



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE ESPUMANTES
CHAMPENOISE ELABORADOS COM LEVEDURAS E COADJUVANTES
IMOBILIZADOS E NA FORMA LIVRE**

GUSTAVO PIRES COSTA

Porto Alegre
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE ESPUMANTES
CHAMPENOISE ELABORADOS COM LEVEDURAS E COADJUVANTES
IMOBILIZADOS E NA FORMA LIVRE**

Gustavo Pires Costa
Engenheiro de Alimentos
UFRGS - ICTA 2010/2 -

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para a obtenção do grau em Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Manfroi

Co-orientador(a): Prof.^a Dra. Claudia Alcaraz Zini

Porto Alegre
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Pires Costa, Gustavo
Caracterização dos Compostos Voláteis de
Espumantes Champenoise Elaborados com Leveduras e
Coadjuvantes Imobilizados e na Forma Livre / Gustavo
Pires Costa. -- 2013.
77 f.

Orientador: Vitor Manfroi.
Coorientadora: Claudia Alcaraz Zini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Compostos voláteis em espumantes. 2. Leveduras
e coadjuvantes imobilizados. 3. Utilização de
manoproteínas e Borrás. I. Manfroi, Vitor, orient.
II. Alcaraz Zini, Claudia, coorient. III. Título.

Gustavo Pires Costa
Engenheiro de Alimentos - UFRGS - ICTA

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

(PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Homologada em:

Pela Comissão Examinadora:

Por:

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Orientador - PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub
Coordenador do Programa
de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimento PPGCTA

Prof.^a Dra. Claudia Alcaraz Zini
Co-orientadora – PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi
Banca - FAEM/UFPeI

Prof. Dr. Jean Philippe Palma Révillon
Banca – PPG Agronegócios/UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Banca - PPGCTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais que me apoiaram incondicionalmente na decisão de dar continuidade aos meus estudos. Também agradeço a minha irmã e familiares que compreenderam minhas ausências em muitos momentos importantes.

A minha namorada que foi a maior incentivadora quando fui aprovado na seleção do PPGCTA, que compreendeu meus horários complicados, meus fins de semanas de leituras, etc. Mas, principalmente, por estar sempre ao meu lado quando foi preciso e que me faz muito feliz.

Aos colegas que tive durante a graduação e a pós que se tornaram grandes amigos, conselheiros, consultores e foram extremamente importantes nessa etapa.

Ao enólogo Alejandro Cardozo, Diretor Técnico da Vinícola Piagentini, que foi peça fundamental na realização do experimento, fornecendo vinho base, co-adjuvantes e a estrutura da vinícola. Também ao enólogo Daniel Dalla Valle Diretor Técnico da Vinícola Família Valduga, por ter cedido material para a realização dos experimentos.

A Karine Nicole pelo treinamento no uso de HS-SPME e do GC/MS, e auxílio na realização das análises.

A Co-Orientadora Prof.^a Dra. Claudia Alcaraz Zini, pela paciência, pelas longas conversas e correções que contribuíram muito para o trabalho e para minha formação.

Ao Orientador Prof. Dr. Vitor Manfroi, que me orientou pela segunda vez, e que possibilitou a realização deste trabalho em uma área tão desafiadora e surpreendente.

RESUMO

O vinho espumante apresenta uma variada gama de compostos voláteis, que são oriundos da uva ou do processo fermentativo. Segundo a literatura tais variações podem ocorrer durante o processo de elaboração, por diversos fatores como tempo de guarda ou técnica utilizada. No presente trabalho utilizou-se da análise de compostos voláteis para a diferenciação entre os tratamentos realizados durante a segunda fermentação de espumante *Champenoise*. Realizou-se nove tratamentos utilizando leveduras livres, imobilizadas experimentalmente em alginato de cálcio e encapsulada comercial, acrescidas de coadjuvantes, manoproteínas, borras de espumante *Champenoise* e *Charmat*. Para a determinação dos compostos voláteis utilizou-se a técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME). Injetando as amostras em cromatógrafo gasoso monodimensional acoplado a detector quadrupolar de espectrometria de massa (GC/qMS) foram identificados 46 compostos, pertencentes às seguintes classes: 22 ésteres, 11 álcoois, 7 ácidos orgânicos, 4 terpenos e 2 cetonas. Utilizou-se a análise multivariada onde foram encontrados 12 compostos principais (acetato de isoamila, hexanoato de etila, succinato de dietila, octanoato de etila, 4-(*E*)-decanoato de etila, decanoato de etila, hexadecanoato de metila, acetato de feniletila, álcool feniletílico, hexanol, ácido hexanoico e o ácido decanoico). Com a aplicação da Análise dos Componentes Principais (PCA) foi possível separar em blocos distintos os tratamentos que utilizaram leveduras livres e imobilizadas, e o vinho base, que apresentou características diferentes dos dois blocos anteriores. E analisando por PCA, foram encontradas similaridades entre os tratamentos que utilizaram manoproteínas e borras de *Champenoise*. A segunda parte do trabalho consistiu em monitorar a evolução dos 13 compostos principais, nos tratamentos com leveduras e manoproteínas na forma livre e imobilizadas, sendo que esses apresentaram algumas diferenças na velocidade de evolução dos compostos.

Palavras chaves: vinho espumante, leveduras imobilizadas, manoproteínas, HS-SPME, PCA e voláteis.

ABSTRACT

The sparkling wine has large number of volatile compounds, are from grape or fermentation process. According to literature such variations may occur during the process of elaboration by various factors such as guard time or technique used. In this study the analysis of volatile compounds was used to differentiate between treatments performed during the second fermentation of sparkling *Champenoise*. Nine treatments were done, using free yeast, immobilized in calcium alginate experimentally yeast and encapsulated commercial, added, coadjuvants, mannoproteins, lees sparkling wine *Champenoise* and Charmat. For the determination of volatile compounds, the technique of headspace solid phase micro extraction (HS-SPME). Samples were injected into the one-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometric detection (GC/qMS) 46 compounds were identified belonging to the following classes: 22 esters, 11 alcohols, 7 organic acids, 4 terpenes and 2 ketones. The analysis of multivariable was used there were 12 principal components (isoamyl acetate, ethyl hexanoate, diethyl succinate, ethyl octanoate, 4-(*E*)-decenoate acetate, ethyl decanoate, methyl hexadecanoate, phenylethyl acetate, phenylethyl alcohol, hexanol, hexanoic acid and decanoic acid). With the application of Principal Component Analysis (PCA), it was possible separate into distinct blocks the treatments of free and immobilized yeast, and the wine base showed different characteristics of the two blocks. And by PCA analyses found between treatments of using mannoproteins and lees of *Champenoise*. The second part of the study was to monitor the evolution of the 13 main compounds in the treatment with yeast and mannoproteins in free form and immobilized, they showed some differences in the speed of evolution of the compounds.

Keywords: sparkling wine, immobilized yeast, mannoproteins, HS-SPME, PCA and volatile compounds.

LISTA DE ABREVIÇÕES E UNIDADES UTILIZADAS

CAR/PDMS: Carboxen/polidimetilsiloxano (do inglês, *carboxen/polydimethyl siloxane*).

CAR/DVB/PDMS: Carboxen/divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (do inglês, *carboxen/divinylbenzene/polydimethyl siloxane*).

DVB/PDMS: divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (do inglês, *divinylbenzene/polydimethyl siloxane*).

GC/MS: Cromatografia gasosa monodimensional acoplada à detector de espectrometria de massa (do inglês, *one-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection*).

GC/qMS: Cromatografia gasosa monodimensional acoplada à detector quadrupolar de espectrometria de massa (do inglês, *one-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometric detection*).

GC-O: Cromatografia gasosa-olfatometria (do inglês, *gas chromatography-olfatometry*).

HS-SPME: Microextração em fase sólida no modo *headspace* (do inglês, *headspace solid phase micro extraction*).

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LTPRI: Índice de retenção com programação linear de temperatura (do inglês, *linear temperature programmed retention index*).

LTPRical: Índice de retenção com programação linear de temperatura calculado experimentalmente através da fórmula descrita no item 4.6.

LTPRILit: Índice de retenção com programação linear de temperatura encontrado na literatura atual para um determinado composto.

PC: Componente principal (do inglês, *principal component*).

PCA: Análise dos componentes principais (do inglês, *principal component analysis*).

SPME: Microextração em fase sólida (do inglês, *solid phase micro extraction*).

°GL: Graus Gay Lussac.

g/L: gramas por litro.

hL: hectolitro.

g/hL: gramas por hectolitro

meq/L: miliequivalente por litro.

mg/L: miligramas por litro.

x g: vezes a força da gravidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 VINHO ESPUMANTE	16
3.2 MANOPROTEÍNAS	17
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS.....	19
3.4 COMPOSTOS AROMÁTICOS EM ESPUMANTES	22
3.5 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	23
3.6 ANÁLISES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 VINHO BASE.....	26
4.2 IMOBILIZAÇÃO DE <i>S. CEREVISIAE</i> E COADJUVANTES.....	27
4.3 COADJUVANTES: MANOPROTEÍNAS E BORRAS	28
4.4 SEGUNDA FERMENTAÇÃO	28
4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	35
5.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	48
5.3 EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS	56
6. RESUMO DOS RESULTADOS	65
CONCLUSÕES	67
GLOSSÁRIO.....	75
ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resultados das análises físico-químicas do vinho base utilizado no experimento.....	27
Tabela 2: Descrição dos tratamentos realizados com o vinho base proveniente da vinícola Piagentini, segundo tipo de levedura e coadjuvante utilizado.	29
Tabela 3: Dosagem de leveduras e materiais coadjuvantes de fermentação realizada em cada tratamento no momento do envase do vinho base.	30
Tabela 4: Compostos tentativamente identificados no <i>headspace</i> dos vinhos espumantes elaborados em laboratório, por cromatografia gasosa em coluna polar e apolar.	36
Tabela 5: Compostos tentativamente identificados no <i>headspace</i> do vinho base e dos vinhos espumantes elaborados experimentalmente através de nove tratamentos diferentes feitos antes da segunda fermentação.....	42
Tabela 6: Percentual de área cromatográfica dos compostos tentativamente identificados no <i>headspace</i> do vinho base e dos vinhos espumantes elaborados experimentalmente, por cromatografia gasosa em coluna apolar .	46
Tabela 7: Contribuição dos parâmetros para os <i>Loadings</i> das componentes principais, <i>Eigenvalues</i> e respectivas variâncias, avaliando-se o vinho base e os nove tratamentos.....	49
Tabela 8: Contribuição dos parâmetros para os <i>loadings</i> dos Componentes Principais, <i>Eigenvalues</i> e respectivas variâncias, avaliando o vinho base e vinhos espumantes resultantes de tratamentos que utilizaram leveduras livres.	52
Tabela 9: Contribuição dos compostos voláteis (parâmetros) do <i>headspace</i> do vinho base e dos espumantes provenientes dos tratamentos que utilizaram leveduras imobilizadas em laboratório, para os <i>Loadings</i> dos componentes principais, escores e respectivas variâncias.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da autólise de uma levedura durante a 2ª fermentação. a) início, b) entre 3 e 6 meses e c) entre 9 e 12 meses, após o início da 2ª fermentação..... 18
- Figura 2:** Ilustração esquemática dos principais métodos de imobilização celular: (A) fixação ou adsorção em sólidos; (B) aprisionamento em matriz porosa; (C) floculação (natural ou artificialmente induzida), e (D) contenção atrás de barreiras.. 20
- Figura 3:** Aparato utilizado para desgaseificação de amostras de espumantes em banho de água e gelo em um ultrassom da empresa Unique Group, São Paulo..... 31
- Figura 4:** Montagem empregada para realização das HS-SPME de compostos voláteis de vinhos espumantes em bloco termostático.. 32
- Figura 5:** Cromatógrafo gasoso com detector quadrupolar de espectrometria de massas da marca Shimadzu, modelo QP2010 Plus, onde foram realizada as análises dos compostos voláteis dos vinhos..... 33
- Figura 6:** Cromatograma obtido após extração do *headspace* de amostra de vinho espumante elaborado experimentalmente, utilizando o revestimento polimérico de DVB/CAS/PDMS 50/30 StableFlex para SPME, com coluna OV-5. 38
- Figura 7:** Cromatograma obtido após extração do *headspace* de amostra de vinho espumante elaborado experimentalmente, utilizando o revestimento polimérico de DVB/CAS/PDMS 50/30 StableFlex, com coluna Wax..... 39
- Figura 8:** Gráfico indicativo do agrupamento dos nove tratamentos experimentais nos planos definidos pelas componentes principais, tendo-se avaliado os compostos voláteis do *headspace* do vinho base e dos nove vinhos espumantes..... 50
- Figura 9:** Projeção das variáveis (área cromatográfica percentual dos compostos voláteis do *headspace* de vinho base e de nove diferentes tratamentos) e seus *Loadings* no plano constituído pelas duas componentes principais. 51
- Figura 10:** Gráfico representando os tratamentos experimentais nos planos CP(2x1), avaliando o vinho base e os tratamentos eu utilizaram leveduras livres..... 54

Figura 11: Projeção dos dados provenientes dos tratamentos experimentais que utilizaram leveduras imobilizada em laboratório, bem como de vinho base, no plano definido pelas duas componentes principais. 56

Figura 12: Evolução da área cromatográfica normalizada de hexanol e álcool feniletílico, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizada e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre..... 57

Figura 13: Evolução da área cromatográfica normalizada de ácido hexanóico e ácido decanóico, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizada e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre..... 59

Figura 14: Evolução da área cromatográfica normalizada para ésteres de cadeia longa, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizada e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre..... 60

Figura 15: Evolução da área cromatográfica normalizada para ésteres de cadeia média, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizada e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre..... 60

Figura 16: Evolução da área cromatográfica normalizada para os ésteres succinato de dietila, acetato de feniletila e acetato de isoamila, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizada e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre..... 62

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2011, foram produzidas no Brasil cerca de 1.463.481 toneladas de uva, sendo esse valor 12,9% maior do que a safra do ano anterior. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 57,1% das uvas produzidas foram destinadas ao processamento de sucos, vinhos e derivados. Dentro desse panorama, o estado do Rio Grande do Sul participou com aproximadamente 56,6% das uvas produzidas em todo território nacional, sendo responsável por cerca de 90,0% da produção de vinhos e sucos de uva. O estado do Rio Grande do Sul no ano de 2011 produziu mais de 13,3 milhões de litros de espumante. Enquanto espumantes moscatéis apresentaram um crescimento de 1,8% e vinhos espumantes obtiveram um crescimento de 6,3%. (DE MELLO, 2012).

O espumante está no mais alto patamar da Enologia, sendo que continuamente são realizadas pesquisas e implantadas novas tecnologias, visando alcançar melhor qualidade nestes produtos. Nenhum outro vinho necessita de tamanha dedicação e trabalho para se obter um produto final de destaque (DE ROSA, 1979; MANFROI, 2009).

Devido aos fatores naturais de clima e solo existentes na Serra Gaúcha, além de cultivares de videiras adaptadas, os vinhos espumantes brasileiros alcançaram um elevado nível qualitativo, comparado aos melhores do mundo. O vinho espumante é, entre os produtos obtidos da uva, o de maior valor agregado da vinícola (RIZZON, MENEGUZZO e ABARZUA, 2000).

Existem dois principais processos de elaboração de vinhos espumantes, o método *Charmat*, que é a forma mais rápida e barata de realizar a segunda fermentação, que ocorre em grandes tanques fechados, conhecidos como tanques de pressão. E o método *Champenoise*, onde a segunda fermentação ocorre diretamente na garrafa de vidro. Este é o método tradicional francês de produção de vinho espumante, originalmente da região de Champagne, mas atualmente utilizado para produzir os melhores vinhos espumantes ao redor do mundo (COLLIN, 2004).

Os vinhos espumantes elaborados pelo processo *Champenoise* resultam em produtos com melhores características sensoriais, destacando-se a

formação de aromas e sabores formados pela autólise das células de levedura, e posterior maturação sobre essas borras formadas (DE ROSA, 1979).

Em alguns tipos especiais de vinhos tranquilos tem-se a prática de maturar sobre as borras finas, porém essa técnica tradicional pode apresentar alguns inconvenientes. Atualmente vem crescendo a utilização de preparados à base de levedura, como “cascas de leveduras” e manoproteínas purificadas (MANFROI, 2009).

Na elaboração do espumante tradicional são utilizados coadjuvantes de tecnologia e, dentre esses se destaca a bentonite, que atua como clarificante, auxiliando na etapa de *remuage*. A *remuage* consiste no giro lento das garrafas após a segunda fermentação, na qual se propicia um lento aumento da inclinação das mesmas, de forma que os sedimentos se depositem no gargalo. A bentonite é formada por uma mistura de argilas, geralmente impuras, de grãos muito finos, sendo empregada como clarificante protéico. No entanto, esse tipo de coadjuvante pode interferir negativamente na formação da espuma (DE ROSA, 1979). Encontra-se disponível no mercado a opção de leveduras encapsuladas, que são utilizadas no processo de tomada de espuma, sendo uma alternativa ao uso de clarificantes (MANFROI, 2009).

É de conhecimento público que vinícolas gaúchas estão utilizando dessas novas tecnologias, como o uso de manoproteínas, mas muitas vezes de forma empírica, com o objetivo de melhorar a qualidade de seus vinhos e espumantes. Sabe-se também do emprego ainda incipiente de leveduras imobilizadas para a realização da segunda fermentação em espumantes *Champenoise*.

Neste contexto, o presente trabalho buscou contribuir investigando as consequências da utilização de leveduras imobilizadas, manoproteínas e borras na elaboração de vinhos espumantes, principalmente no que tange à modificação dos compostos voláteis destas bebidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os compostos voláteis de vinhos espumantes *champenoise* elaborados com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e manoproteínas imobilizadas em esferas de alginato. Utilizando esses coadjuvantes tecnológicos já disponíveis no mercado, assim como as imobilizadas experimentalmente, nos quais as leveduras e manoproteínas serão unidas em um único suporte.

2.2 Objetivos específicos

1º Investigar semelhanças e dessemelhanças entre o perfil dos compostos voláteis dos vinhos espumantes elaborados com leveduras livres e imobilizadas.

2º Comparar a influencia do uso de manoproteínas comerciais e de borras finas na formação de compostos aromáticos .

3º Verificar a interação da imobilização de leveduras e manoproteínas em um suporte único, através do perfil de compostos voláteis.

4º Acompanhar a evolução das áreas cromatográficas dos compostos voláteis majoritários do *headspace*, durante a segunda fermentação, de vinhos espumantes elaborados com leveduras livres e imobilizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Vinho Espumante

A Lei Nº 10.970, de 12 de novembro de 2004, altera dispositivos da Lei Nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Essa define Champanha (Champagne), Espumante ou Espumante Natural como 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 Celsius) e com teor alcoólico de 10% (dez por cento) a 13% (treze por cento) em volume (BRASIL, 2004).

Segundo De Rosa (1979), os primeiros registros históricos sobre a elaboração de espumante referem-se ao método *Champenoise*, no final do século XVII, que de forma sucinta é o método em que a tomada de espuma (2ª fermentação) ocorre diretamente nas garrafas.

O processo de elaboração do vinho espumante compreende dois estágios, o primeiro é a elaboração do vinho base e a segunda compreende a etapa de tomada de espuma (RIBÉREAU-GAYON, *et al.* 2006b). A primeira fermentação do mosto ocorre em tanques abertos, normalmente de aço inoxidável, o que origina o vinho base. Esse é utilizado para a produção de espumante e deve apresentar grau alcoólico relativamente baixo, valores entre 10° GL e 11,5° GL, 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 de aproximadamente 3,2. Ainda são importantes os seguintes parâmetros: baixo teor de açúcar residuais (menor que 2 g/L), baixa acidez volátil (inferior a 10 meq/L) e baixo teor de dióxido de enxofre (inferior a 50 mg/L) (RIZZON, MENEGUZZO e ABARZUA, 2000; MANFROI, 2009).

