustação de espumantes. Para fins de análise, foi calculada a média de cada degustador para os distintos parâmetros, e as mesmas utilizadas para análise estatística (análise de variância e comparação de médias).

Os resultados da avaliação sensorial encontram-se sumarizados na Tabela 5. Conforme pode ser apreciado, os espumantes apresentaram aumento na intensidade de cor em relação ao vinho base. Este pequeno aumento, decorrente de processos oxidativos (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 2006), conforme tem sido constatado em diversos trabalhos (ex. TORRENS *et al.*, 2010). De um modo geral, um aumento de cor da ordem observada não é considerado um defeito.

Tabela 5 - Resultados da avaliação sensorial do vinho base e espumantes obtidos com oito cepas de leveduras comerciais.

	Aspecto visual				Aspecto olfativo						
	Intensidade de cor	Intensidade de efervescência	Qualidade de espuma	Tamanho de borbulhas	Intensidade total de aroma	Intensidade de frutado	Intensidade de floral	Intensidade de levedura	Intensidade de vegetal	Fineza de aroma	Odor indesejáveis
Vinho Base	2,00 ± 0,95 ^B	0,00 ± 0,00 ^C	0,00 ± 0,00 ^E	0,00 ± 0,00 ^B	3,00 ± 0,63 ^{ABC}	2,86 ± 0,84 ^A	1,91 ± 0,77 ^A	0,41 ± 0,54 ^B	0,77 ± 0,79 ^A	3,23 ± 0,68 ^A	0,09 ± 0,20 ^A
VL3	2,34 ± 0,42 ^A	1,50 ± 0,83 ^B	1,20 ± 0,78 ^D	1,45 ± 1,08 ^A	2,73 ± 0,77 ^C	2,21 ± 0,94 ^B	1,50 ± 1,04 ^{AB}	1,43 ± 0,82 ^A	0,61 ± 0,74 ^A	2,75 ± 0,87 ^A	0,25 ± 0,55 ^A
X5	2,34 ± 0,36 ^A	2,39 ± 1,10 ^A	2,00 ± 1,16 ^{AB}	1,52 ± 0,91 ^A	3,27 ± 0,48 ^A	2,77 ± 0,91 ^{AB}	1,75 ± 0,99 ^{AB}	1,43 ± 0,93 ^A	0,61 ± 0,82 ^A	3,07 ± 0,73 ^A	0,18 ± 0,39 ^A
X16	2,32 ± 0,36 ^A	2,30 ± 0,65 ^A	2,05 ± 1,01 ^{AB}	1,68 ± 0,92 ^A	2,93 ± 0,50 ^{ABC}	2,66 ± 1,05 ^{AB}	1,50 ± 0,89 ^{AB}	1,48 ± 0,70 ^A	0,48 ± 0,72 ^A	2,98 ± 0,68 ^A	0,00 ± 0,00 ^A
Delta	2,32 ± 0,48 ^A	1,91 ± 0,92 ^{AB}	1,41 ± 0,96 ^{BCD}	1,64 ± 1,17 ^A	2,68 ± 0,57 ^C	2,43 ± 0,66 ^{AB}	1,45 ± 0,51 ^{AB}	1,52 ± 0,75 ^A	0,70 ± 0,80 ^A	2,80 ± 0,63 ^A	0,25 ± 0,37 ^A
PDM	2,32 ± 0,39 ^A	1,93 ± 0,90 ^{AB}	1,18 ± 0,81 ^D	2,02 ± 2,46 ^A	3,00 ± 0,60 ^{ABC}	2,57 ± 0,95 ^{AB}	1,86 ± 0,85 ^A	1,73 ± 1,29 ^A	0,66 ± 0,78 ^A	2,86 ± 0,88 ^A	0,20 ± 0,40 ^A
Spark	2,34 ± 0,39 ^A	2,18 ± 1,03 ^A	1,86 ± 0,93 ^{ABC}	1,64 ± 0,93 ^A	2,98 ± 0,57 ^{ABC}	2,48 ± 0,79 ^{AB}	1,50 ± 0,65 ^{AB}	1,27 ± 0,65 ^A	0,48 ± 0,59 ^A	3,02 ± 0,70 ^A	0,25 ± 0,67 ^A
SP665	2,32 ± 0,48 ^A	2,52 ± 0,89 ^A	2,27 ± 1,19 ^A	1,23 ± 0,63 ^A	3,18 ± 0,61 ^{AB}	2,66 ± 0,82 ^{AB}	1,66 ± 0,89 ^{AB}	1,61 ± 1,24 ^A	0,61 ± 0,71 ^A	3,07 ± 0,64 ^A	0,11 ± 0,31 ^A
EC1118	2,36 ± 0,47 ^A	1,91 ± 0,89 ^{AB}	1,34 ± 0,75 ^{CD}	1,64 ± 0,88 ^A	2,77 ± 0,46 ^{BC}	2,39 ± 0,82 ^{AB}	1,25 ± 0,75 ^B	1,43 ± 0,82 ^A	0,75 ± 0,84 ^A	2,75 ± 0,51 ^A	0,23 ± 0,43 ^A

