

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE AROMA EM MOSTO DE
UVA DESTINADO A PRODUÇÃO DE VINHO
ESPUMANTE**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Maria Eugênia de Oliveira Mamede** aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de maio de 2003.

Campinas, 22 de maio de 2003.

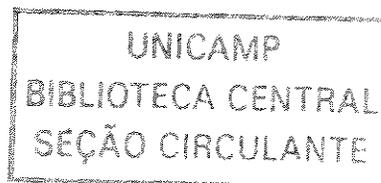

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

Maria Eugênia de Oliveira Mamede
M.S, em Ciências Biológicas - Bioquímica.

Gláucia Maria Pastore
Profa. Orientadora

Tese apresentada á Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas
2003



BANCA EXAMINADORA



Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora



Dra. Helena Maria André Bolino Cardello
Membro



Dra. Helena Teixeira de Godoy
Membro



Dr. Douglas Wagner Franco
Membro



Dra. Hélia Harumi Sato
Membro

Dra. Hilary Castle de Menezes
Suplente

Dra. Maria Regina Bueno Franco
Suplente

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

00922225

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo apoio e carinho dados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu tio Eterlon pela sua admiração pelo meu esforço.

A Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela amizade e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Helena M. A. Bolini Cardello pela sua atenção e orientação no procedimento da análise sensorial realizada.

A Profa. Dra. Maria Regina Bueno Franco pela permissão da utilização do espectrômetro de massas do Laboratório de Análises de Alimentos.

A Profa. Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer pela permissão da utilização do Laboratório de Microbiologia para identificação dos microrganismos.

Ao Prof. Dr. Douglas Wagner Franco pela sua amizade e permissão da utilização do espectrômetro de massas do Laboratório para o Desenvolvimento da Química de Aguardente.

A amiga Mercedes que tanto ajudou neste início deste trabalho me dando força e apoio.

As amigas Maria Gabriela, Márcia, Crtistina, Eliane, Andréia pela amizade e incentivo recebidos.

Aos amigos do laboratório Cleber e Andréas pelo apoio técnico e cooperação.

A Mariana pela cooperação e amizade.

A Rosinha do Laboratório de Termobacteriologia de Alimentos pela sua amizade e cooperação no trabalho de identificação das leveduras.

A Natália e Gisele do Laboratório de Análise de Alimentos pela sua amizade, apoio técnico e sugestões na fase de identificação de compostos voláteis.

Aos alunos do Laboratório para Desenvolvimento o da Química de Aguardente (LDQA) – Instituto de Química/USP (São Carlos –S.P.) pela hospitalidade e apoio técnico prestado durante as análises realizadas.

A Chandon do Brasil S/A pela participação neste trabalho, através do fornecimento de amostras, utilização do laboratório e pela valiosa atenção de seus funcionários.

A UVIBRA (União Brasileira de Viticultura) pelas informações concedidas para realização deste trabalho.

A FUNARBE (Fundação Artur Bernardes) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

As amizades conquistadas durante quatro anos de trabalho foram muitas, por isso deixo aqui minha gratidão a todos que compartilharam comigo das alegrias e tristezas de um doutorado.

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Fermentação alcoólica. | 6 |
| Figura 2 | Formação do glicerol | 7 |
| Figura 3 | Rota de formação do diacetil. | 8 |
| Figura 4 | Formação de álcoois superiores a partir do metabolismo de aminoácidos | 11 |
| Figura 5 | Formação de acetal | 14 |
| Figura 6 | Formação de éster a partir da reação de ácido com álcool. | 14 |
| Figura 7 | Reação de formação de lactona. | 16 |
| Figura 8 | Molécula de isopreno | 17 |
| Figura 9 | Histograma de aceitação do mosto Pinot Noir fermentado com <i>Pichia membranaefaciens</i> (amostra 1). | 67 |
| Figura 10 | Histograma de aceitação do mosto Chardonnay fermentado com <i>Pichia membranaefaciens</i> (amostra 2). | 67 |
| Figura 11 | Histograma de aceitação do Mosto Chardonnay fermentado com <i>Kloeckera apiculata</i> (amostra3). | 68 |
| Figura 12 | Histograma de aceitação do mosto Pinot noir fermentado com <i>Candida valida</i> (amostra 4). | 68 |
| Figura 13 | Histograma de aceitação do mosto Chardonnay fermentado com <i>Candida valida</i> (amostra 5). | 68 |
| Figura 14 | Histograma de aceitação do Mosto Pinot Noir fermentado com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (amostra 6). | 69 |
| Figura 15 | Histograma de aceitação do mosto Chardonnay fermentado com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (amostra 7). | 69 |
| Figura 16 | Histograma de aceitação do mosto Pinot noir fermentado com <i>Kloeckera apiculata</i> (amostra 8). | 69 |
| Figura 17 | Histograma da intenção de compra do mosto Pinot Noir fermentado com <i>Pichia membranaefaciens</i> (amostra 1) | 71 |
| Figura 18 | Histograma da intenção de compra do mosto Chardonnay fermentado com <i>Pichia membranaefaciens</i> (amostra 2). | 71 |
| Figura 19 | Histograma de intenção de compra do Mosto Chardonnay fermentado com <i>Kloeckera apiculata</i> (amostra 3). | 72 |
| Figura 20 | Histograma da intenção de compra do mosto Pinot Noir fermentado com <i>Candida valida</i> (amostra 4). | 72 |
| Figura 21 | Histograma da intenção de compra do mosto Chardonnay fermentado com <i>Candida valida</i> (amostra 5). | 72 |
| Figura 22 | Histograma de intenção de compra do Mosto Pinot Noir fermentado com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (amostra 6). | 73 |
| Figura 23 | Histograma da intenção de compra do mosto Chardonnay fermentado com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (amostra 7). | 73 |
| Figura 24 | Histograma da intenção de compra do mosto Pinot Noir fermentado com <i>Kloeckera apiculata</i> (amostra 8). | 73 |

INDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|------------|--|----|
| Gráfico 1 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com <i>Kloeckera apiculata</i> a 20 °C. | 46 |
| Gráfico 2 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com <i>Pichia membranaefaciens</i> a 20 °C. | 47 |
| Gráfico 3 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com <i>Candida valida</i> a 20 °C. | 47 |
| Gráfico 4 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 20 °C. | 48 |
| Gráfico 5 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Kloeckera apiculata</i> a 20 °C. | 49 |
| Gráfico 6 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Pichia membranaefaciens</i> a 20 °C. | 49 |
| Gráfico 7 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Candida valida</i> a 20 °C. | 50 |
| Gráfico 8 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 20 °C. | 50 |
| Gráfico 9 | Varição da massa celular seca e do pH do mosto Chardonnay fermentado com <i>Kloeckera apiculata</i> a 15 °C. | 52 |
| Gráfico 10 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com <i>Pichia membranaefaciens</i> a 15 °C. | 52 |
| Gráfico 11 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com <i>Candida valida</i> a 15 °C. | 53 |
| Gráfico 12 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 15 °C. | 54 |
| Gráfico 13 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Kloeckera apiculata</i> a 15 °C. | 54 |
| Gráfico 14 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Pichia membranaefaciens</i> a 15 °C. | 55 |
| Gráfico 15 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Candida valida</i> a 15 °C. | 56 |
| Gráfico 16 | Varição da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 15 °C. | 56 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1 | Origem das substâncias de sabor e aroma do vinho | 4 |
| Tabela 2 | Número de compostos de sabor e aroma detectados em vinho e uvas | 9 |
| Tabela 3 | Condições de extração dos voláteis por "Purge and Trap Concentrador/Dynamic Headspace". | 38 |
| Tabela 4 | Características do aroma e sua intensidade | 42 |
| Tabela 5 | Resultados dos testes bioquímicos das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1), <i>Candida valida</i> (2) e <i>Kloeckera apiculata</i> (3) | 43 |
| Tabela 6 | Parâmetros físico-químicos do mosto Chardonnay e Pinot Noir. | 44 |
| Tabela 7 | Compostos voláteis, isolados por extração com solvente, identificados e tentativamente identificados por espectrometria de massas e Índice de Kovats (I.K.) no mosto não fermentado e no mosto fermentado pelas leveduras selecionadas por 168 horas. | 58 |
| Tabela 8 | Compostos voláteis isolados por "Dynamic Headspace" identificados e tentativamente identificados por espectrometria de massa e Índice de Kovats (I.K.), no mosto não fermentado e no mosto fermentado pelas leveduras selecionadas por 168 horas. | 60 |
| Tabela 9 | Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído no mosto Chardonnay fermentado a 20 °C. | 61 |
| Tabela 10 | Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato e isoamila e acetaldeído no mosto Pinot Noir fermentado a 20 °C. | 62 |
| Tabela 11 | Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Chardonnay fermentado a 20 °C. | 63 |
| Tabela 12 | Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Pinot Noir fermentado a 20 °C. | 63 |
| Tabela 13 | Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído no mosto Chardonnay fermentado a 15 °C. | 65 |
| Tabela 14 | Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído no mosto Pinot Noir fermentado a 15 °C. | 65 |
| Tabela 15 | Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Chardonnay fermentado a 15 °C. | 66 |
| Tabela 16 | Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Pinot Noir fermentado a 15 °C. | 66 |
| Tabela 17 | Médias de aceitação das amostras. | 70 |

INDICE GERAL

| | |
|--|-------------|
| 1 – RESUMO | xi |
| 2- ABSTRACT | xiii |
| 3– INTRODUÇÃO | 1 |
| 3.1 – Revisão Bibliográfica | 21 |
| 4 – OBJETIVOS | 32 |
| 5 – MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 5.1 – Isolamento, seleção e caracterização de microrganismos produtores de aroma de frutas. | 33 |
| 5.1.1 – Coleta de amostras | 33 |
| 5.1.2 – Preparo do meio sintético para produção de aroma de frutas | 33 |
| 5.1.3 – Avaliação sensorial preliminar da produção de aroma de fruta em meio sintético. | 33 |
| 5.1.4 – Identificação dos microrganismos produtores de aroma de frutas. | 34 |
| 5.2 Avaliação dos compostos de aroma formados na fermentação de mosto de uva. | 35 |
| 5.2.1 – Mostos utilizados para fermentação | 35 |
| 5.2.2 – Características físico-químicas dos mostos fornecidos pela indústria. | 35 |
| 5.2.3 – Fermentação do mosto Chardonnay e Pinot Noir | 36 |
| 5.2.4 – Preparação da amostra para análise no cromatógrafo | 37 |
| 5.2.4.1 – Condições de extração dos compostos voláteis. | 37 |
| 5.2.4.1.1 – Extração por solvente (líquido-líquido). | 37 |
| 5.2.4.1.2 – Extração por “Dynamic Headspace”. | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.5 - Condições cromatográficas | 38 |
| 5.2.5.1 - Condições cromatográficas para análise dos compostos voláteis isolados pela extração com solvente (líquido-líquido). | 38 |
| 5.2.5.2 - Condições cromatográficas para análise dos compostos voláteis isolados pelo “Dynamic Headspace”. | 39 |
| 5.3 – Avaliação Sensorial | 40 |
| 5.3.1 – Análise de aceitação do mosto fermentado | 40 |
| 6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 6.1 - Isolamento, seleção e caracterização de microrganismos produtores de aroma de frutas. | 42 |
| 6.2 – Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos mostos Chardonnay e Pinot Noir | 44 |
| 6.3 – Variação da massa celular seca e pH dos mostos Chardonnay e Pinot Noir durante a fermentação a 20 °C. | 45 |
| 6.4 – Variação da massa celular seca e pH dos mostos Chardonnay e Pinot Noir durante a fermentação a 15 °C. | 51 |
| 6.5 – Cromatografia gasosa | 57 |
| 6.6 – Compostos isolados por extração com solvente (líquido-líquido) e “Dynamic Headspace”. | 57 |
| 6.7 – Quantificação dos compostos majoritários formados durante a fermentação e isolados pelo “Dynamic Headspace”. | 61 |
| 6.8 – Análise sensorial | 67 |
| 7 - CONCLUSÃO | 74 |
| 8– REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 77 |
| ANEXO 1 – Cromatograma de identificação dos compostos identificados pela extração “Dynamic Headspace” | 86 |

1- RESUMO

O vinho é uma bebida obtida pela completa ou parcial fermentação alcoólica do mosto de uva. A comercialização do vinho teve uma razoável evolução no Brasil. Os Champanhas/espumantes e espumantes "Asti" foram os vinhos que tiveram o maior consumo pela população brasileira nos últimos 10 anos. O Estado do Rio Grande do Sul (RG) é responsável por mais de 90 % da produção de uva para elaboração do vinho. A região da Serra Gaúcha (RG) produz uva com as melhores características para produção de vinho espumante. Durante a fermentação alcoólica, além de etanol, CO₂, glicerol são formados em paralelo compostos de sabor e aroma de diferentes classes de substâncias tais como: ésteres, álcoois, ácidos, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis voláteis, terpenos, acetais, nitrilas, amidas entre outras. Estas classes de substâncias são provenientes da uva, da fermentação e também do envelhecimento ou amadurecimento. A análise sensorial permite a nós identificar as características ou propriedades que nos agradam em um alimento e tem sido utilizada intensamente para classificar vinhos com base na sua composição aromática. Os objetivos deste trabalho foram: a) isolar e selecionar microrganismos produtores de aroma de frutas em meio sintético; b) identificar os microrganismos produtores de aroma de frutas; c) estudar a composição de voláteis produzidos pelos microrganismos selecionados nos mostos de uvas Chardonnay e Pinot Noir; d) avaliar o grau de aceitação sensorial das amostras de mosto fermentado a 15 °C em relação aos voláteis de aroma produzidos. A produção de aroma foi verificada em meio sintético contendo 5 % de glicose durante 72 horas a 30 °C. A seleção dos microrganismos produtores de aroma foi realizada pela análise sensorial direta descritiva utilizando 10 provadores. A identificação das leveduras foi realizada pelo sistema automático e padronizado mini API/ID 32 C. Análises físico-químicas do mosto como densidade, álcool e açúcar foram realizados pelo densímetro Mustimetre Dujardin-Salleron (385200); as análises de acidez volátil, acidez total, SO₂ livre e total foram realizadas por titulação. Os mostos Chardonnay e Pinot Noir foram fermentados com as leveduras selecionadas a 15 °C e 20 °C durante sete dias. Os compostos voláteis de aroma foram extraídos pela técnica de extração líquido-líquido com éter-etílico/hexano (1:1) e por "Dynamica Headspace" e identificados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG-EM) e índice de Kovats. A análise de aceitação do

mosto fermentado a 15 °C durante sete dias foi realizada por uma equipe composta por 25 provadores representativos do público alvo, utilizando escala hedônica não estruturada de nove centímetros. A intenção de compra foi registrada em uma escala de atitude de cinco pontos. As leveduras selecionadas foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida valida*, *Kloeckera apiculata* e *Pichia membranaefaciens*. As leveduras apresentaram um maior crescimento a 20 °C do que a 15 °C. Conseqüentemente a produção de compostos voláteis foi maior a 20 °C do que a 15 °C. Compostos formados durante a fermentação como acetaldeído, acetato de etila, etanol, isobutanol, acetato de amila, acetato de isoamila, álcool isoamílico, feniletanol, acetato de 2-feniletanol, ácido hexanóico, ácido propanóico, ácido butanóico, propanal, butanal entre outros foram detectados nos mostos e no caldo sintético em diferentes concentrações. Os resultados da análise de aceitação mostraram que oito amostras diferiram entre si na produção de aroma. Pelo teste de tukey apenas uma amostra diferiu significativamente em relação às outras amostras. Este resultado pode ser salientado pelos dados da concentração dos compostos majoritários, que mostrou ser muito similar na composição aromática das três amostras com maior aceitação.

2 -ABSTRACT

Wine is an alcoholic drink obtained by the partial or complete alcoholic fermentation of grape must. The wine markets have evolved reasonably in Brazil. Champagne/sparkling and "Asti" sparkling core those most consumed by the population in the last 10 years. State of "Rio Grande do Sul" (RG) is responsible for more than 90 % the grape production for wine making. The "Serra Gaúcha" region produces grapes with the best characteristics for sparkling wine production. During the alcoholic fermentation in addition to ethanol, CO₂ and glycerol are formed in parallel with flavor components derived from different groups of substances, such as esters, alcohols, acids, aldehydes, ketones, lactones, volatile phenols, terpenes, acetals, nitriles, etc. These groups of substances come from the grape or are formed during maturation/aging. Sensory analysis allows us to identify pleasant characteristics or properties of the food under study. It has been intensively used to classify wines based on their aromatic composition. In this work we aimed: a) to isolate and select microorganisms that produce fruit aroma in synthetic media, detectable by direct descriptive analysis; b) to identify the fruit aroma producing microorganisms; c) to study the composition of the volatiles produced by the selected microorganisms in Chardonnay and Pinot Noir grape musts; d) to evaluate the degree of sensory acceptance of must sample fermented at 15 °C, with respect to the volatile aroma produced. The production of aroma was verified in synthetic media containing 5 % glucose during 72 hours at 30 °C. Selection of aroma producing microorganisms in synthetic media was performed by direct descriptive sensorial analysis, using 10 testers. Yeast identification was carried out by the standard automatic system, mini API/ID 32 C. Physico-chemical analysis of the musts, such as alcohol and sugar content, were effected using the Mustimetre Dujardin-Salleron Densimeter (385200); the analyses of total volatile acidity, acidity, free and total SO₂, were carried out by titration. The Chardonnay and Pinot Noir musts were inoculated with the yeast at 15 °C and 20 °C incubated for 7 days. The volatile aroma compounds were extracted by the liquid-liquid extraction technique ethyl ether/hexane (1:1) and by the purge and trap extraction system and identified by GC/MS and by the Kovats index. The acceptance fermented must of the was determined by a team of 25 representative target consumers using a nine centimeter non-structured hedonic scale. The purchasing intention was registered on a five points

attitude scale. The selected yeast were *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida valida*, *Kloeckera apiculata* and *Pichia membranaefaciens*. The yeast grew more at 20 °C than at 15 °C. Consequently, they produced a higher concentration of volatiles at 20 °C than at 15 °C. Compounds formed during fermentation, such as acetaldehyde, ethyl acetate, ethanol, isobuthyl alcohol, amyl acetate, isoamyl acetate, isoamyl alcohol, phenylethanol, 2-phenylethanol acetate, hexanoic acid, propanoic acid, butanoic acid, propanal, butanal and others were detected in the must and the synthetic broth in different concentration. Results of the sensory analysis of the musts fermented at 15 °C showed that the 8 samples tested differed between themselves with respect to the aromas produced. Using Tukey's test, only one sample was significantly different in comparison with the others. This result is apparent from the data for the concentration of the major compounds, which were very similar for the three most accepted samples.

3- INTRODUÇÃO:

O vinho é uma bebida obtida pela completa ou parcial fermentação alcoólica do mosto da uva, que é o suco obtido do esmagamento do bago da uva por prensagem. Desde de 3500 A.C. o vinho já era consumido pelos assírios e egípcios (Jackson, 1994). A fabricação do vinho é vista como a arte da combinação do trabalho de viticultores com uma crescente e sofisticada tecnologia. Atualmente os países do mediterrâneo como a França, Itália e Espanha são os três maiores produtores mundiais de vinho, o Brasil ocupa o décimo quinto lugar em uma escala dos vinte maiores produtores.

Vinho no Brasil

O mercado de vinhos finos no Brasil mostrou uma razoável evolução nos últimos 20 anos (Lona, 1996). Em 1989 o mercado interno brasileiro comercializou 254.000.000 litros de vinhos e com o aumento da aceitação do produto pelo consumidor, em 1999 a comercialização alcançou 293.000.000 litros. Sendo os champanhas/ espumantes, os espumantes (processo Asti) e os frisantes os que mais cresceram em consumo durante os dez últimos anos (UVIBRA, 2000/2001).

No Brasil o vinho espumante é referido como espumante natural ou champanha de acordo com o decreto nº 73.267 de 06 de dezembro de 1973. No artigo 79, o champanha é definido como o vinho cujo dióxido de carbônico (CO₂) formado advém de uma segunda fermentação alcoólica que pode ser em garrafa (método tradicional) ou em um grande recipiente (método charmat). Este tipo de vinho deve apresentar uma graduação alcoólica entre 10-13 °GL, e uma pressão mínima de 3 atm resultante do CO₂. No espumante vinho tipo "Asti" o CO₂ formado é resultante de uma única fermentação alcoólica, que pode ser em garrafa ou grande recipiente, do mosto de uva da variedade moscatel. Este vinho deve apresentar uma graduação alcoólica entre 7 e 10 °GL e uma pressão mínima de 2 atm (Veses, 1976) .

A maior parte dos vinhos é obtida de uvas provenientes da videira do gênero *Vitis*, sendo cultivadas nos Brasil espécies como a *Vitis vinifera*, em maior escala, *Vitis riparia*, *Vitis labrusca* e alguns híbridos. A primeira destinada apenas para produção de vinho fino, as duas últimas não são próprias para vinificação, mas sim para produção de sucos

de uva e vinho comum. Dentre os 8000 tipos de uvas provenientes da *Vitis vinífera*, podemos citar algumas cultivadas no Brasil como a Chardonnay, Pinot Blanc, Riesling, Sauvignon Blanc, Sémillon, Trebiano e Muscat Blanc para produção de vinho branco e champanha, sendo a primeira a mais nobre. Para vinho tinto a Carbenet sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Lambrusco, Nebbiolo, Aramon e Grand Noir (Amarante, 1986).

O Estado do Rio Grande do Sul (RG) é responsável por mais de 90 % da produção de uvas para elaboração de vinho (Souza e Arruda, 2001). A região da Serra Gaúcha (RG) produz uma uva ácida e de baixa maturidade devido aos fatores climáticos e natureza do solo (Souza e Arruda, 2001). Estas características são péssimas para o vinho, mas excelentes para o espumante, pois o vinho base utilizado para iniciar a 2ª fermentação deve ter um pH em torno de 3,0 ou menor (Boulton et al, 1996).

Recentemente, Bento Gonçalves (RG) sediou o 1º concurso internacional de vinho no Brasil, do qual participaram críticos do assunto, consumidores em potencial e enólogos. Os espumantes brasileiros avaliados receberam a maioria das medalhas de ouro e prata.

Além do mais o “Vale dos Vinhedos” (RG) acaba de receber um certificado de indicação geográfica de procedência, e agora os vinhos produzidos com pelo menos 85 % de uvas desta região poderão condecorar seus rótulos com o selo de origem.

Sabor e aroma - Percepção

A análise sensorial permite ao homem identificar as características ou propriedades que lhes agradam em um alimento. A primeira observação de um consumidor em relação a um produto seria em relação a sua aparência. Em seguida vêm as percepções do sabor e aroma ao adicionar o alimento na boca. O sabor é uma resposta integrada aos estímulos gustatórios e olfativos. O gosto é classificado em cinco categorias básicas: doce, amargo, salgado, ácido e umame. O sistema olfativo é bem desenvolvido e permite a percepção de milhares de compostos da matriz de um alimento. Muitos compostos de aroma do vinho mesmo que sejam contribuintes significativos são difíceis de serem detectados pela análise química, pois estão em concentrações muito baixas, mas podem ser detectados pelo olfato, pois este estímulo é um “detector” extremamente sensível. Tanto o sistema olfativo quanto o gustativo tem um limiar mínimo

de detecção chamado de *threshold* que é definido como a menor quantidade necessária para um indivíduo detectar o estímulo (Vannier et al, 1999).

Cada pessoa tem uma percepção do aroma global de um determinado alimento. Às vezes um alimento têm características sensoriais marcantes de um determinado composto que é chamado de composto de “impacto”, mas nenhum composto sozinho é responsável pelo aroma global.

Em análise sensorial existem vários métodos que podem ser aplicados de acordo com o objetivo do estudo sobre um determinado produto. Os métodos discriminativos ou de diferença servem para determinar se amostras que sofreram diferentes tratamentos, diferem sensorialmente entre si.

Métodos descritivos ou analíticos avaliam tanto a descrição quanto à discriminação dos atributos sensoriais de um alimento. Os testes destes métodos descrevem e avaliam numericamente a intensidade de cada atributo.

Os métodos afetivos avaliam a preferência ou aceitação de um determinado produto junto ao mercado consumidor.

Os métodos afetivos são de muita utilidade, e geralmente são aplicados após os testes descritivos e de discriminação. Os métodos (testes) afetivos podem dizer se um consumidor gosta ou desgosta de um determinado produto ou qual é a sua preferência de um produto em relação a outro. Geralmente estes testes são aplicados antes do produto chegar ao mercado consumidor e tem bastante utilidade para as indústrias. Os provadores dos testes afetivos devem ser consumidores potenciais do produto em questão, sendo sua aplicação para produtos concorrentes; desenvolvimento de novos produtos; otimização ou melhoria da qualidade de produtos; acesso ao mercado potencial. Quando se quer saber se o consumidor gosta ou desgosta de um produto se aplica o teste afetivo de aceitação.