Como descrito anteriormente o vinho base para espumante possui uma quantidade de açúcar residual muito pequena (inferior a 2 g/L). Para que ocorra a segunda fermentação e formação de CO₂, é necessário um aporte de carbono e esse é alcançado através da adição do *licor de tirage*. Para atingir-se

uma atmosfera de pressão (1 atm) são necessários 4 g/L de açúcar, contudo, como a pressão normalmente desejada é de 6 atm, seriam necessárias 24 g/L de sacarose, na mistura de vinho base e *licor de tirage*, que resultariam em cerca de 1,4° GL. Juntamente com o *licor de tirage* devem ser adicionadas as leveduras, que realizarão o processo de fermentação. São utilizadas as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* e *Saccharomyces bayanus*, ou mesmo, preparados comerciais das duas (RIZZON, MENEGUZZO e ABARZUA, 2000; MANFROI, 2009). A etapa subsequente à mistura das matérias primas e engarrafamento é o armazenamento das garrafas nas *caves*, para que ocorra a tomada de espuma, em um período de 1 a 3 meses, e a maturação, para a qual se recomenda um mínimo de 12 meses (DE ROSA, 1979; MANFROI, 2009).

Para a retirada das borras formadas durante o processo de tomada de espuma e maturação é realizada a *remuage* e o *degorgement*. O primeiro consiste em girar as garrafas lentamente e aumentando a inclinação das mesmas, para que os sedimentos se depositem no gargalo, essa etapa é obtida com o auxílio de *pupitres* ou *giro pallets*. *Degorgement* é um processo que consiste em congelar o bico da garrafa, onde se encontram as borras sedimentadas; colocando-se a garrafa na posição vertical, quando a mesma é aberta, sendo o bloco de gelo formado, expulso pela pressão interna (RIZZON, MENEGUZZO e ABARZUA, 2000; MANFROI, 2009).

Existem ainda duas alternativas comerciais para facilitar a retirada do depósito de borras: a utilização de um cartucho de membrana, semelhante aos utilizados para a filtração, com leveduras no seu interior; e o uso de leveduras imobilizadas em esferas de alginato (RIZZON, MENEGUZZO e ABARZUA, 2000; MANFROI, 2009).

3.2 Manoproteínas

A parede celular da *S. cerevisiae* corresponde a valores de 20 a 30% em peso seco da célula. Constituída principalmente por manoproteínas e β -glucanos, que correspondem respectivamente a percentuais entre 30-50% e

40-60% em peso da parede celular seca (KLIS, BOORSMA e DE GROOT, 2006).

Durante o processo de maturação do espumante ocorre a autólise da levedura, um processo lento associado com a morte celular, envolvendo enzimas que agem para liberar substâncias citoplasmáticas (peptídeos, ácidos graxos, nucleotídeos, aminoácidos) e compostos da parede celular (manoproteínas) para o espumante. Temperaturas baixas (10°C a 12°C) de envelhecimento fazem com que a taxa de mortalidade seja baixa, assim como as reações enzimáticas, explicando a lentidão do processo. Durante o envelhecimento sobre as borras de levedura, o espumante tem suas propriedades organolépticas e características da espuma modificadas (ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006).

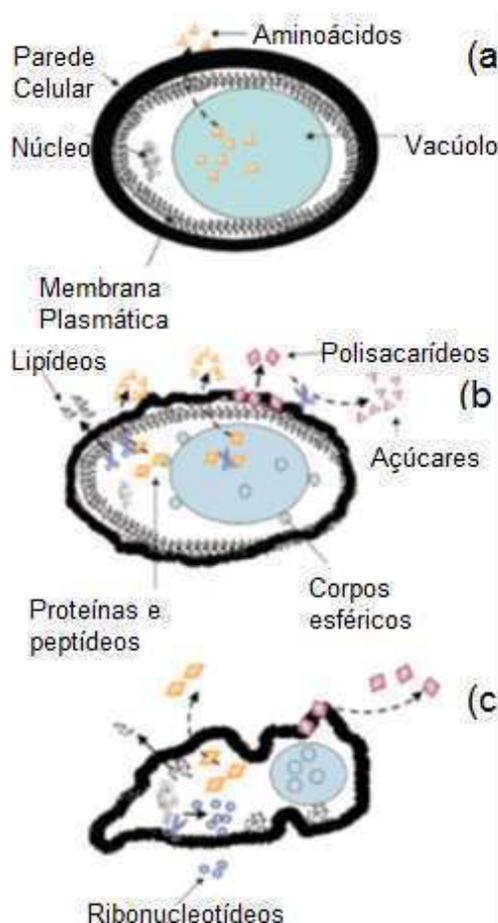


Figura 1. Representação esquemática da autólise de uma levedura durante a 2ª fermentação. a) início, b) entre 3 e 6 meses e c) entre 9 e 12 meses, após o início da 2ª fermentação. Modificado da fonte: ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006.

Segundo Caridi (2006), existem diversos relatos na literatura sobre a atuação das manoproteínas de leveduras atuando como bio-emulsificantes, sendo possível a sua obtenção em larga escala, para a produção de preparados comerciais. Interações entre manoproteínas e compostos aromáticos do vinho podem levar a modificações de volatilidade e intensidade aromática destes vinhos, podendo, nesse caso, ocorrer a intensificação do aroma de componentes já existentes.

Gabbardo (2009), testando concentrado de manoproteínas comerciais em vinho tinto, elaborado com uvas Cabernet Sauvignon da Serra Gaúcha, observou que a adição de manoproteínas contribui para a complexação de taninos, resultando em maior intensidade de cor, menor adstringência, melhor qualidade olfativa, qualidade de boca e avaliação global, entre outras características.

O processo de autólise industrial pode ser induzido por fatores físicos, como o aumento da temperatura, alternância de congelamento e descongelamento, e por pressão osmótica, indutores químicos como pH e detergentes, ou também por indutores biológicos, como aeração e inativação. O processo de autólise pode ser muito rápido, entre 48 e 72 horas, a depender do indutor utilizado no processo (ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006).

3.3 Imobilização de Leveduras

A imobilização de células pode ser definida como confinamento físico de células intactas em certa região do suporte, preservando sua atividade catalítica. A imobilização, muitas vezes, tende a imitar o que ocorre naturalmente quando as células crescem em superfícies ou dentro de estruturas naturais, utilizando-se da própria capacidade de certos microrganismos de aderir a diferentes tipos de superfícies na natureza (KAREL, LIBICKI e ROBERTSON, 1985; KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Diversos processos biotecnológicos são favorecidos através de técnicas de imobilização e, portanto, várias dessas técnicas e materiais de apoio têm sido propostos. Estas técnicas podem ser divididas em quatro grandes

categorias, com base no mecanismo físico empregado: fixação ou adsorção em sólidos, aprisionamento em uma matriz porosa, floculação (natural ou artificialmente induzida), e contenção atrás de barreiras, como ilustrado na Figura 2 (PILKINGTON, MARGARITIS e MENSOUR, 1998; KOURKOUTAS *et al.*; 2004).

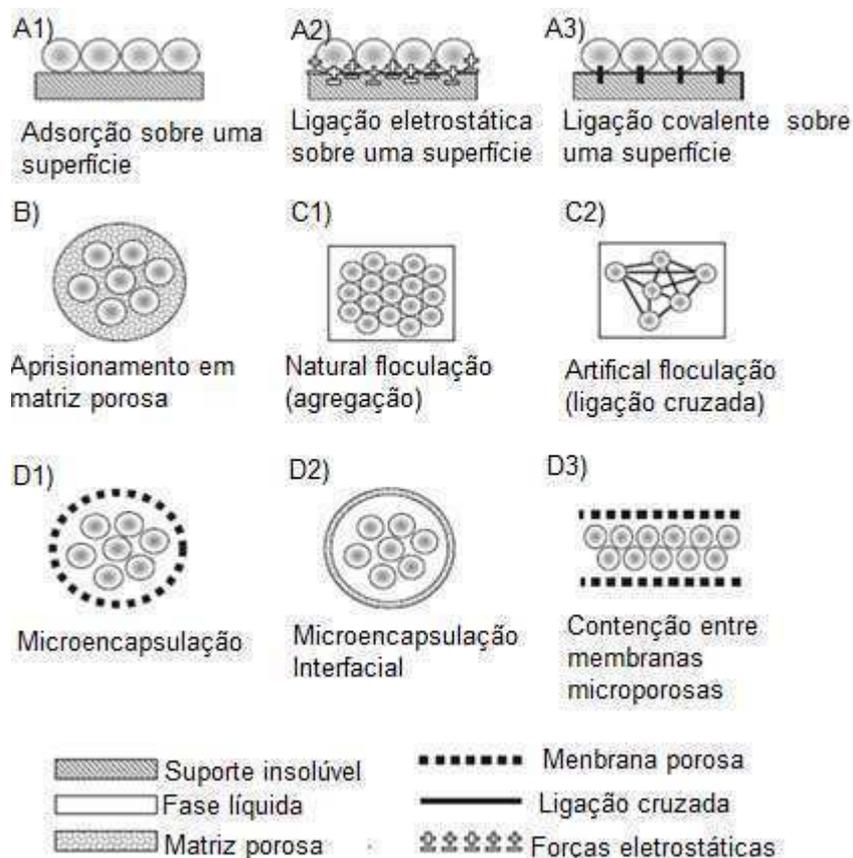


Figura 2: Ilustração esquemática dos principais métodos de imobilização celular: (A) fixação ou adsorção em sólidos; (B) aprisionamento em matriz porosa; (C) floculação (natural ou artificialmente induzida), e (D) contenção atrás de barreiras. Modificado da fonte: KOURKOUTAS *et al.*, 2004.

O uso de células imobilizadas oferece vantagens como, maior produtividade de fermentações (alta densidade celular), adaptação destas células a processos contínuos, que podem ser otimizados e controlados, uso de sistemas simplificados para a remoção de células microbianas do processo, maior tolerância à presença de substâncias inibidoras de leveduras, fermentação em menor escala (capital e custos de funcionamento reduzidos), e as possibilidades de emprego de uma variedade de cepas de microrganismos, incluindo os organismos geneticamente modificados. Algumas desvantagens

também devem ser consideradas como, por exemplo, o crescimento excessivo de células que aumenta a turbidez da bebida fermentada, a estabilidade mecânica da matriz usada para imobilizar células microbianas, perda de atividade em operação prolongada (COLAGRANDE, SILVA e FUMI, 1994; KOURKOUTAS *et al.*, 2002).

Na elaboração de espumantes pelo processo *Champenoise*, com a utilização de leveduras encapsuladas na segunda fermentação, se reduz significativamente o tempo do processo de *remuage*, o qual pelo processo tradicional demanda entre 3 e 4 semanas, e que passa a ser realizado em aproximadamente 20 segundos (COLAGRANDE, SILVA e FUMI, 1994; DIVIES e CACHON, 2005).

Durante as últimas décadas, estão sendo realizadas pesquisas com células de leveduras imobilizadas, e também para a utilização na elaboração de vinhos, tendo em vista a redução do trabalho, simplificação dos processos e consequente redução de custos. A publicação de trabalhos e patentes sobre o uso de células microbianas imobilizadas para a produção de bebidas fermentadas tem mostrado o potencial industrial desta tecnologia (DIVIES e CACHON, 2005).

Gòdia, Casas e Solá (1991) utilizaram *S. cerevisiae* imobilizadas em esferas de gel de alginato e carragena na elaboração de *Cava* (vinho espumante espanhol) e verificaram que o consumo de açúcar ocorreu entre três e quatro semanas, sendo que a formação de CO₂ mostrou-se adequada para ambos os suportes. O alginato e a carragena são polissacarídeos extraídos de algas marinhas marrons e vermelhas respectivamente. O alginato é um polímero de estrutura linear formado por unidades de L-gulurônico e D-manurônico, e a carragena apresenta grupos sulfatos; k-carragena é a forma mais abundante, e apresenta um grupo sulfato para cada duas unidades de galactose (TAPIA *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2011).

Bakoyianis *et al.* (1997) compararam alginato de cálcio, γ -alumina e kissiris, na imobilização de leveduras para a produção de vinho, em batelada e em processo contínuo, e comprovaram que esses três suportes resistiram à concentração de etanol, que no experimento variou entre 7,8°GL e 12,4°GL, e podem ser utilizados em temperatura ambiente (30°C). O kissiris é um mineral poroso de origem vulcânica, encontrado na Grécia, similar ao granito e

constituído por SiO₂ (70%), Al₂O₃ (13%) e outros óxidos inorgânicos (BAKOYIANIS *et al.*, 1992; 1993). Kana *et al.* (1989) realizaram um experimento utilizando γ -alumina (γ -Al₂O₃)³ como suporte de imobilização para *S. cerevisiae*, para a fermentação em batelada de glicose e extrato de uvas.

3.4 Compostos Aromáticos em Espumantes

Durante o processo de fermentação, além da formação de etanol e anidrido carbônico, são formados diversos metabólitos secundários, como álcoois superiores, ésteres, carbonilas e ácidos alifáticos de cadeias curtas (SWIEGERS *et al.*, 2005). Álcoois superiores são formados a partir de aminoácidos, seguindo a reação de Ehrlich, e ou derivados do metabolismo de açúcares (RIBÉREAU-GAYON, *et al.* 2006a). Segundo esses autores, vários trabalhos demonstram que as cepas de leveduras e bactérias maloláticas utilizadas para a elaboração de vinhos podem ter um impacto importante no perfil de aroma e sabor do produto final.

Presa-Owens *et al.* (1998), realizaram análise sensorial com um grupo treinado, avaliando 28 vinhos base para espumante e posteriores espumantes elaborados pelo método *Champenoise*, e verificaram que o vinho base apresentava características distintas entre cultivares. Foi constatado também que, a maioria desses aromas identificados nos vinhos base, após a segunda fermentação, recebeu maior pontuação nas avaliações, o que indicou uma maior intensidade destes aromas.

Ganss *et al.* (2011) constataram que, durante a etapa de segunda fermentação, na elaboração de espumante *Charmat*, monovarietal *Chardonnay* e *Riesling*, ocorreu um aumento na concentração de ácidos alifáticos de cadeia curta e um decréscimo nos ácidos de cadeia média. Efeito semelhante também ocorreu com os ésteres.

Durante o envelhecimento do Cava, os furanos apresentaram acréscimos nas suas concentrações. A esses compostos estão associados aromas de tostado, láctico e/ou doce, que caracterizam o buquê de Cava descrito nas análises sensoriais, que corresponde especificamente a compostos como furfuriltiol, 2-metil-3-furanotiol, diacetil (2,3 butanodiona), e

algumas lactonas. Os compostos específicos encontrados no vinho base elaborados com uvas das variedades *Macabeu*, *Xarel-lo* e *Parellada*, são principalmente acetatos e seus ésteres etílicos, que geralmente possuem aromas descritos como frutado, o que poderia explicar as notas frutadas encontradas predominantemente na análise sensorial deste vinho base (TORRENS *et al.* 2010).

3.5 Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas

A micro extração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) associada à metodologia de cromatografia gasosa (GC) vem sendo amplamente utilizada para caracterização e quantificação de compostos voláteis. É uma microtécnica, onde os processos de pré-concentração e extração de analitos ocorrerem simultaneamente, com posterior introdução da amostra em um equipamento analítico. Esse método apresenta vantagens como, por exemplo, pequeno volume de amostra, reprodutibilidade, alta sensibilidade e principalmente pode ser aplicada a matrizes complexas como alimentos e bebidas (KATAOKA, LORD e PAWLISZYN, 2000; VALENTE e AUGUSTO, 2000).

O emprego da técnica de HS-SPME juntamente com a Cromatografia gasosa monodimensional acoplada à detector de espectrometria de massa (GC/MS) levou a identificação tentativa de 32 compostos em vinhos base da variedade *Chardonnay*, produzidos por cinco vinícolas do estado do Rio Grande do Sul. Dentre os resultados destacam-se o elevado percentual de etil ésteres e suas prováveis contribuições a qualidade dos vinhos bases analisados (Welke *et al.* 2012a),

Ganss *et al.* (2011) identificaram 37 compostos relevantes para o aroma de espumantes, cujo vinho base utilizado foi o de uvas *Chardonnay* e o *Riesling*. Esses autores avaliaram os compostos no vinho base e após a segunda fermentação. Os filmes poliméricos empregados para extração dos voláteis destes vinhos foram carboxen/polidivinilbenzeno (CW/DVB), quando os compostos de interesse foram os álcoois, ácidos de cadeia curta, β -damascenona, monoterpenos e seus óxidos e

divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) quando se pretendia extrair os ésteres.

Torrens *et al.* (2010) identificaram positivamente 35 compostos quando avaliaram vinho base para Cava, Cava jovem e Cava reserva, estas duas últimas com 14 e 24 meses de maturação, respectivamente. Os autores utilizaram a técnica de SPME associada à Cromatografia gasosa-olfatometria (GC-O).

O GC/MS vem sendo utilizado amplamente para a identificação de compostos aromáticos que contribuem para a formação do perfil sensorial de bebidas como vinhos tintos, vinhos brancos, espumantes, Cavas e vinhos base para espumante (BOUTOU e CHATONNET, 2007; BOTELHO, MENDES-FAIA, CLÍMACO, 2010; TORRENS *et al.*, 2010; WELKE *et al.*, 2011; WELKE *et al.*, 2012a).

Com a utilização de GC/MS torna-se possível a comparação do espectro de massa da amostra injetada com os disponíveis em bibliotecas comerciais. Mas para a correta identificação dos compostos torna-se necessário a utilização de outras ferramentas, como a comparação de LTPRI (do inglês, *linear temperature programmed retention index*) obtidos experimentalmente para o composto em questão com o LTPRI disponível na literatura. Para a determinação da LTPRI experimental utiliza-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

$$LTPRI = 100n + 100 \left\{ \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{R(n+1)} - t_{Rn}} \right\}$$

Onde: t_{Rx} = tempo de retenção do composto em análise;

$$t_{Rn} \leq t_{Rx} \leq t_{R(n+1)};$$

t_{Rn} = tempo de retenção do alcano que elui antes do composto para o qual se quer calcular o índice;

n = número de carbonos referente ao n -alcano injetado nas mesmas condições de análise da amostra;

3.6 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA, do inglês: *Principal Component Analysis*) é provavelmente o método estatístico para multivariáveis mais utilizado entre as disciplinas científicas (ABDI e WILLIAMS, 2010). É um método de tratamento de multivariáveis que consiste em uma manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de novos vetores (autovetores), ortogonais entre si, denominados componentes principais (PC, do inglês: *Principal Component*). Nesse novo sistema de eixos, são representadas as amostras, e podem ser avaliadas através de poucas dimensões (FERREIRA *et al.*, 1999; MIRANDA, LE BORGNE, BONTEMPI, 2007). Os objetivos da utilização do PCA são basicamente, extrair as informações mais importantes de um grupo de dados, compactar um conjunto de dados mantendo apenas os dados importantes, simplificar o conjunto de dados, e analisar a estrutura dos dados (ABDI e WILLIAMS, 2010).

Poerner *et al.* (2010) utilizaram PCA para a diferenciação de vinhos base para espumante de duas regiões vitícolas do Rio Grande do Sul, baseado nas análises de minerais. Welke *et al.* (2012b) utilizaram o PCA como ferramenta quimiométrica para realizar diferenciação de vinhos gaúchos dos varietais *Merlot*, *Cabernet Sauvignon*, *Sauvignon Blanc*, *Chardonnay* e de um corte 50% *Chardonnay* e 50% *Pinot Noir*, avaliando seus compostos voláteis. Rocha *et al.* (2001) empregaram PCA para a diferenciação de quatro vinhos brancos monovarietais (*Bical*, *Arinto*, *Cerceal* e *Maria Gomes*), através de nove compostos voláteis mais significativos. O emprego de oito aromas característicos de vinhos *Jerez* em uma PCA permitiu a diferenciação entre vinhos *Jerez*, jovens, finos e daqueles elaborados com os métodos tradicional e ecológico (Moyano *et al.*, 2009). A aplicação de PCA aos dados concernentes à composição volátil de vinhos tintos (*Merlot*, *Vranec*, *Cabernet Sauvignon*, *Kékfrankos* e *Portugieser*) e brancos (*Chardonnay*, *Tokaji* e *Temjanika*) da Macedônia e da Hungria, tornou possível a diferenciação destes vinhos de acordo como o país de origem (IVANOVA *et al.*, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Vinho base

Realizou-se o experimento com o vinho base cedido pela Vinícola Piagentini (Caxias do Sul, RS), sendo este constituído de uma *assemblage* de quatro vinhos bases das seguintes cultivares: *Chardonnay*, *Pinot Noir*, *Viognier* e *Riesling*, nas proporções de 30%, 30%, 30% e 10%, respectivamente. As uvas empregadas na produção do vinho base vieram da Região da Serra Gaúcha, mais especificamente de três municípios, Caxias do Sul, Monte Belo do Sul e Nova Prata.