	Aspecto gustativo								Qualidade global
	Intensidade de Paladar	Doçura	Corpo em boca	Fineza de paladar	Acidez	Amargor	Gosto indesejáveis	Persistência em boca	
Vinho Base	2,91 ± 0,74 ^A	1,00 ± 0,59 ^A	2,36 ± 0,60 ^B	3,23 ± 0,52 ^A	3,14 ± 0,60 ^A	0,50 ± 0,45 ^A	0,09 ± 0,20 ^A	2,68 ± 1,06 ^B	84,64 ± 2,98 ^{AB}
VL3	3,07 ± 0,76 ^A	1,27 ± 0,88 ^A	2,75 ± 0,69 ^{AB}	2,75 ± 0,92 ^{AB}	2,80 ± 0,55 ^A	0,59 ± 0,78 ^A	0,32 ± 0,89 ^A	2,98 ± 0,66 ^{AB}	83,91 ± 3,94 ^{AB}
X5	3,11 ± 0,60 ^A	1,14 ± 0,77 ^A	2,75 ± 0,72 ^{AB}	2,95 ± 0,77 ^{AB}	2,93 ± 0,68 ^A	0,45 ± 0,86 ^A	0,41 ± 0,88 ^A	3,25 ± 0,65 ^A	84,18 ± 3,50 ^{AB}
X16	3,14 ± 0,54 ^A	1,25 ± 1,13 ^A	2,95 ± 0,51 ^A	2,91 ± 0,81 ^{AB}	2,95 ± 0,55 ^A	0,68 ± 0,66 ^A	0,41 ± 0,59 ^A	3,27 ± 0,53 ^A	84,14 ± 4,26 ^{AB}
Delta	2,98 ± 0,48 ^A	1,14 ± 0,73 ^A	2,59 ± 0,70 ^{AB}	2,61 ± 0,58 ^B	3,02 ± 0,61 ^A	0,91 ± 0,77 ^A	0,34 ± 0,50 ^A	2,82 ± 0,50 ^{AB}	82,32 ± 2,95 ^B
PDM	3,00 ± 0,53 ^A	1,18 ± 0,82 ^A	2,73 ± 0,59 ^{AB}	2,73 ± 0,75 ^{AB}	2,98 ± 0,59 ^A	0,80 ± 0,78 ^A	0,50 ± 0,69 ^A	3,09 ± 0,72 ^{AB}	82,32 ± 4,27 ^B
Spark	3,07 ± 0,42 ^A	1,05 ± 0,82 ^A	2,70 ± 0,48 ^{AB}	2,75 ± 0,69 ^{AB}	2,75 ± 0,72 ^A	0,66 ± 0,68 ^A	0,43 ± 0,62 ^A	2,91 ± 0,78 ^{AB}	83,68 ± 4,40 ^{AB}
SP665	3,07 ± 0,54 ^A	1,25 ± 0,87 ^A	2,80 ± 0,59 ^{AB}	2,91 ± 0,65 ^{AB}	2,98 ± 0,59 ^A	0,73 ± 0,74 ^A	0,18 ± 0,39 ^A	3,09 ± 0,59 ^{AB}	85,14 ± 2,95 ^A
EC1118	2,91 ± 0,50 ^A	1,07 ± 0,56 ^A	2,64 ± 0,47 ^{AB}	2,73 ± 0,53 ^{AB}	2,75 ± 0,43 ^A	0,93 ± 0,68 ^A	0,43 ± 0,73 ^A	2,86 ± 0,47 ^{AB}	83,36 ± 3,61 ^{AB}

* Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Variação significativa foi observada nas características de espuma entre os espumantes elaborados com as oito leveduras comerciais. O espumante obtido com a levedura VL3 apresentou a menor nota para intensidade de espuma e a segunda menor para qualidade de espuma. Por outro lado, a levedura SP665 proporcionou as melhores características considerando os três parâmetros relacionados a espuma (Tabela 5). As características de espuma estão intimamente relacionadas ao vinho base e a levedura empregada na segunda fermentação, já que são afetadas pela liberação de compostos tenso-ativos durante o metabolismo e, principalmente, o processo autolítico como peptídios, glucanos e mananos (SARACCO e GOZZELINO, 1995; LEPE e LEAL, 2004; ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006; BLANCO-GOMIS et al., 2009). Neste sentido é importante observar que os espumantes elaborados com a levedura SP665 exibiram a segunda maior nota para intensidade de levedura (Tabela 5).

Quanto às características aromáticas, os espumantes exibiram uma tendência geral de redução na intensidade de frutado, floral e vegetal, e aumento significativo na intensidade de levedura, em relação ao vinho base. A diminuição dos aromas de frutas e flores coincide com a redução da concentração de ésteres (Tabela 4) nos espumantes. Esta relação tem sido constatada em diversos trabalhos (RIBEREAU-GAYON et al., 2006; RIU-AUMATELL et al., 2006; TORRENS et al., 2010) e tem sido associada à lenta hidrólise dos ésteres durante o período de maturação de vinhos e espumantes (FERREIRA et al., 1995). Por outro lado, o aumento na intensidade de levedura é decorrente do longo contato com a borra pós-fermentação durante o qual ocorrem autofagia e autólise de leveduras com liberação de constituintes celulares com características aromáticas próprias (SARACCO e GOZZELINO, 1995; LEPE e LEAL, 2004; ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006).

Assim como para as características aromáticas, poucas variações foram detectadas entre as características gustativas. As tendências mais relevantes, apesar de não significativas, foram aumento geral do corpo em boca, intensidade de paladar, doçura e persistência em boca, e redução da acidez e aumento de amargor nos espumantes em relação ao vinho base (Tabela 5). O aumento do corpo, intensidade, doçura e persistência podem ser associadas à liberação de peptídios, manoproteínas e glucanos por autofagia/autólise das leveduras (ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006; RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

Quanto as notas finais da qualidade global (de 1 a 100 pontos), destacou-se com a maior nota a levedura SP665 com 85,14 pontos, sendo as menores notas das leveduras Delta e PDM com 82,32 pontos.

Para obter uma visão global das características organolépticas dos espumantes obtidos com as oito leveduras comerciais avaliadas, os resultados médios foram submetidos a análise multivariada de componentes principais. Conforme pode ser observado na Figura 8, a análise permitiu a separação dos espumantes em três grupos. O Grupo 1 é composto pelos espumantes obtidos com as leveduras X5, X16 e SP665. Estes espumantes apresentaram valores elevados de intensidade de efervescência e qualidade de espuma, associados com importante intensidade de aroma e intensidade de frutado. Em termos de características gustativas, as leveduras X5, X16 e SP665 apresentaram valores elevados de intensidade de paladar, doçura, corpo em boca, acidez e persistência em boca. Em conjunto estas características contribuíram para que os espumantes obtidos com estas leveduras recebessem os maiores valores de qualidade global.