A análise sensorial é muito utilizada para classificar vinhos com base na sua composição aromática (Noble et al., 1980; Udé et al., 1984; Cliff e Dever, 1996; Owens et al., 1998; Vannier et al., 1999).

Origem do Sabor e Aroma do Vinho

A qualidade e o tipo do vinho é dado pela sua composição de substâncias voláteis e não-voláteis, que distingue o seu sabor e aroma (Chatonnet et al., 1992).

No vinho há mais de 800 compostos de diferentes classes de substâncias que parte da constituição do seu sabor e aroma (Maarse et al., 1992).

Estes compostos são originários da uva, da fermentação por microrganismos, de reações químicas como oxidação que ocorrem no processamento e envelhecimento do vinho, e também do envelhecimento em barril de madeira (Tabela 1) (Matheis, 1992).

Tabela 1 – Origem das substâncias de sabor e aroma do vinho.

| Origem | Características |
|--|--|
| Uva | Substâncias que passam inalteradas da uva para vinho |
| Fermentação por leveduras ou bactérias | Substâncias de sabor e aroma formadas durante a fermentação |
| Infestação por fungos | Substâncias formadas durante o apodrecimento da uva pelo <i>Botrytis cinerea</i> |
| Reações químicas | Formação de acetais durante o envelhecimento em garrafa |
| Barril de madeira (carvalho) | Substâncias aromáticas oriundas do barril de carvalho durante o envelhecimento |

Matheis, 1992

Fermentação

Fermentação Alcoólica

A grande maioria dos compostos de sabor e aroma do vinho é formada durante a fermentação alcoólica do mosto da uva (Margalith e Schwartz, 1970). As leveduras utilizam os nutrientes da uva como açúcar (glicose ou frutose), compostos nitrogenados, vitaminas, sais, etc; para crescer e se multiplicar. Em primeira instância os açúcares são metabolizados para etanol, CO₂ e glicerol, os quais são chamados de compostos primários da fermentação.

De todos os microrganismos detectados na microflora da uva, as leveduras do gênero *Saccharomyces* são as mais abundantes, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras do gênero *Saccharomyces* são bem resistentes ao etanol, por isso a sua sobrevivência durante a fermentação é maior do que outras leveduras de outros gêneros. Assim sendo, essas linhagens da *Saccharomyces* são as mais tolerantes as modificações do meio durante a fermentação (Fleet, 1994).

Leveduras como as do gênero *Kloeckera*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Hanseniospora*, *Candida*, *Pichia*, entre outras também são comuns à microflora da uva. Devido ao fato de serem pouco tolerantes ao álcool, estas leveduras fazem parte apenas do início da fermentação, mas podem atrapalhar o crescimento do *Saccharomyces* e comprometer a finalização da fermentação (Fleet, 1994).

As leveduras precisam sintetizar metabólitos intermediários para crescer e se multiplicar. Estes metabólitos intermediários são gerados da via glicolítica, via pentose-fosfato e também do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Jackson, 1994).

As linhagens do *Saccharomyces*, da *Candida*, da *Pichia* e da *Kloeckera* quando inoculadas no mosto, podem optar pelo crescimento aeróbio se o oxigênio estiver disponível, ou anaeróbio (fermentação), sendo as leveduras do gênero *Pichia* as mais aeróbias (Feet, 1994).

Em crescimento anaeróbio, no final da glicólise são geradas duas moléculas de ATP e uma de NADH. O NADH formado precisa ser regenerado a NAD⁺, para que uma nova molécula de glicose ou frutose seja oxidada e a fermentação não seja interrompida, além do mais o excesso de NADH causa alterações do potencial elétrico da célula.

Os microrganismos desenvolveram algumas estratégias diferentes para regeneração do NADH oriundo da fermentação alcoólica. Na fermentação alcoólica, quando o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase são formados CO_2 e acetaldeído. O acetaldeído formado serve então como acceptor final de hidrogênio e é reduzido pela álcool desidrogenase a etanol regenerando o NAD^+ (Figura 1) (Boulton, 1996).

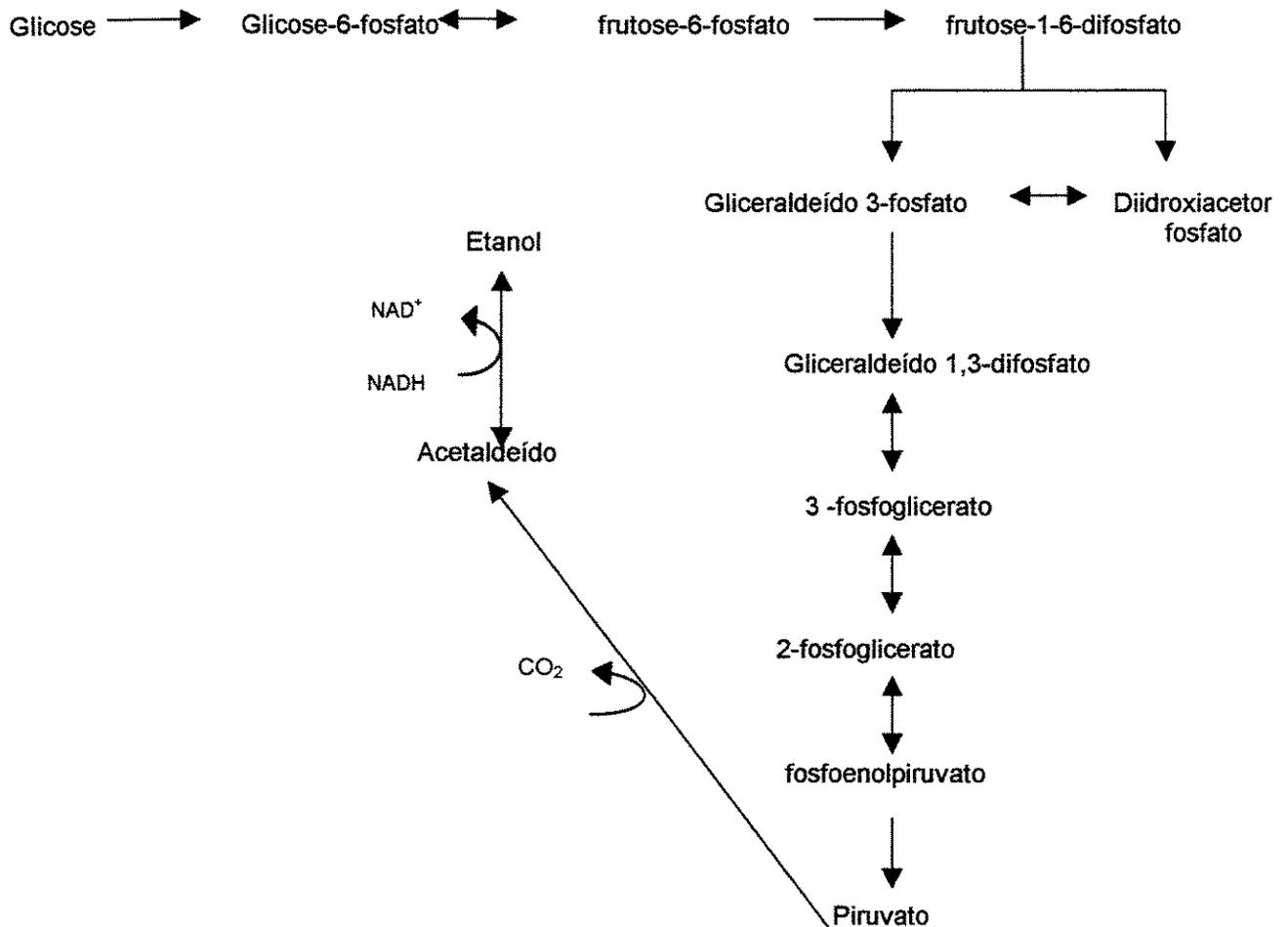


Figura 1 - Fermentação alcoólica.

Na fermentação, a principal função do ciclo do TCA é gerar metabólitos intermediários para síntese de aminoácidos. Outra forma de se regenerar o NADH é através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). O NADH formado da oxidação do citrato a succinato pode ser prevenido se o oxaloacetato for reduzido a succinato. O NADH produzido em excesso da glicólise também pode ser reoxidado pelo caminho inverso do ciclo do TCA.

Quando as leveduras estão em condições de crescimento aeróbico, o etanol não é produzido imediatamente (Whiting, 1972). As enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase tem baixa atividade (Sharma e Tauro, 1986). Em consequência, outros compostos como o glicerol é formado. A diidroxiacetona fosfato é reduzida a glicerol fosfato pela diidroxiacetona fosfato redutase regenerando a molécula de NAD⁺. O glicerol fosfato é então desfosforilado pela glicerol fosfato fosfatase e então o glicerol é produzido (Figura 2).

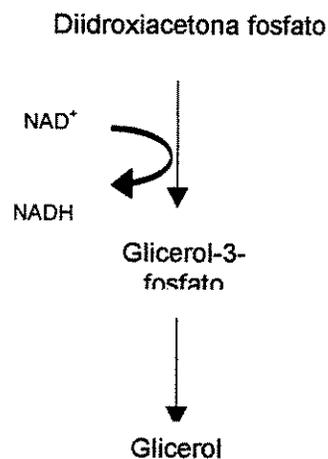


Figura 2 – Formação do glicerol

Fermentação Malolática

As bactérias lácticas, que também fazem parte da microflora da uva, durante a fermentação alcoólica metabolizam o ácido málico originando ácido láctico e CO₂, processo metabólico conhecido como fermentação malolática (FM), também chamado de fermentação secundária (Boulton et al, 1996).

Geralmente as bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* são os mais encontrados nos vinhos, por isso são as responsáveis pela fermentação malolática do vinho (Fleet, 1994). Este tipo de metabolismo é importante na fabricação de alguns tipos de vinho por três razões: deacidificação, modificação do aroma e sabor e estabilidade microbiana.

Outros compostos como a diacetil, acetoína e 2,3-butilenoglicol também são formados durante a fermentação malolática do vinho. Estes compostos dão um aroma de nozes e manteiga, sendo desejáveis apenas em alguns vinhos, mas em pequenas quantidades. A Figura 3 mostra o esquema de formação do diacetil, acetoína e 2,3-butilenoglicol durante a fermentação malolática. O citrato sofre uma quebra e dá origem ao oxaloacetato. O oxaloacetato é descarboxilado para piruvato, o qual se complexa com coenzima tiamina pirofosfato-acetaldeído (TTP-C⁺/ ativo acetaldeído). Este complexo reage com uma outra molécula de piruvato dando origem ao α -acetolactato que sofre uma descarboxilação oxidativa e forma o diacetil. O α -acetolactato sofre uma descarboxilação e dá origem a acetoína. A acetoína também pode ser formada pela redução do diacetil para regeneração do NAD(P⁺). O 2,3 - butilenoglicol pode ser formado pela autooxidação da acetoína, reação catalisada pela enzima acetoína redutase.

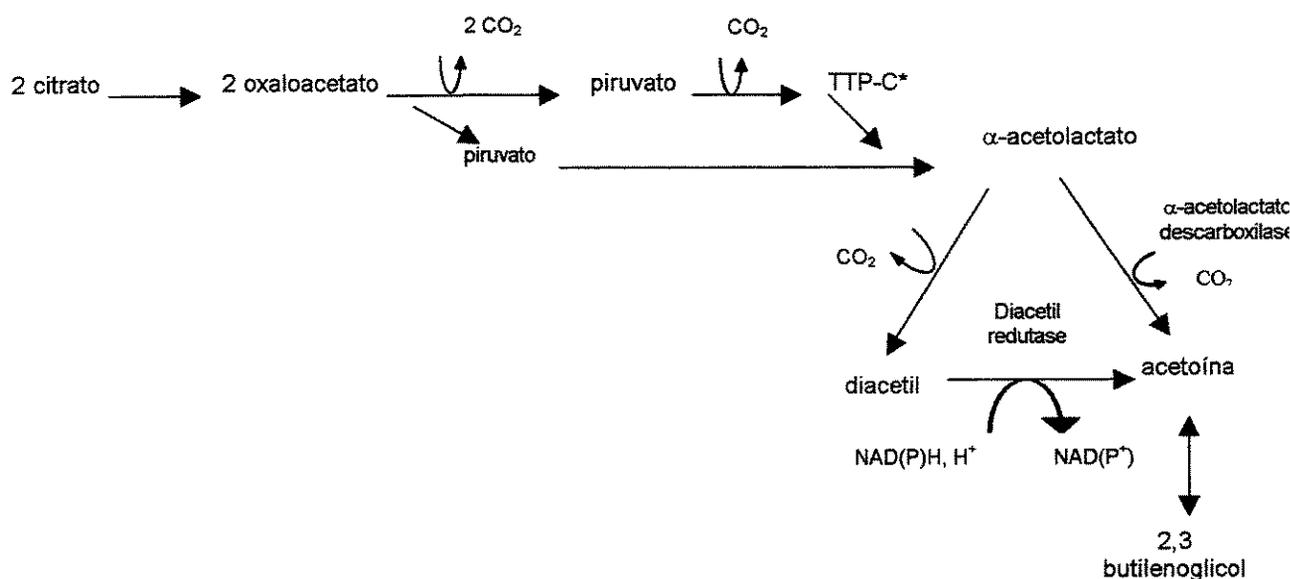


Figura 3 – Rota de formação do diacetil.

Compostos Secundários de Sabor e Aroma.

Durante a fermentação alcoólica, além de etanol, CO₂ e glicerol são formados em paralelo compostos de sabor e aroma de diferentes classes de substâncias tais como: ésteres, álcoois, ácidos, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis voláteis, terpenos, acetais, nitrilas, amidas entre outras.

A Tabela 2 mostra a quantidade de compostos de aroma no vinho e na uva. Em termos de quantidade, a classe dos ésteres, álcoois e ácidos são as que contribuem em maior número de compostos de aroma para o vinho (Matheis, 1992).

Tabela 2 – Número de compostos de sabor e aroma detectados em vinho e uvas

| Classe de substâncias | Número de compostos | |
|-----------------------|---------------------|-----|
| | Vinho branco | Uva |
| Ésteres | 178 | 132 |
| Álcoois | 97 | 72 |
| Ácidos | 78 | 44 |
| Hidrocarbonetos | 34 | 93 |
| Cetonas | 31 | 32 |
| Lactonas | 27 | 3 |
| Bases | 27 | 14 |
| Compostos de enxofre | 26 | 3 |
| Fenóis | 26 | 9 |
| Aldeídos | 21 | 40 |
| Acetais | 21 | 3 |
| Furanos | 20 | 13 |
| Nitrilas e amidas | 9 | 2 |
| Éter | 5 | 4 |
| Outros | 32 | 13 |
| Total | 632 | 477 |

Apanhado de 160 referências entre 1944 e 1986 no caso de vinho branco, e 54 referências entre 1955 e 1983 para uvas (Matheis, 1992).

- Álcoois

Os álcoois com mais de dois átomos de carbono são comumente chamados de álcoois superiores ou fúsel álcool, e têm peso molecular e ponto de ebulição mais alto que o etanol e são agradavelmente aromáticos. Estes compostos podem estar presentes nas uvas, mas raramente ocorrem a nível significativo, a não ser os hexanóis que dão um aroma herbáceo em certos vinhos. Álcoois como o 2-etil-1-hexanol, benzil álcool, 2-feniletanol, 3-octanol e 1-octeno-3-ol são originados das uvas e não sofrem mudanças durante a fermentação. O 1-octeno-3-ol também pode ser originado da infestação do *Botrytis cinerea*. Entretanto, muitos álcoois superiores encontrados no vinho são subprodutos da fermentação (Jackson, 1994).

Em termos quantitativos, os álcoois superiores mais importantes são os de cadeia linear como o 1-propanol (*n*-propil álcool), 2-metil propanol (isobutil álcool), 2-metil-1-butanol ou 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) (rota metabólica de formação Figura 2).

O 2-feniletanol é originado do metabolismo da fenilalanina, e é o álcool superior mais importante derivado de fenol (Boulton et al, 1996).

Os álcoois superiores contribuem com mais de 50 % dos constituintes do sabor e aroma do vinho. A produção destes compostos durante a fermentação é uma característica comum de todas as leveduras, mas as quantidades formadas são em fato, dependentes do gênero, espécie e linhagem, como também da quantidade de compostos nitrogenados do mosto da uva (Jackson, 1994).

A rota bioquímica de formação destes compostos pode ser pela transaminação de aminoácidos ou pela síntese de açúcares (Matheis, 1992).

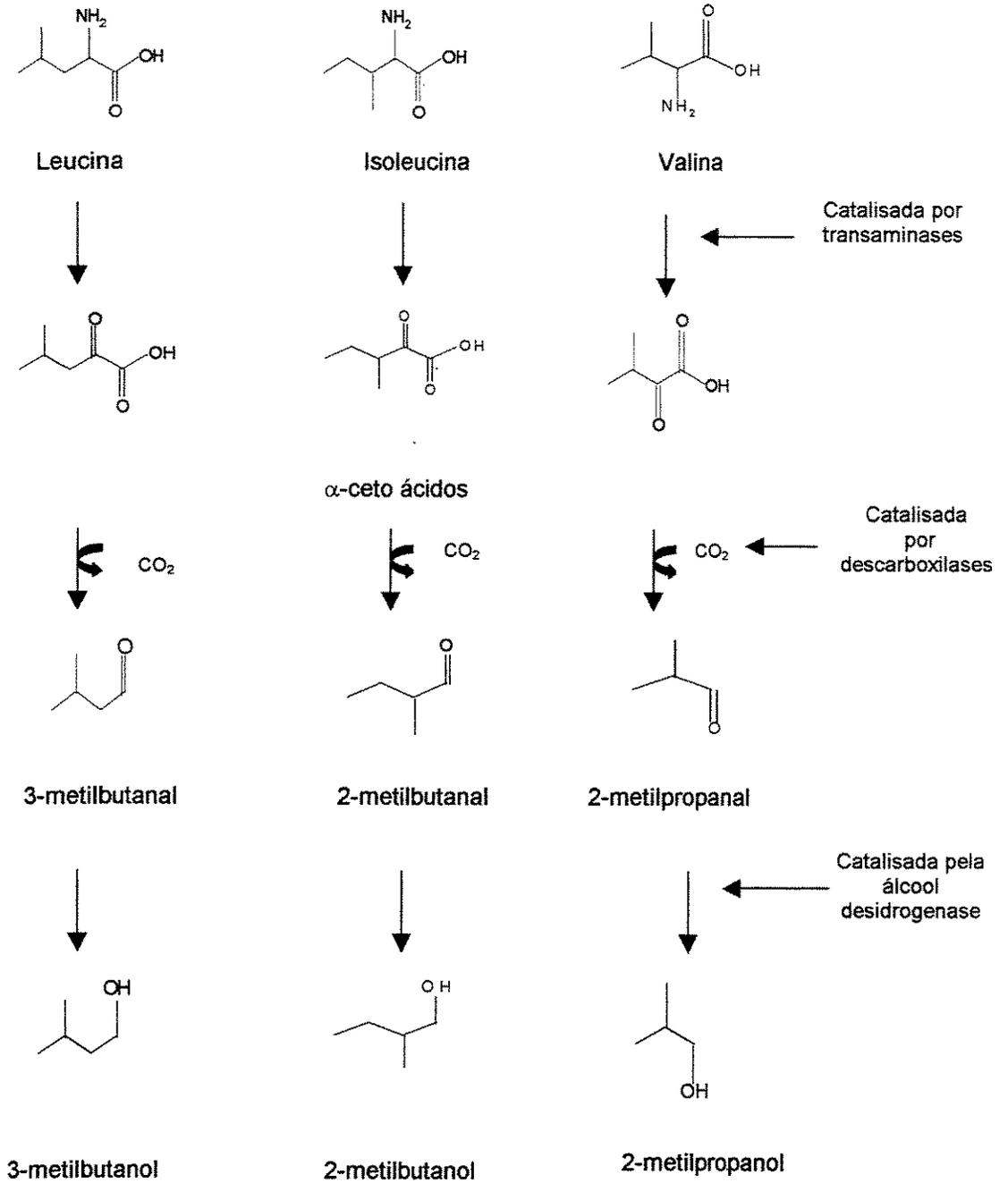


Figura 4 – Formação de álcoois superiores a partir do metabolismo de aminoácidos

Dióis e Polióis

O mais importante diol no vinho é o 2,3 – butanediol (2,3 – butileno glicol), o qual tem pouco aroma e um suave doce gosto de manteiga, tendo pouca importância sensorial.

O Polioli predominante no vinho é o glicerol. No vinho seco, ele é comumente o composto mais abundante depois da água e do etanol e tem uma grande importância sensorial em relação à viscosidade, além de ter um leve gosto doce (Jackson, 1994).

- Fenóis

Os fenóis são compostos muito importantes para a qualidade de vinhos tintos. Em vinhos brancos os fenóis também são importantes, mas ocorrem em pequenas quantidades. Estes compostos dependendo da sua quantidade no vinho podem afetar a aparência, o gosto, o aroma e atuar com agente microbiano.

A estrutura química dos fenóis é uma estrutura cíclica de benzeno com ou mais grupos hidroxilas associados diretamente a estrutura. São dois grupos distintos de fenóis que ocorrem nas uvas e vinhos, chamados de flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides são caracterizados como moléculas que possuem dois fenóis ligados por um grupo pirano (contém oxigênio). Os mais comuns nos vinhos são os flavonols, flavano-3-ols, e em vinho tinto as antocianinas. Os flavonóides podem existir na forma livre ou polimerizados com outros flavonóides, ou com açúcares, ou com não-flavonóides e ainda por combinação destes. Compostos como o benzaldeído, a vanilina, ácidos de vanilina, ácido benzóico, ácido gálico e ácido cafeico são exemplos de não-flavonóides.

Alguns fenóis voláteis ou derivados fenólicos encontrados nos vinhos são originados das uvas, da semente da uva e também do caule do cacho de uva. Um deles é a acetovanilona, o qual tem um suave aroma de vanila. O mais aromático é o metil antranilato, um éster fenólico, característico do aroma das variedades da *Vitis labrusca*.

Do metabolismo de leveduras podem ser originados alguns fenóis importantes para a composição do sabor e aroma do vinho como o tirosol. O tirosol é um fenol não-flavonóide produzido em pequenas quantidades. A fermentação e estocagem em

carvalho também dão origem a este composto. O aldeído fenólico mais notado no vinho é o benzaldeído que tem um aroma de amêndoas. Este composto pode ser originado da conservação em barril de carvalho ou por oxidação do álcool benzílico por enzimas produzidas em uvas infectadas pelo *Botrytis* ou por leveduras (Jackson, 1994).

- Aldeídos

A quantidade de aldeídos é maior na uva do que no vinho. Isto pode ser resultado da redução de aldeídos para álcoois durante a fermentação. Os mais importantes em vinho são o hexanal e o hexenal, os quais são responsáveis pelo odor herbáceo de certas variedades de uvas como a Grenach e Sauvignon Blanc. Os aldeídos podem ser formados durante o esmagamento da fruta pela ação de enzimas oxidativas sobre lipídios da uva e também durante a fermentação.

O acetaldeído é o aldeído encontrado em maior quantidade, representando 90 % dos aldeídos do vinho e é um dos primeiros subprodutos metabólicos da fermentação. Quando a fermentação está por terminar, o acetaldeído é transportado para as células das leveduras e reduzido a etanol. Assim, o conteúdo de acetaldeído no final da fermentação pode ser baixo em relação ao início da fermentação (Jackson, 1994).

- Cetonas

Poucas cetonas são detectadas em uvas, mas as presentes geralmente não sofrem alterações durante a fermentação. As mais encontradas são as noroisoprenóides cetonas como a β -damascenona, α -ionona e a β -ionona. A primeira tem aroma de rosa e é característica do aroma de várias variedades de uvas, assim como na 'Chardonnay' e 'Riesling'. A α -ionona e a β -ionona têm um aroma de violeta e framboesa, respectivamente.

As únicas cetonas formadas durante a fermentação que tem uma influência na sensorial no vinho são a diacetil (biacetil ou 2,3-butanediona) e acetoína. Em altas quantidades, estas cetonas dão um indesejável aroma de manteiga. Elas podem ser formadas por bactérias lácticas ou por leveduras (Jackson, 1994).

Eles podem ser agrupados em alifáticos ou cíclicos (fenóis). Muitos ésteres de fenóis possuem um baixo “*threshold*” de detecção, com exceção do metil antranilato encontrado em altas quantidades nas uvas, mas em baixas quantidades no vinho.

