



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

**CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DO PERFIL
VOLÁTIL DE VINHOS ESPUMANTES BRASILEIROS
ELABORADOS COM UM *ASSEMBLAGE* INOVADOR
SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
SEGUNDA FERMENTAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Schwertner Palma

Porto Alegre

2014



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

**CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DO PERFIL VOLÁTIL DE VINHOS
ESPUMANTES BRASILEIROS ELABORADOS COM UM *ASSEMBLAGE*
INOVADOR SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE SEGUNDA
FERMENTAÇÃO**

Aline Schwertner Palma

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

Orientador: Prof. Dr. Vitor Manfredi

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

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Schwertner Palma, Aline

CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DO PERFIL VOLÁTIL DE VINHOS ESPUMANTES BRASILEIROS ELABORADOS COM UM ASSEMBLAGE INOVADOR SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE SEGUNDA FERMENTAÇÃO / Aline Schwertner Palma. -- 2014.

83 f.

Orientador: Vitor Manfroi.

Coorientadora: Claudia Alcaraz Zini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. vinho espumante. 2. HS-SPME. 3. compostos voláteis. 4. leveduras. 5. análise de cluster . I. Manfroi, Vitor, orient. II. Alcaraz Zini, Claudia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DO PERFIL VOLÁTIL DE
VINHOS ESPUMANTES BRASILEIROS ELABORADOS COM UM
ASSEMBLAGE INOVADOR SUBMETIDOS A DIFERENTES
CONDIÇÕES DE SEGUNDA FERMENTAÇÃO**

Aline Schwertner Palma

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

(PPGCTA)

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

Aprovada em:

Homologada em:

Pela Comissão Examinadora:

Por:

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Orientador - PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech
Coordenadora do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos PPGCTA

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

Prof. Dra. Neidi Garcia Penna
Banca - PPGCTA/UFSM

Prof. Dra. Juliane Elisa Welke
Banca - PPGCTA/UFRGS

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente, com ações ou palavras de incentivo e que tornaram possível a execução deste trabalho, especialmente:

Aos meus amados pais, Elizabeth e Elvio Palma, que sempre me incentivaram a seguir estudando e entenderam todas as minhas ausências. Gostaria de agradecer pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicional. A vocês, minha eterna gratidão.

A minha irmã, Juliane Palma, pelo incentivo, amor e presença neste e em todos os momentos.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização do mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos a mim concedida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Manfroi, pela confiança e apoio dados durante estes dois anos de mestrado.

A minha co-orientadora, Prof.^a Dra. Claudia Zini, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, pela paciência e auxílio que vieram a contribuir para a minha formação e que foram fundamentais na elaboração deste trabalho.

Ao enólogo Alejandro Cardozo diretor técnico da Piagentini, que cedeu os vinhos espumantes para a realização deste trabalho.

Ao Gustavo Costa, que sempre me recebeu e esteve disposto a me auxiliar em todas as minhas dúvidas e também pelos ensinamentos que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A Janaína Aith Barbará, pelas conversas, informações, treinamento no uso de HS-SPME e do GC/MS, e auxílio que foram fundamentais na realização das análises.

Aos meus amigos, Claudia Romero, Luiza Lena, Diego Andrade, Izabelle Gindri, Daiana Ávila e Cristina Rodrigues pelo apoio, amizade, contribuições e presença constante.

À banca examinadora, por terem aceitado o convite a fim de contribuir com meu trabalho.