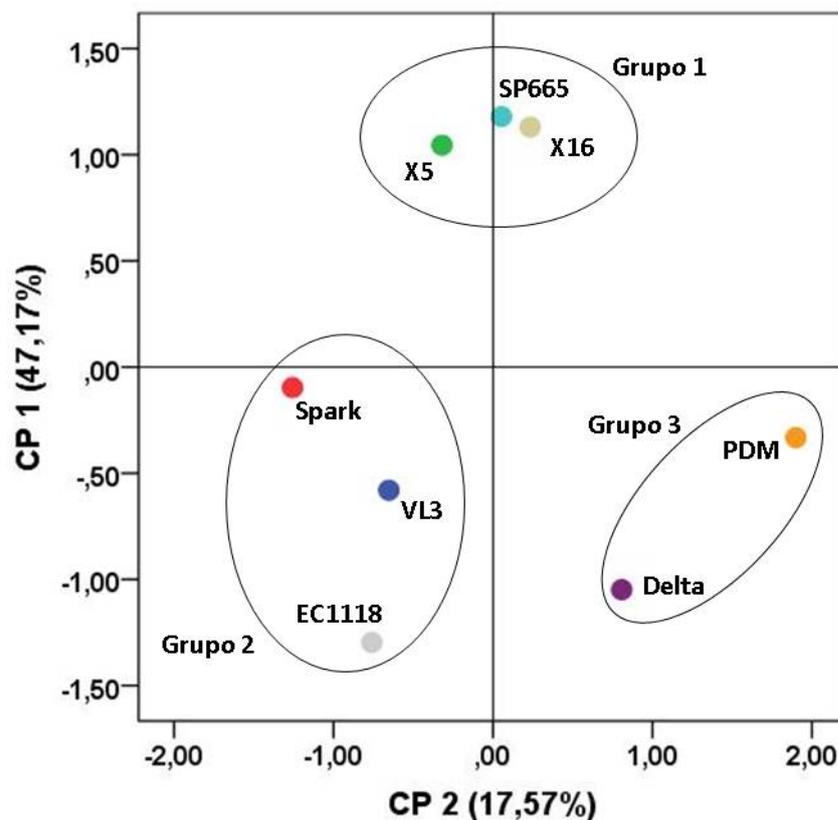


Figura 8 - Análise de componentes principais com base nas características organolépticas de espumantes obtidos com oito cepas de leveduras. Os dois primeiros componentes acumulam 64,74% da variância.

A comparação dos agrupamentos obtidos pela análise multivariada dos componentes aromáticos (Figura 7) e das características organolépticas (Figura 8) não permite observar uma relação evidente. Entretanto, as leveduras X5 e X16, agrupadas pelas suas características organolépticas apresentam altas concentrações de acetato de isoamila, hexanoato de etila, e baixas concentrações de dietil succinato e 2-feniletanol, quando comparadas com as outras leveduras avaliadas. Por sua vez, os espumantes obtidos com a levedura SP665, pertencente ao mesmo grupo organoléptico, possuem alta concentração de 3-metil-1-butanol associada com baixa concentração de ésteres etílicos de ácidos graxos e 2-fenil etanol.