Os ésteres alifáticos podem ainda ser subdivididos em éster de ácido monocarboxílico, éster de ácido di ou tricarboxílico e éster hidroxil e oxi ácidos. Muitos são produzidos pelas leveduras e também após a estocagem por hidrólise. Dos três subgrupos apenas o primeiro tem uma importância sensorial. Os mais importantes são aqueles formados metabolicamente de etanol e ácidos como o hexanóico, octanóico e decanóico, respectivamente, dão origem aos ésteres hexanoato, octanoato e decanoato. O acetato de isoamila (composto de impacto da banana) e o acetato de benzila (composto de aroma da maçã) formados da síntese de ácido acético e álcoois superiores também são compostos de relativa importância sensorial do vinho

O etil lactato ocorre principalmente após a fermentação malolática em concentrações da ordem de 1,0 mg/L e tem pouca importância sensorial para o aroma do vinho (Jackson, 1994).

Geralmente a quantidade de ésteres produzidos pelas leveduras do gênero *Saccharomyces* é similar, embora algumas leveduras não-*Saccharomyces* possam produzir maiores quantidades do que as *Saccharomyces* (Fleet, 1994).

Fatores como temperatura de fermentação e conteúdo de nitrogênio afetam drasticamente a produção de ésteres. Temperaturas de fermentação em torno de 10 °C favorece a formação de ésteres como o acetato de isoamila, acetato de isobutila, e acetato de hexila, enquanto que temperatura em torno de 15-20 °C favorece a formação de ésteres de peso molecular maior como o etil octanoato, etil decanoato e acetato de feniletil. Temperaturas maiores que 20 °C induz a formação de éster por favorecer as reações de sua formação. A presença de ésteres durante o envelhecimento depende da temperatura pré e pós-engarrafamento como também da sua quantidade produzida durante a fermentação devido a sua baixa estabilidade. Durante a autólise das leveduras são liberados alguns ésteres de cadeia longa de acil que são importantes para o sabor e aroma do vinho espumante (Boulton, 1996).

- Terpenos

Os terpenos são compostos formados basicamente por cinco átomos de carbonos com estrutura semelhante ao isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

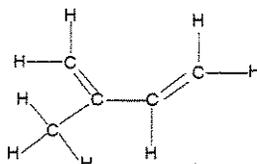


Figura 8 – Molécula de isopreno

Alguns terpenos são formados de 2, 3, 4 ou 6 unidades de isopreno. Estes são chamados de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, respectivamente. Grupos funcionais como os álcoois, as cetonas e os óxidos, podem fazer parte da estrutura dos terpenos (Boulton et al, 1996).

Alguns terpenos, assim como alguns fenóis, são encontrados ligados a uma molécula de glicose por uma ligação glicosídica, neste caso estes compostos não têm atividade sensorial, ou seja, não há percepção do sabor nem aroma. Algumas leveduras durante a fermentação como as do gênero *Hansenula* podem hidrolisar ligação glicosídica e liberar moléculas de terpenos e fenóis com atividade sensorial (Jackson, 1994).

Geralmente os terpenos são amplamente encontrados em diferentes variedades de uva e não sofrem mudanças durante a fermentação, mas podem sofrer hidrólise ou outras reações durante o envelhecimento do vinho (Schreier, 1979). O geraniol e o linalool são álcoois de monoterpenos voláteis, os quais conferem um agradável aroma floral ao vinho, sendo encontrados principalmente nas uvas da variedade 'Muscat'. O hidrocarboneto de terpeno que mais contribui para o sabor e aroma do vinho é o 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno (TDN). Este composto é obtido da degradação dos carotenóides chamados de norisoprenóides de 13 átomos de carbono. Estes são encontrados principalmente no mosto das uvas da família Riesling e em mínimas

quantidades nas uvas da família Muscat e Chardonnay. O TDN em altas quantidades não dá um bom aroma ao vinho devido ao seu odor de querosene (Boulton et al, 1996). O limoneno e o mirceno também são dois hidrocarbonetos de monoterpenos detectados em uvas e vinhos (Schreier, 1979).

- Ácidos

A acidez total do vinho é composta de ácidos voláteis e não voláteis. Em uvas os ácidos tartárico e málico constituem mais de 90 % do total de ácidos não voláteis do vinho. O ácido acético é o principal ácido volátil do vinho, em seguida vem os ácidos fórmico, butírico e o propiônico.

A fermentação alcoólica não interfere na quantidade destes ácidos, a não ser a fermentação malolática que aumenta a quantidade de ácido láctico. Outros ácidos orgânicos como o cítrico, isocítrico, fumárico e α -cetoglutarato são produzidos durante o metabolismo de açúcar, aminoácidos e ácidos graxos. Os ácidos além de darem uma sensação de sabor refrescante ao vinho, também modificam a percepção de outros sabores. Os ácidos têm a capacidade de diminuir como, por exemplo, a percepção do sabor doçura. O principal papel dos ácidos no vinho é manter o pH baixo, estabilizando as antocianinas e diminuindo a atividade microbiana. Os ácidos fenólicos são sintetizados a partir do ácido chiquímico ou obtidos também do barril de carvalho (Jackson, 1994).

Isolamento, separação e identificação dos compostos voláteis de aroma do vinho.

A adequação de técnicas analíticas de extração de compostos voláteis de vinho ainda é um desafio, pois estes compostos são bastantes sensíveis e estão sujeitos a modificações e perdas durante a extração.

Vários métodos de extração de voláteis de vinho são usados como: extração por solvente (líquido-líquido); microextração com solvente (Ortega et al, 2001); destilação-extração simultânea (Flath e Forrey, 1977); "Headspace" (Schreier et al, 1979; Frutos et al, 1988); "Dynamic Headspace" (Salinas et al, 1994; Rosillo et al, 1999); extração em fase sólida (SPE) (Edwards e Beelman, 1990; Escobal et al, 1997; Ferreira et al, 2001);

microextração em fase sólida (SPME) (Yang e Peppard, 1994; Garcia et al, 1996; Gracia et al, 1997).

A pouco tempo, a extração por solvente (líquido-líquido) foi empregada para isolar os compostos voláteis de aroma do vinho (Vlasova, 1995; Gonzáles-Viñas et al, 1996; Laminkara, 1996). Algumas desvantagens desta técnica são a grande manipulação que a amostra sofre; baixa reprodutibilidade; perdas de compostos de baixo ponto de ebulição; volume grande de solvente utilizado. Uma das vantagens é a boa extração de compostos com alto ponto de ebulição.

Ao longo dos anos várias técnicas de extração de voláteis foram aperfeiçoadas assim como a análise direta do "Headspace" ou "Static Headspace". Nesta técnica, a fase vapor, onde estão concentrados os voláteis, que está em equilíbrio com fase sólida/líquida da amostra é retirada com uma seringa e injetado diretamente no cromatógrafo. Esta técnica apresenta a vantagem de pouco manuseio com a amostra, com isso a perda de voláteis é minimizada. Os compostos de alto ponto de ebulição e em quantidades de traços (ppb-ppt) não são isolados com facilidade pela técnica "Static Headspace", neste caso é necessário um grande volume de injeção do extrato, tornando-se um procedimento incompatível com a prática cromatográfica.

Surgiu então a técnica de "Análise dinâmica do Headspace" ou "Dynamic Headspace", onde os compostos voláteis da fase vapor da amostra são retirados por um fluxo de gás. O equilíbrio que havia entre a fase vapor e a fase líquida/sólida da amostra são alteradas pelo fluxo de gás contínuo. Com o equilíbrio alterado os compostos voláteis da fase vapor vão sendo arrastados e adsorvidos em um polímero de material inerte. Nesta técnica os compostos de menor ponto de ebulição são extraídos com mais facilidade do que compostos de ponto de ebulição alto, pois quanto mais volátil for o composto menor será o seu equilíbrio com a fase líquida ou sólida.

O uso de polímeros adsorventes, ou seja, uma armadilha (Trap) para aprisionar voláteis tem sido estudada há algum tempo (Leoni et al, 1976; Brown et al, 1979; Bertoni et al, 1981).

O maior sucesso de aplicação de polímeros como adsorvente dos compostos voláteis extraídos pelo "Dynamic Headspace" foi verificada em vinho (Bertuciacioli e Viani, 1976; Noble, 1978; Garcia-Jares et al., 1999). A dessorção dos voláteis do "Trap" pode ser por eluição com solvente (Stashenko et al, 1992) ou por aquecimento do polímero,

neste caso, os compostos desorvidos vão sendo arrastados diretamente para a coluna cromatográfica e a perda de voláteis é praticamente nula (Noble et al, 1980; Salinas, et al, 1994; Rosillo, 1999). O Trap Tenax (2,6-difenil-*p*-fenilene oxido) é um ótimo adsorvente de compostos voláteis de vinho devido a sua baixa capacidade de adsorver água e etanol (Janák et al, 1974).

Várias técnicas de separação e identificação destas substâncias que compõem o sabor e aroma do vinho foram desenvolvidas e aperfeiçoadas ao longo dos tempos.

A cromatografia gasosa (CG) é a técnica mais usada para separação de compostos voláteis de aroma. A amostra é injetada manualmente ou por um injetor automático e imediatamente sofre volatilização a altas temperaturas e são introduzidos na coluna cromatográfica onde os compostos da amostra, pertencentes a diferentes classes de substâncias, vão sendo arrastados por um gás inerte (fase móvel). Cada composto tem uma afinidade pela fase estacionária (sólida ou líquida) e é isto que possibilita a separação dos compostos. A cromatografia gasosa é uma boa técnica de separação, mas é ineficiente para identificação.

A maioria das análises por cromatografia gasosa utiliza o espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo. A espectrometria de massas é uma técnica de identificação, onde cada composto volatilizado da amostra sofre uma fragmentação gerando íons que são analisados e representados pelo espectro de massas. O espectro de massas mostra as porcentagens de fragmentação características de um composto, fornecendo assim o que chamam de identidade da molécula. Muitas vezes, o espectro de massas de um composto desconhecido não é suficiente para determinar sua identidade, pois existem um grande número de compostos que apresentam espectros de massas muito similares. Neste caso é muito utilizado o índice de retenção conhecido como Kovats.

O índice de Kovats é um índice de retenção muito utilizado na identificação de compostos voláteis e pode ser usado em conjunto com a espectrometria de massas. Neste caso o tempo de retenção de um composto é comparado ao de uma mistura de alcanos saturados de diferentes números de átomos de carbono e através da fórmula abaixo se calcula o índice de retenção de um composto em questão.

$$IR = \frac{(T_{rx} - T_{rcn-1}) \times (C_n - C_{n-1}) \times 100 \times C_{n-1} \times 100}{(T_{rcn} - T_{rcn-1})}$$

IR = Índice de retenção

T_{rx} = Tempo de retenção do composto em questão

T_{rcn} = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção após T_{rx} .

T_{rcn-1} = Tempo de retenção do hidrocarboneto que possui tempo de retenção anterior T_{rx} .

C_n = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com T_{rcn} .

C_{n-1} = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com T_{rcn-1} .

3.1 - Revisão Bibliográfica:

Compostos voláteis de vinhos e uvas

Stevens et al. (1966) identificaram 60 compostos voláteis de aroma por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM) de uvas da variedade Muscat de Alexandria. O geraniol e o linalool foram os compostos detectados em maior abundância. Dos álcoois, o 1-hexanol foi o mais abundante, já o álcool isoamílico e o amílico ativo ocorreram em menor proporção. Os resultados indicaram que o linalool e o geraniol, devido à sua relativa abundância, foram os compostos que sem dúvida contribuíram para o agradável aroma das uvas Muscat.

Os compostos de aroma do vinho tinto "Rubesco", safra de 1966 e 1973, foram analisados por CG-EM. Os voláteis foram extraídos por "Dynamic Headspace" e adsorvidos em "Tenax (60-80 mesh)". Um total de 40 compostos de aroma foram isolados, mas apenas 27 foram identificados. Os álcoois em geral não foram identificados, devido à baixa retenção destes no Tenax. O caproato de etila e caprilato de etila e também o 2-(etoximetil)furano e o 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno (deidroionona), foram identificados em maiores quantidades no vinho de 1966, sendo os dois últimos considerados os compostos responsáveis pelo sabor e aroma do vinho. O primeiro deles já foi detectado em morango e pêra. Estes resultados sugerem que o processo de envelhecimento aumenta o buquê do vinho (Bertuccioli e Viani, 1976).

Shinohara et al. (1976) analisaram por cromatografia gasosa (CG) o conteúdo de álcoois superiores e acetato de etila em 571 vinhos de mesa de diferentes países. Não houve separação dos alcoóis isoamílico e amílico ativo. O acetato de etila foi o único composto que apresentou concentração maior (343 mg/l) do que seu valor de *threshold* (150 mg/L), as concentrações dos álcoois metílico, isobutílico, *n*-propílico e *n*-butílico apareceram em concentrações menores do que seu *threshold* de 500, 500, 500 e 150 mg/L, respectivamente.

Os constituintes voláteis de sete uvas foram isolados sob inibição enzimática e extraídos com pentano/cloreto de metileno (2:1). As análises por cromatografia gasosa e espectrometria de massas e cromatografia gás/líquido e espectrometria de massa levaram à identificação de 225 compostos de aroma que incluem 81 hidrocarbonetos, 48 ácidos, 31 alcoóis, 23 aldeídos, 18 cetonas, 11 ésteres e 13 compostos de estrutura mista. Todos os ácidos detectados em uvas já foram detectados em frutas ácidas, com exceção do ácido *trans*-gerânico considerado um constituinte do óleo de geraniol. Alguns ácidos livres que não são alterados pela fermentação, como os ácidos 2-etilhexanônico, *cis*-3-hexanônico, ácido fenilacético, ácido salicílico, ácido 3-fenilpropionico e ácido cinâmico foram detectados. Poucos ésteres foram identificados, provavelmente devido à inibição com metanol (Scherier, 1976).

Nelson et al. (1978) isolaram e identificaram os compostos voláteis dos vinhos Catawba: rosé preparado por fermentação do mosto em contato com a casca (RF), rosé por destilação (RD) e branco pela fermentação do mosto (B). A identificação foi feita através por cromatografia gasosa/espectrometria de massas e análise sensorial de aroma. Os voláteis foram isolados por freon 113 (1,1,2-tricloro-1,2,1-trifluoretano) e identificados um total de 21 compostos em RF e RD e 19 em B. Os ésteres do ácido acético, como o acetato de isoamila e 2-feniletil acetato, foram detectados em maior abundância em (RD). Os três vinhos foram diferenciados pelas quantidades de acetato de isoamila e de 2-feniletil acetato.

A diferença da composição aromática dos vinhos Riesling (R), Chardonnay (C) e French Colombard (F) foi realizada por cromatografia gasosa-olfatometria. Os voláteis foram extraídos por "Dynamic Headspace" adsorvidos em Tenax, analisados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Um total de 60 compostos voláteis de aroma foram identificados por EM. Apenas 27 dos 120 compostos

detectados foram utilizados para análise de componentes principais (ACP). Os dados da ACP mostram que oito compostos voláteis foram detectados em maior concentração no vinho (R) do que em (C) ou (F). Estes compostos receberam uma discriminação de aroma frutal e floral, um desses compostos poderia ser o vitispirano, o qual foi tentativamente identificado por EM. Os vinhos (C) e (F) foram caracterizados pelo intenso aroma de fruta, devido as altas concentrações de ésteres como o 3-metil butil acetato e 2-metil butil acetato (Noble, 1980).

Compostos de aroma de quatro tipos de vinho espumante rosado foram extraídos com pentano-éter (1:1) e analisados por cromatografia gás-liquido. Um total de 89 compostos de aroma foram isolados. A composição do vinho Pompadour foi a mais rica devido a diversidade de ésteres de baixo e alto peso molecular como o acetato de etila, acetato de isobutila, acetato de isoamila, caprilato de isobutila, heptanoato de isoamila, caproato de hexila, acetato de 2-feniletil, etil laurato, tetradecanoato de etila, hexanoato de etila e linoleato de etila. Nos vinhos Cabernet e Reisling foram detectados as maiores concentrações de álcoois insaturados como o linalol, geraniol, citronelol, *cis*- e *trans*-farnesol que tem um importante papel na composição do sabor e aroma cítrico e floral do vinho (Vlasova et al., 1995).

A mudança de compostos voláteis em vinhos Airen foi estudada durante a estocagem. Os compostos voláteis foram extraídos com pentano/diclorometano (60:40) e analisados por CG. Observou-se que apenas o conteúdo de ácido succínico teve um grande aumento com a estocagem. Ao contrário, foi observado para os acetais, compostos de aromas frutados e frescos, que foram diminuindo com o tempo de estocagem. Segundo estes autores, esta perda pode ter sido causada por um ambiente quente e muito iluminado (Gonzalez-Viñas et al, 1996).

A composição aromática das uvas Monastrel, Trepanillo, Cabernet Sauvignon, Dyer Grenach, Airén, Chardonnay e Ugni Blanc, bem como a sua diferenciação foi estudada através da extração dos seus constituintes voláteis pela técnica do "Dynamic Headspace". Os compostos voláteis adsorvidos em Tenax sofreram desorção térmica e foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas e quantificados pelo método da padronização externa. As análises de Cluster aplicadas aos voláteis diferenciaram as uvas em três grupos: 1) uvas brancas; 2) Monastrell, tempranillo e Cabernet sauvignon; 3) Dyer Grenach. O acetato de hexila, álcool benzílico, feniletil

álcool e benzaldeído foram os quatro compostos voláteis usados como variáveis discriminantes para diferenciação das uvas. O feniletil álcool foi detectado em maior abundância em Grenach ($1635.38\mu\text{g/L}$), nas variedades brancas a maior concentração foi detectada na Chardonnay ($175.11\mu\text{g/L}$). O acetato de hexila foi o éster detectado em maior concentração ($12.01\mu\text{g/L}$) em Monastrell, não tendo sido detectado nas variedades Chardonnay, Airén e Trempanillo (Rosillo et al, 1999).

Dois vinhos tintos de marca desconhecida, um novo (N) e um de seis meses (N_2), dois vinhos burgand, um novo (B) e um de seis meses (B_2), e dois vinhos caseiros, um de 30 anos (C) e outro de 2 anos (C_2) foram usados para estudar os compostos de sabor e aroma através de CG-EM após a extração feita com "Tenax TA". Compostos de sabor e aroma como o acetato, butirato, caproato e caprilato de etila foram identificados em todos os vinhos. O butirato de isopropila e 3-metil etil butirato foram detectados em (B), (B_2), (C) e (C_2). Em (B) e (B_2) e não houve mudanças quanto à sua quantidade; entretanto, o acetal foi detectado tanto em (N_2) quanto em (B_2). Segundo estes autores, este resultado pode ter sido devido às reações de catálise ácida que ocorreram após a abertura da garrafa, uma vez que o pH medido em (N_2) e (B_2) estavam bem baixo. A presença do tolueno em (N_2) pode ser resultado dos processos de fabricação ou podem ainda ocorrer naturalmente; altas concentrações de acetato de etila e também a presença de etileno glicol dietil éter em (C) e (C_2) podem indicar um vinho de sabor e aroma mais rico do que os outros vinhos (Overton e Manura, 1999).

Processo Fermentativo

Mostos de uvas Aurora fermentados sem material insolúvel (A) e com materiais insolúveis (B) foram inoculados com *Sacharomyces cerevisiae* (S₁) e *Leuconostoc oenos* (L₁), a fim de se estudar a interação de (S₁) e (L₁) e a produção de ácido decanóico. Os vinhos feitos com (A) apresentaram os maiores níveis de ácido decanóico (5 mg/L) e também de crescimento de (L₁). Provavelmente este resultado pode ter sido devido a baixa disponibilidade de oxigênio no mosto. A baixa produção deste ácido em (B) pode ser resultado da adsorção destes ácidos nos materiais insolúveis (Edwards et al, 1990).

Mateo et al. (1991) estudaram a participação de diferentes leveduras isoladas e identificadas na formação de aroma no mosto de uvas monastrelli. Após 7 dias de fermentação de cada espécie isolada, os voláteis foram extraídos com pentano/diclorometano (3:2) e identificados através do tempo de retenção de padrões conhecidos. Os álcoois superiores foram produzidos em maior escala e exclusivamente por *Hanseniospora uvarum* e *Kloeckera apiculata*, 340 mg/L e 584 mg/L, respectivamente, embora estas produziram as menores quantidades de etil acetato. Do gênero *Saccharomyces* a linhagem *cerevisiae* var. *chevalieri* produziu a maior quantidade de compostos de aroma (1520 mg/L) entre álcoois superiores, acetatos e ésteres.

A combinação de cinco linhagens de leveduras próprias para produção de champanha com quatro linhagens de bactérias ácidos lácticas no mosto de Chardonnay foi realizada para investigar a formação de voláteis durante a fermentação, os quais foram analisados por cromatografia gás-líquida e cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Os dados mostraram que no controle, ou seja, no mosto sem bactéria foi produzido 51 mg/L de isobutiraldeído comparado com 26 mg/L no mosto com bactéria, enquanto para o isobutanol foi observado o contrário, 17,4 mg/L no controle e 48 mg /L na presença de bactéria. Estes resultados sugeriram a redução do isobutilaldeído para isobutanol pela fermentação malolática. Outra observação foi de que o isobutil acetato desapareceu no mosto com bactéria, podendo provavelmente ter sido resultado de uma hidrólise para isobutanol ou outro acetato. Os dados de CG-EM mostraram que após a FM oito compostos de aroma frutado, como etil hexanoato e hexil acetato foram identificados (Avedovech et al, 1992).

Stashenko et al. (1992) utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* no mosto de uva Thompson para investigar a formação de voláteis durante 40 dias de fermentação. Os compostos de aroma foram extraídos por “Dynamic Headspace” e identificados por CG-EM. A eluição dos compostos do “Trap” foi por solvente (diclorometano). A composição dos voláteis em 40 dias de fermentação foi 47 % de álcoois, sendo 33,4 % de 1-pentanol; 37 % de acetais e 13 % de etil ésteres de cadeia longa, assim como os ácidos hexanóico, octanóico e decanóico com 3,19 %, 7,12 % e 1,32 %, respectivamente. A concentração de acetato e etil ésteres cresceu apenas nos três primeiros dias, após este período houve declínio na produção destes ésteres.

Pastore et al. (1994) estudaram a formação de aroma de fruta pelo *Geotrichum* sp isolado de mamão papaia. A linhagem *Geotrichum* sp foi escolhida por uma análise sensorial direta como melhor produtora de aroma de frutas, dentre outros diferentes microrganismos produtores de aroma. A linhagem foi fermentada a 30 °C por cinco dias em três diferentes meios de cultura. Os compostos voláteis foram extraídos por “Dynamic Headspace”, utilizando como material adsorvente o “Tenax”, separadas por cromatografia gasosa (CG) e identificados por espectrometria de massas. Um total de 22 compostos foram isolados, sendo identificados etil isovalerato, etil hexanoato, etil butirato, acetato de etila, propionato de etila, 2-propanol, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-butanol. No meio (G) o qual continha 5 % de glicose e 40 mL de autolisado de levedura e no meio preparado com extrato de malte e ágar foram observados as maiores produções de etil isovalerato e etil hexanoato, compostos que conferem um agradável aroma de fruta como maçã e morango.

A produção de acetaldeído por 86 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foi investigada em meio sintético e em oito diferentes mostos de uva em temperaturas de 12 °C, 18 °C, 24 °C e 30 °C. A maior produção de acetaldeído ocorreu nos mostos de uvas por apenas duas linhagens. A produção foi de aproximadamente 60 mg/L. A temperatura de fermentação onde se observou a maior produção de acetaldeído foi a 30 °C. Provavelmente a maior produção de acetaldeído a 30 °C é devido ao efeito inibitório da temperatura na atividade da álcool desidrogenase, enzima que reduz o acetaldeído a etanol (Romano et al., 1994).

A influência de linhagens de *Saccharomyces* (Tsimlyanskaya, M-1 e Sapevari-2) na formação de compostos de aroma em vinho espumante rosé foi investigada por

cromatografia gás-líquido. A análise dos compostos foi feita através de CLG. A linhagem M-1 foi a que mais produziu compostos de aroma como o linalool (0.2 mg/L), α -terpineol (1.30 mg/L), geraniol (0.55 mg/L), β -feniletanol (74.48 mg/L) e tirosol (13.0 mg/L) (Abromov et al, 1995).

A formação de compostos de sabor e aroma do vinho Muscadine foi analisada durante 44 semanas de fermentação. Extraídos com pentano/diclorometano (7:3), 14 compostos voláteis, entre ácidos, ésteres e hidrocarbonetos foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. O feniletil álcool não foi detectado nas uvas previamente esmagadas, mas somente a partir do quinto dia da fermentação até o final da fermentação do mosto com a casca. Sua presença e continuidade crescente no processo fermentativo provavelmente são resultados da sua biossíntese na casca com liberação para o mosto. Os ésteres só foram detectados no sétimo dia de fermentação, com destaque para o ácido butanodióico éster. O teor de metil benzaldeído diminuiu com o envelhecimento, provavelmente devido às reações de hidrólise com conseqüente formação de derivados que não foram identificados. A perda de compostos como o etil benzeno, etil metil benzeno e propil benzeno pode indicar o papel destes como intermediários na formação de feniletil álcool. O forte aroma do Muscadine foi condicionado ao alto conteúdo de fenietil álcool e ao éster do ácido butanodióico formado durante o processamento (Lamikanra et al, 1996).