As correções do vinho base foram realizadas com a dosagem de 30 g/hL de fosfato de amônio bi-básico, 30 g/hL de Thiozote SP[®] produto que favorece o desenvolvimento de leveduras, e apresenta composição de aproximadamente 49,93% de fosfato de amônio, 49,93% de sulfato de amônio e 0,12% de cloridrato de tiamina. Também adicionou-se 30 g/hL de BioActiv[®], produto que fornece suporte físico a leveduras e desintoxicante de mosto, elaborado a partir da parede celular de leveduras e leveduras para vinificação inativadas, rico em celulose. Completou-se a preparação do vinho base com adição de 30 g/hL BioArom[®], produto que atua na biossíntese e liberação de compostos antioxidantes, tais como aminoácidos e peptídeos sulfurados, como a glutationa (LAFFORT, 2012). O BioActiv[®] e BioArom[®] podem interferir nas características do vinho espumante elaborado, mas tais adições já haviam sido realizadas pela vinícola no vinho base destinado ao experimento. Na **Tabela 1** estão apresentados os resultados das análises físico-químicas do vinho base utilizado no experimento, após a realização das correções necessárias.

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas do vinho base utilizado no experimento.

Análise	Valores
pH	3,22
SO ₂ Livre	18 mg/L
SO ₂ Total	109 mg/L
Densidade	1005 g/L
Álcool	11,0 °GL
Acidez Total	83 meq/L
Acidez Volátil	6 meq/L
Açúcar	33,24 g/L

Fonte: Laboratório Físico-químico da Vinícola Piagentini, dezembro de 2011.

4.2 Imobilização de *S. cerevisiae* e Coadjuvantes

As leveduras utilizadas foram previamente hidratadas em água destilada na proporção 1:10 g/mL, em temperatura de 25°C. Estas foram imobilizadas em alginato de sódio a 2% em água. Utilizou-se na proporção levedura: alginato de sódio de 1:1, correspondente à massa seca (m:m). A solução de alginato de sódio e levedura hidratada foi homogeneizada e esta solução foi gotejada, com o auxílio de uma bomba peristáltica modelo Pump P-1, (Pharmacia Biotech) de vazão variável em uma solução de 0,1 M de cloreto de cálcio. A formação de esferas foi feita pelo gotejamento do gel de alginato de sódio e leveduras através de uma agulha de aço inoxidável, com as dimensões de 12,7 mm x 0,33 mm, empregando-se a saída da bomba com uma vazão de 2,5 mL/min. A solução de cloreto de sódio onde foi gotejado o alginato com leveduras foi mantido em um erlenmeyer, sob agitação em um agitador orbital modelo Certomat MO (B. Braun Biotech. Göttingen, Alemanha), a baixa frequência, cerca de 60 RPM. As esferas ficaram por 30 min em contato com a solução de cloreto de cálcio e, a seguir, passaram por quatro ciclos de lavagem em água gelada (10°C), sendo acondicionadas em sacos plásticos, os quais foram selados e mantidos sobre refrigeração até o momento da utilização. O período de refrigeração não ultrapassou 24 horas. Esse procedimento é uma adaptação ao descrito por Gòdia, Casas e Sola (1991) e Callone *et al.* (2008).

Experimentalmente imobilizou-se *S. Cerevisae* e coadjuvantes, sendo que representam três tratamentos, onde imobilizou-se levedura e manoproteína na proporção de 1:0,2 (m:m); levedura e preparado de borra de *Champenoise*

na proporção de 1:0,04 (m:m); e levedura e preparado de borra de *Charmat* na proporção de 1:0,04 (m:m).

4.3 Coadjuvantes: manoproteínas e borras

No presente trabalho utilizou-se Biolees[®], um coadjuvante comercial, sendo esse um preparado específico de extrato de paredes celulares de leveduras, com elevado teor de manoproteínas, e rico em peptídeo sávido e polissacarídeos (LAFFORT, 2012).

As borras utilizadas no trabalho foram fornecidas pela Vinícola Valduga, sendo provenientes de processos de segunda fermentação de espumantes *Charmat* e *Champenoise*. Essas foram coletadas e mantidas sob refrigeração, até o momento de serem processadas. Utilizou-se da centrifugação para a separação das borras finas e das borras grosseiras juntamente com os clarificantes. Realizou-se essa etapa em uma centrífuga Sigma Laboratory, modelo 4K15, com 3000 x g de força durante 15 minutos. No experimento foram utilizadas apenas as borras de menor densidade que após a centrifugação ficaram localizada na interface com o líquido. Após esse processamento, as borras foram mantidas congeladas em freezer (aproximadamente -18°C) até o momento da sua utilização.

4.4 Segunda Fermentação

A segunda fermentação foi realizada utilizando-se nove tratamentos distintos: quatro tratamentos que empregaram *S. cerevisiae*, imobilizada em alginato de cálcio, no Laboratório de Enologia e Bebidas (LABEN/ICTA), quatro que usaram *S. cerevisiae* na forma livre e um tratamento com *S. cerevisiae* encapsulada comercial. Utilizou-se também manoproteína comercial, borra de espumante *Charmat* e borra de espumante *Champenoise*, em dois tratamentos cada, um associado à levedura livre e o outro à levedura imobilizada. Uma descrição sucinta dos tratamentos realizados está descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2: Descrição dos tratamentos realizados com o vinho base proveniente da vinícola Piagentini, segundo tipo de levedura e coadjuvante utilizado.

Tratamentos	Levedura (forma)	Coadjuvante adicionado
T1	Imobilizada no laboratório	Não
T2	Imobilizada no laboratório	Manoproteína
T3	Imobilizada no laboratório	Borra de processo <i>Champenoise</i>
T4	Imobilizada no laboratório	Borra de processo <i>Charmat</i>
T5	Livre	Não
T6	Livre	Manoproteína
T7	Livre	Borra de processo <i>Champenoise</i>
T8	Livre	Borra de processo <i>Charmat</i>
T9	Encapsulada Comercial	Não

As leveduras *S. cerevisiae* livres utilizadas no experimento foram reidratadas 30 minutos antes de sua utilização, na proporção de 1:10 (gramas de levedura : mL de água) a 25°C. Nos tratamentos que também utilizaram coadjuvantes, esses foram homogeneizados no momento da reidratação das leveduras.

As leveduras comerciais utilizadas no tratamento 9 correspondem ao produto ProElif[®], da empresa Proenol (Canelas, Portugal). A descrição do produto é de *S. cerevisiae* encapsuladas em alginato de cálcio e desidratadas. As leveduras utilizadas no experimento, tanto as livres quanto as imobilizadas no laboratório, correspondem a EC1118[®], fornecidas pela empresa Proenol, sendo da mesma linhagem da ProElif[®] (Proenol, 2011). Essas foram utilizadas na dosagem de 30 g/hL de levedura desidratada, seguindo as recomendações do fornecedor. Manteve-se essa relação com as leveduras imobilizadas experimentalmente, através de um cálculo de rendimento, comparando o peso de leveduras desidratadas utilizadas e o peso de esferas de alginato de cálcio produzidas. Nos tratamentos em que foram empregados coadjuvantes foram mantidas as relações peso de leveduras desidratadas e coadjuvantes: levedura e manoproteína 1:0,2 (m:m); levedura e preparado de borra de *Champenoise* 1:0,04 (m:m); e levedura e preparado de borra de *Charmat* 1:0,04 (m:m).

As parcelas foram engarrafadas em garrafas, devidamente identificadas e fechadas com tampas metálicas do tipo corona, nos dias 06 e 07 de dezembro de 2011. As garrafas foram acondicionadas na posição horizontal, em caixas de papelão padrão para vinhos e espumantes, em temperatura ambiente (20°C ±2), até o momento das análises. Tal temperatura foi utilizada

devido a uma limitação técnica do laboratório utilizado. A segunda fermentação foi interrompida oito meses após o fechamento das garrafas.

Na **Tabela 3** estão descritas as dosagens referentes a cada tratamento realizado no experimento.

Tabela 3: Dosagem de leveduras e materiais coadjuvantes de fermentação realizada em cada tratamento no momento do envase do vinho base.

Tratamento	Dosagem (g/garrafa)
T1	4,80
T2	5,28
T3	5,76
T4	5,76
T5	0,15
T6	0,15 + 0,03 de manoproteína
T7	0,15 + 0,06 de borra de processo <i>Champenoise</i>
T8	0,15 + 0,06 de borra de processo <i>Charmat</i>
T9	0,80

4.5 Preparação das Amostras e Extração dos Compostos Voláteis

As amostras foram dispostas em pupitre e efetuou-se a *remuage* por 10 dias e nos dias 15, 16 e 17 de agosto de 2012 realizou-se o *degorgement*. Em um passo seguinte, as garrafas foram fechadas novamente com tampas do tipo corona, mantidas resfriadas a 5°C. Posteriormente transferiu-se cerca de 100 mL do espumante para um erlenmeyer de 250 mL, e submeteu as amostras ao ultrassom para desgaseificação, mantidas em banho de água e gelo, por um ciclo de 30 minutos em ultrassom modelo Unique UltraCleaner 1400 (Unique Group, São Paulo, Brasil), como aparece na **Figura 3**. Após essa etapa, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar de 100 mL, fechados com batoque e tampa roscada e mantidas em freezer (-16°C ± 2) até o momento das análises.



Figura 3: Aparato utilizado para desgaseificação de amostras de espumantes em banho de água e gelo em um ultrassom da empresa Unique Group, São Paulo. Fonte: Autor.

Para a realização de HS-SPME dos compostos voláteis dos espumantes, utilizou-se 1 mL de amostra e 0,3 g de NaCl, em frascos de vidro incolor de 10 mL, providos de tampa de rosca, vazada internamente e preenchida com septo revestido por teflon (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Utilizou-se NaCl de grau PA da Merck (Darmstadt, Alemanha), previamente seco em estufa a 150°C por duas horas e armazenado em dessecador. Os frascos foram colocados em um bloco termostático, fabricado no Instituto de Física da UFRGS, a uma temperatura de 40°C \pm 0,6, por aproximadamente cinco minutos, a fim de que se alcançasse o equilíbrio de volatilização dos compostos voláteis contidos na mistura. A seguir, uma fibra recoberta com o revestimento polimérico DVB/CAR/PDMS foi introduzida no *headspace* de um frasco, com o auxílio do suporte de amostragem manual (Supelco, PA, EUA), sendo o tempo de extração de 30 min, como demonstrado na **Figura 4**. Após o período de extração, a fibra foi inserida no pórtico de injeção do cromatógrafo para dessorção térmica dos compostos voláteis extraídos. A temperatura e o tempo utilizados para a dessorção térmica da fibra foi 250°C e 5 minutos. As fibras empregadas nestes experimentos foram previamente condicionadas, conforme orientações do fabricante.



Figura 4: Montagem empregada para realização das HS-SPME de compostos voláteis de vinhos espumantes em bloco termostático. Fonte: Autor.

Para a verificação da evolução dos componentes voláteis durante a segunda fermentação dos vinhos espumantes que utilizaram leveduras e manoproteínas nas formas livres e imobilizadas experimentalmente (T2 e T6), foram congeladas alíquotas de 500 mL durante o processo, nos períodos de 0, 4, 8, 14, 21, 28, 35 e 46 semanas de fermentação. Essas alíquotas foram congeladas a -18°C , e mantidas nessas condições até o momento da realização das análises. Quando descongeladas, foram mantidas a 5°C e posteriormente foram acondicionadas em um erlenmeyer de 250 mL e submetidas a um banho ultrassom modelo Unique UltraCleaner 1400 (Unique Group, São Paulo, Brasil), por um ciclo de 30 minutos para desgaseificação, sendo refrigeradas por um banho de água e gelo. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 50 mL com tampa, fechados com batoque e tampa roscada e novamente congeladas ($-16^{\circ}\text{C} \pm 2$) até o momento das análises cromatográficas em coluna OV-5.

4.6 Análises Cromatográficas e Análise de Componentes Principais

A análise dos compostos voláteis do *headspace* das amostras de espumante foi realizada através de um cromatógrafo gasoso com detector quadrupolar de espectrometria de massas (GC/qMS) da marca Shimadzu (Kioto, Japão), modelo QP2010 Plus, equipado com uma coluna capilar de fase

estacionária composta por 5% fenilmetilpolisiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano (OV-5; 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm ; Ohio Valley Specialty, Ohio, EUA), que aparece na Figura 5. As temperaturas do injetor, detector e interface com o detector foram de 250°C. As análises iniciaram com o forno a 60°C e, após 5 minutos, o forno foi aquecido a 3°C/min até 120°C, quando a taxa de aquecimento passou a 5°C/min, até a temperatura final de 200°C. A partir desta temperatura o forno foi aquecido a 10C°/min até 250°C, onde permaneceu por mais 5 minutos. A vazão de Hélio (pureza 5.0, White Martins, Pinhais, PR) foi de 1,0 mL/min . O intervalo de massas avaliado foi de 40 a 450 uma, sendo a análise realizada no modo impacto eletrônico, sendo a energia do feixe de elétrons de 70 eV. A coluna capilar de fase estacionária composta por polietileno glicol (DB-WAX; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm ; J&W Scientific, Folsom, EUA) também foi empregada, mas as temperaturas do injetor, detector e interface foram de 250°C, 230°C e 240°C, respectivamente. A temperatura máxima da coluna foi de 240°C, segundo orientações do fabricante.



Figura 5: Cromatógrafo gasoso com detector quadrupolar de espectrometria de massas da marca Shimadzu, modelo QP2010 Plus, onde foram realizadas as análises dos compostos voláteis dos vinhos. Fonte: Autor.

A identificação tentativa dos compostos voláteis foi realizada comparando-se os índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI) obtidos experimentalmente com aqueles reportados na literatura, empregando-se as colunas OV-5 (apolar) e DB-WAX (polar) descritas para uso na GC/qMS. No que tange à comparação dos LTPRI obtidos

experimentalmente com aqueles reportados na literatura, admitiu-se uma variabilidade de ± 20 unidades.

Uma solução hexânica de alcanos, desde o nonano (C9, isto é, um alcano com nove átomos de carbono em sua estrutura) até o triacontano (C30) foi analisada nas mesmas condições cromatográficas empregadas para os compostos voláteis das amostras de vinho para obtenção dos tempos de retenção destes alcanos.

A comparação entre os espectros de massas dos compostos voláteis dos espumantes com aqueles da biblioteca comercial de espectros de massas Wiley versão 229, considerando-se um valor mínimo de similaridade espectral de 80% também corroborou no processo de identificação tentativa dos compostos voláteis do *headspace* dos espumantes em estudo.

Compostos que apresentaram percentual de área cromatográfica inferior a 0,06% da área total dos picos cromatográficos obtidos, foram considerados não detectados. A qualidade das colunas cromatográficas e do polímero de SPME foi constantemente avaliada, através de análises em branco, de forma a constatar-se ausência de interferentes nos resultados obtidos.

Todas as análises cromatográficas foram feitas em triplicata e foi considerada a média dos resultados.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o software Statistica[®], em sua versão 7.2.

O acompanhamento da evolução dos compostos voláteis foi realizado monitorando a área normalizada para cada um dos compostos voláteis em estudo em cada intervalo de tempo pré-determinado dos tratamentos. A área normalizada A_n foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$A_n = \frac{A_x}{A_{max}}$$

Onde, A_x é igual a área cromatográfica de um determinado composto em uma dada etapa do processo de fermentação e A_{max} é a área máxima encontrada para o composto em questão durante todo o processo de fermentação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Cromatográficas

Foram tentativamente identificados 46 compostos por GC/qMS no *headspace* dos vinhos espumantes obtidos nos nove tratamentos, apresentados na **Tabela 4**. Destes compostos, 32 compostos foram separados e identificados através de uma coluna OV-5 e 34 em uma coluna DB-Wax, sendo que 20 destes componentes foram tentativamente identificados em ambas as colunas. Exemplos de cromatogramas encontrados no presente trabalho podem ser visualizados nas **Figuras 6 e 7**

Os 46 compostos pertencem às seguintes classes: 22 ésteres, 11 álcoois, 7 ácidos orgânicos, 4 terpenos e 2 cetonas. Com a utilização da coluna OV-5 identificou-se: 16 ésteres, 7 álcoois, 4 ácidos orgânicos, 3 terpenos e 2 cetonas. Com a utilização da coluna DB-Wax identificou-se: 16 ésteres, 10 álcoois, 6 ácidos orgânicos e 2 terpenos. Os compostos identificados são apresentados na **Tabela 4**, assim como seus respectivos índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI). A faixa de LTPRI coberta pelo LTPRI calculado experimentalmente (LTPRI_{cal}) ficou entre 1200 à 2600, quando se empregou a coluna DB-Wax e entre 850 à 2150 quando do uso da coluna OV-5. Os LTPRI calculados, que apresentaram valores abaixo destas duas faixas, foram obtidos por extrapolação da reta obtida entre os índices e os tempos de retenção dos alcanos lineares (Van den Dool e Kratz, 1963).

A separação e consequente identificação tentativa dos compostos butanoato de isoamila, ácido nonanoico, ácido octanoico e α -terpineol, apenas na coluna polar podem ser explicadas por uma possível co-eluição na coluna apolar, pois esses compostos apresentam LTPRI para coluna apolar, descritos na literatura, próximos a outros compostos encontrados.

Tabela 4: Compostos tentativamente identificados no *headspace* dos vinhos espumantes elaborados em laboratório, por cromatografia gasosa em coluna polar e apolar.

Número	Composto	LTPRlcal (OV-5)	LTPRIlit (OV-5)	LTPRlcal (DB-Wax)	LTPRIlit (DB-Wax)	Classe
1	hexanol	879*	863 ¹⁰	1357	1351 ¹	álcool
2	acetato de isoamila	884*	869 ¹⁰	<1200	1015 ²	éster
3	ácido hexanóico	985	967 ¹⁰	1858	1845 ¹	ácido
4	hexanoato de etila	1001	997 ¹⁰	1237	1232 ¹	éster
5	Acetato de hexila	1015	1007 ¹⁰	1276	1275 ²	éster
6	2 etil-1- hexanol	1030	1030 ⁹	1495	1490 ³	álcool
7	1 octanol	1073	1063 ¹⁰	1563	1563 ⁴	álcool
8	2 nonanona	1094	1087 ¹⁰			cetona
9	linalool	1101	1095 ¹⁰	1555	1558 ²	terpeno
10	2 nonanol	1103	1097 ¹⁰	1525	1530 ⁵	álcool
11	álcool feniletílico	1114	1106 ¹⁰			álcool
12	succinato de dietila	1183	1176 ¹⁰	1685	1678 ¹	éster
13	octanoato de etila	1200	1196 ¹⁰	1440	1430 ¹	éster
14	fenilacetato de etila	1247	1243 ¹⁰	1791	1795 ¹	éster
15	acetato de feniletil	1259	1254 ¹⁰	1821	1815 ²	éster
16	ácido decanoico	1378	1364 ¹⁰	2285	2278 ³	ácido
17	β - damascenone	1387	1383 ¹⁰		1832 ¹¹	cetona
18	(4E) decenoato de etila	1390	1380 ¹⁰			éster
19	decanoato de etila	1398	1395 ¹⁰	1644	1639 ¹	éster
20	octanoato de isoamila	1449	1442 ¹⁰	1662	1649 ¹	éster
21	geranil acetona	1456	1453 ¹⁰			terpeno
22	dodecanol	1476	1469 ¹⁰	1972	1981 ¹¹	álcool
23	ácido dodecanóico	1564	1565 ¹⁰	2496	2477 ³	ácido

24	(E) - nerolidol	1567	1561 ¹⁰			terpeno
25	tridecanol	1577	1570 ¹⁰			álcool
26	dodecanoato de etila	1596	1594 ¹⁰	1847	1827 ¹	éster
27	tetradecanoato de metila	1727	1722 ¹⁰	2014	2009 ¹	éster
28	tetradecanoato de etila	1795	1795 ¹⁰		2065 ¹¹	éster
29	hexadecanoato de metila	1928	1921 ¹⁰			éster
30	ácido hexadecanóico	1967	1959 ¹⁰	>2600	2986 ⁶	ácido
31	hexadecanoato de etila	1995	1992 ¹⁰	2285	2288 ⁴	éster
32	linoleato de metila	2103	2095 ¹⁰			éster
33	álcool isoamílico	<850	759 ⁸	1212	1210 ¹	álcool
34	lactato de etila	<850	821 ¹	1349	1349 ¹	éster
35	3-etóxi-1-propanol			1379	1378 ²	álcool
36	cis-3-hexen-1-ol	<850	850 ¹⁰	1389	1382 ²	álcool
37	ácido acético	<850		1466	1461 ⁴	ácido
38	butanoato de isoamila		1056 ⁷	1268	1255 ⁷	éster
39	(E)-3-hexenol	<850	844 ¹⁰	1369	1365 ³	álcool
40	2,3 butanediol	<850	785 ¹⁰	1546	1545 ⁴	álcool
41	9-decenoato de etila			1694	1691 ¹	éster
42	α -terpineol		1186 ¹⁰	1699	1719 ⁴	terpeno
43	succinato de etila			2398	2370 ²	éster
44	ácido octanoico		1167 ¹⁰	2072	2072 ²	ácido
45	ácido nonanoico		1267 ¹⁰	2178	2168 ⁷	ácido
46	malato de dietila			2054	2058 ²	éster

¹Bosch-Fust et al. (2006); ² Boido et al. (2003); ³ Umano et al. (1999); ⁴ Gürbüz, Rouseff and Rouseff (2006); ⁵ Werkhoff et al. (1998); ⁶lawo et al. (2011); ⁷Fan and Qian (2006); ⁸ Escudero et al. 2004; ⁹ Welke et al 2012a; ¹⁰ Adams 2007; ¹¹ Li et al, 2008. LTPRlit: índice de retenção com programação linear de temperatura obtido de fontes da literatura científica; LTPRcal: índice de retenção com programação linear de temperatura obtido; OV-5(apolar), DB-Wax (polar). * LTPRcal através da extrapolação da série de alcanos injetadas.