RESUMO

Os vinhos espumantes elaborados pelo método Tradicional são elaborados, comumente, a partir das uvas Chardonnay, Pinot Noir, Chadonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano e Pinot Noir e os componentes voláteis destes espumantes já têm merecido a atenção de diversos estudos científicos. Entretanto, vinhos espumantes produzidos a partir de outros varietais de uvas ainda não foram alvo de pesquisas científicas. A segunda fermentação ocorre dentro da garrafa e acaba por conferir uma maior complexidade aromática ao espumante produzido pelo método Tradicional, devido ao contato do vinho com as leveduras em meio redutor, por um determinado período de tempo. Isto acontece devido aos produtos secundários do metabolismo das leveduras, durante a conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono. Esta conversão depende dos nutrientes adicionados, chamados adjuvantes de fermentação, bem como da espécie de levedura utilizada, visto que cada levedura possui um metabolismo diferente para a utilização dos nutrientes e açúcares presentes no vinho base. Assim, objetivou-se, neste trabalho, caracterizar os componentes voláteis de vinhos espumantes de uma vinícola gaúcha, que emprega um *assemblage* inovador, empregando uvas Chadonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano e Pinot Noir. Do *assemblage* deste vinho base utilizou-se, para segunda fermentação, duas espécies de leveduras comerciais: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus*. Para cada levedura utilizada na fermentação do vinho base, oito diferentes adjuvantes de fermentação foram empregados. A determinação dos compostos voláteis se deu através da técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-

SPME) e cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa quadrupolar (GC/MS). Ao total, 25 compostos foram tentativamente identificados nos vinhos em estudo, sendo os compostos majoritários citados a seguir, com sua possível contribuição para o aroma destes vinhos: octanoato de etila (aroma de fruta), álcool isoamílico (aroma de banana), ácido octanoico (aroma de pimentão) e álcool fenilético (aroma floral). O fenetil fenilacetato, um dos compostos minoritários tentativamente identificado em alguns dos vinhos, até então não reportado em vinho espumante, é associado a aroma frutado. Não foi possível distinguir subgrupos entre os 16 vinhos em estudo, provenientes de diferentes condições na segunda fermentação, quando as áreas cromatográficas dos compostos voláteis destes 16 vinhos foram submetidas a análise de cluster. Isto implica em que, nas condições experimentais deste estudo, não foi possível distinguir os voláteis dos vinhos fermentados (2ª fermentação) com *S. cerevisiae* e os fermentados com *S. bayanus*. A mesma análise de *cluster* mostrou a subdivisão dos compostos voláteis dos 16 vinhos em dois grupos, os quais se distinguiram, provavelmente, devido aos diferentes adjuvantes nutricionais empregados: fosfato e Thiazote. Desta forma, através de análise qualitativa por HS-SPME-GC/MS, foi possível verificar a homogeneidade do perfil volátil dos 16 vinhos espumantes, obtidos a partir de diferentes adjuvantes de fermentação e duas espécies distintas de leveduras *Saccharomyces* sp, além de comparar os componentes voláteis presentes nestes espumantes com aqueles reportados na literatura para outros vinhos espumantes.

Palavras chaves: vinho espumante, adjuvantes, leveduras, compostos voláteis, voláteis, microextração em fase sólida, HS-SPME, análise de cluster (HCA).

ABSTRACT

Sparkling wines elaborated by Traditional Method are usually produced by the grapes Chardonnay, Pinot Noir and Riesling, in which the volatile compounds of these sparkling wines have been calling attention to scientific studies. However, sparkling wines produced by other varietal grapes have not been a target of scientific research yet. The second fermentation occurs inside the bottle, in which confer a greater aromatic complexity to the sparkling wine produced by Traditional Method, due to the contact of it with lees in a reducing medium during a certain period of time. This happens due to secondary products of yeast metabolism, during the conversion of sugar in ethanol and carbon dioxide. This conversion depends on the nutrients added, called fermentation adjuvants, as the yeast used, since each one has a different metabolism for using this nutrients and sugars presented in the base wine. Thus, this work aims to characterize the volatile compounds of a south Brazilian winery, which use an innovative *assemblage*, using the grapes Chardonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano and Pinot Noir. To the base wine, two different commercial yeasts were added: *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* to the performance of second fermentation. To each yeast used for fermenting the base wine, eight different fermentation adjuvants were used. The determination of volatile compounds were performed by Headspace solid-phase Microextraction (HS-SPME) and gas chromatography coupled to a mass quadrupole spectrometry (GC/MS). In total, 25 compounds were tentatively identified in the studied sparkling wines, being the majority listed as it follows, with their possible contribution to these sparkling wines aroma: ethyl octanoate (fruity), isoamyl alcohol (banana), octanoic acid (green pepper), and phenethyl alcohol (flower).