Lema et al (1996) estudaram a contribuição de linhagens de *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* na composição do aroma do vinho Albariño. A fermentação foi realizada nos mostos "O Condado" (M) e "O Rosal" (E). As análises de componentes principais (ACP) das amostras fermentadas em conjunto com a análise *cluster* dos voláteis detectados por cromatografia gasosa, mostraram que a inoculação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces cerevisiae*, sendo a primeira predominante, produziram nos primeiros dias de fermentação a maior parte dos compostos de aroma que garantem a boa qualidade do vinho Albariño.

Produção de aroma no mosto da uva Palomino para produção de vinho "Fino Sherry" foi investigada em diferentes sistemas industriais. Sistema (A) mosto fermentado com sólidos não decantados, (B) mosto fermentado decantado e (C) mosto fermentado decantado e filtrado. No sistema (A) foi detectado a maior concentração de acetaldeído (163 mg/L) e álcool isoamílico (236 mg/L) do que em (B) ou (C). As linhagens de

Saccharomyces cerevisiae (beticus) e *Saccharomyces cerevisiae (cheresiensis)* foram as que reduziram a maior quantidade de acidez volátil do mosto em comparação com a *Saccharomyces cerevisiae (montuliensis)*. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae (montuliensis)* produziu as maiores quantidades de acetaldeído, composto de impacto do vinho “Fino Sherry” (Martinez et al, 1998).

O uso combinado de *Candida stellata* imobilizada e *Saccharomyces cerevisiae* foi estudado para melhorar a qualidade do vinho. No mosto Pinot grigio com concentração de açúcar igual 27 % (m/v) e pH 3,1 foi inoculado com *Candida stellata* imobilizada e *Saccharomyces cerevisiae* em 5 modalidades diferentes: (1) apenas *Saccharomyces cerevisiae*; (2) *Candida stellata* imobilizada; (3) associação simultânea de *Candida stellata* imobilizada e *Saccharomyces cerevisiae*; (4) fermentação seqüencial com *Candida stellata* imobilizada com adição de *Saccharomyces cerevisiae* após três dias de fermentação; (5) fermentação parcial com *Candida stellata* imobilizada substituída por *Saccharomyces cerevisiae* após três dias de fermentação. Os dados obtidos mostraram que foi possível observar uma redução da concentração ácido acético e álcoois superiores e um aumento da produção de ácido succínico na modalidade de fermentação (4) e (5) em comparação a modalidade (1). Na modalidade (2) foi observada baixa produção de compostos voláteis como o acetato de isoamila, caproato de etila, caprilato de etila, caproato de etila, álcoois superiores e álcool fenil etílico. O excesso de acetaldeído produzido na modalidade (2) não foi observado nas outras modalidades, provavelmente devido à baixa atividade da enzima álcool desidrogenase da *Candida stellata*. Na modalidade (2) foi observado também uma alta concentração de acetoína (60,3 mg/mL), composto que contribui para “off-flavor”, enquanto que nas outras modalidades a concentração foi 5 vezes menor. Assim a combinação de *Candida stellata* imobilizada e *Saccharomyces cerevisiae* pode ser usada para aumentar a qualidade do vinho (Ciani et al, 1998).

As mudanças microbiológicas durante a fermentação de uvas brancas das variedades Alvarinho e Loureiro foram analisadas durante 24 semanas. A identificação das leveduras foi feita pelo mini API/ID 32 °C. As leveduras identificadas, aproximadamente 25 espécies, pertencem ao gênero *Torulaspota (T)*, *Debaryomyces (Deb.)*, *Rhodotorula (R.)*, *Saccharomyces (Sac.)*, *Kloeckera (K.)*, *Leucosporidium (L.)*, *Zygosaccharomyces (Zyg.)* e *Dekkera (Dek.)*. As grandes alterações microbiológicas

aconteceram durante as três primeiras semanas de fermentação. A temperatura de 20 °C foi a que mais favoreceu o crescimento tanto de leveduras quanto de bactérias ácido lácticas. A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* no início da fermentação não mostrou dominância. Somente após a terceira semana esta linhagem se desenvolveu e passou a ser a espécie dominante da fermentação superando o crescimento de leveduras de outros gêneros. As bactérias do gênero *Lactobacillus* foram as dominantes durante a fermentação (Pina e Hogg, 1999).

O efeito da fermentação malolática na composição dos voláteis dos vinhos tintos foi estudada pela inoculação com *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus* sp. Os compostos voláteis foram extraídos com diclorometanopentano (40:60), separados e identificados por CG. A maior concentração de isoamil álcool foi verificada pela linhagem da espécie *Oenococcus oeni* e a concentração de etil lactato foi máxima na espécie *Lactobacillus* sp. Um aumento diferenciado de γ -butirolactona foi verificado em toda as linhagens, isto pode ser explicado pelas características individuais de cada linha de microrganismo (Maicas et al., 1999).

Nielsen et al. (1999) também estudaram o efeito da fermentação malolática no desenvolvimento do sabor e aroma. Os compostos voláteis foram isolados "Dynamic Headspace" e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. A amostra utilizada foi mosto da uva Chardonnay, o qual sofreu a inoculação de *Oenococcus oeni* em condições semiaeróbias (S) ou anaeróbias (A). Esta bactéria durante o seu crescimento em condições (S) metabolizou o ácido cítrico a ácido α -acetolático, o qual foi degradado a acetoína que foi reduzida a 2,3-butanodiol. Em condições (A) a concentração de diacetil (produzido pela descarboxilação do α -acetolático) aumentou 11 mg/L, enquanto que a concentração de acetoína diminuiu 8 mg/L. Com adição de ácido cítrico sob condição (S) a concentração de diacetil chegou a 29 mg/L, duas vezes mais do que sem a adição de ácido cítrico, já nas condições (A) a adição de ácido cítrico chegou a 20 mg/L. A atividade microbiológica foi afetada pelo SO₂ produzido pelas leveduras, interferindo na concentração de diacetil.

A avaliação da formação de voláteis e características sensoriais na produção de vinho usando diferentes espécies comerciais de leveduras do gênero *Saccharomyces* foi estudada no mosto sem adição de leveduras e no mosto com adição de leveduras. Os vinhos foram avaliados por 12 provadores treinados e os resultados interpretados pela

análise componente principal (ACP). As amostras de mosto inoculadas com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* var *uvarum* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram as maiores quantidades de acetaldeído 243 e 94 mg/L, respectivamente. Estas amostras apresentaram um sabor refrescante e cítrico, parecido com fruta verde e um aroma semelhante ao de maçã. Estes resultados foram salientados e confirmados pela ACP. Os mostos fermentados com *Saccharomyces cerevisiae* var *bayanus* e *Saccharomyces wild biota* apresentaram uma alta concentração de 1-propanol, metanol e álcool isoamílico (Iranzo et al, 2000).

Vinhos Brasileiros

Rizzon et al. (1994) investigou a composição química de 22 amostras de vinho espumante brasileiro pertencentes a 10 vinícolas (RG) e compararam os resultados aos padrões estabelecidos pela legislação. Os dados mostraram que 3 vinhos espumantes “brut” apresentaram alterações na concentração de açúcar, 6 vinhos apresentaram graduação alcoólica inferior à exigida.

Benassi et al. (1998) utilizou a análise sensorial descritiva de perfil livre para caracterizar termos como aparência, sabor e odor de 7 vinhos brancos de varietal Riesling Itália. Os vinhos foram separados com base em atributos de sabor (doce, frutado, ácido, “adstringente” e alcoólico) e um atributo de aparência (cor amarela).

Behrens et al. (1999) avaliaram vinhos brancos varietais através de testes sensoriais afetivos de preferência e aceitação. O trabalho foi realizado por provadores com hábito de consumo de vinho branco. Os resultados mostraram que 86 % dos consumidores preferiram os vinhos brancos suaves e apenas 14 % indicaram sua preferência por vinhos brancos secos ou demi-sec. Em 2000 este mesmo autor, estudou o perfil sensorial dos mesmos vinhos varietais através da análise descritiva quantitativa. Os resultados indicaram moderada variação entre os perfis sensoriais das amostras dos varietais Gewurztraminer e Riesling e pouca variação entre os perfis sensoriais dos vinhos Charonnay. As amostras foram separadas em 2 grupos: um grupo caracterizado por vinhos com maior intensidade de doçura, sabor e aroma frutado e corpo, no outro

grupo ficaram os vinhos de maior acidez, adstringência, amargor, sabor alcoólico e sabor fermentado.

4 - OBJETIVOS:

Este trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- 1) Isolar microrganismos da região do Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves (RG).
- 2) Selecionar microrganismos que durante a fermentação em meio sintético produzam aroma de fruta, detectável pela análise sensorial direta descritiva.
- 3) Identificar os microrganismos produtores de aroma de frutas.
- 4) Estudar a composição de voláteis produzidos pelos microrganismos selecionadas nos mostos de uvas Chardonnay e Pinot Noir.
- 5) Avaliar o grau de aceitação sensorial amostras de mosto fermentado a 15 °C em relação aos voláteis de aroma produzidos.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1) Isolamento, seleção e caracterização de microrganismos produtores de aroma de frutas.

5.1.1. Coleta de amostras

Os microrganismos foram isolados de folhas, cascas, solo, uva e mosto de uva (fruta prensada) de parreirais do Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves (RG).

5.1.2. Preparo de meio sintético para produção de aroma de frutas.

A produção de aroma de fruta foi obtida após a incubação de inóculo contendo 10^7 células/mL em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL do meio composto por: 17 mL de autolisado de levedura, 8 mL de água e 5 % de glicose (Pastore et al, 1994); a 30 °C a 100 rpm, durante 72 horas. A cada 24 horas de incubação, a amostra fermentada foi filtrada em membrana 0,22 μ m (Millipore), o sobrenadante foi recolhido e seu pH determinado. O peso da massa celular seca (MCS) foi quantitativamente determinado, através de secagem a 100 °C, por 24 horas. A massa celular seca é a quantidade (mg/L) de células obtidas das três fases de crescimento, ou seja, fase inicial, fase log ou exponencial e fase estacionária.

O autolisado de levedura foi preparado pesando-se 150 gramas de fermento biológico adicionados a 2 litros de água destilada e aquecidos a 80-85 °C por 1 hora. Após o resfriamento, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, a 0 °C, o sobrenadante foi denominado de autolisado de levedura.

5.1.3. Avaliação sensorial preliminar da produção de aroma de fruta em meio sintético.

As amostras fermentadas foram avaliadas sensorialmente por uma equipe não treinada de 10 provadores, os quais avaliaram 10 amostras de cada vez. Os provadores foram capazes de avaliar o aroma predominante em cada amostra e sua intensidade, e

tiveram liberdade para descrever a nota percebida. A ficha de aplicação do teste está descrita abaixo.

Ficha de aplicação:

| | | | | | | | | | |
|--|---|-------|-------|----------|--------------|-------------|---|-------------|--|
| Nome:- _____ | | | | | Data:- _____ | | | | |
| Indique qual aroma predomina em cada amostra. Verifique uma amostra de cada vez da esquerda para direita indicando a intensidade do aroma. | | | | | | | | | |
| Intensidade do aroma: | | | | | | | | | |
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| nenhum | | fraco | | moderado | | forte | | muito forte | |
| Amostra | | | Aroma | | | Intensidade | | | |
| _____ | | | _____ | | | _____ | | | |
| _____ | | | _____ | | | _____ | | | |
| _____ | | | _____ | | | _____ | | | |
| _____ | | | _____ | | | _____ | | | |

5.1.4. Identificação dos microrganismos produtores de aroma de frutas.

As leveduras foram identificadas pelo sistema de identificação **ID 32 C** (Biomeriux). A galeria **ID 32 C** é padronizada para identificação de leveduras que utiliza mini testes de assimilação padronizados e uma base de dados especialmente adaptada. A interpretação da leitura da galeria **ID 32 C** foi realizada pelo modo automático **mini API** (Biomeriux).

As leveduras antes da análise foram incubadas em meio sólido "Sabouraud" por 24 horas. Várias colônias idênticas no meio de cultura foram suspensas em água desmineralizada até atingir a opacidade equivalente a escala 2 de McFarland. Dessa suspensão de levedura foi transferido 250 µL para uma ampola de 7 mL contendo: sulfato de amônio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, fosfato dibásico de sódio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, histidina, triptofano,

metionina, gelose, solução de vitaminas, solução de oligo-elementos, água desmineralizada, pH:6,4-6,8. Um volume de 135 μ L foi inoculado em cada cúpula da galeria **ID 32 C**. A galeria foi colocada em bandeja umidificada com água estéril e levada à incubação por 24 e 48 horas em estufa a 30 °C. Após a incubação foi feita a leitura da galeria **ID 32 C** no sistema **mini API**.

A linhagem *Pichia membranaefaciens* faz parte da coleção de leveduras do Laboratório de Bioaromas e foi identificada de acordo com Kreger Van-Rij (1984) e Barnett et al. (1990).

5.2. Avaliação dos compostos de aroma formados na fermentação de mosto de uva.

5.2.1. Mostos utilizados para fermentação

Os mostos de uva Chardonnay (C) e Pinot Poir (P) oriundos da região do Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves (RG) foram fornecidos pela indústria de vinhos espumantes Chandon do Brasil. Estes dois mostos foram utilizados para estudar a formação de aroma de fruta semelhante ao aroma de vinho espumante pelas leveduras selecionadas e identificadas.

5.2.2. Características físico-químicas dos mostos fornecidos pela indústria.

•**Densidade:** a densidade (g/dm^3) foi medida pelo densímetro Mustimetre Dujardin-Salleron (385200)

•**Álcool:** a porcentagem de álcool provável foi obtida pelo densímetro Mustimetre Dujardin-Salleron (385200)

•**Açúcar:** a concentração de açúcar (g/L) foi obtida pelo densímetro Mustimetre Dujardin-Salleron (385200).

Através da densidade foi obtido os valores de açúcar (g/L) e de álcool provável pelas tabelas de relação entre densidade, álcool e açúcar.

•**Acidez volátil:** a acidez volátil foi feita no destilador Gilbertini (Distillatore Eletrônico Enochimic). No borbulhador do destilador colocou-se 20 mL de mosto, o

destilado foi recuperado em Erlenmeyer de 250 mL e titulado com NaOH (10 N) e 3 gotas de fenolftaleína (1 %). Após a viragem da cor rosa adicionou-se 4 gotas de ácido sulfúrico 3 N e 2 mL de amido (2 %) e titulou-se com iodo até viragem da cor azul. O cálculo foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$N'' - N' = X$$

$$X - \text{Vol. Gasto (NaOH)} = Y$$

$$Y \times 0,3 = Z \text{ g/L de ácido acético}$$

Onde: N'' é a segunda titulação

N' é a primeira titulação

•**Acidez total:** em um béquer foi colocado 5 mL de mosto e 3 gotas de azul de bromotimol e titulou-se com NaOH (10 N) até a viragem da cor verde-azulado. Um padrão de 10 mL de NaOH (10 N) + 3 gotas de azul de bromotimol foi titulado com ácido sulfúrico (10 N) até a viragem da cor verde-azulado. O volume gasto de NaOH é igual acidez total em g/L de ácido sulfúrico.

•**SO₂ livre e total:** o SO₂ livre e total foi calculado pela adaptação de Ribereau e Peynaud (1958). Em um Erlenmeyer foi colocado 50 mL de mosto, 2 mL de ácido sulfúrico (3N) e 2 mL de amido, e titulou-se com iodo. O volume gasto de iodo é igual ao SO₂ livre. O SO₂ combinado foi obtido ao adicionar-se 10 mL de NaOH (2,5 N) ao SO₂ livre. Após 6 minutos adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ (3 N) e titulou-se com iodo, o volume gasto é igual ao SO₂ combinado. SO₂ total = SO₂ livre + combinado.

•**pH:** a leitura de pH foi realizada em um pH-metro (Mettler Toledo 320- Tecnal)

5.2.3. Fermentação do mosto Chardonnay e Pinot Noir

A fermentação com produção de aroma foi verificada após a incubação do inóculo contendo de 10^7 células/mL de quatro linhagens em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de mosto a 15 e 20 °C a 100 rpm por 7 dias. A cada 24 horas de incubação, os meios de cultura foram filtrados em membrana Millipore 0,22 µm, o sobrenadante foi recolhido e seu pH determinado. O peso da massa seca foi quantitativamente determinado, através de secagem a 100 °C, por 24 horas.

5.2.4. Preparo da amostra para análise no cromatógrafo gasoso

Os sobrenadantes dos mostos fermentados foram acondicionados em frasco de vidro, lacrados com septo de borracha e tampa de alumínio. Os frascos contendo as amostras foram armazenados em freezer a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, até análise cromatográfica.

5.2.4.1. Condições de extração dos compostos voláteis.

Foram utilizados dois tipos de extração dos compostos voláteis das amostras de mosto fermentado: extração por solvente e extração por “Dynamic Headspace”.

5.2.4.1.1. Extração por solvente (líquido-líquido).

Os compostos voláteis presentes no sobrenadante foram extraídos com 5 g de NaCl e 6 mL da mistura de éter etílico/hexano (1:1), em três extrações consecutivas de 2 mL em funil de separação. Na fase orgânica recolhida foi adicionado Na_2SO_4 para secagem da amostra (Bertrand, 1981).

5.2.4.1.2. Extração por “Dynamic Headspace”

Os compostos voláteis presentes no sobrenadante extraídos pela técnica de “Dynamic Headspace” seguiram as condições de extração descrita na Tabela 3. Da amostra filtrada (sobrenadante) foi retirado uma alíquota de 2 mL e injetado no frasco em forma de U. O sistema de extração utilizado foi o “Purge & Trap Concentrador/Dynamic Headspace” (G1900-60500).

Tabela 3 - Condições de extração dos voláteis por "Purge and Trap Concentrador/Dynamic Headspace".

| | |
|---|--------------|
| Tempo de pré-aquecimento da amostra | 3 minutos |
| Temperatura da amostra | 50 °C |
| Tempo de purga | 15 minutos |
| Temperatura do Trap na purga | 30 °C |
| Fluxo de gás de purga(Hélio) | 30 mL/minuto |
| Pré-aquecimento de desorção | 185 °C |
| Temperatura de desorção | 225 °C |
| Tempo de desorção | 3 minutos |
| Fluxo de gás de arraste na desorção (Hélio) | 1 mL/minuto |
| "Bake Time" | 10 minutos |
| "Bake Temp" | 230 °C |
| Temperatura da linha de transferência | 200 °C |

5.2.5. Condições Cromatográficas.

5.2.5.1. Condições cromatográficas para análise dos compostos voláteis isolados pela extração por solvente (líquido-líquido).

Os compostos voláteis foram separados em uma coluna capilar HP-INNOWAX (Crosslinked Polyethylene Glycol) de dimensão 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm acoplada ao cromatógrafo gasoso Chrompack CP 9001, com detector de ionização de chama (FID).

| Injetor | Programação da temperatura | Detector |
|--|----------------------------|--|
| Temperatura: 200 °C Tipo de Injeção: Splitless Gás de arraste: -Hélio -Pressão: 70 kPa Volume de injeção: 1 µL | | Temperature: 250 °C Gases: -Nitrogênio -Ar sintético -Hidrogênio |

A identificação dos compostos voláteis foi realizada no cromatógrafo gasoso Shimadzu 17 A, acoplado ao de espectrometro de massas (EM) QP 5000 e também pelo índice de retenção definido por Kovats (Van Den Dool e Kratz, 1963).

Os compostos voláteis identificados tiveram sua identidade confirmada calculando-se o índice de retenção em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (FID). Uma mistura de hidrocarbonetos (C_6 - C_{18}) foi adicionada as amostras e também, separadamente, a uma mistura de padrões autênticos.

5.2.5.2. Condições cromatográficas para análise dos compostos voláteis isolados pelo "Dynamic Headspace"

Os compostos voláteis foram separados em uma coluna capilar HP-INNOWAX (Crosslinked Polyethylene Glycol) de dimensão 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m acoplada cromatógrafo gasoso HP-G 1908-60500, com detector de ionização de chama (FID).

| Injetor | Programação da temperatura | Detector |
|--|----------------------------|--|
| Temperatura: 200 °C Tipo de Injeção: "on column" Gás de arraste: -Hélio -Pressão: 50 Psi Volume de injeção: 2 mL | | Temperatura: 250 °C Gases: -Nitrogênio -Ar sintético -Hidrogênio |

A quantificação dos compostos foi feita por padronização externa relacionando as áreas obtidas às curvas de calibração de padrões autênticos (Salinas et al, 1994; Rosillo et al, 1999).

A identificação foi realizada da mesma forma que no item 5.2.5.1.

5. 3 - Avaliação sensorial

5.3.1. Análise de Aceitação do mosto fermentado

Estudos da aceitação das amostras de mosto fermentado a 15 °C (temperatura próxima da fermentação de produção industrial de vinho espumante) foram realizados em relação ao aroma. As amostras foram servidas aos provadores através de apresentação monádica em cálices formato tulipa opaca, e codificados. Os cálices foram cobertos com vidro de relógio, que foram retirados no momento do teste, para análise do aroma.

As análises foram realizadas por uma equipe composta por 25 provadores representativos do público alvo, utilizando escala hedônica não estruturada de nove centímetros, quatro amostras foram analisadas por dia (Stone e Sidel, 1993).

Na mesma ficha de análise os provadores registraram para cada amostra suas intenções de compra para um produto com o aroma avaliado, em escala de atitude de cinco pontos (Meilgaard et al., 1987). A ficha de aplicação do teste está descrita a seguir.

Ficha de aplicação:

| | |
|--|-------------------|
| Nome: _____ | Data: _____ |
| Amostra: _____ | |
| Por favor, sinta o aroma deste vinho espumante e marque na escala abaixo o que achou: | |
| ----- | ----- |
| Desgostei muitíssimo | Gostei muitíssimo |
| Comentários: _____ | |
| Com base em sua opinião exclusivamente em relação ao aroma , se este vinho estivesse a venda: | |
| <input type="checkbox"/> eu certamente compraria | |
| <input type="checkbox"/> eu provavelmente compraria | |
| <input type="checkbox"/> tenho dúvida se compraria ou não | |
| <input type="checkbox"/> eu provavelmente não compraria | |
| <input type="checkbox"/> eu certamente não compraria | |
| Justifique: _____ | |

Análise estatística dos resultados

Os resultados da análise de aceitação foram avaliados por análise estatística univariada (análise de variância – ANOVA) e testes de médias de Tukey. Análises de histogramas da frequência de distribuição das notas dadas em relação à escala hedônica e de atitude de compra também foram realizadas.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Isolamento, seleção e caracterização de microrganismos produtores de aroma de fruta.

Isolamento e seleção

De folhas, mosto de uva, bago de uva e casca da parreira foram isolados aproximadamente 200 microrganismos sendo na maioria leveduras e bactérias. Estes 200 microrganismos foram submetidos à investigação da produção de aroma de fruta no meio sintético como descrito em Material e Métodos item 5.1.2. A análise sensorial direta deste meio sintético realizado por provadores não treinados selecionou apenas três leveduras de um total de 200 microrganismos. As leveduras escolhidas produziram aroma de fruta numa intensidade maior que 4 de acordo com a ficha de aplicação descrita no Material e Métodos item 5.1.3. A descrição e a intensidade do aroma produzido por estas leveduras no meio sintético está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Características do aroma e sua intensidade.

| Leveduras | 1 | 2 | 3 |
|-------------|--------------------------------------|------------------|----------------|
| aroma | Maçã-verde Adstringente Frutal | Frutal Banana | Frutal doce |
| Intensidade | 4 | 6 | 5 |

Média de 4 provadores

Identificação

As três leveduras da Tabela 4, produtoras de aroma, foram identificadas através do kit de identificação ID 32 C/mini API como: 1) a levedura *Saccharomyces cerevisiae*; 2) a levedura *Candida valida* e 3) a levedura *Kloeckera apiculata*. Os testes bioquímicos que caracterizaram as leveduras estão descritos na Tabela 5. O sinal (+) indica teste positivo e o sinal (-) indica teste negativo.

Tabela 5 – Resultados dos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*(1), *Candida valida* (2) e *Kloeckera apiculata* (3).

| Fontes de carbono e nitrogênio | Resultados | | |
|--------------------------------|------------|---|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| Galactose | - | - | - |
| Actidiona | - | - | + |
| Sacarose | + | - | - |
| N-acetil-glucosamina | - | - | - |
| DL-lactato | - | - | - |
| L-Arabinose | - | - | - |
| Celiobiose | - | - | + |
| Rafinose | + | - | - |
| Maltose | + | - | - |
| Trealose | - | - | - |
| 2-ceto-gluconato | - | - | - |
| α -metil-D-glucosideo | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - |
| D-Xilose | - | - | - |
| Ribose | - | - | - |
| Glicerol | - | + | - |
| Ramnose | - | - | - |
| Palatinose | - | - | - |
| Eritritol | - | - | - |
| Melibiose | - | - | - |
| Glucuronato | - | - | - |
| Melezitose | - | - | - |
| Gluconato | - | - | + |
| Levulinato | - | - | - |
| Manitol | - | - | - |
| Lactose | - | - | - |
| Inositol | - | - | - |
| Glucose | + | + | + |
| Sorbose | - | - | - |
| Glucosamina | - | + | - |

O sinal (+) indica teste positivo e o sinal (-) indica teste negativo.

As leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia* e *Candida* são comuns à microflora da uva (Fleet, 1994; Jackson, 1994; Boulton et al, 1996).

Na fermentação espontânea ou induzida pela adição de inóculo as leveduras do gênero *Kloeckera*, *Candida* e *Pichia* fazem parte apenas do início da fermentação. Estas leveduras são pouco tolerantes a quantidade de etanol que elas produzem durante a fermentação. O etanol tem um efeito tóxico sobre estas leveduras causando inibição do seu crescimento (Fleet, 1994). Após três dias de fermentação o crescimento destas leveduras começa a declinar, o crescimento das linhagens do gênero *Saccharomyces cerevisiae* aumenta, e estas passam a dominar a fermentação até o esgotamento de nutrientes. As leveduras do gênero *Saccharomyces* são as mais resistentes ao etanol (Fleet, 1994; Pina e Hoog, 1999).

6.2- Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos mostos Chardonnay e Pinot Noir.

As análises dos parâmetros físico-químicos como densidade, % de álcool provável, açúcar (g/L), acidez total (g/L), acidez livre (g/L), SO₂ livre (mg/L), SO₂ total (mg/L), NH₄⁺ (mg/L) e pH foram realizadas na Indústria Chandon do Brasil S/A (RS). Os dados destas análises estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do mosto Chardonnay e Pinot Noir.

| Parâmetros químicos | Mosto Chardonnay | Mosto Pinot Noir |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Densidade | 1,074 ^{12 °C} | 1,071 ^{17 °C} |
| % de álcool provável | 10,23 | 8,91 |
| Açúcar (g/L) | 172,10 | 164,40 |
| Acidez total (g/L) | 4,90 | 3,70 |
| SO ₂ livre (mg/L) | 5,60 | 9,90 |
| SO ₂ total (mg/L) | 19,80 | 38,66 |
| NH ₄ ⁺ (mg/L) | 76,60 | 75,60 |
| pH | 3,20 | 3,21 |
| Acidez volátil (g/L) | 0,18 | 0,07 |

Segundo Fleet (1994) uma fermentação de 25 a 55 dias necessita de uma concentração de açúcar em torno de 150-240 g/L e uma concentração mínima de nitrogênio na forma amoniacal em torno de 70-140 mg/L.

A presença de SO₂, bem como sua quantidade, no mosto regula a atividade microbiana e impede o crescimento de alguns microrganismos. A quantidade 1 a 10 mg/L de SO₂ livre é o suficiente para que não ocorra contaminação do mosto por bactérias láctias durante a fermentação alcoólica (Fleet, 1994).

O pH do mosto para produção de vinho espumante deve estar em torno de 3 a 2,8 (Boulton et al, 1996)

De acordo com Boulton et al (1996) e Fleet (1994) a concentração de açúcar, nitrogênio, SO₂ livre e o valor do pH do mosto Pinot Noir e Chardonnay do Vale dos Vinhedos (RG) (Tabela 3) estão dentro de condições propícias para se iniciar a fermentação para produção de vinho espumante.

6.3 – Variação da Massa celular seca e pH dos mostos Chardonnay e Pinot Noir durante a fermentação a 20 ° C.

O pH durante a fermentação das quatro leveduras (*Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia* e *Candida*) utilizadas para produção de aroma não caiu muito em relação ao pH do mosto (pH inicial). Os valores medidos do pH inicial do mosto Chardonnay e Pinot Noir foi de 3,20 e 3,21, respectivamente. Durante a fermentação o pH inicial caiu nas 120 horas de fermentação, causando uma leve acidificação do meio. Em 168 horas de fermentação o valor registrado do pH foi de 2,88 (Gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

A fase de crescimento da levedura *Kloeckera apiculata* no mosto Chardonnay apresentou um rápido crescimento nas 72 horas iniciais da fermentação. A sua massa celular alcançou uma concentração de 12,27 mg/L em 168 horas de fermentação (Gráfico 1).

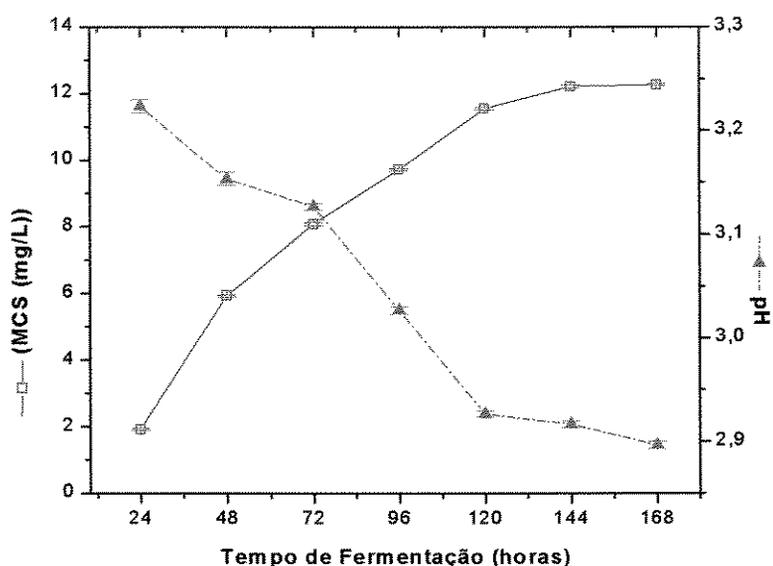


Gráfico 1- Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Kloeckera apiculata* a 20 °C.

A levedura *Pichia membranaefaciens* no mosto Chardonnay teve sua fase de maior crescimento nas 96 horas iniciais de fermentação. Após esse período de fermentação houve um declínio no crescimento, provavelmente devido ao início da fase estacionária. Após 168 horas de fermentação a massa celular alcançou uma concentração de 10,85 mg/L (Gráfico 2).

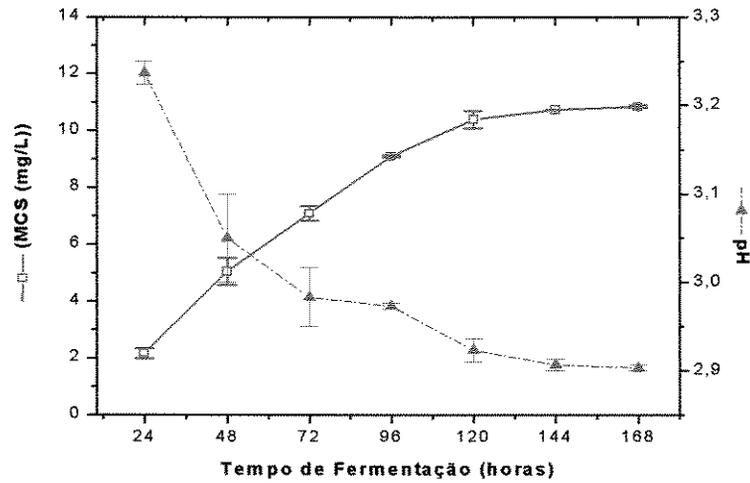


Gráfico 2- Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Pichia membranaefaciens* a 20 °C.

A levedura *Candida valida* no mosto Chardonnay teve fase de maior crescimento no período até 48 horas de fermentação, após este período o crescimento declinou. Após 168 horas de fermentação a concentração de massa celular chegou a 11,55 mg/L (Gráfico 3).

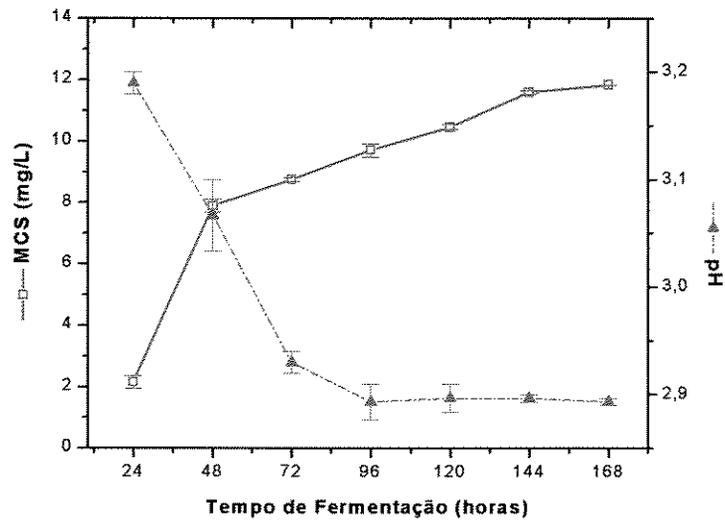


Gráfico 3 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Candida valida* a 20 °C.

A fase de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no mosto Chardonnay ocorreu nas 72 horas iniciais da fermentação. Após esse período de fermentação o crescimento praticamente estagnou. Em 168 horas de fermentação a concentração de massa celular alcançou 12,42 mg/L que é praticamente a concentração da massa celular em 72 horas de fermentação (Gráfico 4).

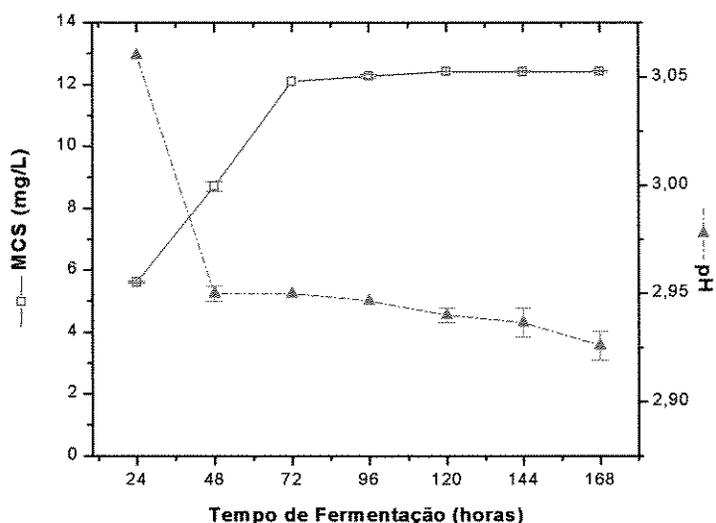


Gráfico 4 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Saccharomyces cerevisiae* a 20 °C.

A fase de maior crescimento da levedura *Kloeckera apiculata* no mosto Pinot Noir aconteceu nas 72 horas iniciais da fermentação, após este período houve um declínio, provavelmente devido a fase estacionária. Após 168 horas de fermentação a concentração de massa celular foi de 10,10 mg/L (Gráfico 5).

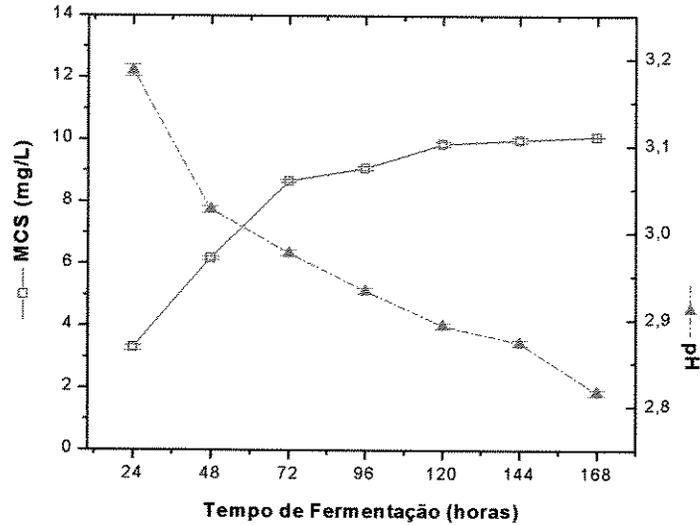


Gráfico 5 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com *Kloeckera apiculata* a 20 °C.

A fase de maior crescimento da levedura *Pichia membranaefaciens* no mosto Pinot Noir ocorreu nas 72 horas iniciais da fermentação. A concentração da massa celular chegou a 11,22 mg/L em 168 horas de fermentação (Gráfico 6).

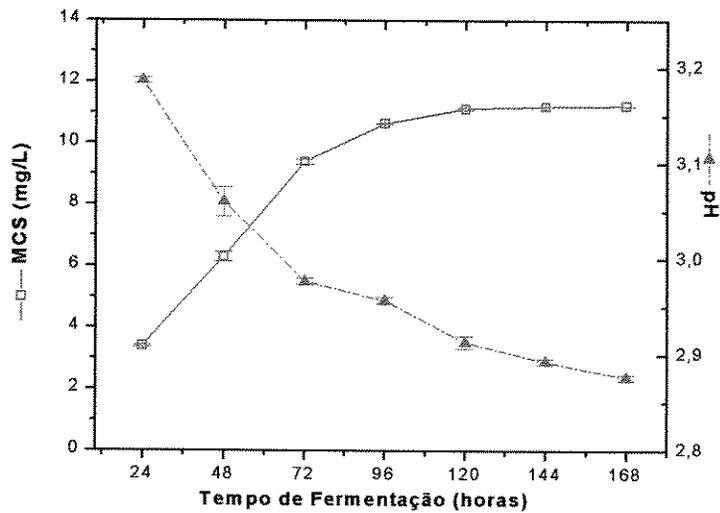


Gráfico 6- Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com *Pichia membranaefaciens* a 20 °C.

A levedura *Candida valida* teve sua fase de maior crescimento nas 48 horas iniciais da fermentação. Após 168 horas de fermentação a concentração de massa celular chegou a 11,50 mg/L (Gráfico 7).

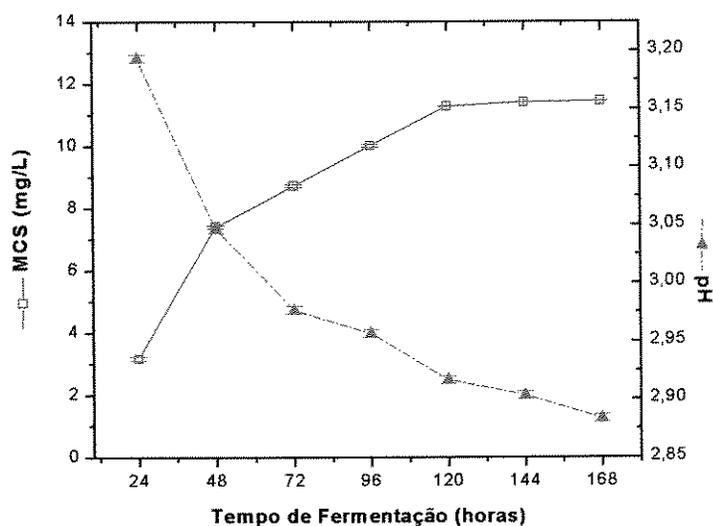


Gráfico 7 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com *Candida valida* a 20 °C.

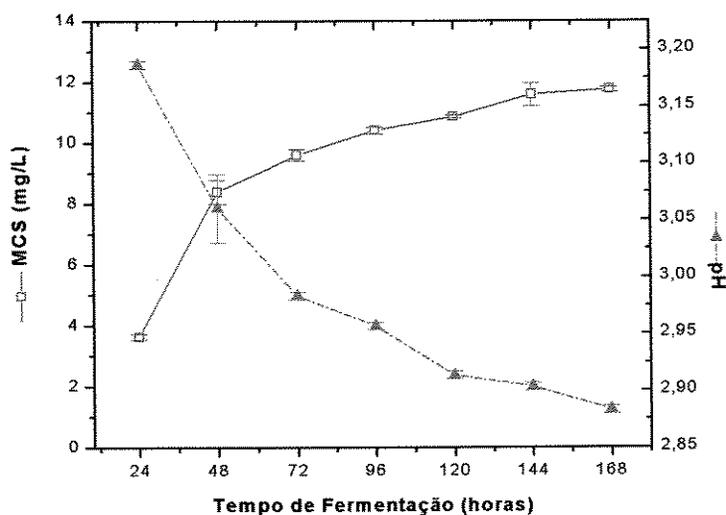


Gráfico 8 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot noir com *Saccharomyces cerevisiae* a 20 °C.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve sua fase de maior crescimento no mosto Pinot Noir nas 48 horas iniciais da fermentação. No final da fermentação (168 horas) a concentração de massa celular foi de 11,74 mg/L (Gráfico 8).

Segundo Fleet (1994) as leveduras do gênero *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida valida* e *Saccharomyces cerevisiae* atingem a sua fase de maior crescimento nas 72 horas iniciais da fermentação. Este comportamento do crescimento das leveduras citadas acima foi observado também por Lema et al. (1996).

6.4 – Variação da massa seca e pH dos mostos Chardonnay e Pinot Noir durante a fermentação a 15 ° C.

A variação do pH durante a fermentação a 15 °C foi muito similar a variação do pH durante a fermentação a 20 °C. Em 168 horas de fermentação o pH dos mostos fermentados alcançaram um valor de 2,93 – 2,90. Estes valores são um pouco maiores dos que os valores do pH dos mostos fermentados a 20 °C, provavelmente devido ao menor crescimento observado na fermentação a 15 °C (Gráficos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16).

O crescimento das leveduras do gênero *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces* é influenciado pela temperatura de fermentação (Fleet, 1994).

A fase de maior crescimento da levedura *Kloeckera apiculata* no mosto Chardonnay ocorreu nas 96 horas iniciais. Após este período de fermentação houve um brando crescimento, possivelmente devido ao início da fase estacionária. Após 168 horas a concentração de massa celular chegou a 9,60 mg /L (Figuras 9).

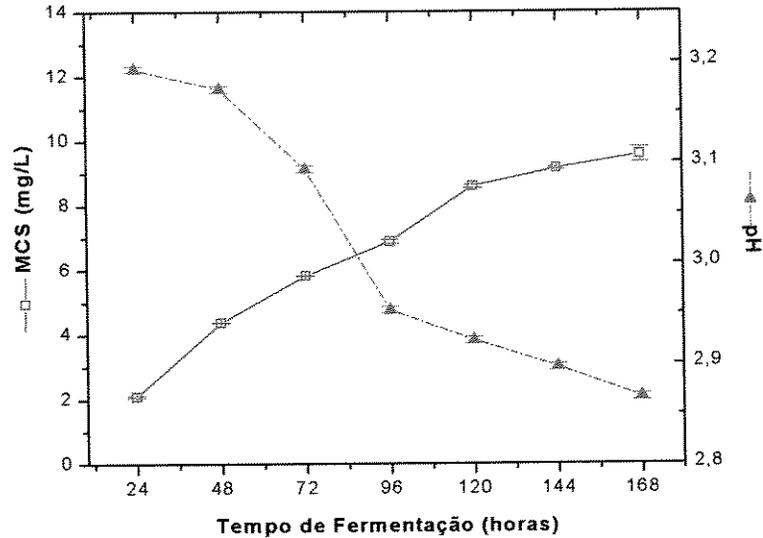


Gráfico 9 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Kloeckera apiculata* a 15 °C.

A levedura *Pichia membranaefaciens* no mosto Chardonnay desenvolveu um rápido crescimento nas 96 horas iniciais da fermentação. No final da fermentação (168 horas) a concentração de massa celular alcançou 10,59 mg/L (Gráfico 10)

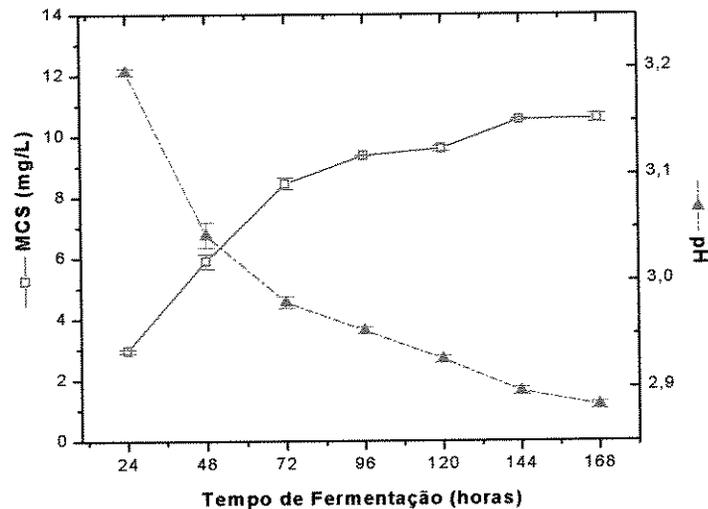


Gráfico 10 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Pichia membranaefaciens* a 15 °C.

A levedura *Cândida valida* no mosto Chardonnay também teve sua fase maior crescimento nas 96 horas iniciais da fermentação. A concentração de massa celular alcançou 10,20 mg/L após 168 horas de fermentação (Gráfico 11).

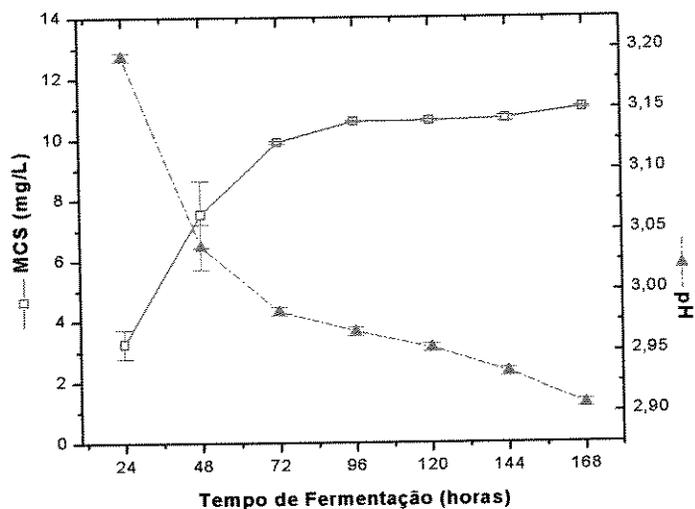


Gráfico 11 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Candida valida* a 15 °C.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve sua fase de maior crescimento no mosto Chardonnay nas primeiras 72 horas de fermentação, mostrando após este período um declínio do crescimento provavelmente devido ao início da fase estacionária. Após 168 horas de fermentação a massa celular alcançou 10,40 mg/L (Gráfico 12).

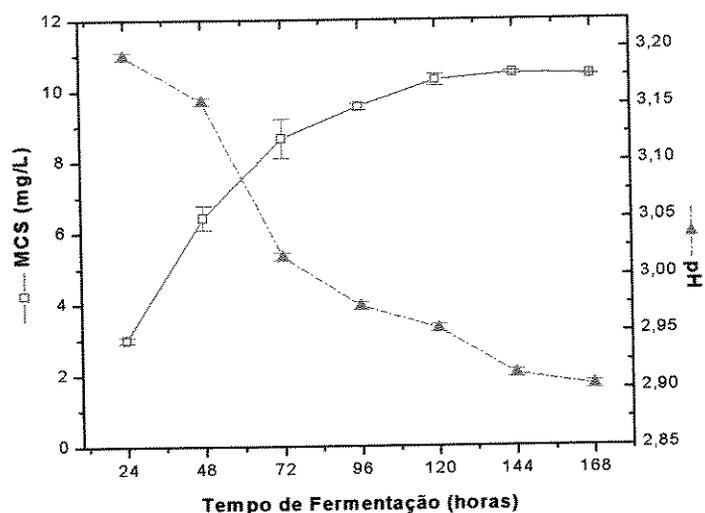


Gráfico 12 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Chardonnay com *Saccharomyces cerevisiae* a 15 °C.

A levedura *Kloeckera apiculata* no mosto Pinot noir teve sua fase maior crescimento nas primeiras 96 horas de fermentação. Após as 120 horas de fermentação o crescimento declinou. Em 168 horas de fermentação a concentração de massa celular chegou a 9,2 mg/L (Gráfico 13).

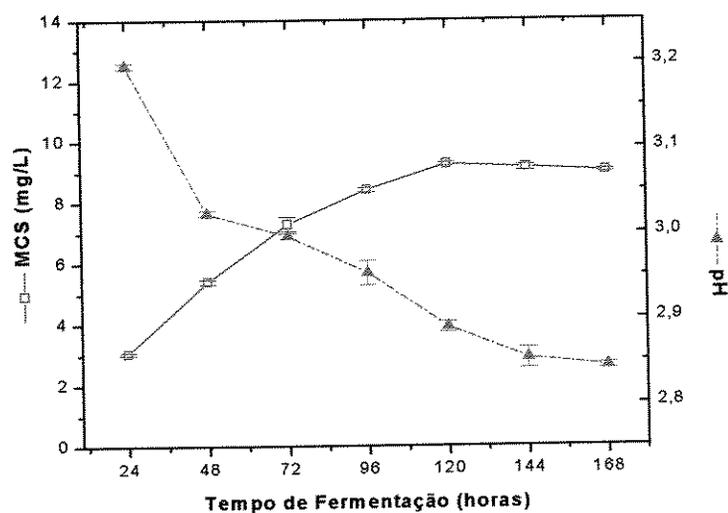


Gráfico 13 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com *Kloeckera apiculata* a 15 °C.