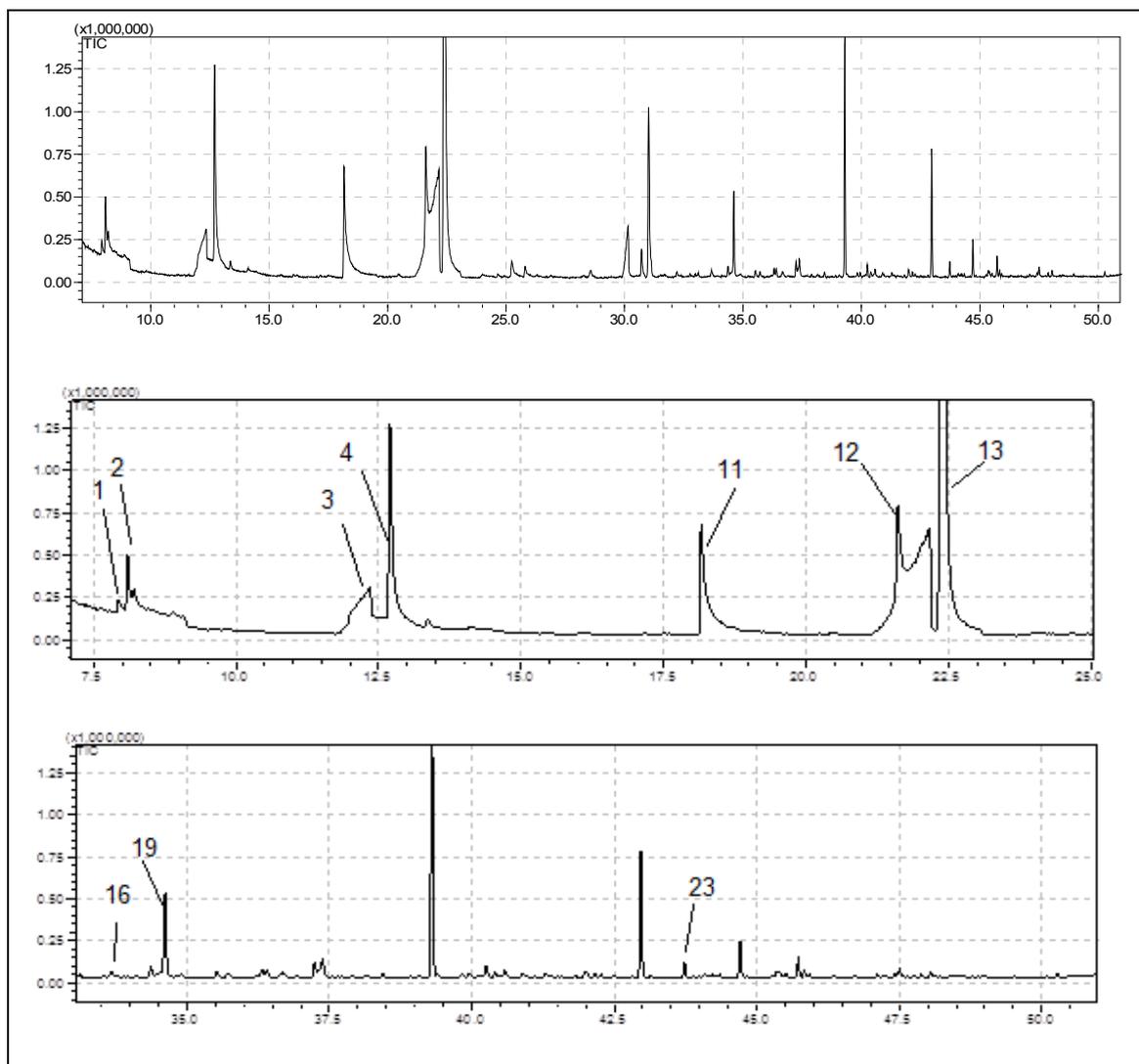


Figura 6: Cromatograma obtido após extração do *headspace* de amostra de vinho espumante elaborado experimentalmente, utilizando o revestimento polimérico de DVB/CAS/PDMS 50/30 StableFlex para SPME, com coluna OV-5. Fonte: Autor (Condições experimentais da extração e análise nos itens 5.2 e 5.3)

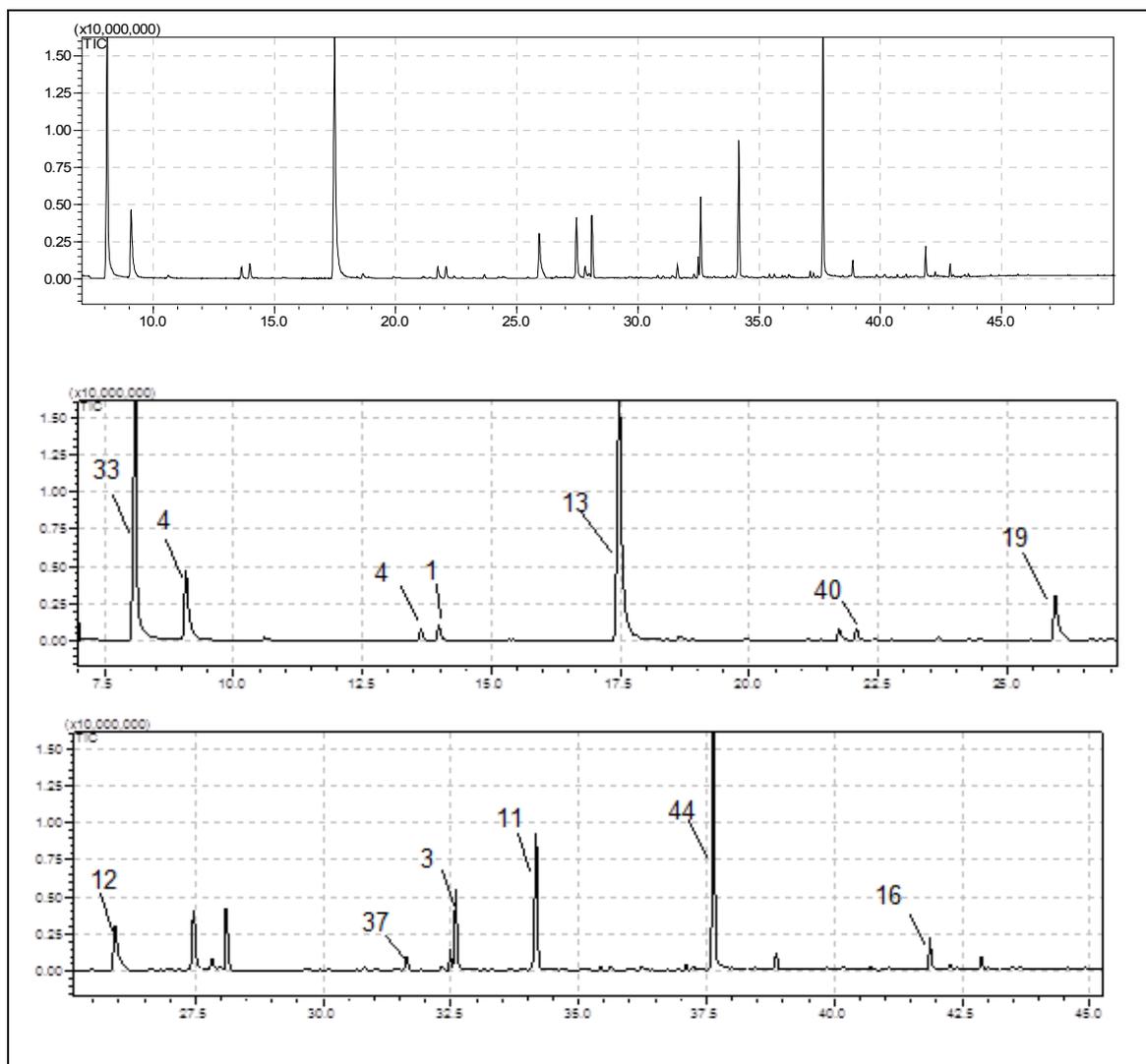


Figura 7: Cromatograma obtido após extração do *headspace* de amostra de vinho espumante elaborado experimentalmente, utilizando o revestimento polimérico de DVB/CAS/PDMS 50/30 StableFlex, com coluna Wax. Fonte: Autor (Condições experimentais da extração e análise nos itens 5.2 e 5.3).

Verificou-se que os **ésteres** foram os compostos majoritários do *headspace* representando aproximadamente 48% de todos os compostos tentativamente identificados. De forma semelhante, Welke *et al.* (2012a) verificaram que os ésteres representaram 56% dos compostos tentativamente identificados em vinho base para fabricação de espumante *Chardonnay* e Ganss *et al.* (2011) reportaram a presença de 39% e 26% de ésteres entre o total de compostos voláteis de vinhos espumantes *Charmat*, elaborados com vinho base *Chardonnay* e *Riesling* respectivamente.

Os ésteres são formados a partir da reação entre álcoois e ácidos, com liberação de moléculas de água, sendo esta uma reação reversível. Existe um

grande número de diferentes álcoois e ácidos no vinho, o que torna possível a formação de um número extenso de ésteres (RIBÉREAU-GAYON, *et al.* 2006a).

Entre os 46 compostos encontrados nas análises de *headspace* dos vinhos espumantes, 25 estavam presentes em todos os tratamentos, sendo esses oriundos do vinho base utilizados. Os compostos encontrados no vinho base e nos vinhos espumantes submetidos aos nove tratamentos realizados estão apresentados na **Tabela 5**.

No vinho base foi possível a identificação tentativa de 40 compostos, enquanto nos tratamentos em que foram utilizadas leveduras imobilizadas foram tentativamente identificados 38, 42, 31, 30 e 39 para os tratamentos 1, 2, 3, 4 e 9 respectivamente. E para os tratamentos 5, 6, 7 e 8, nos quais foram empregadas leveduras livres, identificou-se 39, 33, 38 e 42 compostos, respectivamente.

Os compostos **1-octanol** e **2-nonanol**, não foram identificados no vinho base, mas identificou-se em parte dos tratamentos. O 1-octanol foi identificado nos tratamentos 1, 2, 4, 7 e 8, e o 2-nonanol nos tratamentos 2, 5, 8 e 9. O composto 1-octanol apresenta aroma cítrico, de rosas e floral (SELLI, *et al.*, 2008; JIANG e ZHANG, 2010).

O composto 2-nonanona foi identificado apenas no T7, estando associado a aromas doces, amadeirados e frutados (KLESK, QIAN e MARTIN, 2004). O composto **β -damascenona** foi identificado no T9, e segundo a literatura, esse composto está associado aos aromas de maçã cozida, geleia e doce (GÜRBÜZ, ROUSEFF e ROUSEFF, 2006; TORRENS, *et al.*, 2010; BARATA, *et al.*, 2011).

A presença dos compostos **(E)- nerolidol** e **malato de dietila** foi verificado nos nove tratamentos realizados, após a segunda fermentação, mas não foram identificados no vinho base. Os autores Lee e Noble (2003), utilizando GC-O para caracterização de aromas provenientes de vinhos *Chardonnay* produzidos na Califórnia, associaram o malato de dietila ao aroma característico de açúcar mascavo, e Selli *et al.* (2008) associaram-no ao caramelo.

O composto **butanoato de isoamila**, foi o único composto detectado apenas no vinho base, tal composto está associado a aroma floral e frutado (FAN e QIAN, 2006).

Os compostos **geranil acetona**, **ácido hexadecanoico** e **α -terpineol**, **linalol**, foram detectados no vinho base e posteriormente detectados em parte dos tratamentos realizados (geranil acetona no tratamento 2; ácido hexadecanoico nos tratamentos 2, 5 e 8; α -terpineol nos tratamentos 1, 2, 7, e 8; e o linalol nos tratamentos 2, 5, 8 e 9). O geranil acetona (6,10-Dimetil-5,9-undecadien-2-ona) foi detectado em vinhos italianos das variedades *Ruché*, *Malvasia* e *Brachetto* em trabalho realizado por Bonino *et. al* (2003) e em Cava, com extração por SPME e análises em GC/MS, realizadas por Gallardo-Chacón *et al.* (2009). Segundo esses autores algumas cetonas alifáticas, o que inclui o geranil acetona, estão relacionadas à degradação de carotenoides C13.

Selli *et al.* (2004), detectou ácido hexadecanoico em vinhos tintos elaborados com uvas *Kalecik Karasi*, uma variedade típica da Turquia. Lawo *et al.* (2009) encontraram esse composto analisando partes específicas da videira (*Vitis sp.*), tais como talos e folhas.

Bonino *et. al* (2003) também detectaram linalol e α -terpineol em diferentes variedades de vinhos tintos avaliados, também foram encontrados em vinhos tintos *Merlot* avaliados por Welke *et al.* (2012b), e em *Cabernet Sauvignon* por Forde *et al.* (2011). Tais compostos estão associados a aromas frutados, cítricos, florais e doces (KLESK, QIAN e MARTIN, 2004; JIANG e ZHANG, 2010).

Avaliando a transformação de compostos voláteis durante a fermentação de mosto de uva *Moscato* branco, utilizando três diferentes cepas de levedura, Ugliano *et al.*(2006) quantificou a redução de 70% na concentração de linalol, e de menos de 40% na concentração de α -terpineol. Efeito similar pode ter ocorrido no caso dos tratamentos 1, 3, 4, 6 e 7 com o composto linalol e nos tratamentos 3, 4, 5, 5, 6 e 9 para o α -terpineol, como uma possível explicação para a não detecção desses dois compostos após a segunda fermentação.

Tabela 5: Compostos tentativamente identificados no *headspace* do vinho base e dos vinhos espumantes elaborados experimentalmente através de nove tratamentos diferentes feitos antes da segunda fermentação.

Composto	base	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
hexanol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
acetato de isoamila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ácido hexanoico	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
hexanoato de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
acetato hexila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2 etil-1- hexanol	*	*	*	*	*	*	nd	nd	*	*
1 octanol	nd	*	*	nd	*	nd	nd	*	*	nd
2 nonanona	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*	nd	nd
linalol	*	nd	*	nd	nd	*	nd	nd	*	*
2 nonanol	nd	nd	*	nd	nd	*	nd	nd	*	*
álcool feniletílico	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
succinato de dietila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
octanoato de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
fenilacetate de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
acetato de feniletila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ácido decanoico	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
β -damascenone	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*
4 -(E)- decenoato de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
decanoato de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
octanoato de isoamila	*	nd	*	*	*	*	nd	nd	*	*
geranil acetona	*	nd	*	nd						
dodecanol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ácido dodecanóico	*	*	*	nd	nd	*	*	*	*	*
(E)-nerolidol	nd	*	*	*	*	*	*	*	*	*
tridecanol	*	*	*	*	nd	*	nd	*	*	*

dodecanoato de etila	*	*	*	*	nd	*	*	*	*	*
tetradecanoato de metila	*	*	*	nd	nd	*	*	*	*	*
tetradecanoate de etila	*	*	*	nd	nd	*	*	*	*	*
hexadecanoato de metila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ácido hexadecanoico	*	nd	*	nd	nd	*	nd	nd	*	nd
hexadecanoato de etila	*	*	*	nd	nd	*	*	*	*	*
linoleato de metila	*	*	nd	nd	nd	*	*	*	*	nd
álcool isoamilíco	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
lactato de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3-etóxi-1-propanol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ácido acético	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
btanoato de isoamila	*	nd								
(<i>E</i>)-3-hexenol	*	*	*	nd	nd	nd	nd	*	*	*
2,3 butanediol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
9-decenoato de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
α -terpineol	*	*	*	nd	nd	nd	nd	*	*	nd
succinato de etila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ácido octanoico	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ácido nonanoico	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
malato de dietila	nd	*	*	*	*	*	*	*	*	*

T: tratamento; * Composto presente no referido tratamento, nd composto não detectado no referido tratamento, pois sua área cromatográfica percentual é menor do que 0,06%.

A **Tabela 6** apresenta os resultados das análises cromatográficas em percentual de área dos picos cromatográficos correspondentes aos compostos voláteis do *headspace* dos vinhos espumantes produzidos neste trabalho, correspondentes aos nove tratamentos distintos, realizadas através do uso de HS-SPME e GC/qMS.

O **octanoato de etila** representou 54,61% da área cromatográfica dos voláteis no vinho base e seu percentual sofreu uma redução após a segunda fermentação, apresentando valores entre 32,65% e 47,15%. Este mesmo éster está presente no grupo de compostos majoritários, em vinho base *Chardonnay* para espumante (WELKE *et al.* 2012a) e em vinho base *Chardonnay* e *Riesling*, como composto majoritário e como o segundo éster em maior proporção no *headspace*, após a 2ª fermentação (GANSS *et al.* 2011). O octanoato de etila também está presente em vinhos de outras variedades como *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, vinho *Jerez* e *Cava* (MOYANO, *et al.*, 2002; LEE e NOBLE, 2003; TORRENS, *et al.*, 2008; BARATA, *et al.*, 2011; FORDE, *et al.*, 2011; WELKE, *et al.* 2012b). Este composto, octanoato de etila, está associado a aromas frutados (pera, abacaxi, banana, morango), frescos e adocicados (MOYANO, *et al.*, 2002; LEE e NOBLE, 2003; TORRENS, *et al.*, 2010).

O segundo composto que apresentou maior área cromatográfica percentual no *headspace* do vinho base, o **decanoato de etila**, também sofreu redução de 16,74%, para valores entre 3,02% e 8,35%. Segundo trabalho realizado por Moyano *et al.* (2009) esse composto está associado a aromas químicos e de gordura em vinhos *Jerez* e a aromas florais e de sabão, de acordo com Swlegers *et al.* (2005).

Alguns compostos do vinho base, como **hexanoato de etila** e **succinato de dietila**, apresentaram um acréscimo nos seus percentuais de 2,58% e 4,97% respectivamente, para valores entre 5,46% e 14,96% para o hexanoato de etila e valores entre 6,64% e 21,15% para o succinato de dietila, após a segunda fermentação. Esse último composto apresenta aromas frutados, florais e adocicados, enquanto o aroma do hexanoato de etila se traduz em notas frutadas, de anis e adocicadas (CAMPO, *et al.*, 2006; KOMES, ULRICH e LOVRIC, 2006; TORRENS *et al.*, 2010; BOTELHO, MENDES-FAIA e CLÍMACO, 2010).