Os espumantes obtidos com as leveduras Delta e PDM (Grupo 3) apresentaram os menores notas de qualidade global (Tabela 5), enquanto os espumantes das leveduras VL3, Spark e EC118 exibiram notas baixas para intensidade de aroma, frutado, floral e de levedura, assim como várias características gustativas. Com base nos resultados, de um modo geral, as leveduras dos grupos 2 e 3 podem ser consideradas leveduras mais neutras, enquanto as leveduras do grupo 1 apresentam maior contribuição aromática, gustativa e qualidade global, justificada até certo ponto, pela análise cromatográfica dos componentes voláteis.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

(1) Tanto leveduras descritas como *S. cerevisiae* *rf. bayanus* quanto aquelas descritas como *S. cerevisiae* apresentaram potencial para elaboração de vinhos espumantes, completando a segunda fermentação de forma adequada.

(2) Poucas variações foram encontradas entre os vinhos espumantes obtidos com as oito leveduras avaliadas quanto às análises básicas. Porém, os espumantes diferiram significativamente do vinho base.

(3) De um modo geral, os vinhos espumantes comparados ao vinho base, apresentaram maior concentração de 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, dietil succinato e dodecanoato de etila, e redução nas concentrações de 3-metil-1-butanol, acetato de isoamila, hexanoato de etila, cis-3-hexen-1-ol, trans-3-hexen-1-ol, decanoato de etila, acetato de feniletila e ácidos graxos.

(4) Quanto às características aromáticas, os espumantes em relação ao vinho base, exibiram uma tendência geral de redução na intensidade de frutado, floral e vegetal, e aumento significativo na intensidade de levedura.

(5) Os espumantes obtidos com a levedura X5 apresentaram as maiores concentrações de butanoato de etila, acetato de isoamila e hexanoato de etila, compostos responsáveis pelos aromas frutados (pêra, banana, maçã), fato que justifica as suas altas notas de intensidade de aroma, frutado, floral e fineza aromática.

(6) A levedura SP665 proporcionou as melhores características considerando os três parâmetros relacionados à espuma, além de intensidade e fineza de aromas e características gustativas favoráveis.

(7) Quanto à qualidade global dos espumantes destacaram-se com as maiores notas as leveduras SP665, X5 e X16.

(8) A elevada variabilidade detectada entre leveduras confirma a necessidade de testes específicos de leveduras visando à obtenção de vinhos espumantes com características organolépticas particulares.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, H.; GUILLOUX-BENATIER, M. (2006) Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Austr. J. Grape & Wine Res.* 12: 119–127.
- ANTONELLI, A.; CASTELLARI, L.; ZAMBONELLI, C.; CARNACINI, A. (1999) Yeast influence on volatile composition of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1139–1144.
- AZEVEDO, A.; VELLOSO, G. (2006) Chandon: a crença no espumante brasileiro de qualidade. *Wine Style* 6: 7-11.
- BAUTISTA, R.; FERNANDEZ, E.; FALQUE, E. (2007) Effect of the contact with fermentation-lees or commercial lees on the volatile composition of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 405–413.
- BERTRAND, A. (1981) Formation des substances au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité des vins. Colloque Soc. Fr. Microbiol., Reims. 251-267.
- BLANCO-GOMIS, D.; MANGAS-ALONSO, J.J.; JUNCO-CORUJEDO, S.; GUTIERREZ-ALVAREZ, D. (2009) Characterization of sparkling cider by the yeast type used in taking foam on the basis of polypeptide content and foam characteristics. *Food Chem.* 115: 375–379.
- BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; SAINT PRIX, F.; SABRAYROLLES, J.M. (2002) La formation de composés volatils par les levures. 13^{ième} Symp. Intern. d’Oenologie, INRA, Montpellier, France.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 283, de 18 de junho de 1998. Aprova normas e procedimentos para o registro de estabelecimento, bebidas e vinagres, inclusive vinhos e derivados da uva e do vinho e expedição dos respectivos certificados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 22 jun. 1998. Seção 1, n.106.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004 que altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 nov. 2004. Seção 1. p. 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº24, de 08 de setembro de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, seção 1, 2005. p 11.