A fase de maior crescimento da *Pichia membranaefaciens* no mosto Pinot Noir ocorreu nas 96 horas iniciais da fermentação. Após 168 horas de fermentação a concentração de massa celular chegou a 10,23 mg/L (Gráfico 14).

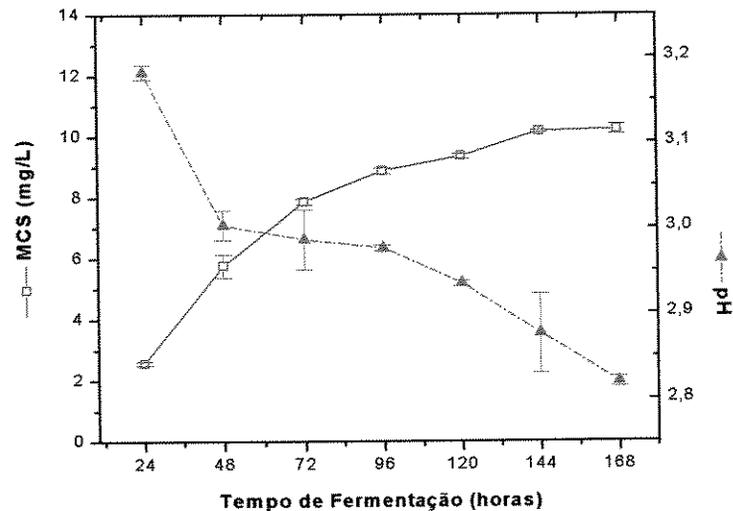


Gráfico 14- Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com *Pichia membranaefaciens* a 15 °C.

A levedura *Cândida valida* teve sua fase de maior crescimento nas 72 horas iniciais da fermentação. Em 168 horas de fermentação a concentração de massa celular alcançou 10,18 mg/L (Gráfico 15).

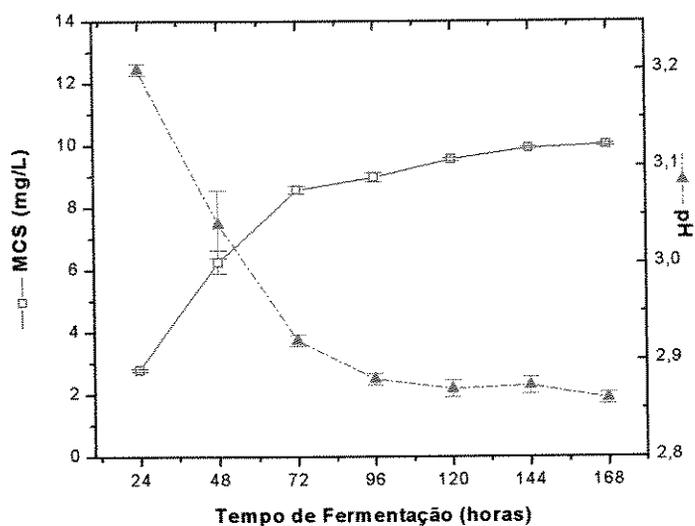


Gráfico 15 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com *Candida valida* a 15 °C.

O perfil do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no mosto Chardonnay foi muito similar ao crescimento da mesma no mosto Chardonnay. A fase de maior crescimento ocorreu nas primeiras 96 horas de fermentação. No final da fermentação a concentração de massa celular alcançou 10,45 mg/L (Gráfico 16).

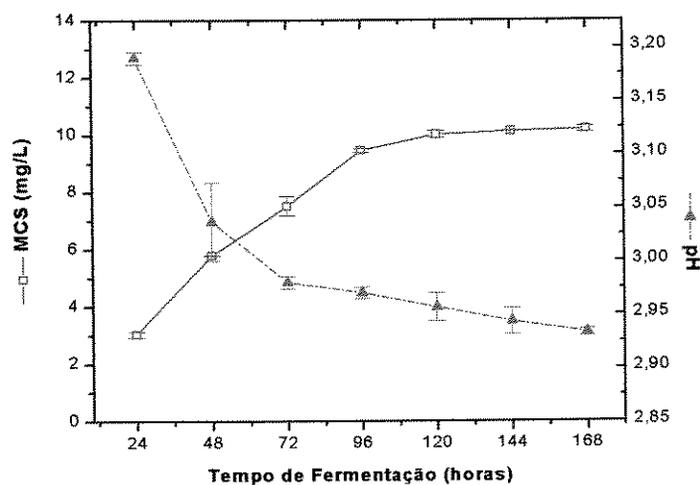


Gráfico 16 - Variação da massa celular seca e do pH durante a fermentação do mosto Pinot Noir com *Saccharomyces cerevisiae* a 15 °C.

6.5 – Cromatografia gasosa

O uso da cromatografia gasosa capilar permitiu a detecção de 44 compostos voláteis de aromas isolados do mosto não fermentado e fermentado com as leveduras selecionadas. Foram utilizadas dois tipos de extração, para extrair o maior número de compostos possíveis, já que para cada classe de compostos há uma técnica mais apropriada de análise (Bertrand, 1981).

6.6 - Compostos isolados por extração com solvente (líquido-líquido) e “Dynamic Headspace”.

Extração dos compostos voláteis por solvente (líquido-líquido)

A Tabela 7 mostra os valores dos índices de Kovats teórico/prático dos compostos isolados pela extração líquido-líquido no mosto não fermentado e no mosto fermentado. Um total de 30 compostos voláteis de aroma foram isolados pela técnica de extração com solvente. Os compostos para os quais não foi possível obter o valor do índice de Kovats teórico/prático foram identificados somente por CG-EM, foram considerados “tentativamente identificados”.

Compostos como o 1-hexanol, 2-hexen-1-ol, 3-hexen-1-ol, 1-heptanol, 1-decanol, propionato de isobutila, benzaldeído, ácido 3-metil butírico, ácido isopropanóico, ácido hexanóico e ácido octanóico foram detectados tanto no mosto Chardonnay quanto no mosto Pinot Noir não fermentado. O ácido 3-metil butírico e o ácido isopropanóico são compostos originados geralmente da fermentação. Neste caso, a presença destes ácidos no mosto inicial pode ter sido resultado de uma ligeira fermentação por leveduras “selvagens”, ou seja, leveduras da microflora da uva. O caproato de etila e o caprilato de etila foram detectados apenas no mosto Pinot Noir não fermentado.

Compostos como o etanol, isobutanol, álcool isoamílico, feniletanol, butanol, acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de 2-feniletil, 3-hidroxi-2-butanona, ácido acético, ácido propanóico e ácido butanóico são originados do processo fermentativo. Estes compostos foram detectados, após 168 horas de fermentação, tanto no mosto Chardonnay quanto no mosto Pinot noir. Embora a detecção do ácido láctico e do lactato de etila tenha ocorrido durante a fermentação pelo *Saccharomyces cerevisiae*, estes foram apenas tentativamente identificados. Algumas linhagens de *Saccharomyces*

podem produzir estes compostos (Jackson, 1994). A presença de bactérias lácticas é descartada, pois os mostos foram filtrados em membrana 0,22 μm .

Tabela 7: Compostos voláteis, isolados por extração com solvente, identificados e tentativamente identificados por espectrometria de massas e Índice de Kovats (I.K.), no mosto puro e no mosto fermentado pelas leveduras selecionadas por 168 horas.

| Compostos voláteis | Meio reacional detectados | I.K. |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|
| 1) Etanol | Mosto/1,2,3 e 4 | 937/930 ⁺ |
| 2) 1-Hexenol | Mosto | 1349/1360 ⁺ |
| 3) 2-Hexen-1-ol | Mosto | ** |
| 4) 3-Hexen-1-ol | Mosto | ** |
| 5) Isobutanol | Mosto/1,2,3 e 4 | 1101/1101 ⁺ |
| 6) Álcool isoamílico | Mosto/1,2,3 e 4 | 1213/1204 ⁺ |
| 7) 1-Heptanol | Mosto | ** |
| 8) 1-Decanol | Mosto | 1750/1768 ⁺ |
| 9) Feniletanol | 1,2,3 e 4 | ** |
| 10) Butanol | 4 | ** |
| 11) Acetato de etila | Mosto/1,2,3 e 4 | 900/902 ⁺ |
| 12) Acetato de propila | 1 | 982/978 ⁺ |
| 13) Acetato de isoamila | Mosto/1,2,3 e 4 | 1228/1233 ⁺ |
| 14) Acetato de 2-feniletila | 2 e 3 | 1835/1827 ⁺ |
| 15) Acetato de pentila | 2 e 4 | ** |
| 16) Lactato de etila | 4 | ** |
| 17) Caproato de etila | Apenas Mosto Pinot noir | 1347/1357 ⁺ |
| 18) Caprilato de etila | Apenas Mosto Pinot noir | 1437/1445 ⁺ |
| 19) Propionato de isobutila | Mosto | ** |
| 20) 2-Hexanona | 3 | 1077/1084 ⁺ |
| 21) 3-Hidroxi-2-butanona | 4 | 1392/1391 ⁺ |
| 22) Benzaldeído | Mosto | 1625/1639 ⁺ |
| 23) Ácido acético | Mosto/1,2,3 e 4 | 1490/1485 ⁺ |
| 24) Ácido 3-metilbutírico | Mosto | ** |
| 25) Ácido isopropanóico | Mosto | ** |
| 26) Ácido láctico | 4 | ** |
| 27) Ácido hexanóico | Mosto | 1866/1867 ⁺ |
| 28) Ácido octanóico | Mosto | ** |
| 29) Ácido propanóico | 1,2,3 e 4 | 1560/1560 ⁺ |
| 30) Ácido butanóico | 1,2,3 e 4 | 1658/1659 ⁺ |

⁺Índice de Kovats teórico (obtidos de padrões autênticos); ** Compostos tentativamente identificados.

Mosto = mosto não fermentado. 1=mosto fermentado com *Kloeckera*; 2= mosto fermentado com *Candida*; 3 =mosto fermentado com *Pichia* e 4 = mosto fermentado com *Saccharomyces*.

Extração dos compostos voláteis por “Dynamic Headspace”

A extração dos compostos voláteis, do mosto não fermentado e fermentado pelas leveduras selecionadas, por “Dynamic Headspace”, mostrou que a técnica foi muito eficaz para compostos de baixo ponto de ebulição, houve boa reprodutibilidade dos picos dos compostos. Por esta técnica foi possível isolar 25 compostos de aroma. A tabela 8 mostra os valores dos índices de Kovats teórico/prático dos compostos isolados pela extração “Dynamic Headspace” no mosto não fermentado e no mosto fermentado pelas leveduras selecionadas. Embora a técnica tenha sido eficaz para a extração de compostos de baixo ponto de ebulição, ocorreu também a detecção de compostos de alto ponto de ebulição como o butirato de etila, butil isobutirato e ácido capróico, mas estes compostos foram apenas tentativamente identificados. Os compostos para os quais não foi possível obter o valor do índice de Kovats teórico/prático, e, portanto, identificados somente por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, foram considerados “tentativamente identificados”.

Compostos como o hexanol, butirato de etila e butil isobutirato foram detectados apenas no mosto, sendo os dois últimos presentes apenas no mosto Chardonnay.

Aldeído de baixo ponto de ebulição como o propanal, 1-butanal, 3-metil butanal e isobutiraldeído foram detectados no mosto não fermentado e também no mosto fermentado com a linhagem *Saccharomyces cerevisiae*, provavelmente não ocorreu a redução destes aldeídos a álcoois durante a fermentação.

Compostos como o acetato de propila e propionato de etila foram identificados apenas no mosto fermentado com a levedura *Kloeckera apiculata*. O acetato de isopropila e o 2-propanol foram detectados apenas no mosto fermentado com a levedura *Pichia membranaefaciens*, sendo o primeiro composto identificado. O 2-propanol só foi tentativamente identificado em apenas uma das três repetições de cada amostra.

Tabela 8: Compostos voláteis, isolados por "Dynamic Headspace" identificados e tentativamente identificados por espectrometria de massa e Índice de Kovats (I.K.), no mosto não fermentado e fermentado pelas leveduras selecionadas por 168 horas.

| Compostos voláteis | Meio reacional detectados | I.K. |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|
| 1) Etanol | Mosto/1,2,3 e 4 | 1032/1022 ⁺ |
| 2) 1-Hexenol | Mosto | ** |
| 3) Isobutanol | Mosto/1,2,3 e 4 | ** |
| 4) Álcool isoamílico | Mosto/1,2,3 e 4 | ** |
| 5) 1-Propanol | Mosto/1,2,3 e 4 | 1121/1124 ⁺ |
| 6) 2-Propanol | 3 | ** |
| 7) Butanol | 4 | ** |
| 8) Acetato de etila | Mosto/1,2,3 e 4 | 971/982 ⁺ |
| 9) Acetato de metila | 1,2 e 3 | ** |
| 10) Acetato de propila | 1 | 1057/1051 ⁺ |
| 11) Acetato de isopropila | 2 | 1099/1088 ⁺ |
| 12) Acetato de Butila | 2 e 3 | 1169/1162 ⁺ |
| 13) Acetato de isoamila | Mosto/1,2,3 e 4 | ** |
| 14) Propionato de etila | 1 | 1057/1046 ⁺ |
| 15) Acetato de 2-feniletila | 2 e 3 | ** |
| 16) Butirato de etila | Apenas Mosto Chardonnay | ** |
| 17) Butil isobutirato | Apenas Mosto Chardonnay | ** |
| 18) 3-Hidroxi-2-butanona | 4 | ** |
| 19) n-propanal | Mosto/4 | ** |
| 20) 1-Butanal | Mosto/4 | ** |
| 21) 3-metil, butanal | Mosto/4 | ** |
| 22) Isobutiraldeído | Mosto/4 | ** |
| 23) Acetaldeído | 1,2,3 e 4 | 838/841 ⁺ |
| 24) Ácido acético | Mosto/1,2,3 e 4 | ** |
| 25) Ácido capróico | Mosto/1,2,3 e 4 | ** |

⁺Índice de Kovats teórico (obtidos de padrões autênticos)

** Compostos tentativamente identificados.

Mosto = mosto não fermentado. 1=mosto fermentado com *Kloeckera*; 2= mosto fermentado com *Candida*; 3 =mosto fermentado com *Pichia* e 4 = mosto fermentado com *Saccharomyces*.

6.7 - Quantificação dos compostos majoritários formados durante a fermentação e isolados pelo “Dynamic Headspace”

A) Produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído após 168 horas de fermentação a 20 °C no mosto Chardonnay e Pinot Noir.

A produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído pela *Kloeckera apiculata*, *Candida valida* e *Saccharomyces cerevisiae* a 20 °C não apresentaram grandes diferenças em relação aos mostos Chardonnay e Pinot Noir (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído no mosto Chardonnay fermentado a 20 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Cândida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Acetato de etila | 310,0 ± 5 | 281,5 ± 6 | 270,0 ± 6 | 184,0 ± 5 |
| Acetato de Isoamila | 31,2 ± 3 | 33,8 ± 2 | 30,7 ± 3 | 20,3 ± 3 |
| Acetaldeído | 53,9 ± 4 | 69,4 ± 3 | 42,7 ± 6 | 132,3 ± 5 |

A maior produção de acetato de etila foi verificado no mosto fermentado com a *Kloeckera apiculata*.

A *Candida valida* é a forma imperfeita da *Pichia membranaefaciens*, ou seja, seu modo de reprodução é sexuado. Os resultados da produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído pela *Pichia membranaefaciens* são próximos dos resultados obtidos pela *Candida valida*. Neste caso a diferença no modo de reprodução não trouxe grandes diferenças em relação à quantidade de acetato de etila.

Tabela 10 – Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato e isoamila e acetaldeído no mosto Pinot Noir fermentado a 20 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Candida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Acetato de etila | 295,0 ± 5 | 272,5 ± 5 | 286,0 ± 6 | 195,0 ± 7 |
| Acetato de Isoamila | 24,9 ± 2 | 32,0 ± 3 | 30,6 ± 2 | 19,0 ± 3 |
| Acetaldeído | 45,3 ± 3 | 70,0 ± 4 | 67,8 ± 4 | 125,6 ± 4 |

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* produziu a maior concentração de acetaldeído e a menor concentração de acetato de isoamila.

A temperatura de fermentação influencia a produção de álcoois superiores, ésteres, acetaldeído e ácido acético (Fleet, 1994).

Mateo et al. (1991), utilizaram a temperatura de 28 °C para fermentação do mosto de uva para produção de vinho. Embora as leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Kloeckera* e *Candida* tenham produzido uma quantidade maior de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído, temperaturas altas de fermentação como 28 °C são incompatíveis com o processo de fabricação do vinho.

B) Produção de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico em 168 horas de fermentação a 20 °C no mosto Chardonnay e Pinot Noir.

A produção de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico observada no mosto Chardonnay foi próxima da produção no mosto Pinot Noir (Tabelas 11 e 12)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* produziu a maior quantidade de etanol em comparação com as outras três leveduras, e as menores quantidades de 1-propanol e álcool isoamílico. O álcool isoamílico e o 1-propanol são compostos importantes para a composição do aroma do vinho.

As leveduras *Candida valida* e a *Kloeckera apiculata* produziram a maior quantidade de 1-propanol e álcool isoamílico.

O isobutanol foi produzido em maior quantidade pelas leveduras *Candida valida* e *Pichia membranaefaciens*.

Tabela 11 – Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Chardonnay fermentado a 20 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Candida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Etanol (g/L) | 23,8 ± 3 | 32,7 ± 3 | 32,50 ± 3 | 34,5 ± 2 |
| 1-propanol (mg/L) | 15,0 ± 2 | 12,0 ± 3 | 10,8 ± 2 | 9,0 ± 1 |
| Isobutanol (mg/L) | 20,30 ± 2 | 72,0 ± 4 | 33,7 ± 3 | 54,0 ± 5 |
| Álcool isoamílico (mg/L) | 111,7 ± 5 | 120,29 ± 4 | 98,0 ± 3 | 7,7 ± 2 |

Tabela 12 – Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Pinot Noir fermentado a 20 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Candida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Etanol (g/L) | 23,0 ± 2 | 32,0 ± 2 | 31,5 ± 3 | 32,0 ± 2 |
| 1-propanol (mg/L) | 12,0 ± 2 | 15,0 ± 1 | 10,2 ± 4 | 7,5 ± 3 |
| Isobutanol (mg/L) | 19,5 ± 1 | 69,0 ± 3 | 30,7 ± 6 | 52,6 ± 3 |
| Álcool isoamílico (mg/L) | 126,6 ± 4 | 113,5 ± 4 | 96,0 ± 7 | 6,8 ± 5 |

C) Produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído no sétimo dia de fermentação a 15 °C no mosto Chardonnay e Pinot Noir.

Os dados da produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído estão descritos nas Tabelas 10 e 11.

Através dos dados da massa celular seca foi observado que o crescimento a 15 °C é mais lento e menor do que a 20 °C. As leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Candida valida* e *Pichia membranaefaciens* aumentam ou diminuem seu crescimento, ou seja, a sua massa celular de acordo com a temperatura de fermentação. A produção de compostos voláteis como álcoois superiores, ésteres, acetaldeído também variam de acordo com a temperatura de fermentação (Fleet, 1994).

A produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído foi menor a 15 °C do que a 20 °C. A temperatura de fermentação de 15 °C está mais próxima da temperatura de fermentação do mosto de uva para produção de espumante. A temperatura de fermentação utilizada pela indústria Chandon do Brasil (RG), para produção de espumante fica em torno de 13-14°C. A indústria utiliza temperatura de fermentação de 20 °C para preparação do "Pé de cuba". O "Pé de cuba" é uma mistura de mosto mais bagaço de uva com adição de leveduras, fermentada durante 3-5 dias. Este processo é utilizado pela indústria para condicionar as leveduras ao crescimento e multiplicação.

O comportamento da produção de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído a 15 °C foi similar ao comportamento da produção a 20 °C. As leveduras tiveram o mesmo comportamento da quantidade de produção destes compostos. Na temperatura de fermentação de 15 °C, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi a levedura que produziu a maior quantidade de acetaldeído, resultado igual ao da fermentação a 20 °C. A diferença como já esperada foi observada na quantidade destes compostos. A concentração destes compostos foi menor a 15 °C do que a 20 °C.

Tabela 13 – Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído no mosto Chardonnay fermentado a 15 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Candida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Acetato de etila | 200,0 ± 10 | 165,0 ± 10 | 147,0 ± 11 | 111,0 ± 9 |
| Acetato de Isoamila | 19,40 ± 2 | 27,0 ± 3 | 28,1 ± 2 | 15,70 ± 2 |
| Acetaldeído | 14,9 ± 2 | 39,5 ± 2 | 36,0 ± 3 | 98,4 ± 4 |

Tabela 14 – Concentração (mg/L) de acetato de etila, acetato de isoamila e acetaldeído no mosto Pinot Noir fermentado a 15 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Candida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Acetato de etila | 198,0 ± 10 | 151,0 ± 11 | 149,10 ± 10 | 120,0 ± 5 |
| Acetato de Isoamila | 20,0 ± 4 | 26,20 ± 2 | 27,40 ± 3 | 14,70 ± 2 |
| Acetaldeído | 13,9 ± 2 | 38,1 ± 2 | 31,50 ± 2 | 80,3 ± 5 |

D) Produção de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no sétimo dia de fermentação a 15 °C no mosto Chardonnay e Pinot Noir.

A produção de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Chardonnay foi similar à produção no mosto Pinot Noir (Tabela 15 e 16).

A *Candida valida* nesta temperatura também produziu a maior quantidade de isobutanol em comparação com as outras leveduras.

A *Pichia membranaefaciens* produziu quantidades de álcool isoamílico, etanol e 1-propanol próximas das quantidades produzidas pela *Cândida valida*, mas a quantidade de isobutanol foi razoavelmente diferente.

Tabela 15 – Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Chardonnay fermentado a 15 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Candida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Etanol (g/L) | 12,5 ± 3 | 26,16 ± 4 | 25,60 ± 3 | 28,3 ± 3 |
| 1-propanol (mg/L) | 9,0 ± 2 | 8,7 ± 5 | 8,5 ± 2 | 8,0 ± 1 |
| Isobutanol (mg/L) | 18,10 ± 3 | 40,0 ± 5 | 28,5 ± 4 | 38,0 ± 3 |
| Álcool isoamílico (mg/L) | 99,0 ± 4 | 85,0 ± 6 | 80,0 ± 7 | 5,40 ± 1 |

Tabela 16 – Concentração de etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico no mosto Pinot Noir fermentado a 15 °C.

| Composto | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Candida valida</i> | <i>Pichia membranaefaciens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Etanol (g/L) | 6,38 ± 5 | 22,5 ± 5 | 24,0 ± 8 | 27,2 ± 3 |
| 1-propanol (mg/L) | 9,5 ± 6 | 10,0 ± 6 | 7,5 ± 2 | 6,5 ± 1 |
| Isobutanol (mg/L) | 19,6 ± 4 | 39,0 ± 5 | 26,0 ± 3 | 36,2 ± 2 |
| Álcool isoamílico (mg/L) | 98,0 ± 2 | 96,0 ± 10 | 98,2 ± 4 | 5,0 ± 2 |

6.8 – Análise sensorial

A) Análise de aceitação

A aceitação dos provadores (público alvo para o vinho espumante) em relação ao aroma produzido pelas leveduras pode ser observada nas Figuras 9 a 16.

Quanto à aceitação do produto as Figuras 9, 10 e 11 mostram as amostras com maior aceitação (1, 2 e 3) de acordo com os dados estatísticos indicados na Tabela 17. A Figura 9 mostra que, cerca de 12 % dos provadores gostaram ligeiramente, 16 % gostaram moderadamente, 12 % gostaram muito e 12 % gostaram muitíssimo. Nenhum provador desgostou muitíssimo da amostra 1. As Figuras 10 e 11 mostram que a variação da aceitação da amostra 2 e 3 foi de 20 % e 12 % dos provadores gostaram ligeiramente, 16 % e 16 % gostaram moderadamente, 20 % e 8 % gostaram muito, 8 % e 16 % gostaram muitíssimo, respectivamente. Nestas duas amostras 8 % dos provadores desgostaram muitíssimo.