No vinho base os compostos **álcool feniletílico** e **ácido hexanoico** apresentaram valores percentuais de área respectivamente de 4,47% e 4,36%. Enquanto que nos vinhos espumantes elaborados experimentalmente apresentaram variações no percentual de área cromatográfica, entre 7,47% e 14,70% para o composto álcool feniletílico e valores entre 4,10% e 11,06% para o ácido hexanoico.

Os compostos ácido hexanoico e álcool feniletílico foram identificados através de extração por SPME, e análise em GC/MS em *Cavas* por Riu-Aumatell, *et al.* (2004), em vinhos *Chardonnay*, por Marco, Moreno e Azpilicueta (2008), e em vinhos *Riesling* e *Chardonnay* por Knoll, *et al.* (2011), em vinhos *Ruché* por Bonino *et al.* (2003), em vinho *Syrah*, por Zhang *et al.* (2011), em vinho *Cabernet Sauvignon*, por Forde *et al.* (2011), em vinhos *Chardonnay* oriundos do estado da Califórnia (EUA) por Lee e Noble (2003) e em vinhos espumantes elaborados com uvas dos varietais *Riesling* e *Chardonnay* por Ganss *et al.* (2011).

Peinado *et al.*, (2004) avaliaram vinho *Jerez*, e associaram ao composto ácido hexanoico aromas de ranço, queijo e gordura, e para o composto álcool feniletílico a aromas de rosas. Em vinhos DO (Vinhos de Madrid), Gil *et al.* (2006) associaram aroma de queijo ao ácido hexanoico e de rosas ao álcool feniletílico.

Tabela 6: Percentual de área cromatográfica dos compostos tentativamente identificados no *headspace* do vinho base e dos vinhos espumantes elaborados experimentalmente, por cromatografia gasosa em coluna apolar

Composto	base	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
hexanol	0,36	1,11	1,86	1,44	1,06	1,20	0,37	0,76	0,90	1,86
acetato de isoamila	1,47	4,18	6,30	4,03	2,29	2,29	1,20	1,47	2,28	4,78
ácido hexanoico	4,36	11,06	4,10	8,83	9,43	7,38	7,13	9,36	8,42	5,60
hexanoato de etila	2,58	9,01	14,96	10,49	7,09	9,02	5,71	5,34	5,46	10,18
acetate hexila	0,25	0,32	0,53	0,34	0,26	0,23	0,17	0,15	0,18	0,17
2 etil-1-hexanol	0,08	0,16	0,13	0,24	0,23	0,14	nd	nd	0,12	0,17
1 octanol	nd	0,11	0,10	nd	0,11	nd	nd	0,10	0,12	nd
2 nonanona	nd	0,11	nd	nd						
linalol	0,09	nd	0,13	nd	nd	0,14	nd	nd	0,11	0,17
2 nonanol	nd	nd	0,05	nd	nd	0,12	nd	nd	0,08	0,15
álcool feniletílico	4,47	10,18	7,47	11,22	14,55	7,76	12,16	14,70	10,13	9,51
succinato de dietila	4,97	13,12	6,64	17,83	21,15	9,14	18,33	19,01	14,31	11,00
octanoato de etila	54,61	38,44	46,90	36,71	32,65	47,15	38,04	33,49	40,48	36,91
fenilacetato de etila	0,08	0,16	0,14	0,21	0,27	0,17	0,24	0,25	0,17	0,17
acetato de feniletila	1,15	0,89	0,65	0,82	1,34	0,69	1,39	1,31	1,07	1,02
ácido decanóico	5,69	3,46	2,91	3,04	4,29	4,83	4,86	4,11	4,57	6,75
β - damascenone	nd	0,08								
4 -(E)- decenoato de etila	0,87	0,88	0,55	0,47	0,62	1,26	1,67	1,11	0,80	0,31
decanoato de etila	16,74	4,70	5,25	3,02	3,39	4,95	5,07	3,42	4,64	8,35
octanoato de isoamila	0,28	nd	0,07	0,26	0,24	0,09	nd	nd	0,12	0,12
geranil acetona	0,06	nd	0,07	nd						
dodecanol	0,26	0,24	0,20	0,23	0,41	0,39	0,51	0,45	0,25	0,41
ácido dodecanoico	0,14	0,13	0,08	nd	nd	0,19	0,24	0,21	0,24	0,22
nerolidol (e)	nd	0,17	0,10	0,14	0,25	0,21	0,19	0,17	0,23	0,14
tridecanol	0,12	0,19	0,06	0,21	nd	0,14	nd	0,27	0,17	0,16

dodecanoate de etila	0,26	0,32	0,21	0,24	nd	0,26	0,41	0,32	0,33	0,73
tetradecanoato de metila	0,20	0,20	0,09	nd	nd	0,20	0,20	0,41	0,23	0,21
tetradecanoato de etila	0,15	0,10	0,10	nd	nd	0,26	0,22	0,31	0,29	0,25
hexadecanoato de metila	0,46	0,60	0,20	0,23	0,38	0,91	1,08	2,05	1,57	0,45
ácido hexadecanóico	0,08	nd	0,09	nd	nd	0,12	nd	nd	0,10	nd
hexadecanoato de etila	0,11	0,11	0,08	nd	nd	0,53	0,51	0,57	2,16	0,14
linoleato de metila	0,10	0,17	nd	nd	nd	0,23	0,29	0,52	0,49	nd

nd composto não detectado no presente tratamento. Condições de análise cromatográfica descritas no item 5.3, tendo sido utilizada uma coluna cromatográfica OV-5.

5.2 Análise de Componentes Principais

As análises foram realizadas como descrito no item 4.3 do presente trabalho, com a utilização da coluna cromatográfica OV-5. De maneira geral o limite de detecção dos compostos foram de no mínimo 0,06% da área total dos picos cromatográfico.

Doze compostos que apresentaram contribuição de área cromatográfica percentual acima de 1 % na maior parte dos vinhos espumantes e vinho base foram escolhidos, de forma que suas áreas cromatográficas foram submetidas a uma PCA, a fim de se verificar possíveis semelhanças e dessemelhanças entre estes vinhos, com base na composição de seus compostos voláteis. Dentre estes doze componentes, oito são ésteres, dois ácidos e dois álcoois: acetato de isoamila, hexanoato de etila, succinato de dietila, octanoato de etila, 4-(E)- decanoato de etila, decanoato de etila, hexadecanoato de metila e acetato de feniletila, álcool fenilético, hexanol, ácido hexanóico e ácido decanóico.

A **Tabela 7** apresenta o resultado da PCA para os doze componentes voláteis do *headspace* do vinho base e dos nove vinhos espumantes resultantes dos distintos tratamentos. As primeiras quatro componentes principais (PC, do inglês *principal component*) respondem por 91,87% do total da variância, sendo que as duas primeiras PC explicam 75,74% do total da variância do sistema, sendo que a PC1 responde por 42,73% e a PC2 por 33,01% desta variância. A maior contribuição para o PC1 é dos seguintes compostos: **acetato de isoamila** (-0,766697), **álcool fenilético** (0,783245), **succinato de dietila** (0,823393) e **acetato de feniletila** (0,797278). No caso da PC2, os compostos que mais contribuem são **hexanoato de etila** (0,700982), **octanoato de etila** (-0,686680), e **decanoato de etila** (-0,847637). No entanto, as PC3 e PC4 são responsáveis respectivamente, por 10,58% e 5,55% da variância total da PCA. Demais contribuições dos fatores (*Eigenvalues*) podem ser observadas na **Figura 8**.

Tabela 7: Contribuição dos parâmetros para os *Loadings* das componentes principais, *Eigenvalues* e respectivas variâncias, avaliando-se o vinho base e os nove tratamentos.

Compostos	<i>Loadings</i>			
	CP1	CP2	CP3	CP4
hexanol	-0,655790	0,667518	-0,216920	0,259422
acetado de isoamila	-0,766697	0,583239	-0,083555	0,044155
ácido hexanoico	0,659108	0,499704	0,160784	-0,211177
hexanoato de etila	-0,648948	0,700982	0,105523	0,153821
álcool feniletílico	0,783245	0,570376	-0,178078	0,036427
succinato de dietila	0,823393	0,494258	-0,162738	-0,126157
octanoato de etila	-0,624612	-0,686680	0,343970	-0,079635
acetato de feniletila	0,797278	-0,303765	-0,417288	-0,098696
ácido decanoico	0,015809	-0,618869	-0,615893	0,381707
4-(<i>E</i>)-decanoato de etila	0,552144	-0,415788	0,560801	0,181780
decanoato de etila	-0,380244	-0,847637	-0,263922	-0,181372
hexadecanoato de metila	0,697864	-0,161817	0,253557	0,532933
<i>Eigenvalues</i>	5,127397	3,960800	1,269429	0,666488
% variância	42,7283	33,0066	10,5785	5,5540
% variância total	42,7283	75,7350	86,3135	91,8676

Na **Figura 8**, observa-se a projeção dos dados resultantes dos nove tratamentos realizados antes da 2ª fermentação sobre os planos CP1 e CP2, onde se destacam dois conglomerados que representam as amostras que sofreram a 2ª fermentação com leveduras livres (T5, T6, T7 e T8) e com leveduras imobilizadas (T1, T2, T3, T4 e T9), enquanto o vinho base está localizado em um ponto separado do gráfico.

O vinho base ficou disposto no 3º quadrante do gráfico, evidenciando que ele se destaca dos vinhos espumantes, dada a maior contribuição de octanoato de etila e decanoato de etila na composição do seu *headspace*.

O grupo de tratamentos em que foram utilizadas leveduras imobilizadas (T1, T2, T3, T4 e T9) está localizado no 1º e 2º quadrantes, sendo esse tipo tratamento influenciado pela concentração dos compostos succinato de dietila (0,823393; 0,494258), álcool feniletílico (0,783245; 0,570376), ácido hexanoico (0,659108; 0,499704), acetato de isoamila (-0,766697; 0,583239), hexanol (-0,655790; 0,667518) e hexanoato de etila (-0,648948; 0,700982).

Nos tratamentos onde foram utilizadas leveduras livres, pode-se observar uma influência principal dos compostos do 4º quadrante, acetato de feniletila (0,797278; -0,303765), hexadecanoato de metila (0,697864; -0,161817). Dentro desse grupo o tratamento 5, apresenta uma forte influencia dos compostos do 3º quadrante que caracterizam o vinho base utilizado, tendo como componente majoritário, o octanoato de etila (-0,624612; -0,686680), que também é um dos componentes majoritários do *headspace* do vinho base.

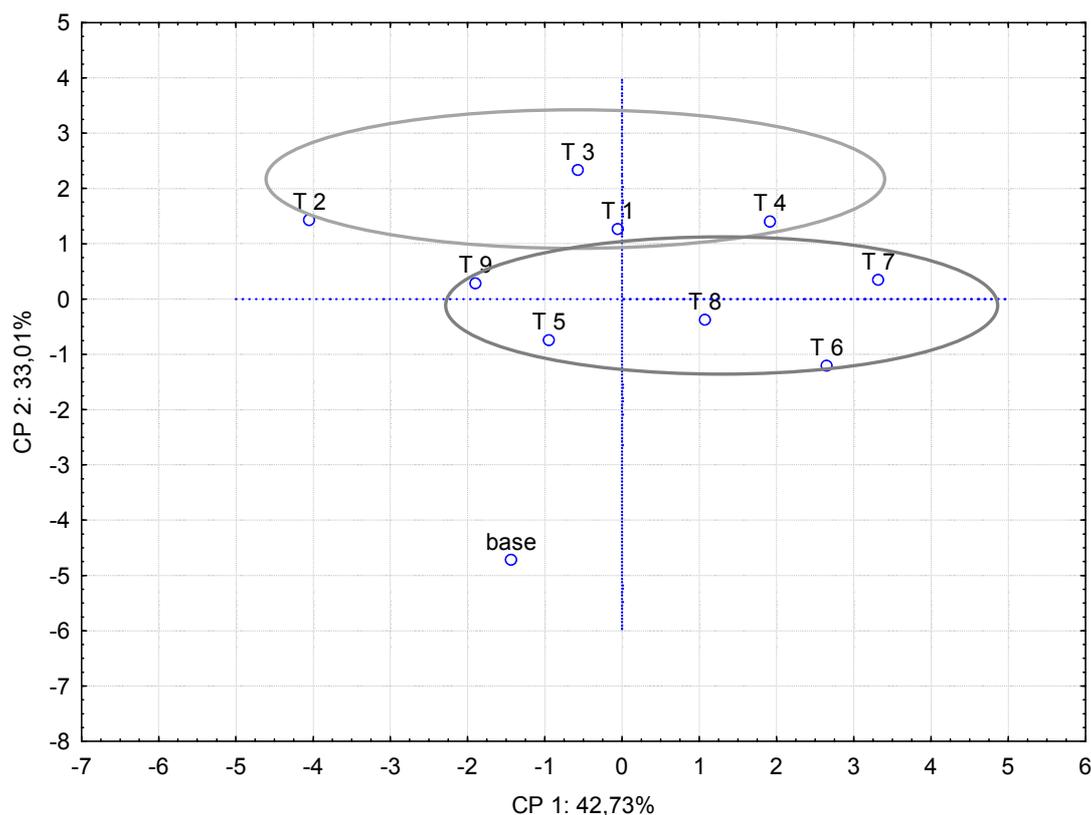


Figura 8: Gráfico indicativo do agrupamento dos nove tratamentos experimentais nos planos definidos pelas componentes principais, tendo-se avaliado os compostos voláteis do *headspace* do vinho base e dos nove vinhos espumantes.

Na **Figura 9**, observa-se as projeções dos percentuais de área cromatográfica dos compostos voláteis, selecionados para a realização do PCA, e seus *Loadings* no plano constituído pelas duas componentes principais.

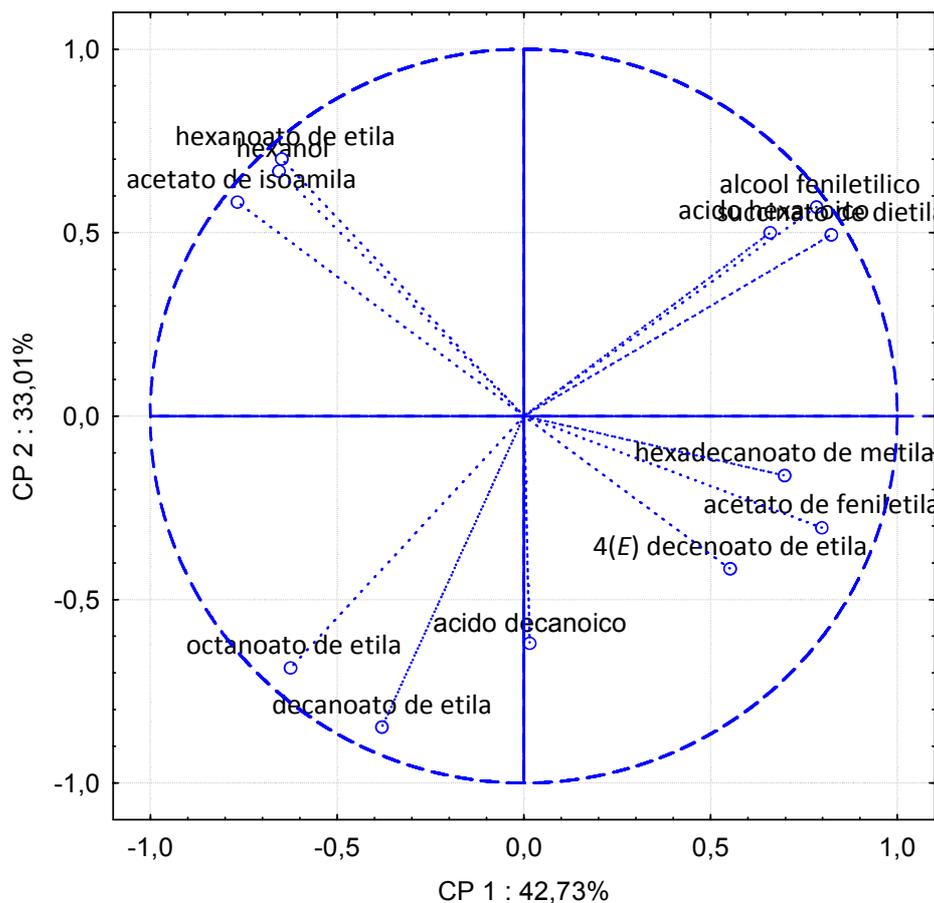


Figura 9: Projeção das variáveis (área cromatográfica percentual dos compostos voláteis do headspace de vinho base e de nove diferentes tratamentos) e seus Loadings no plano constituído pelas duas componentes principais.

Dentre os vários tratamentos, destacam-se ainda T2 e T6, pois em T2 utilizou-se levedura e manoproteína imobilizadas em alginato de cálcio, em laboratório, enquanto em T6, foram empregados os mesmos materiais, mas na forma livre. Observa-se que T2 ficou localizado no 2º quadrante, caracterizado pela concentração de **acetato de isoamila** (-0,766697; 0,583239), **hexanol** (-0,655790; 0,667518) e **hexanoato de etila** (-0,648948; 0,700982), enquanto o T6 localizado no 4º quadrante, caracterizados pelos compostos **acetato de feniletila** (0,783245; 0,570376) e **hexadecanoato de metila** (0,697864; -0,161817).

A análise de componentes principais, levando-se em consideração apenas os resultados obtidos através dos tratamentos em que foram utilizadas leveduras livres (T5, T6, T7 e T8) e o vinho base, observa-se que quatro CP são responsáveis por 100% da variância total dos *Eigenvalues*, incluindo-se

nesta análise, 29 variáveis (compostos voláteis) conforme pode ser visualizado na **Tabela 8**. As primeiras duas componentes principais são responsáveis por 82,54% da variância total.

Tabela 8: Contribuição dos parâmetros para os loadings dos Componentes Principais, *Eigenvalues* e respectivas variâncias, avaliando o vinho base e vinhos espumantes resultantes de tratamentos que utilizaram leveduras livres.

Compostos	Loadings			
	CP1	CP2	CP3	CP4
hexanol	-0,195881	-0,921684	-0,024279	-0,333975
acetato de isoamila	0,121451	-0,983419	-0,125184	0,049652
ácido hexanoico	-0,922217	-0,354106	-0,135105	-0,076619
hexanoato de etila	-0,311970	-0,701483	0,536861	-0,349825
acetato de hexila	0,982552	-0,139871	0,067667	-0,102223
2 etil -1 hexanol	0,522867	-0,848749	-0,045701	0,064392
1 octanol	-0,628043	-0,247725	-0,701383	0,228595
2 nonanona	-0,640201	0,265521	-0,494122	-0,524867
linalol	0,597669	-0,800288	-0,044853	0,017878
2 nonanol	0,109381	-0,979910	0,164817	-0,025463
álcool feniletílico	-0,988314	0,146718	0,009157	-0,040303
succinato de dietila	-0,965948	0,190273	0,110958	0,135753
octanoato de etila	0,996279	-0,068602	-0,003800	-0,052031
fenilacetato de etila	-0,947513	0,119636	0,266563	-0,129809
acetato de feniletila	-0,418000	0,845137	-0,120623	0,310595
ácido decanoico	0,938685	0,272780	0,151335	0,146833
decanoato de etila	0,879930	0,411370	-0,234160	0,040826
octanoato de isoamila	0,915442	0,017370	-0,376277	0,141702
geranil acetona	0,834065	0,444959	-0,325984	-0,009045
dodecanol	-0,611605	0,371254	0,603829	-0,351426
ácido dodecanóico	-0,792763	-0,233509	0,233939	0,512126
(<i>E</i>) nerolidol	-0,721185	-0,597130	0,319078	0,146689
dodecanoato de etila	-0,655452	0,387956	0,403250	0,507210
tetradecanoato de metila	-0,682779	0,199207	-0,548234	-0,439965
tetradecanoato de etila	-0,838046	-0,473627	-0,227715	-0,146639
hexadecanoato de metila	-0,912284	-0,120855	-0,389798	-0,034477
ácido hexadecanoico	0,598312	-0,796542	-0,069463	0,052137
hexadecanoato de etila	-0,349163	-0,592661	-0,284606	0,667711
linoleato de metila	-0,879145	-0,224521	-0,381967	0,175488
<i>Eigenvalues</i>	15,78301	8,15368	2,93811	2,12519
% variância	54,4242	28,1162	11,1314	7,3282
% variância total	58,4242	82,5403	92,6718	100,0000

A **Figura 10** indica a projeção dos dados resultantes dos tratamentos que empregaram leveduras livres para a 2ª fermentação, bem como os dados do vinho base, no plano composto pelas duas primeiras CP, e no **Anexo 1** esta apresentada as projeções das variáveis no plano composto pela duas primeiras

CP. Observa-se que o vinho base está distante dos demais vinhos espumantes, encontrando-se no 1º quadrante e sendo caracterizado primordialmente por **geranil acetona** (0,834065; 0,444959), **decanoato de etila** (0,879930; 0,411370), **octanoato de etila** (0,996279; -0,068602) e **ácido decanóico** (0,938685; 0,272780).