- CARRAU, F.M.; MEDINA, K.; BOIDO, E.; FARINA, L.; GAGGERO, C.; DELLACASSA, E.; VERSINI, G.; HENSCHKE, P.A. (2005) De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 107-115.
- CAVALIERI, D.; McGOVERN, P.E.; HARTL, D.L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. (2003) Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* 57: 226-232.
- CAVAZZANI, N. (1989) Fabricación de vinos espumosos. Editorial Acribia, Zaragoza. 166 p.
- CHATONNET, P. ; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.N.; LAVIGNE, V. (1993) Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sc. Food Agric.* 62: 191-202.
- CHISHOLM, M. G.; GUIHER, L. A.; ZACZKIEWICZ, S. M. (1995) Aroma characteristics of aged Vidal blanc wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 46: 56–62.
- COLORETTI, F.; ZAMBONELLI, C.; TINI, V. (2006). Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiol.* 23: 672-676.
- DIAZ-MAROTO, M.C.; SCHNEIDER, R.; BAUMES, R. (2005) Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging *J. Agric. Food Chem.* 53: 3503-3509
- EHSANI, M. (2007) Ingénierie métabolique de *Saccharomyces cerevisiae* à faible rendement en éthanol: contrôle de la formation d'acétoïne par des levures oenologiques surproductrices de glycérol. Tese de Doutorado, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. Montpellier, France, 151 p.
- FENSTERSEIFER, J. F. (2008) Impacto de diferentes cepas de leveduras no perfil sensorial de espumantes elaborados na safra 2008 na região da Serra Gaúcha. Monografia de graduação, CEFET -BG, Bento Gonçalves. 52 p.
- FARRÉ, J.C.; KRICK, R.; SUBRAMANI S.; THUMM, M. (2009) Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr. Op. Cell Biol.* 2009, 21:522–530
- FERREIRA, V.; FERNANDEZ, P.; PEÑA, C.; ESCUDERO, A.; & CACHO, J. F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.*, 67: 381–392.

- FIA, G.; GIOVANI, G.; ROS, I. (2005) Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorometric method to determine enzymatic activity. *J. Appl. Microbiol.* 99: 509-517.
- FLANZY, C. (2003) *Enología: Fundamentos Científicos y tecnológicos*. 2ª ed. Mundi Prensa, Madrid, 2003. 797 p.
- FLEET, G.H. (2003) Yeast interactions and wine flavor. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 11–22.
- FLEET, G. H.; HEARD, G. M. (1993) Yeast - growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Edited by F. GH: Harwood Academic, p. 27-54.
- GALLART, M.; LOPEA-TAMAMES, E.; SUBERBIOLA, G.; BUXADERAS, S. (2002) Influence of fatty acids on wine foaming. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7042-7045.
- GIOVANNINI, E. (2008) *Produção de uva para vinho, suco e mesa*. Renascença, Porto Alegre. 368 p.
- GIOVANNINI, E.; MANFROI, V. (2009) *Viticultura e enología: elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros*. IFRS, Bento Gonçalves. 360 p.
- GRANDO, M.S; VERSINI, G.; NICOLINI, G.; MATTIVI, F. (1993) Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production. *Vitis* 32: 43-50.
- GUILLAUME, C.; DELOBEL, P.; SABLAYROLLES, J.M.; BLONDIN, B. (2007) Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2432-2439.
- GUTH, H. (1997) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3027-3032.
- HAZELWOOD, L.A.; DARAN, J.M.; VAN MARIS, A.J.A.; PRONK, J.T.; DICKINSON, J.R. (2008) The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2259-2266.
- HERNÁNDEZ, L.F.; ESPINOSA, J.C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BRIONES, A. (2003) β - glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 171-176.
- HERNÁNDEZ, M. R. (2003) *La cata y el conocimiento de los vinos*. 3º ed. Mundi-Prensa, Madrid, 356 p.

- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. (1995) Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 75-83.
- JORDAN, M. J.; MARGARIA, C. A.; SHAW, P.E.; GOODNER, K.L. (2002) Aroma active components in aqueous kiwi fruit essence and kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC-GC-O. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5386-5390.
- KING, A.; RICHARD DICKINSON, J. (2000) Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16: 499-506.
- KLIONSKY, D.J. (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118: 7-18.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (1999) The yeasts, a taxonomic study. Elsevier, NY. 1055 p.
- LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma. *S. Afr. J. Enol. Viticult.* 21: 97-129.
- LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. (1998) Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices; Kluwer, Academic/Plenum Publishers: Massachusetts.
- LEPE, J.A.S.; LEAL, I.B. (2004) Microbiologia enológica: Fundamentos de vinificación. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 761 p.
- LONA, A.A.L. (1999) Vinhos – degustação, elaboração e serviço, 4.ed. Editora AGE, Porto Alegre. 151 p.
- LOUW, L.; TREDoux, A.G.J.; VAN RENSBURG, P.; KIDD, M.; NAES, T.; NIEUWOUDT, H.H. (2010) Fermentation-derived Aroma Compounds in Varietal Young Wines from South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31: 213-225.
- MASNEUF, I.; MURAT, M.L.; NAUMOV, G.I.; TOMINAGA, T.; DUBOURDIEU, D. (2002) Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulphur varietal aromas of *Vitis vinifera* Sauvignon blanc wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 36: 205-212.
- MENDES-FERREIRA, A.; BARBOSA, C.; JIMENEZ-MARTI, E.; DEL OLMO, M.L.; MENDES-FAIA, A. (2010) The wine yeast strain-dependent expression of genes implicated in sulfide production in response to nitrogen availability. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1314-1321.
- MENEGUZZO, J. (2010) Caracterização físico-química e sensorial dos vinhos espumantes da Serra Gaúcha. Tese de Doutorado. Universidade de Caxias do Sul, 101 p.

- MERCOSUL (2002) Resolução 45/1996 do GMC. Regulamento Vitivinícola do Mercosul. In: IBRAVIN. Legislação vitivinícola. Bento Gonçalves: Ibravin.
- MÉVEL, P. (2006) A vocação da Serra Gaúcha está no espumante. Informativo ABE n° 51, Bento Gonçalves, 6 p.
- MIELE, A.; MIOLO, A. (2003) O sabor do vinho. Bento Gonçalves: Vinícola Miolo: Embrapa Uva e Vinho, 136 p.
- MOLINA, A.M.; GUADALUPE, V.; VARELA, C.; SWIEGERS, J.H.; PRETORIUS, I.S.; AGOSIN, E. (2009) Differential synthesis of fermentative aroma compounds at two related commercial wine yeast strains. *Food Chem.* 117: 189-195.
- MOREIRA, N.; MENDES, F.; PEREIRA, O.; GUEDES DE PINHO, P.; HOGG, T. VASCONCELOS, I. (2002) Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Anal. Chim. Acta* 458: 157-167.
- PALACIOS, A. et al. (2007) Diferencias en el grado alcohólico según la cepa empleada. *Revista Internet de Viticultura y Enología* 7/3: 1-3.
- PÉREZ-COELHO, M.S., BRIONES PÉREZ, A.I., UBEDA IRANZO, J.F., MARTIN ALVAREZ, P.J. (1999) Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiol.* 16: 563–573.
- PÉREZ-PRIETO, L.J.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; GÓMEZ-PLAZA, E. (2003) Differences in major volatile compounds of red wines according to storage length and storage conditions. *J. Food Comp. Anal* 16: 697–705.
- PEYNAUD, E.; BLOUIN, J. (2006) Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino. 4ª ed. Mundi Prensa, Madrid, 353 p.
- PEYNAUD, E.; BLOUIN, J. (2010) O gosto do vinho: O grande livro da degustação. 1ª ed. WMF Martins Fonte, São Paulo, 240 p.
- POERNER, N.; RODRIGUES, E.; CELSO, P.G.; MANFROI, V.; HERTZ, P.F. (2010) Diferenciação analítica de vinhos-base para espumantes de duas regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural* 40: 1186-1192.
- POZO-BAYON, M.A.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.; PUEYO, E.; MORENO-ARRIBAS, M.V. (2009) Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends Food Sci. Techn.* 20: 289-299.