Phenethyl phenylacetate, one of the minority compounds tentatively identified in some of the sparkling wines, is associated with fruity aroma. It was not possible to distinguish subgroups from different conditions during the second fermentation, when submitting the chromatographic areas of volatile compounds to cluster analysis. It implies that, under the experimental conditions of these study, it was not possible to differ the volatile compounds of the fermented (2nd fermentation) with *S. cerevisiae* and those which were fermented with *S. bayanus*. The same cluster analysis showed a subdivision of volatile compounds of the 16 wines in two groups, in which were probably distinguished due to the different nutritional adjuvants used: phosphate and Thiazote. Thus, throughout qualitative analysis by HS-SPME-GC/MS, it was possible to verify the homogeneity of volatile profile of the 16 sparkling wines, obtained by different fermentation adjuvants and two different yeast species of *Saccharomyces* sp, besides the comparison of volatile compounds presented in these sparkling wines with those others reported in the literature.

Keywords: sparkling wines, nutrients, yeasts, volatile compounds, volatiles, solid phase Microextraction, HS-SPME, cluster analysis.

LISTA DE ABREVIACÕES E UNIDADES UTILIZADAS

CLSA: extração e análise em ciclo fechado (do inglês, *closed-loop stripping analysis*).

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

GC/MS: Cromatografia gasosa monodimensional acoplada à detecção por espectrometria de massa quadrupolar (do inglês, *one-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection*). **HS-SPME:** Microextração em fase sólida no modo *headspace* (do inglês, *headspace solid phase micro extraction*).

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

LTPRIcal: Índice de retenção com programação linear de temperatura calculado experimentalmente.

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

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

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

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

°GL: Graus Gay Lussac.

g L⁻¹: gramas por litro.

hL: hectolitro.

g hL⁻¹: gramas por hectolitro

meqL⁻¹: miliequivalente por litro.

mg L⁻¹: miligramas por litro.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMENTOS | 5 |
| RESUMO | 6 |
| LISTA DE ABREVIACÕES E UNIDADES UTILIZADAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS E FIGURAS | 12 |
| APRESENTAÇÃO | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 3.1 VINHO ESPUMANTE | 17 |
| 3.2.COMPOSTOS VOLÁTEIS RELACIONADOS AO AROMA DE VINHOS ESPUMANTES | 20 |
| 3.3.LEVEDURAS | 23 |
| 3.4 NUTRIÇÃO E METABOLISMO DAS LEVEDURAS | 28 |
| 3.5.TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS DE VINHO | 30 |
| 3.6.CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS | 32 |
| 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 34 |
| 3.7.1 <i>ANÁLISE DE CLUSTER</i> | 34 |
| 3.7.2 <i>Análise de fisher</i> | 36 |
| ARTIGO | 46 |
| CONCLUSÕES | 77 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação dos vinhos espumantes segundo a legislação brasileira (em gramas por litro)..... | 18 |
| Figura 1. Esquema representativo da formação dos compostos oriundos da fermentação pela levedura <i>Saccharomyces</i> sp..... | 20 |
| Artigo | |
| Table 1. Physicochemical data of base wineand base wine after acidity and sugar correction..... | 49 |
| Table 2. Treatments according to nutrients, fermentation activators and commercial yeasts added to the base wine..... | 50 |
| Table 3. Physicochemical data of evaluated parameters within the 16 treatments of sparkling wines fermented by Classical Method with two different <i>Saccharomyces</i> sp. yeasts submitted to different nutritional supplements..... | 54 |
| Table 4. Compounds tentatively identified in the headspace of sparkling wines using gas chromatography with mass spectrometric detection and the stationary phases ZB-5MS and DB-WAXetr column..... | 56 |
| Table 5. Chromatography area percentage of compounds tentatively identified in the headspace of 16 sparkling wines produced with two different species of <i>Saccharomyces</i> sp. in the second fermentation stage and with eighth different nutritional adjuvants. Chromatographic conditions are described in item Materials and Methods / Chromatographic Conditions..... | 57 |
| Table 6. Contribution of the parameters for the main loadings, eigenvalues and their variance components, evaluating the 16 sparkling wines..... | 62 |
| Figure 1. PC1 vs. PC2 scatter plot of the eleven compounds with an area bigger than 1% of total chromatogram on all sixteen sparkling wines treated by different nutritional adjuvants and two types of <i>Saccharomyces</i> sp. yeasts in the planes defined by the principal components, having assessed the volatile compounds from the headspace of the sparkling wine..... | 67 |