Os tratamentos T6 e T7, em que foram utilizados respectivamente manoproteínas e borras de *Champenoise*, apresentaram similaridades, sendo que esses tratamentos estão posicionados no 2º quadrante, sendo influenciados pelos compostos que apresentaram *Loadings* negativos para CP 1 e positivos para PC 2. Tais tratamentos apresentaram maior familiaridade com os seguintes compostos: **álcool feniletílico** (-0,988314; 0,146718), **succinato de dietila** (-0,965948; 0,190273), **fenilacetato de etila** (-0,947513; 0,119636), **acetato de feniletila** (-0,418000; 0,845137), **dodecanoato de etila** (-0,655452; 0,387956) e **tetradecanoato de metila** (-0,682779; 0,199207).

Nos quadrantes 3 e 4, onde os compostos de maior influência são os que apresentam os *loadings* do CP2 negativos, ficaram localizados os tratamentos 5 e 8. No primeiro foi utilizado apenas levedura e no segundo utilizou também borras provenientes de processo *Charmat*. Esses tratamentos apresentaram similaridades nas áreas cromatográficas percentuais **hexanol** (-0,195881; -0,921684), **acetato de isoamila** (0,121451; -0,983419), **hexanoato de etila** (-0,311970; -0,701483), **2 etil 1 hexanol** (0,522867; -0,848749), **linalol** (0,597669; -0,800288), **2 nonanol** (0,109381; -0,979910) e **ácido hexadecanoico** (0,598312; -0,796542).

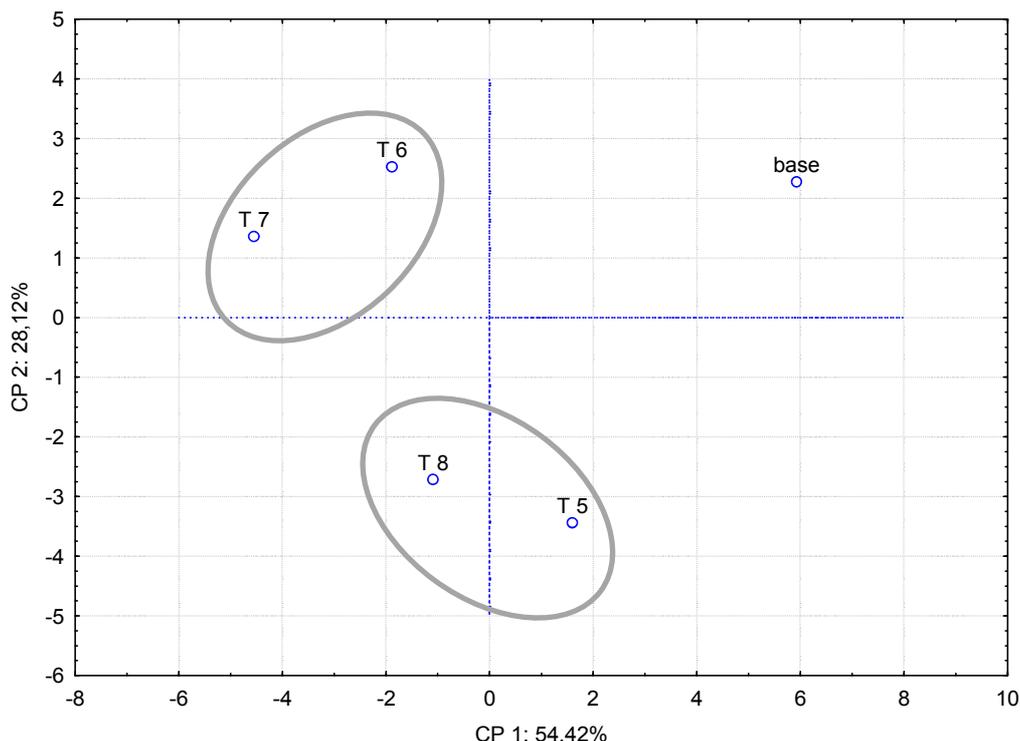


Figura 10: Gráfico representando os tratamentos experimentais nos planos CP (2x1), avaliando o vinho base e os tratamentos eu utilizaram leveduras livres.

Uma análise de componentes principais que levou em consideração apenas os percentuais relativos de área cromatográfica dos componentes voláteis do *headspace* do vinho base e dos vinhos espumantes que passaram pelos tratamentos que empregaram leveduras imobilizadas em laboratório (T1, T2, T3, T4) considerou 30 variáveis (compostos voláteis). Neste caso, as duas primeiras PC representam 74,61% da variância total e as quatro primeiras PC são responsáveis por 100% da variância total dos *Eigenvalues* conforme pode ser visualizado na **Tabela 9**.

De acordo com a **Figura 11**, onde foram projetados os resultados obtidos dos tratamentos do vinho base com leveduras imobilizadas e do próprio vinho base, observa-se que o T1 foi o que apresentou maior similaridade com o vinho base, pois ambos estão situados no 1º quadrante. Esse tratamento não utilizou coadjuvante, apenas levedura encapsulada. A projeção das variáveis no plano composto pelas duas primeiras CP está localizado no **Anexo 2**.

Tabela 9: Contribuição dos compostos voláteis (parâmetros) do *headspace* do vinho base e dos espumantes provenientes dos tratamentos que utilizaram leveduras imobilizadas em laboratório, para os *Loadings* dos componentes principais, escores e respectivas variâncias.

Compostos	<i>Loadings</i>			
	CP1	CP2	CP3	CP4
hexanol	0,383230	-0,911711	0,144564	-0,031916
acetato de isoamila	0,034372	-0,938492	0,339555	-0,052467
ácido hexanoico	0,687340	0,361537	0,629897	0,009143
hexanoato de etila	0,254510	-0,940836	0,215762	-0,059153
acetato de etila	-0,157919	-0,980612	0,057775	-0,100619
2 etil 1 hexanol	0,976276	-0,025633	0,040947	0,211070
1 octanol	0,290807	-0,229421	0,350179	-0,860333
linalol	-0,729956	-0,513983	-0,403581	-0,200269
2 nonanol	-0,267907	-0,892844	-0,165938	-0,321746
álcool fenilético	0,972852	0,096988	0,111673	-0,177993
succinato de dietila	0,969802	0,232087	0,065682	0,036121
octanoato de etila	-0,957668	-0,047823	-0,273078	0,077549
fenilacetato de etila	0,986601	0,057782	-0,056731	-0,141641
acetato de feniletila	0,217715	0,846184	-0,381945	-0,301148
ácido decanoico	-0,449131	0,780005	-0,420832	-0,113022
4(E)-decenoato de etila	-0,603437	0,630555	0,401774	-0,277202
decanoato de etila	-0,836244	0,433012	-0,327234	0,078196
octanoato de isoamila	0,142939	0,451299	-0,771867	0,424405
geranil acetona	-0,807059	-0,363201	-0,441022	-0,149132
dodecanol	0,534610	0,610502	-0,355578	-0,463729
ácido dodecanoico	-0,905685	0,165601	0,350375	-0,171897
(E) nerolidol	0,907359	0,026546	0,233081	-0,348810
tridecanol	-0,156024	0,074402	0,614304	0,769903
dodecanoato de etila	-0,619687	-0,122197	0,617831	0,468338
tetradecanoato de metila	-0,845349	0,266520	0,438677	-0,148040
tetradecanoato de etila	-0,971123	0,053579	0,154432	-0,173783
hexadecanoato de metila	-0,244300	0,721636	0,587582	-0,272593
ácido hexadecanoico	-0,798138	-0,384377	-0,436784	-0,156364
hexadecanoato de etila	-0,898573	0,057569	0,377467	-0,216265
linoleato de metila	-0,501601	0,482633	0,713027	-0,083996
<i>Eigenvalues</i>	13,8655	8,5181	4,8394	2,7767
% variância	46,2182	28,3936	16,1324	9,2557
% variância total	49,2182	74,6118	90,7443	100,0000

Os tratamentos 1 e 4 apresentaram similaridades, por terem grande influência dos compostos com *loadings* positivos para PC 2. Considerando-se que em T1 foram empregadas apenas leveduras imobilizadas e em T4 foram usadas as mesmas leveduras, além de borras provenientes de processo *Charmat*, verifica-se que este resultado é condizente com aquele observado para os tratamentos 5 e 8, onde a borra do processo *Charmat* também não alterou significativamente a composição dos compostos voláteis do vinho produzido apenas com leveduras livres.

Os compostos que apresentam *loadings* negativos no CP2, indicam maior influência nos tratamentos 2 e 3, que são diferenciados apenas pelo uso de manoproteínas e borras de processo *Champenoise* respectivamente. Essa semelhança entre os T2 e T3 também foi verificada para os tratamentos que utilizaram leveduras livres e estes mesmos coadjuvantes.

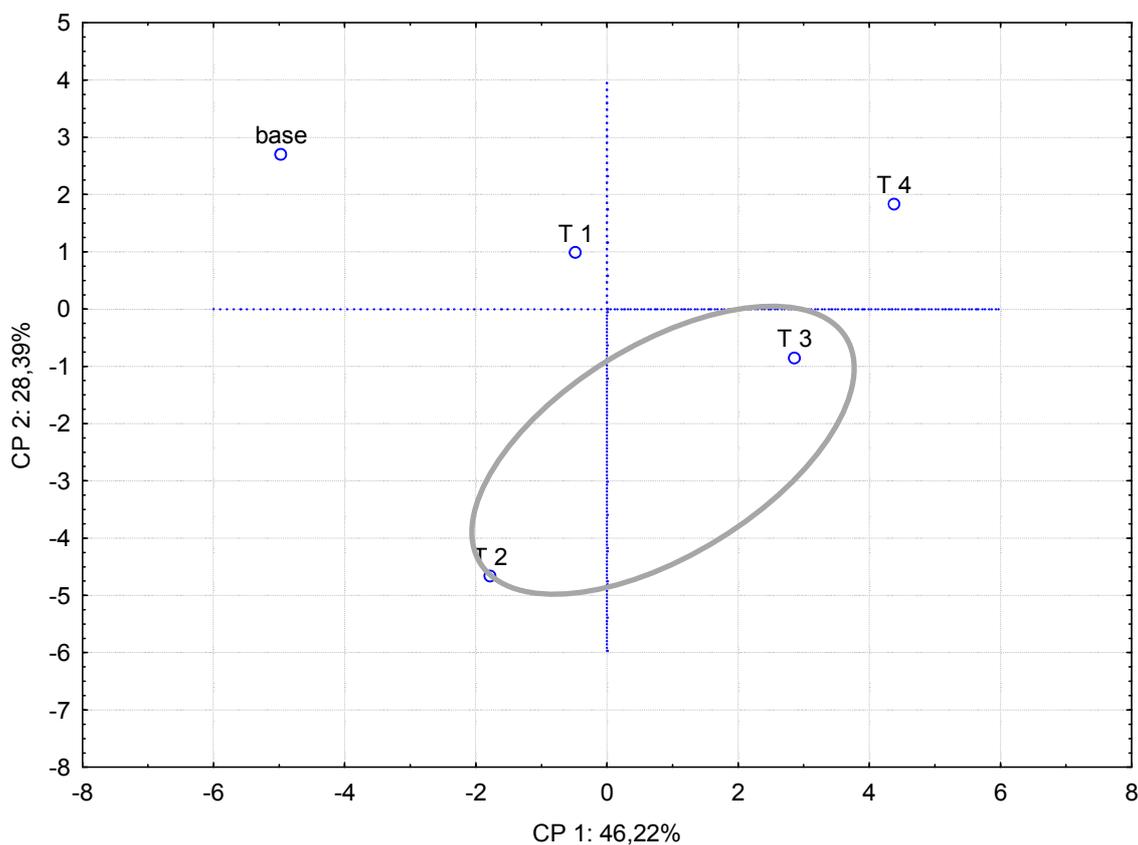


Figura 11: Projeção dos dados provenientes dos tratamentos experimentais que utilizaram leveduras imobilizadas em laboratório, bem como de vinho base, no plano definido pelas duas componentes principais.

5.3 Evolução dos Compostos Voláteis

Em uma segunda etapa do trabalho, a área cromatográfica percentual de treze compostos voláteis, que apresentavam os maiores percentuais, foi acompanhada para dois tratamentos aplicados ao vinho base, antes da segunda fermentação, T2 e T6. No tratamento 2 foram empregadas leveduras e manoproteínas livres e no T6, as leveduras e as manoproteínas foram imobilizada em laboratório, em alginato de cálcio.

A **Figura 12** apresenta o comportamento da área normalizada (item 4.6) dos compostos **hexanol** e **álcool feniletílico** durante o processo de 2ª fermentação. O grupo de álcoois C6 (hexanois e hexenois) são oriundos de partes dos tecidos da uva e partes do tecido da videira, e confere aroma herbáceo, caracterizando vinhos elaborados com uvas com baixo grau de maturidade (RIBÉREAU-GAYON, *et al.* 2006a; 2006b), enquanto o álcool feniletílico está associado a aromas florais, rosas e adocicado (LEE e NOBLE, 2003; COELHO *et al.*, 2009)

Pode-se observar uma tendência de aumento da área normalizada de hexanol nas primeiras semanas de elaboração e que, apesar de oscilação no gráfico após o quinto ponto de avaliação (21ª semana) a área normalizada manteve-se praticamente constante. Tal resultado condiz com o que foi descrito por Zhang *et al.* (2011), no que diz respeito ao comportamento de voláteis durante o processo de fermentação de vinho *Syrah*. Estes verificaram um aumento na concentração de hexanol e álcool feniletílico, e também de outros álcoois, nas primeiras horas após o início da fermentação, e uma redução significativa no período final da fermentação.

Avaliando o perfil volátil e sensorial de vinho base e posterior *Cava*, com 14 e 24 meses de elaboração, Torrens *et al.* (2010) mostraram um aumento significativo nas concentrações de hexanol e álcool feniletílico. Peinado *et al.* (2004) detectaram redução desses dois compostos durante elaboração de vinho *Jerez* com inoculação de *S. cerevisiae* var. *capensis*.

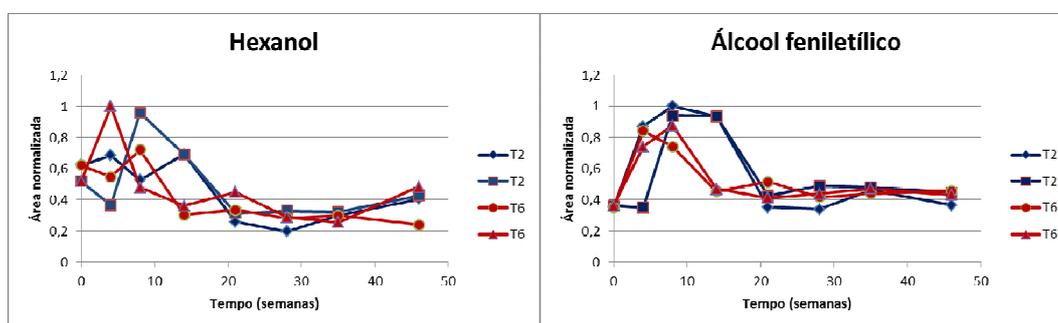


Figura 12. Evolução da área cromatográfica normalizada de hexanol e álcool feniletílico, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizadas e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre.

Ácidos (C6, C8 e C10) são formados pelas leveduras durante a fermentação, mas esses se encontram em pequenas quantidades no vinho,

pois atuam como inibidores de fermentação. Eles afetam a permeabilidade da membrana celular e dificultam o intercâmbio entre o interior da célula e o meio (RIBÉREAU-GAYON, *et al.*, 2006a). O ácido hexanoico está associado a aromas de queijo e ranço e o ácido decanoico a aromas de gordura e ranço (PEINADO, *et al.* 2004; GIL, *et al.* 2006). Foram encontrados em *Cavas* por Riu-Aumatell, *et al.* (2006), em vinhos *Chardonnay* fermentados em tanques de inox e barricas de carvalho, por Marco, Moreno e Azpilicueta (2008), sendo que, esses últimos relatam que os vinhos fermentados no último sistema de barricas de carvalho apresentam maior concentração dos ácidos hexanoico e decanoico.

A evolução da área cromatográfica normalizada dos **ácidos decanoico** e **hexanoico** no experimento apresentaram comportamentos diferentes, como pode ser observada na **Figura 13**, o ácido decanoico apresentou sua maior concentração no vinho base, antes do início da 2ª fermentação, e após o quinto ponto (21ª semana), mantendo uma considerável constância de cerca de 35% do valor inicial. Enquanto a área normalizada do ácido hexanoico apresentou sua maior concentração entre o terceiro e quarto ponto avaliado (8ª e 14ª semanas) a partir do início da segunda fermentação e após o quinto ponto (21ª semana), o composto voltou a um patamar similar ao do início da segunda fermentação. Em T6, no qual se utilizou leveduras livres, as áreas normalizadas foram inferiores às de T2, mas a variação das áreas normalizadas durante o processo foi semelhante em ambos os tratamentos.

Zhang, *et al.* (2011) verificaram que o ácido hexanoico e decanoico apresentaram comportamento idêntico, tendo seus máximos após 96 h da inoculação, sendo que as concentrações desses compostos diminuíram acentuadamente a partir deste ponto. As leveduras podem influenciar nas concentrações destes compostos: avaliando diferentes cepas de leveduras na elaboração de *Cavas*, Torrens *et al.* (2008) observaram diferenças significativas nas concentrações de ácido hexanoico, diretamente associada a cepa utilizada.

No caso de vinhos *Cava* jovem e *Cava* reserva, 14 e 24 meses de elaboração, respectivamente, verificou-se que o ácido hexanoico apresentou concentrações significativamente superiores às do vinho base utilizado, embora para os dois vinhos, as concentrações de ácido hexanoico tenham sido

semelhantes (TORRENS, *et al.* 2010). Observou-se também que, a exposição de vinho branco (*Vitis vinifera* cv. Zalema) engarrafado a luz, pelo período de doze meses, influenciou os valores de concentração dos ácidos hexanoico e decanoico, gerando um aumento dos mesmos (GALLO *et al.* 2011).

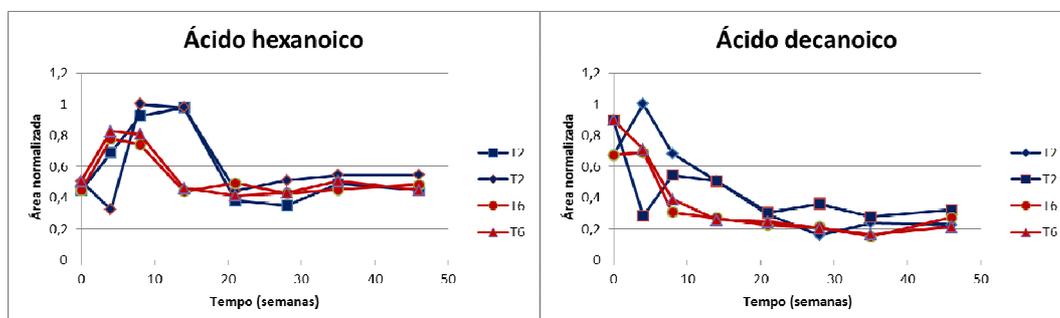


Figura 13. Evolução da área cromatográfica normalizada de ácido hexanoico e ácido decanoico, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizadas e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre.