- PRETORIUS, I.S.; VAN DER WESTHUIZEN, T.J.; AUGUSTYN, O.P.H. (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20: 61-74.
- PRETORIUS, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- RAINIERI, S.; PRETORIUS, I.S. (2000) Selection and improvement of wine yeasts *Ann. Microbiol.* 50: 15-31.
- RANKINE, B. (2000) Manual práctico de Enología. Editorial Acribia, Zaragoza, 394 p.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B; LONVAUD, D. A. (2003) Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino - Vinificaciones. 2. Química del vino – Estabilización y tratamientos. 1ª ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 655 p.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. (2006) Handbook of enology. Vol. 1. The microbiology of wine and vinification. 2nd Edition. John Wiley and Sons, Ltda., Chichester, UK. 496p.
- RIU-AUMATELL, M.; BOSCH-FUSTE, J.; LOPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. (2006) Development of volatile compounds of cava (spanish sparkling wine) during long aging time in contact with lees. *Food Chem.* 95: 237–242.
- RIZZON, L.; MENEGUZZO, J.; ABARZUA, C. E. (2000) Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, Documentos 29, 24 p.
- SARACCO, C.; GOZZELINO, A. (1995) Produzione dei vini espumanti e frizzanti. Edagricole – Edizioni Agricole della Calderini, Bologna, 110 p.
- SCHLEDER, C. (2010) Champagne e vinhos borbulhantes: Vinícolas de charme. Inbook Editora, São Paulo, 146 p.
- SILVA, M. A. A.; SILVA, G. A. (1987) Leveduras nacionais selecionadas para elaboração de vinho. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, *Circular técnica* 14, 19 p.
- SOUSA, S. I. (2005) Espumante: o prazer é todo seu. Marco Zero, São Paulo, 165 p.
- SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*, a review. *Food Chem.* 102: 10-21.
- SWIEGERS, J.H.; PRETORIUS, I.S. (2007) Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 954-960.

- TONET, A. (2007) Avaliação de quatro leveduras para a produção de espumante pelo Método Champenoise. Monografia de graduação, CEFET -BG, Bento Gonçalves. 50 p.
- TORRENS, J.; URPI, P.; RIU-AUMATELL, M.; VICHI, S.; LOPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. (2008) Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microbiol.* 124: 48-57.
- TORRENS, J.; RIU-AUMATELL, M.; VICHI, S.; LOPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. (2010) Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.* 58: 2455–2461.
- UVIBRA (2012) Relatório de comercialização de vinhos e derivados da uva e do vinho do Estado do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 58 p.
- VALADE, M. (2005) Las leveduras seleccionadas, aliadas em el control de qualidade del vino – *La Semana Vitivinícola – Revista técnica de interés permanente.* 3.082. 3038-3041.
- VERDHUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 136: 395-403.
- WIECZORKE, R.; S. KRAMPE, T.; WEIERSTALL, K.; FREIDEL, C. P.; HOLLENBERG, AND E. BOLES. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 464: 123-128.
- ZAMBONELLI, C. (2003) Microbiologia e biotecnologia dei vini: i processi biologici e le tecnologie della vinificazione. Edizione Agricole de il Sole 24 ore, Bologna, 274 p.
- ZAMBONELLI, C.; TINI, V. (1980) I lieviti per vini spumanti e frizzanti. Ricerca dei criteri di selezione. *Vitivinicoltura*, 12.
- ZAMORA, F. (2009) Biochemistry of alcoholic fermentation. In: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas, M.V e Polo, M.C. (eds.). Springer, NY. p. 3-25.
- ZANUS, M. C. (2012) Ficha de degustação de espumantes. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves.