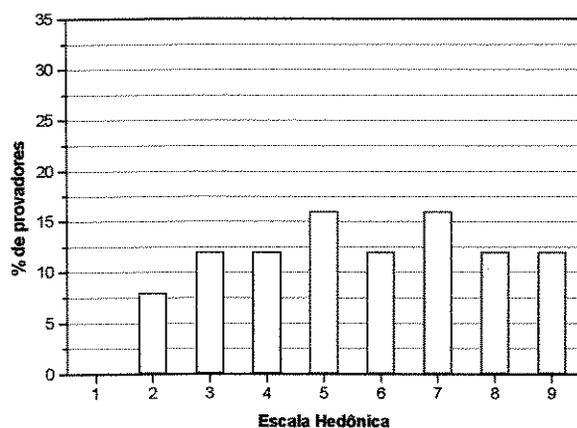


Figura 9 – Histograma de aceitação do mosto Pinot noir fermentado com *Pichia membranaefaciens* (amostra 1).

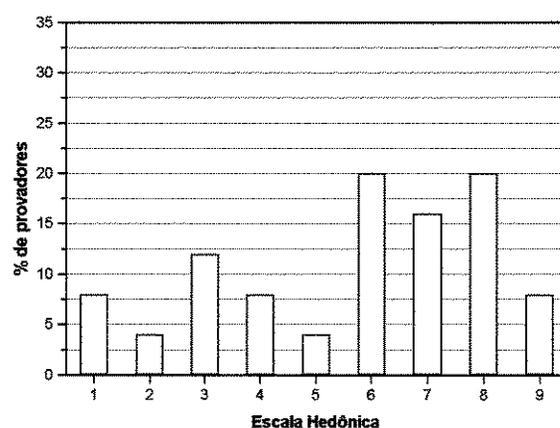


Figura 10 – Histograma de aceitação do mosto Chardonnay fermentado com *Pichia membranaefaciens* (amostra 2).

1= desgostei muitíssimo; 5= nem gostei, nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo.

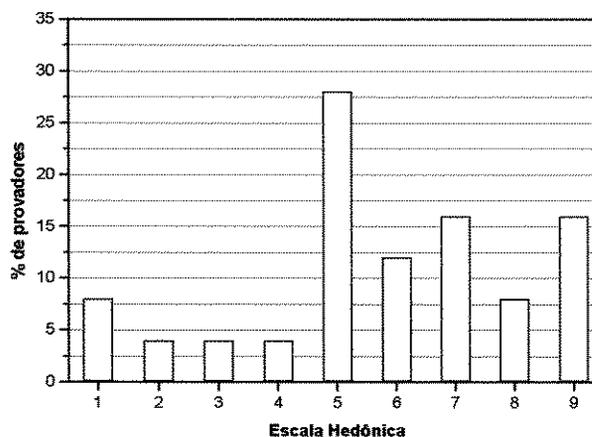


Figura 11 – Histograma de aceitação do Mosto Chardonnay fermentado com *Kloeckera apiculata* (amostra 3). (1= desgostei muitíssimo; 5= nem gostei, nem desgostei; 9= gostei muitíssimo)

A Figura 12 ilustra que 12 % dos provadores gostaram ligeiramente, 16 % gostaram moderadamente, 4 % gostaram muito e 16 % gostaram muitíssimo, sendo 8 % dos provadores desgostaram muitíssimo da amostra 4 (mosto Pinot Noir fermentado como *Candida valida*). As Figuras 13 e 14 mostraram que 16 % e 16 % dos provadores gostaram ligeiramente, 8 % e 8 % gostaram moderadamente, 16 % e 0 % gostaram muito e 12 % e 16 % gostaram muitíssimo; cerca de 8 % e 12 % desgostaram das amostras 5 (mosto Chardonnay fermentado com *Candida valida*) e 6 (mosto Pinot Noir fermentado com *Saccharomyces cerevisiae*), respectivamente.

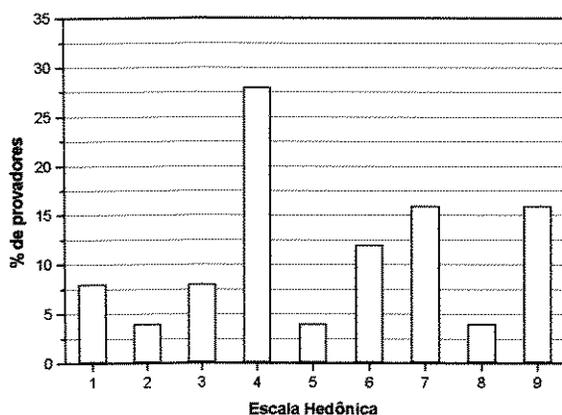


Figura 12 – Histograma de aceitação do mosto Pinot Noir fermentado com *Candida valida* (amostra 4)

1 = desgostei muitíssimo; 5= nem gostei, nem desgostei; 9= gostei muitíssimo)

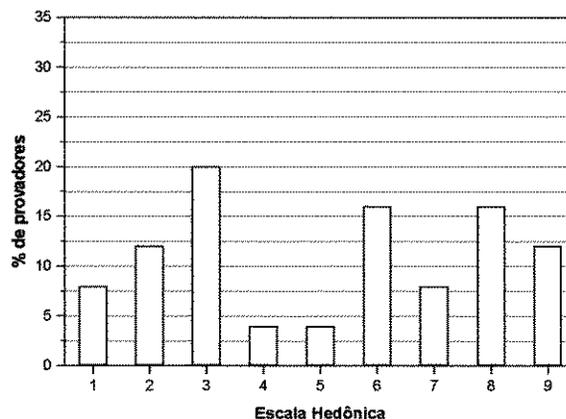


Figura 13 – Histograma de aceitação do mosto Chardonnay fermentado com *Candida valida* (amostra 5).

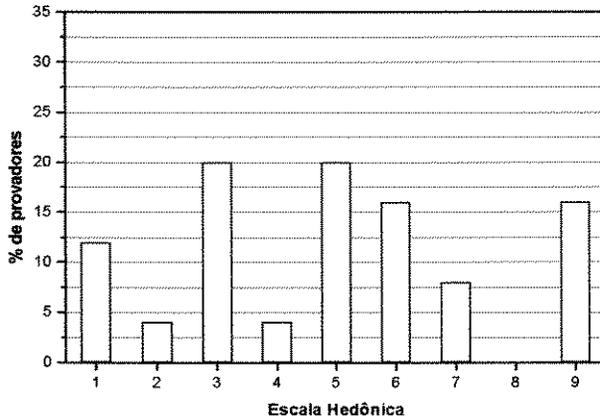


Figura 14 – Histograma de aceitação do Mosto Pinot Noir fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* (amostra 6). (1= desgostei muitíssimo, 5= nem gostei, nem desgostei, 9= gostei muitíssimo)

As amostras 7 e 8 (Figuras 15 e 16) apresentaram os menores níveis de aceitação. Cerca de 8 % dos provadores gostaram ligeiramente, 8 % gostaram moderadamente, 4 % gostaram muito e nenhum provador gostou muitíssimo da amostra, e 16 % desgostaram muitíssimo da amostra 7 (mosto Chardonnay fermentado com *Saccharomyces cerevisiae*). Nenhum provador gostou ligeiramente, 4 % gostou moderadamente, 4 % gostou muito e 8 % gostou muitíssimo da amostra 8 (mosto Pinot Noir fermentado com *Kloeckera apiculata*), embora 12 % dos provadores desgostaram muitíssimo da amostra 8 (mosto Pinot Noir fermentado com *Kloeckera apiculata*).

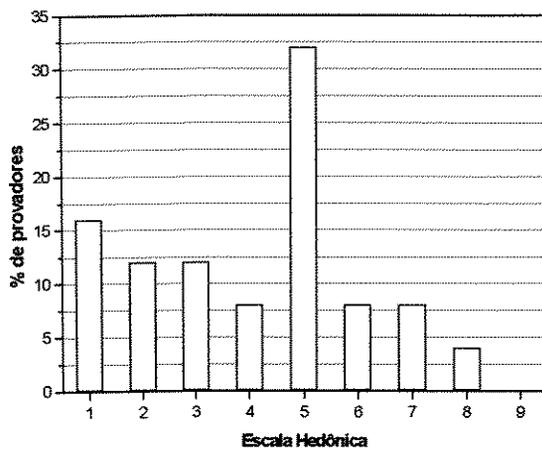


Figura 15 – Histograma de aceitação do mosto Chardonnay fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* (amostra 7).

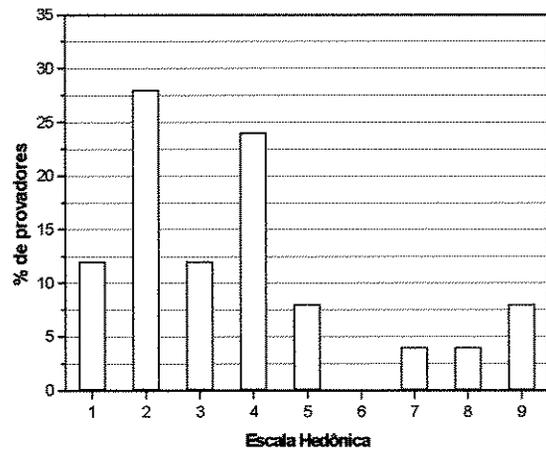


Figura 16 – Histograma de aceitação do mosto Pinot Noir fermentado com *Kloeckera apiculata* (amostra 8).

1= desgostei muitíssimo, 5= nem gostei, nem desgostei, 9= gostei muitíssimo

A Análise de Variância (ANOVA) aplicada as oito amostras mostrou que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) na aceitação do aroma das amostras de bebida semelhante ao vinho espumante em pelo menos duas das oito amostras (Tabela 8).

Tabela 17 - Médias de aceitação das amostras.

| Amostra | Médias da aceitação do aroma |
|---|------------------------------|
| (1) <i>Pichia membranaefaciens</i> no mosto Pinot Noir | 5.4960 ^a |
| (2) <i>Pichia membranaefaciens</i> no mosto Chardonnay | 5.4320 ^a |
| (3) <i>Kloeckera apiculata</i> no mosto Chardonnay | 5.4240 ^a |
| (4) <i>Candida valida</i> no mosto Pinot Noir | 4.8760 ^{ab} |
| (5) <i>Candida valida</i> no mosto Chardonnay | 4.8280 ^{ab} |
| (6) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no mosto Pinot Noir | 4.5760 ^{ab} |
| (7) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no mosto Chardonnay | 3.9960 ^{ab} |
| (8) <i>Kloeckera apiculata</i> no mosto Pinot Noir | 3.3680 ^b |

Médias marcadas com letras iguais não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) mostrou que as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 não diferiram significativamente entre si. Embora esta diferença estatística não tenha ocorrido, as amostras 1, 2 e 3 receberam médias de aceitação acima de 5 (correspondendo ao conceito gostei ligeiramente).

A primeira e a segunda amostra com maior aceitação (mosto Pinot Noir e Chardonnay fermentado com *Pichia membranaefaciens*) diferiu das outras amostras pela presença de compostos como 2-propanol, 2-hexanona, e também pela quantidade de compostos majoritários da fermentação. A concentração de acetato de etila, acetato de isoamila, acetaldeído, etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico na amostra com a maior aceitação de compra foi 149,10 mg/L; 27,40 mg/L; 31,50 mg/L; 24,0 mg/L; 7,5 mg/L; 26,0 mg/L e 98,20 mg/L, respectivamente. Na segunda amostra com maior aceitação a concentração de acetato de etila, acetato de isoamila, acetaldeído, etanol, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico detectada foram de 147,0 mg/L; 28,10 mg/L; 36,0 mg/L; 25,60 mg/L; 8,5 mg/L; 28,50 mg/L e 80,0 mg/L, respectivamente. Na terceira amostra com maior aceitação de compra a concentração de acetato de etila, acetato de isoamila, acetaldeído, etanol, 1-propanol, isobutanol, álcool isoamílico detectada foram de 200,0 mg/L; 19,40 mg/L; 14,90 mg/L; 12,5 mg/L; 9,0 mg/L; 18,10 mg/L e 99,0 mg/L.,

respectivamente. Na terceira amostra com maior aceitação foi detectado compostos de aroma que não foram detectados em outras amostras como o acetato de propila e o propionato de etila.

A intenção de compra para as amostras 1, 2 e 3 foi superior, com maior porcentagem de provadores atribuindo o conceito “provavelmente eu compraria” do que os demais. A amostra 1 teve uma intenção de compra igual a 36 % atribuído ao conceito “provavelmente compraria” e 20 % dos provadores atribuíram ao conceito “provavelmente não compraria”. Para as amostras 2 e 3 a intenção de compra foi igual a 32 % para o conceito “provavelmente compraria” e 8 % e 12 % para o conceito “provavelmente não compraria”. Estes resultados evidenciam que as amostras 1, 2 e 3 apresentaram maior nível de aceitação de aroma especificamente para o produto em questão.

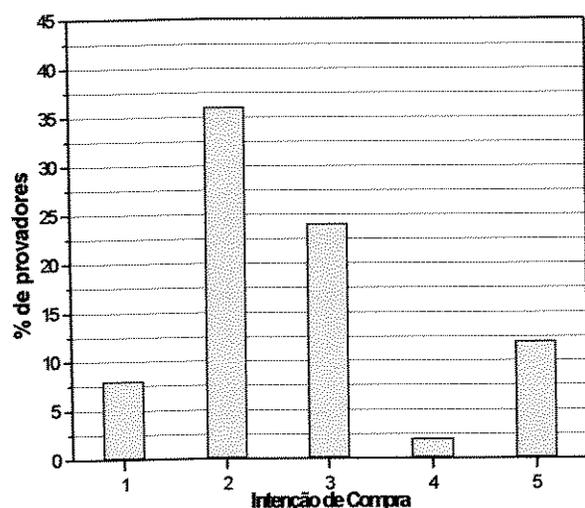


Figura 17 – Histograma da intenção de compra do mosto Pinot noir fermentado com *Pichia membranaefaciens* (amostra 1).

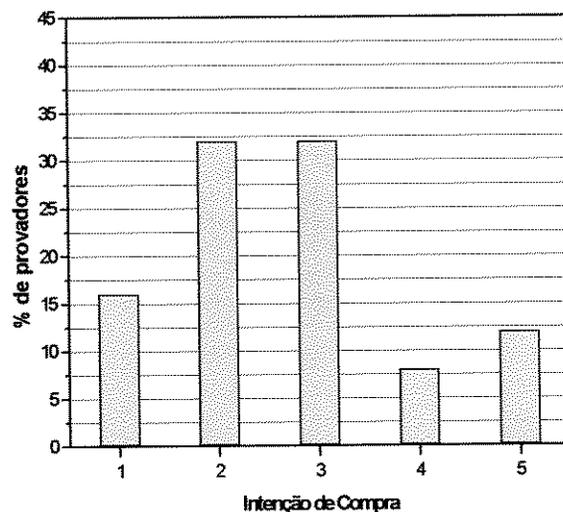


Figura 18 – Histograma da intenção de compra do mosto Chardonnay fermentado com *Pichia membranaefaciens* (amostra 2).

1=certamente compraria, 2= provavelmente compraria, 3= tenho dúvida se compraria ou não, 4 = provavelmente não compraria e 5 = certamente não compraria.

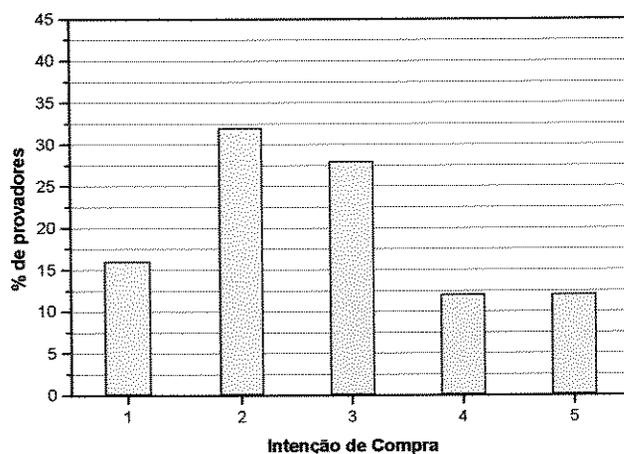


Figura 19- Histograma de intenção de compra do Mosto Chardonnay fermentado com *Kloeckera apiculata* (amostra 3). (1=certamente compraria, 2= provavelmente compraria, 3= tenho dúvida se compraria ou não, 4 = provavelmente não compraria e 5 = certamente não compraria).

As amostras 4, 5 e 6 tiveram uma intenção de compra de 36 % de provadores para o conceito “provavelmente compraria” e 24 %, 28 % e 24 % para o conceito “provavelmente não compraria”.

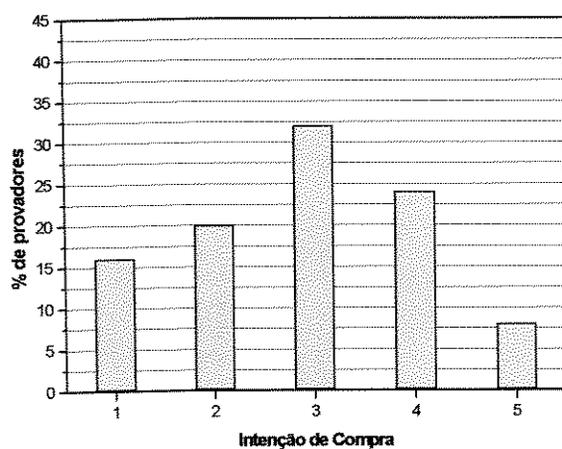


Figura 20 – Histograma da intenção de compra do mosto Pinot Noir fermentado com *Candida valida* (amostra 4).

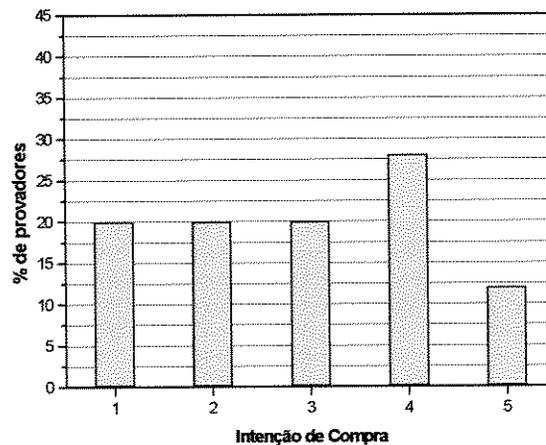


Figura 21 – Histograma da intenção de compra do mosto Chardonnay fermentado com *Candida valida* (amostra 5).

1=certamente compraria, 2= provavelmente compraria, 3= tenho dúvida se compraria ou não, 4 = provavelmente não compraria e 5 = certamente não compraria.

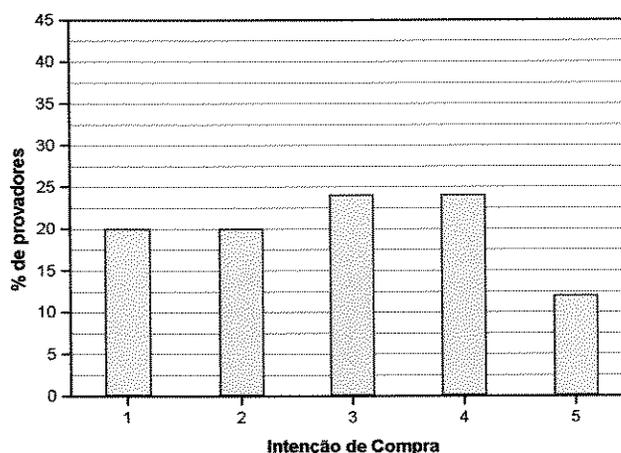


Figura 22 – Histograma de intenção de compra do Mosto Pinot Noir fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* (amostra 6). (1=certamente compraria, 2= provavelmente compraria, 3= tenho dúvida se compraria ou não, 4 = provavelmente não compraria e 5 = certamente não compraria)

As amostras 7 e 8 (Figuras 23 e 24) tiveram uma intenção de compra de 24% e 16 % de provadores para o conceito “provavelmente compraria”, respectivamente. Estas mesmas amostras tiveram intenção de compra de 20% e 44 % em relação ao conceito “provavelmente não compraria”, respectivamente.

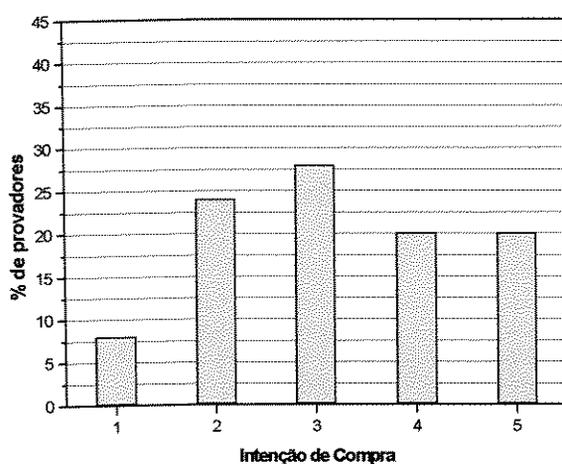


Figura 23 – Histograma da intenção de compra do mosto Chardonnay fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* (amostra 7)

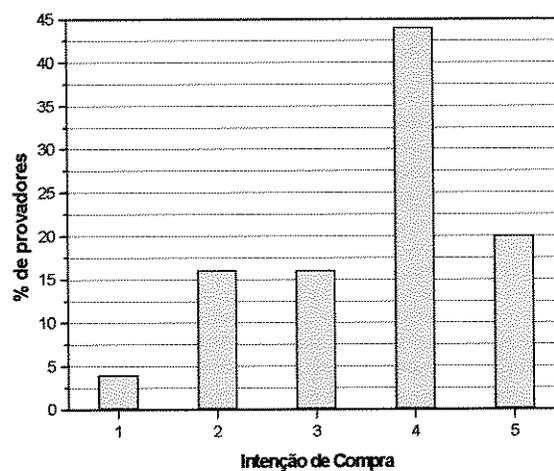


Figura 24 – Histograma da intenção de compra do mosto Pinot noir fermentado com *Kloeckera apiculata* (amostra 8).

1=certamente compraria, 2= provavelmente compraria, 3= tenho dúvida se compraria ou não, 4 = provavelmente não compraria e 5 = certamente não compraria.

7- CONCLUSÕES:

- 1) Em temperaturas de fermentação a 20 °C houve um maior crescimento das linhagens utilizadas representado pela concentração de massa celular seca do que a 15 °C.
- 2) A variação da massa seca das quatro linhagens utilizadas mostra que a *Saccharomyces cerevisiae* foi à linhagem que cresceu mais durante as 168 horas de fermentação, pois produziu a maior concentração de massa celular seca (MCS). Essa levedura produziu a maior quantidade de etanol entre as linhagens testadas. Embora a *Saccharomyces cerevisiae* tenha crescido mais que as outras leveduras, os mostos fermentados por esta levedura não tiveram uma boa aceitação quanto do seu aroma, no final de 168 horas de fermentação.
- 3) Os resultados de análise sensorial dos mostos fermentados a 15 °C mostram que as amostras que obtiveram a maior aceitação de aroma semelhante ao vinho espumante foram: *Pichia membranaefaciens* no mosto Pinot Noir (1), a *Pichia membranaefaciens* no mosto Chardonnay (2) e a *Kloeckera apiculata* no mosto Chardonnay (3). Estas amostras também tiveram a maior intenção de compra.
- 4) A primeira amostra (mosto Pinot Noir fermentado com *Pichia membranaefaciens*) e a segunda amostra (mosto Chardonnay fermentado com *Pichia membranaefaciens*) com maior aceitação apresentaram a mesma composição de compostos de aroma. As concentrações dos compostos majoritários de aroma isolados pelo “Dynamic Headspace” nestas amostras foram muito similares. Resultados compatíveis com os dados da análise sensorial, pois de acordo com o teste de Tukey estas amostras não diferiram entre si.
- 5) A terceira amostra (mosto Chardonnay fermentado com *kloeckera apiculata*) que obteve a maior aceitação apresentou menores concentrações de etanol e cresceu menos em comparação a primeira e a segunda amostra com maior aceitação. Embora a *Kloeckera apiculata* tenha tido o menor crescimento das quatro

leveduras estudadas, a maior concentração de álcool isoamílico foi produzido por ela.

- 6) A amostra que teve a menor aceitação (mosto Pinot Noir fermentado com *Kloeckera apiculata*) em comparação com a terceira amostra com maior aceitação (mosto Chardonnay fermentado com *Kloeckera apiculata*) apresentou concentrações similares dos compostos majoritários, com exceção do etanol. Provavelmente a baixa concentração de etanol impediu a volatilização dos compostos voláteis de aroma, e com isso a aceitação da amostra foi a menor.
- 7) Embora, a *Saccharomyces cerevisiae* seja comumente a levedura utilizada para produção de vinho espumante a *Pichia membranaefacies* mostrou melhor aceitação.
- 8) Através da extração por “Dynamic Headspace” foi isolado maior número de compostos de baixo ponto de ebulição como 1-propanol, 2-propanol, acetato de metila, acetato de butila, propionato de etila, propanal, butanal, 3-metil-butanal e isobutiraldeído, compostos os quais não foram detectados pela extração por solvente (líquido-líquido). Provavelmente estes compostos estavam em baixas concentrações ou o extrato sofreu perdas durante a extração. Dos 25 compostos isolados por esta técnica 17 foram tentativamente identificados. A identificação não foi maior devido à falta de padrões autênticos e também pela eluição e resolução dos picos da mistura de alcanos utilizada para cálculo do índice de Kovats.
- 9) Através da extração por solvente foram isolados 30 compostos voláteis, um número maior de compostos do que a extração por “Dynamic Headspace”. A grande parte dos voláteis isolados por esta técnica são compostos de ponto de ebulição intermediário a alto assim como o feniletanol, 1-heptanol, 1-decanol, benzaldeído, ácido láctico, ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido propanóico, ácido butanóico, caproato de etila e caprilato de etila, além de isômeros como o 2-

hexen-1-ol e o 3-hexen-1-ol. Dos 30 compostos isolados por esta técnica 18 foram tentativamente identificados.