Devido à atividade das esterases, as leveduras são capazes de produzir diversos tipos de ésteres, mas em baixas quantidades, de cerca de algumas miligramas por litro. Os acetatos de álcoois superiores são os mais importantes no que tange a sua contribuição para o aroma. Um exemplo disto é o acetato de isoamila que apresenta aroma de banana, e o acetato de feniletila que apresenta aroma de rosas (RIBÉREAU-GAYON, *et al.* 2006b).

Os **hexadecanoatos de metila** e de **etila** apresentaram comportamentos similares, os maiores valores de área normalizada entre a segunda e terceira avaliação, e posterior redução chegando a valores menores aos encontrados no vinho base. Para os dois ésteres, o T6 teve seu pico máximo de área na quarta semana avaliada, enquanto o T2 apresentou seu auge no terceiro ponto avaliado (8ª semana), como pode ser observado na **Figura 14**.

O T2 apresentou variações de área normalizada para os compostos **4-(E)- decenoato de etila** e **decanoato de etila** nos primeiros pontos da avaliação e nos dois últimos apresentaram valores abaixo dos encontrados inicialmente. Enquanto que para o T6 foram encontradas as maiores áreas ponderadas para o segundo e terceiro ponto de avaliação (4ª e 8ª semanas), com um grande declínio posteriormente, apresentado valores inferiores aos encontrados no vinho base.

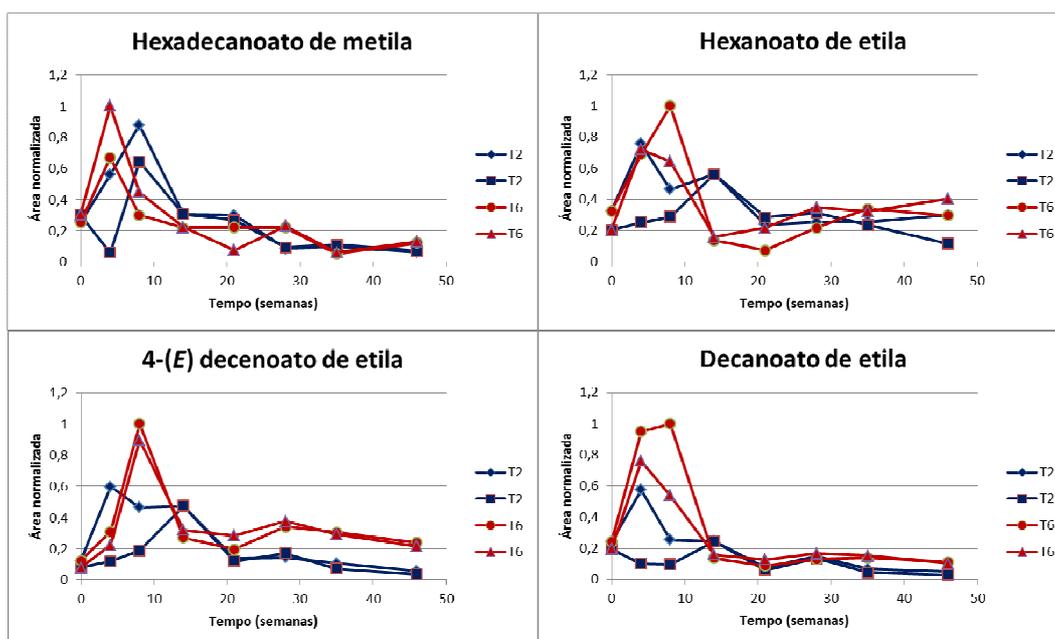


Figura 14. Evolução da área cromatográfica normalizada para ésteres de cadeia longa, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizadas e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre.

Avaliando a hidrólise e formação de ésteres voláteis em vinho *Sauvignon Blanc*, pelo período de um ano, Makhotkina e Kilmartin (2012), constataram uma redução significativa na concentração de hexanoato de etila, octanoato de etila, laurato de etila e decanoato de etila. Torrens *et al.* (2010) constataram uma redução significativa na concentração de decanoato de etila, quando comparado o vinho base e as *Cavas* elaboradas, mas não encontraram diferenças entre *Cavas* jovens e *Cavas* reserva. A literatura descreve para o decanoato de etila aromas doce, florais e frutados (LEE e NOBLE, *et al.*, 2003; SWIEGERS, *et al.*, 2005; FORDE *et al.*, 2011)

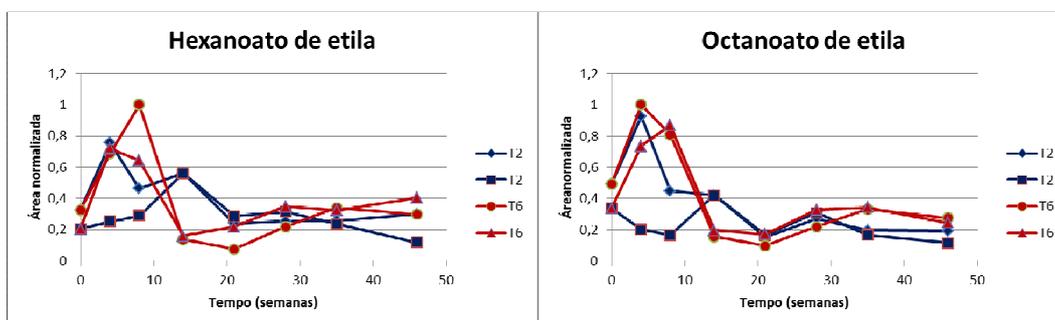


Figura 15. Evolução da área cromatográfica normalizada para ésteres de cadeia média, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizadas e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre.

Durante o processo de elaboração os compostos **hexanoato de etila** e **octanoato de etila**, apresentaram comportamentos semelhantes, sendo que no T6 ocorreu uma tendência de acréscimo, das áreas normalizadas, nas primeiras semanas após o início da 2ª fermentação, e posteriormente ocorreu uma drástica redução, voltando a valores próximos aos detectados no início do processo para o hexanoato de etila, e valores levemente inferiores para o octanoato de etila. No T2 ocorreu uma oscilação nas primeiras semanas, e após pode-se identificar uma tendência a redução dos valores da área ponderada. O hexanoato de etila apresentou valor final um pouco inferior ao detectado no vinho base, enquanto o octanoato de etila teve redução de cerca de 50% da área cromatográfica. Tais considerações sobre a evolução dos compostos podem ser observadas na **Figura 15**.

Peinado *et al.* (2004), observaram uma redução na concentração de hexanoato de etila e aumento na concentração de octanoato de etila, durante a elaboração de vinho *Jerez*. Em contraponto Gallo *et al.* (2011) observaram uma redução na concentração de octanoato de etila e que a concentração de hexanoato de etila manteve-se inalterada durante o período de 12 meses de estocagem em garrafas do vinho branco avaliado. Em experimento semelhante Makhotkina e Kilmartin (2012), observaram reduções significativas nas concentrações desses compostos avaliando vinho *Sauvignon Blanc* estocado por um período de 1 ano.

Ganss *et al.* (2012), detectaram redução na concentração de hexanoato de etila e octanoato de etila durante a segunda fermentação de espumantes que utilizaram vinho base varietal *Riesling*, e para os que utilizaram vinho base *Chardonnay*, ocorreu uma um acréscimo da concentração de hexanoato de etila, e a concentração de octanoato de etila ficou praticamente inalterada. Torrens *et al.*, (2010) quantificaram redução na concentração de octanoato de etila comparando o vinho base e a *Cavas* elaboradas, após 14 e 24 meses da segunda fermentação, enquanto o hexanoato de etila foi detectado apenas nas *Cavas*. Em vinhos *Chardonnay* fermentados em tanques de inox e barricas de carvalho Marco, Moreno e Azpilicueta (2008), observaram valores de concentração de octanoato de etila e hexanoato de etila, quatro vezes maiores para os vinhos que foram fermentados em barricas.

Octanoato de etila está associado a aromas fresco, doce, banana, abacaxi, pera e sabão (LEE e NOBLE, 2003; MOYANO, *et al.*, 2006), enquanto a literatura associa para o hexanoato de etila aromas frutado, maçã verde, banana e morango (AZNAR, *et al.*, 2001; CAMPO, *et al.*, 2006; MOYANO, *et al.*, 2006).

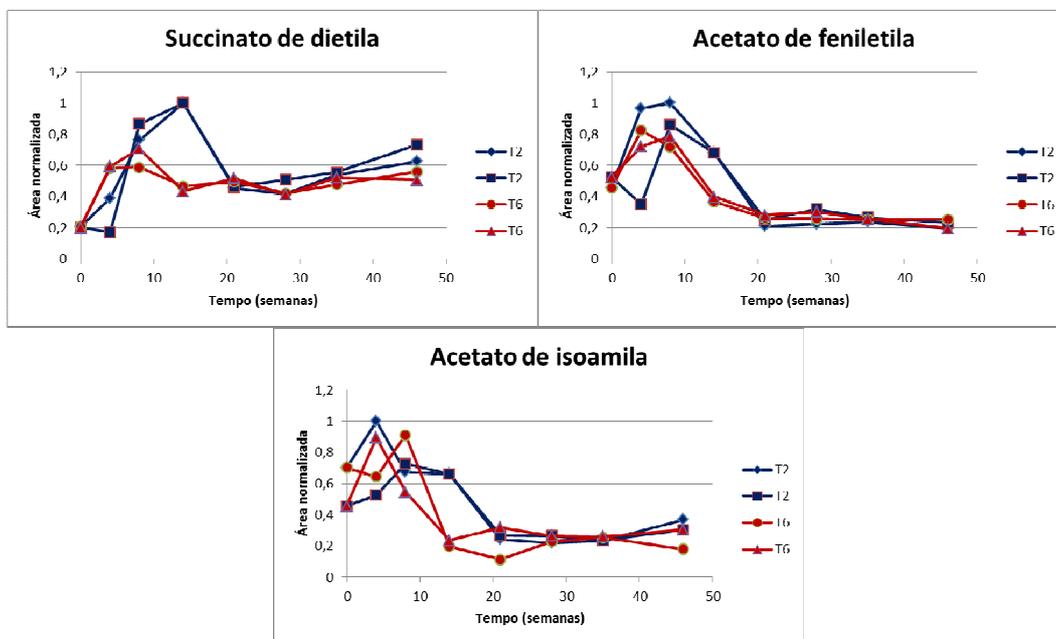


Figura 16. Evolução da área cromatográfica normalizada para os ésteres succinato de dietila, acetato de feniletila e acetato de isoamila, durante o período da 2ª fermentação do vinho espumante. T2 diz respeito ao tratamento do vinho base com levedura e manoproteínas imobilizadas e T6 inclui os mesmos materiais, na forma livre.

A evolução das áreas cromatográficas normalizadas dos compostos **succinato de dietila**, **acetato de feniletila** e **acetato de isoamila** podem ser observados na **Figura 16**. Observa-se que o composto acetato de feniletila e acetato de isoamila apresentaram evolução semelhante durante o período analisado: nas primeiras semanas ocorreram um acréscimo nas áreas cromatográficas, depois ocorreu uma acentuada redução, sendo que os últimos pontos da avaliação apresentaram cerca de 50% da área cromatográfica normalizada observada no vinho base utilizada. Os dois tratamentos apresentaram uma tendência de aumento áreas cromatográficas nos primeiros pontos da avaliação do composto acetato de isoamila, na metade final do acompanhamento, notoriamente ocorreu redução das áreas normalizadas.

Torrens *et al.* (2010) determinaram uma redução de acetato de isoamila, de cerca de dez vezes da concentração inicial do vinho base, quando

comparado a concentração final encontrada nas Caves elaboradas. Durante o período de 12 meses de estocagem em garrafas, o vinho branco (*Zalema*) avaliado por Gallo *et al.* (2011) apresentou uma redução significativa nas concentrações de acetato de isoamila e acetato de feniletila. Makhotkina e Kilmartin (2012), também observaram reduções significativas desses compostos durante a estocagem de vinho *Sauvignon Blanc*, mas observaram um acréscimo da concentração de succinato de dietila, variando de 2 a 10 vezes do valor inicial, sendo influenciado pela temperatura de estocagem. Durante a elaboração de vinho *Jerez* foi observado uma redução na concentração de acetato de isoamila e acetato de feniletila (PEINADO *et al.* 2004).

Acetato de isoamila apresenta aromas descrito na literatura de banana, frutado e doce (PEINADO *et al.* 2004; GIL, *et al.*, 2006), enquanto o acetato de feniletila está associado a aromas de rosas e frutado (PEINADO *et al.* 2004; CAMPO, *et al.*, 2006)

Os autores Marco, Moreno e Azpilicueta (2008), encontraram valores de 2, 5 e 10 vezes maiores para acetato de feniletila, acetato de isoamila e succinato de dietila, respectivamente, em vinhos *Chardonnay* fermentados em barricas de carvalho, quando comparados aos fermentados em tanques de inox. O composto succinato de dietila não foi detectado no vinho base por Torrens *et al.* (2010), mas detectaram nas Caves elaboradas, sendo que a reserva (24 meses de elaboração) apresentou valor superior a Cava jovem (14 meses de elaboração).

O composto succinato de dietila apresentou o comportamento mais anômalo entre os compostos avaliados, tendo apresentado um acréscimo da área cromatográfica normalizada nas primeiras semanas. O T2 apresentou área cromatográfica 5 vezes maior que a concentração encontrada inicialmente no vinho base. Posteriormente apresentou redução significativa, mas ao final das avaliações possuía uma área cerca de 3 vezes maior que a área inicial.

A concentração de succinato de dietila é maior em vinhos *Chardonnay* elaborados com uvas de colheita tardia, onde também ocorre um incremento na concentração durante o envelhecimento em garrafa. Tal acréscimo na concentração pode estar associado ao *bouquet* de vinhos *Chardonnay* envelhecido (MARIĆ e FIRŠT-BAČA, 2003).

As cepas de leveduras que apresentam maior eficiência na síntese de acetatos, também apresentam maiores teores de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta produzidos, como por exemplo hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila), mas no entanto algumas estirpes podem vir a apresentar comportamentos diferentes (ANTONELLI, *et al.*, 1999).

6. RESUMO DOS RESULTADOS

Um total de 46 compostos foram tentativamente identificados, utilizando-se HS-SPME associada GC/qMS, no *headspace* dos vinhos espumantes obtidos nos nove tratamentos realizados durante a segunda fermentação e no vinho base.

Um total de 32 compostos foram separados e tentativamente identificados através de uma coluna OV-5, os quais são pertencentes às seguintes classes: 16 ésteres, sete álcoois, quatro ácidos orgânicos, três terpenos e duas cetonas. Em uma coluna DB-Wax foram separados e tentativamente identificados 34 compostos, pertencentes às seguintes classes: 16 ésteres, 10 álcoois, seis ácidos orgânicos e dois terpenos. Observou-se que 20 compostos foram tentativamente identificados em ambas as colunas.

Os ésteres foram os compostos majoritários do *headspace* dos vinhos espumantes e do vinho base representando aproximadamente 48% da área cromatográfica percentual relativa de todos os compostos tentativamente identificados. O octanoato de etila apresentou a maior área cromatográfica relativa dos voláteis no vinho base (54,61%), a qual foi reduzida para valores entre 32,65% e 47,15%, após a segunda fermentação. O segundo composto que apresentou maior área cromatográfica percentual relativa no *headspace* do vinho base, o decanoato de etila, também sofreu redução de 16,74%, para valores entre 3,02% e 8,35%, após a segunda fermentação.

A presença dos compostos (*E*)-nerolidol e malato de dietila foi verificada apenas no *headspace* dos vinhos que passaram pela segunda fermentação, ao passo que o butanoato de isoamila foi tentativamente identificado somente no *headspace* do vinho base.

A PCA de doze componentes voláteis que apresentaram área cromatográfica percentual relativa superior a 1% no vinho base e em todos os nove espumantes provenientes dos tratamentos experimentais auxiliou na observação da diferença entre o vinho base e os espumantes obtidos após a segunda fermentação, bem como na pequena distinção entre os espumantes dos tratamentos que utilizaram leveduras livres e imobilizadas. O vinho base ficou representado pelas áreas cromatográficas relativas percentuais de octanoato de etila e decanoato de etila. Os tratamentos que utilizaram

leveduras imobilizadas foram caracterizados pelos compostos succinato de dietila, álcool feniletílico, ácido hexanoico, acetato de isoamila, hexanol e hexanoato de etila. Os componentes acetato de feniletila e hexadecanoato de metila se destacaram como característicos dos tratamentos que empregaram leveduras livres.

A PCA dos componentes voláteis dos tratamentos que utilizaram leveduras livres e também do vinho base mostrou semelhanças entre os experimentos que utilizaram manoproteínas e borras de processo *Champenoise* como coadjuvantes. Estes vinhos foram caracterizados pela influência dos compostos álcool feniletílico, succinato de dietila, fenilacetato de etila, acetato de feniletila, dodecanoato de etila e tetradecanoato de metila. Fenômeno semelhante ocorreu com os vinhos espumantes dos tratamentos que empregaram leveduras imobilizadas. Nestes últimos, vinhos foram caracterizados pela influência dos compostos hexanol, acetato de isoamila, hexanoato de etila, acetato de exila e 2 nonanol.

Durante o processo da segunda fermentação, onde foram monitoradas as áreas normalizadas percentuais relativas dos compostos voláteis de maior representação em área cromatografia no vinho base, foram observadas algumas tendências nos comportamentos destes compostos. Os ésteres apresentaram um acréscimo na área normalizada nas primeiras semanas, e uma subsequente redução. O ácido hexanoico apresentou comportamento semelhante aos ésteres avaliados, o ácido decanoico apresentou redução em todas as avaliações realizadas quando comprado ao vinho base.

CONCLUSÕES

A micro extração HS-SPME associada a análise em GC/qMS, aplicadas aos vinhos espumantes elaborados pelos distintos tratamentos e o vinho base, possibilitaram a identificação de 46 compostos, pertencentes as seguintes classes: 22 ésteres, 11 álcoois, 7 ácidos orgânicos, 4 terpenos e 2 cetonas. A utilização da análise de multivariáveis encontrou-se 12 compostos principais (acetato de isoamila, hexanoato de etila, succinato de dietila, octanoato de etila, 4-(*E*)-decenoato de etila, decanoato de etila, hexadecanoato de metila, acetato de feniletila, álcool fenilético, hexanol, ácido hexanoico e o ácido decanoico).

Os resultados da aplicação da PCA, separaram em blocos os tratamentos que utilizaram leveduras livres e imobilizada, e o vinho base apresentou características diferentes dos dois blocos. O grupo de tratamentos que utilizavam leveduras imobilizadas foi influenciado pela concentração dos succinato de dietila, álcool fenilético, ácido hexanoico, acetato de isoamila, hexanol e hexanoato de etila. Enquanto os que utilizavam leveduras livres, foram influenciados principalmente pelos compostos acetato de feniletila e hexadecanoato de metila.

Analisando os tratamentos que utilizaram leveduras livres e imobilizadas, separadamente por PCA, foram encontradas similaridades entre os tratamentos que utilizaram manoproteínas e borras de *Champenoise*.

Os tratamentos que utilizaram durante a segunda fermentação leveduras e manoproteína, na forma livre e imobilizadas, apresentaram algumas tendências no comportamento dos doze compostos voláteis monitorados e também na velocidade de evolução dos mesmos.

As análises de HS-SPME em GC/qMS e associada a PCA, apresentaram-se adequadas para a diferenciação de espumante *Champenoise* elaborados com a utilização de leveduras livres imobilizadas.

REFERÊNCIAS

ABDI, H.; WILLIAMS, L. J.; Principal Component Analysis; **John Wiley & Sons, Inc**, v. 2, July/ August, 2010.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Component by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th Ed. Allured Publishing Corporation. Illinois, USA, 2007.

ALEXANDRE, H.; GUILLOUX-BENATIER, M. Yeast autolysis in sparkling wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 12, p. 119–127, 2006.