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na dissertação de Mestrado intitulada “*CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DO PERFIL VOLÁTIL DE VINHOS ESPUMANTES BRASILEIROS ELABORADOS COM UM ASSEMBLAGE INOVADOR SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE SEGUNDA FERMENTAÇÃO*” do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a ser apresentada em 30 de janeiro de 2014. O trabalho é apresentado em três partes, na ordem que segue:

1. Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos
2. Artigo
3. Conclusões e Considerações Finais.

1. INTRODUÇÃO

Vinhos espumantes podem ser produzidos por três métodos: método tradicional ou *Champenoise*, Charmat e Moscatel. O método tradicional envolve duas fermentações: a primeira, em que o mosto é transformado em vinho base, e a segunda, na garrafa, que dá origem a um vinho espumante depois de vários meses de maturação na presença de leveduras (FLANZY, 2000; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ e PUEYO, 2009).

No Brasil, a elaboração dos primeiros vinhos espumantes começou a partir da segunda década do século XX, no estado do Rio Grande do Sul (RS), mais precisamente no município de Garibaldi, localizado na região hoje denominada Serra Gaúcha. Quase um século depois, os espumantes da Serra Gaúcha ganharam reputação no mercado nacional e reconhecimento de especialistas internacionais (ABE, 2014; CONCOURS MONDIAL, 2014; SLUSZZ e PADILHA 2008), os quais destacam que a Serra Gaúcha é considerada uma das quatro melhores regiões do mundo para a produção de vinho espumante pelo método tradicional, precedida do Champagne francês, Franciacorta Italiano e do CAVA espanhol.

Alguns vinhos espumantes brasileiros têm sido agraciados com prêmios em diversos concursos internacionais, como por exemplo o vinho espumante Aurora Moscatel, da vinícola Aurora, que conquistou no Vinandino 2013, XI edição do Concurso Internacional de Vinhos e Bebidas Espirituosas de Origem Vínico (o mais importante da sua categoria na América do Sul). Neste mesmo concurso o espumante Conde de Foucauld Brut ficou com a medalha de prata. O Vinandino aconteceu em Mendoza e San Juan e contou com a participação de 750 amostras de 18 países. Já no concurso Effervescents du Monde, que premia os melhores espumantes do mundo, os vinhos espumantes Aurora Brut Chardonnay e Marcus James Brut obtiveram medalha de prata. Essa edição foi realizada em Dijon (França), entre os dias 13 e 15 de novembro com a participação de mais de 28 países e aproximadamente 600 amostras. Da mesma forma, o vinho espumante *Monte Paschoal Espumante Moscatel*, produzido por Basso Vinhos e Espumantes Ltda, o qual é apontado como ganhador de

medalha de ouro pelo 6th Brazilian International Wine Competition, bem como o *Calza Espumante Tradicional Brut*, produzido por Calza Júnior Indústria e Comércio de Vinhos Ltda, e *Giuseppe Garibaldi Espumante Brut*, produzido pela Cooperativa Vinícola Garibaldi Ltda., também ganhadores de medalha de ouro neste concurso que teve a participação de vários países reconhecidos mundialmente pela qualidade de seus vinhos.(ABE, 2012). O vinho espumante Moscatel da Panizzon bebidas, produzido por uvas moscato bianco foi ganhador da medalha de prata no Vinitaly de 2014. Este evento internacional de vinhos reúne profissionais que apresentam o melhor da produção vinícola mundial e local anualmente, realizado em Verona, na Itália (VINITALY, 2014).