8 – REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA:

ABRAMOV, SH. A.; KOTENKO, S. TS.; VLASOVA, O. K.; DAUDOVA, T. I. Yeast Strain *Saccharomyces vini* M-1 Intended for Producing Sparkling Rose Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(6), 560-562, 1995.

AMARANTE, J. O. A. – Vinhos e Vinícolas do Brasil: Guia Completo – Summus Editorial – S.P.- (1986).

AVEDOVECH, R. M.; JR.; McDANIEL, M. R.; WATSON, B. T.; SANDINE, W. E. (1992) An Evaluation of Combinations of Wine Yeast and *Leuconostoc oenos* Strains in Malolactic fermentation of Chardonnay Wine. *American Journal Enology and Viticulture*, 43(3), 253-260, 1992.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts identification PC Program*, Version 3. United Kingdom, 1994.

BEHRENS, J. H.; da SILVA, M. A. A. Perfil sensorial de vinhos brancos varietais brasileiros através de análise descritiva quantitativa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20(1):60-67, 2000.

BEHRENS, J. H.; da SILVA, M. A. A.; WAKELING, I. N. Avaliação da aceitação de vinhos brancos varietais brasileiros através de testes sensoriais afetivos e técnica multivariada de mapa de preferência interno. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(2): 214-220, 1999.

BENASSI, M. T.; DAMÁSIO, M. H.; CECCHI, H. M. Avaliação sensorial de vinhos Riesling Itálico nacionais utilizando perfil livre. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(3):265-270, 1998.

BERTONI, G. , BRUNER, F. LIBERTI, A.; PERRINO, C. Some critical parameters in collection, recovery and g as chromatographic analysis of organic pollutants in ambient air using light adsorbents. *Journal Chromatography*, 203, 263, 1981

BERTRAND, A. Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualit e des vins. *Colloque Soc. Fr. Microbiology*, Reims, 251-267, 1981.

BERTUCCIOLI, M.; VIANI, R. Red wine aroma: identification of headspace constituents. *Journal Science Food Agricultural*, 27, 1035-1038, 1976.

BLANCH, G. P.; REGLERO, G.; HERRAIZ, M. Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device. *Food Chemistry*, 56(4), 439-444, 1996.

BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F. & KUNKEE, R. E. – Principles and Practices of Winemaking – Davis – Editora Chapman & Hall (1996).

BROWN, R. H.; PURNELL, C. J. Collection and analysis of trace organic vapour pollutants in ambient atmospheres. *Journal Chromatography*, 178, 79, 1979.

CHATONNETY, P.; BUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. N.; PONS, M. The origin of ethyl phenols in wine. *Journal Science and Food Agriculture*, 60, 165-178, 1992

CHAUDHARY, S. S.; WEBB, A. D.; KEPNER, R. E. GLC Investigation of the Volatile Compounds in Extracts from Sauvignon Blanc Wines from Normal and Botrytised Grapes. *American Journal Enology and Viticulture*, 19(6), 6-12, 1968.

CIANI, M.; FERRARO, L. Combined use of immobilized *Candida stellata* cels and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 247-254, 1998.

CLIFF, M. A.; DEVER, M. C. Sensory and compositional profiles of British Columbia Chardonnay and Pinot noir wines. *Food Research International*, 29(3-4), 317-323, 1996.

EDWARDS, C. G.; BEELMAN, R. Extraction and analysis of volatile compounds in white wines using amberlite XAD-2 resin and capillary gas chromatography. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 38 (1), 216-220, 1990.

EDWARDS, C. G.; BEELMAN, R. B.; BARTLEY, C. E.; McCONNELL, A. L. (1990) Prediction of Decanoic Acid and Other Volatile Compounds and the Growth of yeast and Malolactic Bacteria During Vinification. *American Journal Enology and Viticulture*, 41(1), 48-56, 1990.

ESCOBAL, A.; IRIONDO, C.; LABORRA, C. Determination of volatile compounds in Txakoli wine from Biscay by gás chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 778, 225-234, 1997.

FLATH, R. A.; FORREY, R. R. Volatile components of papaya (*carica papaya*, L) solo variety. *Journal Agricultural and Food Chemsitry*, 25(1), 103, 1997.

FLEET, G. H. – Wine Microbiology and Biotechnology – 2ª edição – Switzerland – Harwood Academic Publishers (1994).

FRUTOS, M; SANZ, J.; CASTRO, M. Simultaneous distillation-extraction (SDE) method in qualitative and quantitative GC analysis of cheese volatile components. *Chromatographia*, 25, 861, 1988.

GARCÍA, D. D.; MAGNACHI, S.; REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *Journal High Resolution Chromatography*, 19, 257-262, 1996.

GARCÍA, D. D.; REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Investigations on wine bouquet componentes by solid-phase microextraction-capillary gás chromatography (SPME-CGC) using different fibres. *Journal High Resolution Chromatography*, 20, 665-668.

GARCÍA-JARES, C.; GARCÍA-MARTÍN, S.; CELA-TORRIJOS, R. Análisis of some highly volatile compounds of wine by means of purge and cold trapping injector capillary gas chromatography. Application to the differentiation of Rixas baixas Spanish white wines. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 764-768, 1995.

GONZALES-VIÑAS, M. A.; PEREZ-COELHO, M S.; SALVADOR, M. D.; CABEZUDO, M. D.; MARTIN-ALVAREZ, P.J. Changes in gas-chromatographic volatiles of young Arien wines during bottle storage. *Food Chemistry*, 56(4), 399-403, 1996.

IRANZO, J. F. U.; MAGAÑA, F. G.; VIÑAS, M. A. G. Evaluation of the formation of volatiles and sensory characteristics in the industrial production of white wines using different comercial strains os the genus *Saccharomyces*. *Food Control*, 11, 143-147, 2000.

JACKSON, R. S. – Wine Science: Principles and Applications. ACADEMIC PRESS – San Diego- USA, (1994).

JANÁK, J.; RUZICKOVÁ, J.; NOVÁK, J. Effect of water vapour in the quantitation of trace components concentrated by frontal gas chromatography on Tenax-GC. *Journal Chromatography*, 99, 689, 1974.

KREGER, V. R. The yeasts, **A taxonomic study**. Elsevier Science Publishers, Amesterdam, 1984.

LAMIKANRA, O.; GRIMM, C. C. & INYANG, I. D. Formation and occurrence of flavor components in Noble muscadine wine. *Food Chemistry*, 56(4), 373-376, 1996.

LEMA, C.; GRACÍA-JARES, C.; ORRIOLS, I.; ANGULO, L. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *American Journal Enological and Viticulture*, 47(2), 1996.

LEMARESQUIER, H. Inter-relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 4, 91-94, 1987.

LEONI, V.; PUCCETTI, G.; COLOMBO, R. J.; D'OVIDIO, A. M. The use of Tenax for extraction of pesticides and polychlorinated biphenyls from water. *Journal Chromatography*, 125, 399, 1976.

LONA, A. A. **Vinhos – Degustação, Elaboração e Serviço**, Editora Age Ltda., Porto Alegre, 151 p., 1996.

MAARSE, H.; VISSCHER, C. A.; WILLEMSSENS, L. C.; BOELENS, M. H. Volatile compounds in food: Qualitative and Quantitative data. Suppl. 4; TNO Biotechnology and Chemistry Institute: Zeist, The Netherlands, 1992.

MAICAS, S.; GIL, J.; PARDO, I.; FERRER, S. Improvement of volatile composition of wine by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International*, 32, 491-496, 1999.

MARGALITH, P.; SCHWARTZ, Y. Flavor and microorganisms. In: **Advances in Applied Microbiology**; Perlman, d., New York, Academic Press, 1970.

MARTÍNEZ, P.; VALCÁRCEL, M. J.; PÉREZ, L.; BENÍTEZ, T. Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeast during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. *American Journal Enology and Viticulture*, 49(3), 240-250, 1998.

MATEO, J. J.; JIMENEZ, M. HUERTA, T.; PASTOR, A. Contribution of different yeast isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 153-160, 1991.

MATHEIS, G. The biogenesis of wine flavor. Dragogo Flavor Information Service, report. 37, 72-89, 1992.

MEILGAARD, G. K.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. I. **Sensory evaluation of foods:** marketing and R & D approaches. Westport: food & Nutrition Press, 1983.

NELSON, R. R. ACREE, T. E.; BUTTS, R. M. Isolation and identification of Volatiles from Catawba Wine. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 26(5), 1188-1190, 1978.

NIELSEN, J. C.; RICHELIEU, M. Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 740-745, 1999.

NOBLE, A. C. Analysis of food and beverages, Headspace Techniques", Academic Press, New York, (1978).

NOBLE, A. C.; FLATH, R. A.; FORREY, R. R. Wine Headspace Analysis. Reproducibility and Application to Varietal Classification. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 28, 346-353, 1980.

OVERTON, V. & MANURA, J. J. - Identification of Volatile Organics In Wines Over Time. <http://www.sisweb.com/reference/applnote/ap17-a.htm>, 20/03/2000.

PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; YANG, T. S.; PARK, Y. K.; MIN, D. B. Production of fruit aroma by newly isolated yeast. *Biotechnology Letters*, 16 (4), 389-392, 1994.

PINA, C. G.; HOGG, T. A. Microbial and chemical changes during the spontaneous ensilage of grape pomace. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 777-784, 1999.

RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. **Analisis de vinos** – Ácido sulfuroso. Aguilar-Madrid, 2ª edição. 310-322 (1958).

RIBÉREAU-GAYON, P.; BOIDRON, J. N.; TERRIER, A. Aroma of Muscat Grape Varieties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1041-1047, 1975.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; ZANUZ, M. C. Composição química de alguns vinhos espumantes brasileiros. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (1), 25-32, 1994

ROMANO, P.; SUZZI, G.; TURBANTI, L.; POLSINELLI, M. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 118, 213-218, 1994.

ROSILLO, L.; SALINAS, M. R.; GARIJO, J.; ALONSO, G.L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. *Journal of Chromatography A*, 847, 155-159, 1999.

SALINAS, M. R. ALONSO, G. L.; ESTEBAN-INFANTES, F. J. Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to the determination of wine aromas. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1328-1331, 1994.

SCHREIER, P. Flavor Composition of Wines: A REVIEW. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59-111, 1979.

SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; JUNKER, A. Identification of volatile constituents from grapes. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 24(2), 331-336, 1976.

SHARMA, S.; TAURO, P. Control of ethanol production by yeast role of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. *Biotechnological Letters*, 8, 735-738, 1986.

SHINOHARA, T.; WATANABE, M. Gas chromatographic analysis of higher alcohols and ethyl acetate in table wines. *Agricultural Biological Chemistry*, 40(12), 2475-2477, 1976.

SOUZA, J. A.; ARRUDA, C. J. S. **Guia dos vinhos brasileiros**. São Paulo: Market Press, 2001.

STASHENKO, H.; MACKU, C.; SHIBAMATO, T. Monitoring Volatile Chemicals Formed from Must during Yeast Fermentation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2257-2259, 1992.

STEVENS, K. L.; BOMBEN, J.; LEE, A.; McFADDEN, W. H. Volatiles from Grapes. Muscat Alexandria. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 14(3), 249-252, 1966.

STONE, H. J.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. London: Academic press, 1993.

UDÉ, L.; MOULIN, J. P. BARBEROT, M. THUILLIER, B DANZART, M.; TRECOURT, P. Mise au point d'une méthode d'analyse sensorielle des champagnes. *Science Aliments*, 4, III, 111-116, 1984.

UVIBRA (União Brasileira de Vitivinicultura) – Comercialização de vinhos e derivados de 1989-1999 – Mercado Externo e Interno. Bento Gonçalves – 2000.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471, (1963).

VANNIER, A.; BRUN, O. X. B.; FEINBERG, M. H. Application of sensory analysis to champagne wine characterization and discrimination. *Food Quality and Preference*, 10, 101-107, 1999.

VESES, E. C. – As uvas e os vinhos – 1ª edição. São Paulo - Editora: Globo S. A. (1988).

VIANI, R.; BERTUCCIOLI, M. Red Wine: Identification of headspace constituents. *Journal Science Food Agricultural*, 27, 1035-1038, 1976.

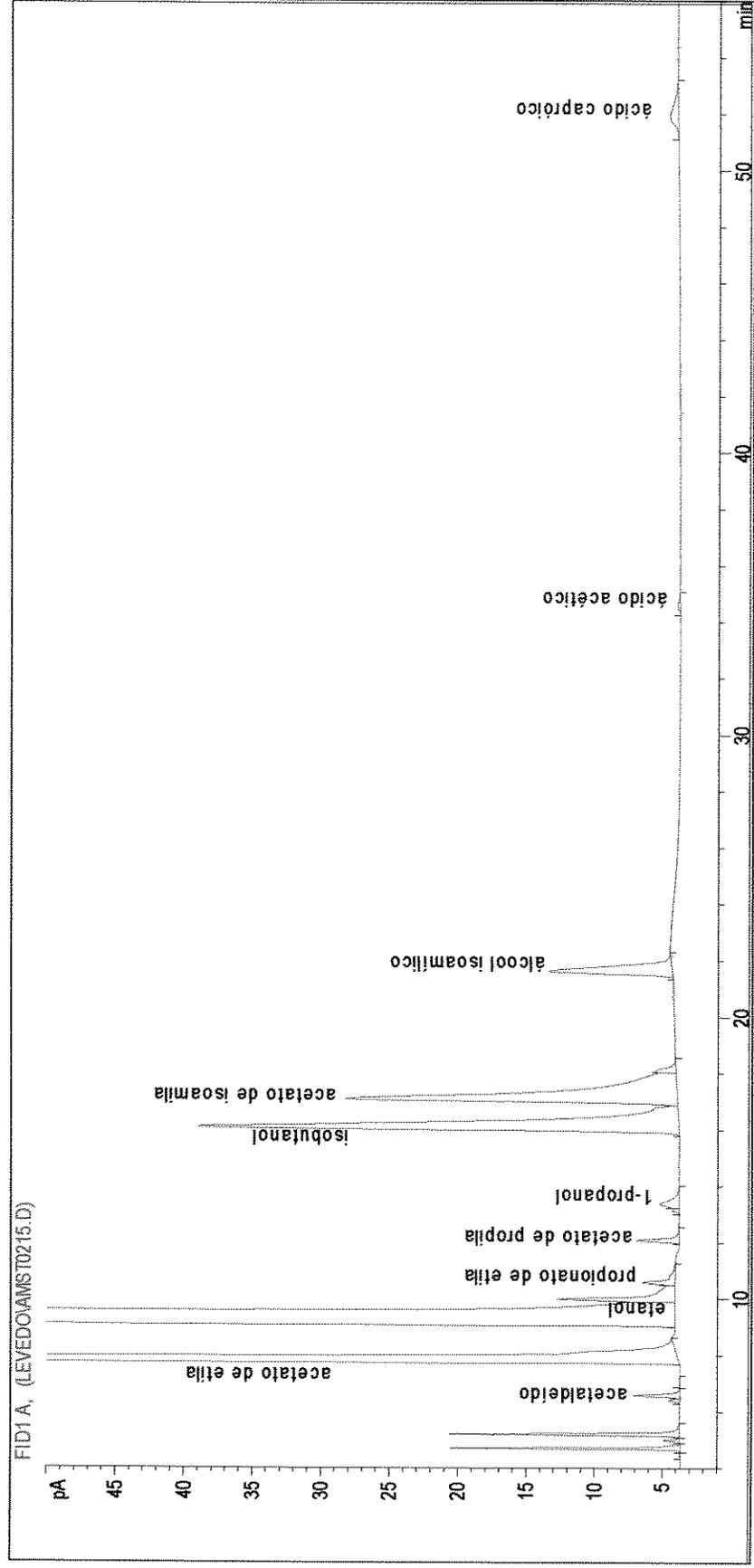
VLASOVA, O. K.; ABRAMOV, Sh. A.; DAUDOVA, T. I.; BEZZUBOV, A. A.; EGOROV, I. A.; RODOPULO, A. K. Aroma forming substances of roses sparkling wines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 31, 470-472, 1995.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages: a review. *Journal Inst. Brewing*, 82, 84-92, 1976.

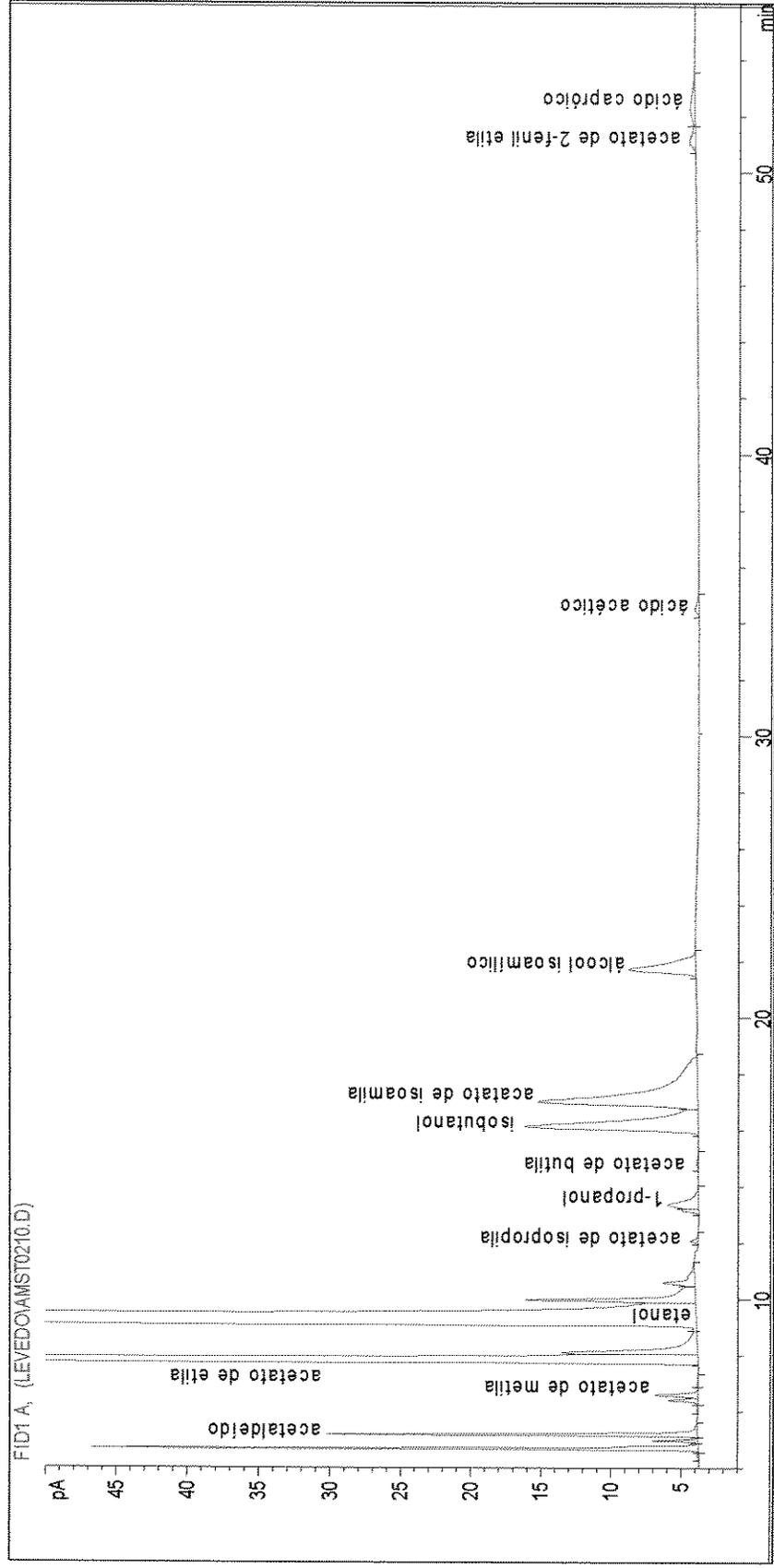
YANG, X.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1925-1930, 1994.

ANEXO 1 – Cromatograma dos compostos identificados pela extração “Dynamic Headspace”.

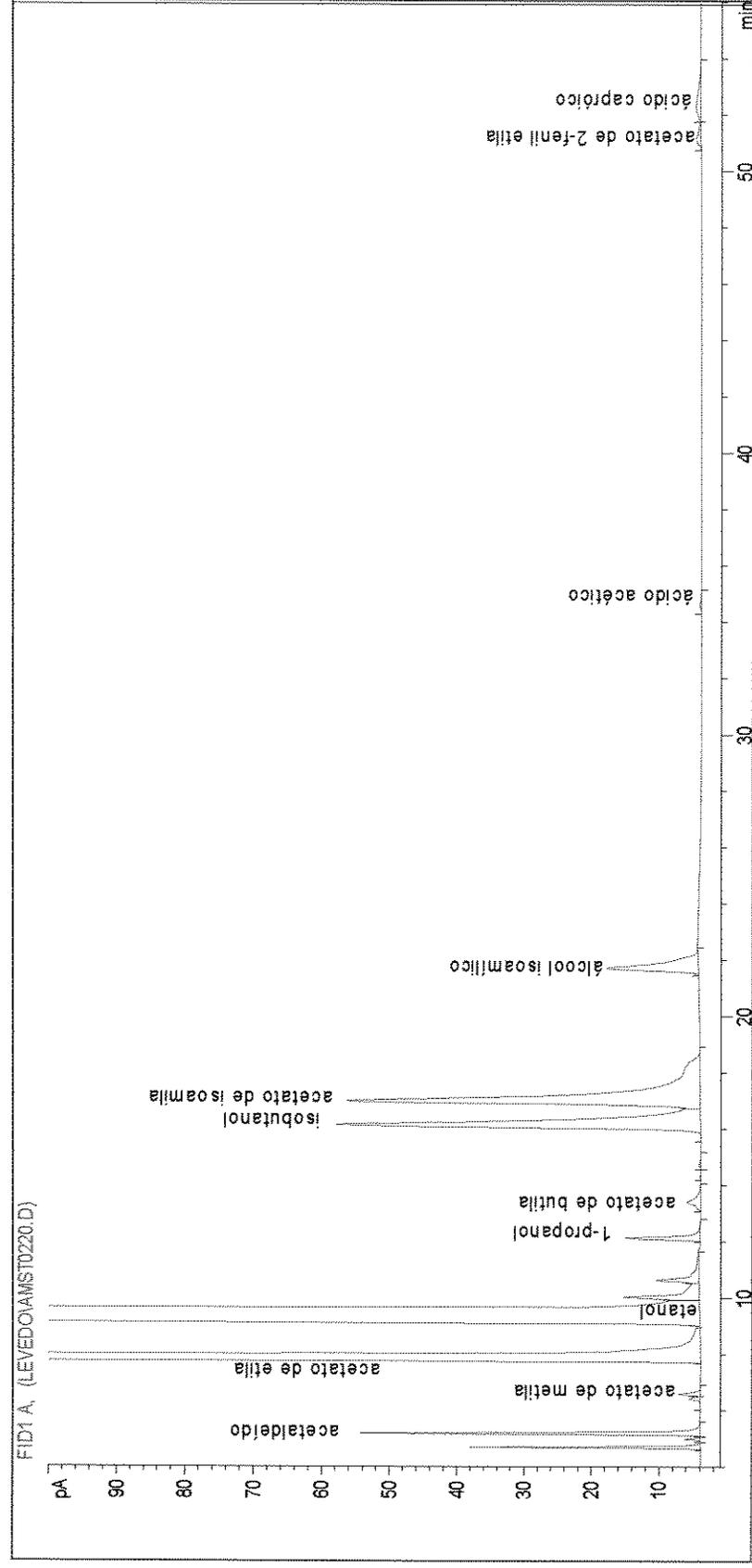
Compostos identificados nos mostos após 168 horas de fermentação pela levedura *Kloeckera apiculata*.



Compostos identificados nos mostos após 168 horas de fermentação pela levedura *Candida valida*.



Compostos identificados nos mostos após 168 horas de fermentação pela levedura *Pichia membranefaciens*.



Compostos identificados nos mostos após 168 horas de fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