ANTONELLI, A.; CASTELLARI, L.; ZAMBONELLI, C.; CARNACINI, A.; Yeast Influence on Volatile Composition of Wine; **J. Agric. Food Chem.**; v. 47, p. 1139-1144, 1999.

AZNAR, M.; LÓPEZ, R.; CACHO, J. F.; FERREIRA, V.; Identification and Qualification of Impact Odorants of Aged Red Wines from Rioja. GC-Olfactometry, Qualitative GC-MS, and Odor Evaluation of HPLC Fractions. **J. Agric. Food Chem.** V. 49, p. 2924-2929, 2001.

BAKOYIANIS, V.; KANELLAKI, M.; KALLIAFAS, A.; KOUTINAS, A. A.; Low-Temperature Wine Making by Immobilized Cells on Mineral Kissiris. . **J. Agric. Food Chem.**, V. 40, p. 1293-1296, 1992.

BAKOYIANIS, V.; KANA, K.; KALLIAFAS, A.; KOUTINAS, A. A.; Low-Temperature Continuous Wine Making by Kissiris-Supported Biocatalyst: Volatile Byproducts. **J. Agric. Food Chem.**, V. 41, p.465-468, 1993.

BAKOYIANIS, V.; KOUTINAS, A. A.; AGELOPOULOS, K.; KANELLAKI, M.; Comparative Study of Kissiris, γ -Alumina, and Calcium Alginate as Supports of Cells for Batch and Continuous Wine-Making at Low Temperatures. **J. Agric. Food Chem.**, V. 45, No. 12, 1997.

BARATA, A.; CAMPO, E.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; Analytical and Sensorial Characterization of the aroma of Wines Produced with Sour Rotten Grapes Using GC-O and GC-MS: Identification of Key Aroma Compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 2543-2553, 2011.

BRASIL; Lei Nº 10970, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2004; **Altera dispositivos da Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências**. In: Publicado no Diário Oficial da União de 16/11/2004, Seção 1, Página 1.

BOIDO, E.; LLORET, A.; MEDINA, K.; FARIÑA, L.; CARRAU, F.; VERSINI, G.; DELLACASSA, E.; Aroma Composition of Vitis vinifera Cv. Tannat: the Typical Red Wine from Uruguay; **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 18, 2003.

BONINO, M.; SCHELLINO, R.; RIZZI, C.; AIGOTTI, R.; DELFINI, C.; BAIOCCHI, C.; Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS; **Food Chemistry**, v. 80, p. 125-133, 2003.

BOSCH-FUSTÉ, J.; RIU-AUMATELL, M.; GUADAYOL, J. M.; CAIXACH, J.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S.; Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis; **Food Chemistry**; v. 105, p. 428–435, 2007.

BOTELHO, G.; MENDES-FAIA, A.; CLÍMACO, M. C.; GC-Olfactometry And Escriptive Sensory Analysis In The Study Of Clonal Red Wines. **Ciência e Téc. Vitiv.** v. 25, n. 1, p 15 - 24, 2010.

BOUTOU, S.; CHATONNET, P.; Rapid Headspace Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Assay For The Quantitative Determination Of Some Of The Main Odorants Causing Off-Flavours In Wine. **Journal of Chromatography A**. v. 1141, p. 1–9, 2007.

CALLONE, E.; CAMPOSTRINI, R.; CARTURAN, G.; CAVAZZAB, A.; GUZZON, R.; Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. **J. Mater. Chem.**,v. 18, p. 4839-4848, 2008.

CAMPO, E.; FERREIRA, V.; ESCUDEIRO, A.; MARQUÉS, J. C.; CACHO, J.; Qualitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 180-187, 2006.

CARIDI, A.; Enological functions of parietal yeast mannoproteins. **Antonie van Leeuwenhoek**, n 89; p 417–422, 2006.

COELHO, E.; COIMBRA, M. A.; NOGUEIRA, J. M. F., ROCHA, S. M.; Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction witch liquid desorption. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 214–221, 2009.

COLAGRANDE, O.; SILVA, A.; FUMI, M. D.; Recent Applications of Biotechnology in Wine Production; **Biotechnol. Prog**, n. 10, p 2-18, 1994.

COLLIN, S.; **Oddbind Dictiorary of Wine**. Bloomsbury Publishing Plc, London, England, 2004.

DE MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura Brasileira – Panorama 2011**. Disponível online em: < www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf > acesso em janeiro de 2012.

DE ROSA, TÚLIO; **Tecnologia dei vini spumanti**. Edicione AEB, Brescia, Italy; 1978.

DIVIES, C.; CACHON, R.; Cap. **Wine production by immobilised cell systems**. In: applications of cell immobilisation biotechnology. NEDOVI, V.; WILLAERT, R. Springer Dordrecht, Berlin, Heidelberg, New York, 2005.

ESCUADERO, A.; GOGORZA, B.; MELÚ S, M. A.; ORTÍN, N.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values; **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 3516-3524, 2004.

FAN, W.; QIAN, M. C.; Characterization of Aroma Compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” Liquors by Aroma Extract Dilution Analysis; **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 2695-2704, 2006.

FERREIRA, M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O.; Quimiometria I: Calibração multivariada, Um Tutorial; **Quím. Nova**, v. 22, n. 5, 1999.

FORDE, C. G.; COX, A.; WILLIAMS, E. R.; BOSS, P. K.; Associations between the Sensory Attributes and Volatile Composition of Carbenet Sauvignon Wines and Volatile Composition of the Grapes Used for Their Production; **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p-2573-2583, 2011.

GANSS, S.; KIRSCH, F.; WINTERHALTER, P.; FISCHER, U.; SCHMARR, H.; Aroma Changes due to Second Fermentation and Glycosylated Precursors in Chardonnay and Riesling Sparkling Wines. **J. Agric. Food Chem.** v. 59, p. 2524-2533, 2011.

GABBARDO, M.; **Borras finas e manoproteínas na maturação de vinho tinto cabernet sauvignon**. Dissertação de Mestrado, Ufpel, 2009.

GALLARDO-CHACÓN, J.; VICHI, S.; LÓPES-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S.; Analisis of Sparkling Wine Lees Surface Volatiles by Optimized Headspace Solid-Phase Microextraction; **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 3279–3285, 2009.

GALLO, V.; BELTRÁN, R.; HEREDIA, J. F.; GONZÁLES-MIRET, M. L.; Application of Multivariate Statistical Analyses to the Study of Factors Affecting White Wine Volatile Composition. **J. Food Quality**, v. 34, p.40-50, 2011.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M.; Characterization of the volatile fraction of Young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 145-153, 2006.

GÒDIA, F.; CASAS, C.; SOLA, C.: Application of Immobilized Yeast Cells to Sparkling Wine Fermentation. **Bilotechnol. Prog.** v. 7, n. 5, p 468-470, 1991.

GÜRBÜZ, O.; ROUSEFF, J. M.; ROUSEFF, R. L.; Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography-Olfactometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry; **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 3990-3996, 2006.

HIDALGO, P.; PUEYO, E.; POZO-BAYÓ N, M. A.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.; POLO, M. C.; Sensory and Analytical Study of Rosé Sparkling Wines Manufactured by Second Fermentation in the Bottle; **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 6640-6645, 2004.

IVANOVA, V.; STEFOVA, M.; VOJNOSKI, B.; STAFILOV, T.; BÍRÓ, I.; BUFA, A.; FELINGER, A.; KILÁR, F.; Volatile Composition of Macedonian and Hungarian Wines Assessed by GC/MS; **Food Bioprocess Technol**; published online; 05 january 2012.

JIANG, B.; ZHANG, Z.; Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China; **Molecules**, v. 15, p. 9184-9196, 2010.

KANA, K.; KANELLAKI, M.; PAPADIMITRIOU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A.; Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on γ -Alumina Pellets and Its Ethanol Production in Glucose and Raisin Extract Fermentation. **J. of Fermen. and Bioeng.** V. 68,nº3, p. 213-215, 1989.

KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J.; Applications of solid-phase microextratction in food analysis. **J. Chroma. A** . v. 800, p. 35-62, 2000.

KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells engineering principles. **Chem. Eng. Science**, v. 40, p.1321–1354, 1985.

KLESK, K.; QIAN, M.; MARTIN, R. R.; Aroma Extract Dilution Analysis of cv. Meeker (*Rubus idaeus* L.) Red Raspberries from Oregon and Washington. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 5155-5161, 2004.

KLIS, F.M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**; n 23, p 185- 202; 2006.

KOLMES, D.; ULRICH, D.; LOVRIC, T.; Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. **Eur. Food Res. Technol**, v. 222, p. 1-7, 2006.

KOURKOUTAS, Y.; DOUMA, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; Continuous winemaking fermentation using quince-immobilized yeast at room and low temperatures. **Process Biochemistry**, v. 39, p.143- 148, 2002.

KOURKOUTAS, Y; BEKATOROU, A; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.

LAFFORT, Catálogo técnico de produtos enológicos. Disponível online em <www.laffort.com>. Acesso em out 2012.

LAWO, N. C.; WEINGAR, G. J.F.; SCHUHMACHER, R.; FORNECK, A.; The volatile metabolome of grapevine roots: First insights into the metabolic response upon phylloxera attack; **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49 , p. 1059-1063, 2011.

LEE, S. J.; NOBLE, A. C.; Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-olfactometry and GC-Mass Spectrometry; **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 8036-8044, 2003.

LI, H.; TAO, Y.S.; WANG, H.; ZHANG, L.; Impact odorents of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). **Eur Food Res Technol**, v. 227, p. 287–292, 2008.

MANFROI, V.; Enologia. In: MANFROI, V.; GIOVANINNI, E.; **Viticultura e Enologia**, Elaboração de grandes vinhos nos *terroirs* brasileiros. Bento Gonçalves; IFRS, 2009.

MAKHOTKINA, O.; KILMARTIN, P. A.; Hydrolysis and formation of volatile esters in New Zealand Sauvignon blanc wine. **Food Chemistry**, v. 135, p. 486-493, 2012.

MARCO, A. G.; MORENO, N. J.; AZPICICUETA, C. A.; Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stainless steel tanks and oak barrels. **Food Chemistry**, v. 108, p. 213-219, 2008.

MARIĆ, J.; FIRŠT-BAČA, M.; Sensory evaluation and some acetate esters of bottle aged Chardonnay Wines. **Plant Soil Environ**. v. 49, p. 332-336, 2003.

MENDES, A.A.; CASTRO,H.F.; OLIVEIRA, P.C.; GIORDANO, R.L.C.; Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova**. v. 34, nº 5, p. 831-840, 2011.

MIRANDA, A. A.; LE BORGNE, Y.-A.; BONTEMPI, G.; New Routes from Minimal Approximation Error to Principal Components; **Neural Processing Letters, Springer**; v. 27, n. 3; 2008.

MOYANO, L.; ZEA, L.; MORENO, J.; MEDINA, M.; Analytical Study of Aromatic Series in Sherry Wines Subjected to Biological Aging; **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 7356-7361, 2002.

MOYANO, L.; ZEA, L.; VILLAFUERTE, L.; MEDINA, M.; Comparison of Odor-Active Compounds in Sherry Wines Processed from Ecologically and Conventionally Grown Pedro Ximenez Grapes; **J. Agric. Food Chem.**,v. 57, n. 3, p. 968–973, 2009.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN; **Compendium Of International Methods Of Wine And Must Analysis**. Volume 1, Edition 2006, 2005.

PEINADO, R. A.; MORENO, M. M.; MAURICIO, J. C.; Changes in volatile compounds and aromatic series in sherry wine with high gluconic acid levels subjected to aging by submerged flor yeast cultures. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 757–762, 2004.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, A.; Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 18, p. 237-255, 1998.

POERNER, N.; RODRIGUES, E.; CELSO, P. C.; MANFROI, V.; HERTZ, P. F.; Diferenciação Analítica de Vinhos-Base para Espumantes de Duas Regiões Vitícolas Do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 40, n.5, maio, 2010.

PRESA-OWENS, C. DE LA; SCHLICH, P.; DAVIES, H. D.; NOBLE, A. C.; Effect of *Méthode Champenoise* Process on Aroma of Four *V. vinifera* Varieties. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 49, n. 3, 1998.

PROENOL, Catálogo técnico de produtos enológicos. Disponível online em <www.proenol.com> ; acesso dez 2011.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUDOURDIEU, D.; **Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments**; Volume 2, 2ªEdition, John Wiley & Sons, Ltda, England, 2006a.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUDOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A.; **Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications**; Volume 1, 2ª Edition, John Wiley & Sons, Ltda, England, 2006b.

RIU-AUMATELL, M.; BOSCH-FUSTÉ, E.; LÓPEZ-TAMAMES, BUXADERAS, S.; Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with less. **Food Chemistry**, v. 95, p. 237-242, 2006.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. E.; ABARZUA, C. E.; **Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola**; Documento 29; Embrapa Uva e Vinho; Bento Gonçalves; 2000.

ROCHA, S.; RAMALHEIRA, V.; BARROS, A.; DELGADILLO, I.; COIMBRA, M. A.; Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model; **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p. 5142-5151, 2001.

SELII, S.; CANBAS, A.; VARLET, V.; KELEBEK, H.; PROST, C.; SEROT, T.; Characterization of the Most Odor-Active Volatiles of Orange Wine Made from a Turkish cv. Kozan (*Citrus sinensis* L. Osbeck); **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 227–234, 2008.

SWIEGERS, J.H.; BARTOWSKY E.J.; HENSCHKE, P.A.; PRETORIUS I.S.; Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 139-173, 2005.

TAPIA, C.; ESCOBAR, Z.; COSTA, E.; SAPAG-HAGAR, J.; VALENZUELA, F.; BASUALTO, C.; GAI, M.N.; YAZDANI-PEDRAM, M.; Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan- alginate and chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 57, p. 65-75, 2004.

TORRENS, J.; URPI, P.; RIU-AUMATELL, M.; VICHI, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S.; Different comercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 48–57, 2008.

TORRENS, J.; RIU-AUMATELL, M.; VICHI, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Assessment of Volatile and Sensory Profiles between Base and Sparkling Wines. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 4, 2010.

UMANO, K.; NAKAHARA, K.; SHOJI, A.; SHIBAMOTO, T.; Aroma Chemicals Isolated and Identified from Leaves of *Aloe arborescens* Mill. Var. *natalensis* Berger; **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 3702-3705, 1999.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; Microextração por Fase Sólida. **Quím. Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-467, 1963.

WELKE, J. E.; ZINI, C. A.; Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Analysis of Volatile Compounds in Foods and Beverages. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 4, p. 609-622, 2011.

WELKE, J. E.; ZANUS, M.; LAZAROTTO, M.; SCHMITT, K. G.; ZINI, C., A.; Volatile Characterization by Multivariate Optimization of Headspace-Solid Phase Microextraction and Sensorial Evaluation of Chardonnay Base Wines. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, p. 678-687, 2012a.

WELKE, J. E.; ZANUS, M.; LAZAROTTO, M.; MANFROI, V.; ZINI, C., A.; Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection; **Jornal Of Chromatography A**; v. 1226, p. 124-139, 2012b.

WERKHOFF, P.; GÜNTERT, M.; KRAMMER, G.; SOMMER, H.; KAULEN, J.; Vacuum Headspace Method in Aroma Research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits; **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 1076-1093, 1998.

GLOSSÁRIO

Assemblage: ou corte é uma ferramenta enológica que utiliza-se da mistura de dois ou mais vinhos, para geram um terceiro produto, com características superior aos vinhos que o geraram.

Cava: é a denominação dada ao vinho espumante elaborado na Espanha.

Borras finas: são os sedimentos que permanecem em suspensão após 24 horas da realização de uma *trasfega* (ato de transferir o vinho de um recipiente para o outro, sem gerar turbulência, e mantendo os sedimentos depositados no primeiro).

Degorgement: etapa que retira as borras depositadas na parte interna da tampa da garrafa de espumante que passou pela etapa de *remuage*.

DO, denominação de origem: é a denominação oficial que é atribuída a determinados produtos como garantia da sua proveniência e qualidade.

Garrafa Champanheira; são garrafas utilizadas para o vinho espumante apresentam algumas características específicas como capacidade efetiva e devem suportar altas pressões, a mais utilizada apresenta 0,75 L.

Giro *pallets*: equipamento automatizado que realiza a *remuage* em garrafas de espumante.

Licor de *tirage*: é basicamente uma solução concentrada de sacarose, diluída no próprio vinho base, e adicionada no vinho base que forneça o aporte de açúcar necessário às leveduras para que ocorra a adequadamente a 2ª fermentação.

***Perlage*:** são as borbulhas de CO₂ que se desprende durante o serviço, do fundo da taça.

Pupitres: são tabuas de madeira furadas para o encaixe das garrafas de espumantes, dispostas em V invertido que auxiliam na etapa de *remuage*.

Qualidade olfativa: conjunto das propriedades e das características relacionado com as sensações sentidas pelo órgão olfativo.

Qualidade gustativa: conjunto das propriedades e das características relacionado com as sensações percebidas pelo órgão gustativo (a língua) quando estimulado por certas substancias.

Qualidade global: ou qualidade geral é o conjunto das propriedades e das características que lhe conferem aptidão para satisfazer as necessidades explícitas e implícitas de uma pessoa.

Remuage: é a aplicação de giros e mudança de inclinação das garrafas de espumante para que as borras (sedimentos) formadas durante a 2ª fermentação se deposite no gargalo da garrafa.

Tampa corona: tampa metálica com vedante interno específica para o uso em garrafa champanheira, utilizada durante a segunda fermentação do espumante.

Tomada de espuma: etapa que compreende a 2ª fermentação em ambiente isobarmétrico (garrafa ou tanque) e ocorre a formação de CO₂ e conseqüentemente espuma.

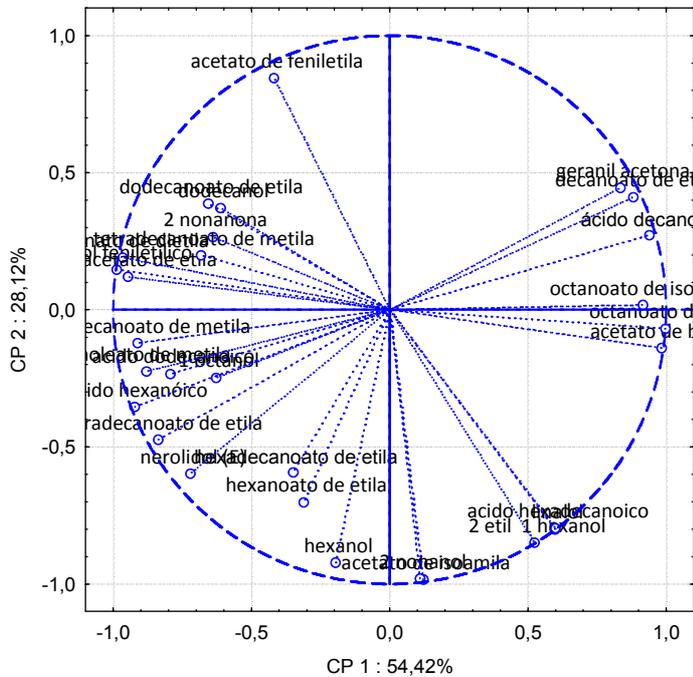
Vinho base: vinho elaborado com características adequadas e que será utilizado para efetuar a 2ª fermentação, dando origem a vinho espumante.

Vinho espumante: a Legislação Brasileira define vinho espumante como o vinho espumante cujo anidrido carbônico seja resultante de uma segunda fermentação alcoólica do vinho, em garrafa ou grande recipiente, com graduação alcoólica de 10 (dez) a 13°GK (treze graus Gay Lussac), a 20° (vinte graus centígrados) e a pressão mínima de 03 (três) atmosferas, a 10°C (dez graus centígrados).

Vinho tranquilo: vinho que não contém anidrido carbônico, e também não é licorosos e/ou fortificados.

ANEXOS

Anexo 1. Projeções das variáveis (área cromatográfica percentual dos compostos voláteis do *headspace* de vinho base e os tratamentos que utilizaram leveduras livres) e seus *Loadings* no plano constituído pelas duas componentes principais.



Anexo 2. Projeções das variáveis (área cromatográfica percentual dos compostos voláteis do *headspace* de vinho base e os tratamentos que utilizaram leveduras imobilizadas experimentalmente) e seus *Loadings* no plano constituído pelas duas componentes principais.