Vários fatores influenciam positivamente na qualidade do vinho espumante da Serra Gaúcha, dentre eles, o clima, as diferentes variedades de uvas empregadas, as distintas técnicas de produção vitícola e enológica, nas diferentes regiões (TONIETTO, 2013a; TONIETTO, 2013). Neste contexto, as empresas do setor têm se tornado produtoras de grande variedade de opções de espumantes.

O valor agregado ao vinho espumante se deve, como ocorre também em outros vinhos, pela combinação de suas propriedades sensoriais, sendo o desprendimento de dióxido de carbono um fator que os diferencia dos demais vinhos. Dentre as características sensoriais está a perlage (bolhas de dióxido de carbono desprendidas durante a abertura da garrafa), aroma agradável, representado pelo *bouquet*, e coloração (Rizzon et al., 2008; Stefenon, C.A., 2012). Segundo Swiegers (2005, apud SCHREIER 1979; apud ETIÉVANT 1991; apud GUTH 1998), Rapp (1998), Lambrechts e Pretorius (2000) e Romano et al. (2003), a análise dos compostos voláteis é um aspecto de grande importância, visto que os mesmos são uma característica vital para a qualidade dos vinhos espumantes sob o ponto de vista da aceitação do produto pelo consumidor. O conhecimento dos compostos voláteis presentes no espaço confinado acima da bebida, definido como *headspace* (SNOW, N.H., 2002), pode auxiliar no aprimoramento do processo de vinificação através da escolha de leveduras que confirmam aroma superior ao vinho, na elucidação de mecanismos de reações químicas e bioquímicas que ocorrem durante as etapas da vinificação, bem como no controle da qualidade destes vinhos e na certificação da mesma.

Constituintes que influenciam o aroma e o *flavor* de vinhos têm sido investigados nas últimas décadas e trabalhos de revisão a este respeito listam centenas de substâncias voláteis detectadas em diferentes vinhos. O termo *flavor* se refere aos efeitos de sabor e aroma, onde o aroma é diretamente ligado ao odor dos compostos voláteis, enquanto o sabor é oriundo de interações mais complexas de componentes voláteis e não-voláteis, resultantes da fermentação e maturação do vinho espumante junto às borras de leveduras (AMERINE, 1965). A importância específica de compostos voláteis derivados da fermentação responsáveis pelo aroma e seus efeitos na qualidade do vinho também tem sido estudada extensivamente (SIMPSON E MILLER 1984, AMERINE E ROESSLER, 1976; WEBB e INGRAHAM 1972, ROMANO, 2003; WELKE et al., 2012). O tipo de levedura empregado influencia o aroma e o estado nutricional das leveduras também é um aspecto importante no perfil de compostos voláteis, sendo dependente dos adjuvantes de fermentação utilizados no processo (LAMBRECHTS AND PRETORIUS 2000; SWIEGERS et al. 2006).

A investigação da identidade destas substâncias voláteis presentes no vinho é crucial para o entendimento da complexidade do aroma do vinho e possibilita o aprimoramento do processo de fermentação (diferentes tipos de leveduras, adjuvantes, temperatura, tempo de contato com as leveduras, etc), com base no perfil de compostos voláteis desejáveis no mesmo. Várias técnicas de extração e análise têm sido empregadas para estes estudos e dentre estas a micro-extração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME, do inglês *headspace solid phase micro extraction*), juntamente com a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC/MS, do inglês *gas chromatography with mass spectrometric detection*) têm sido largamente empregadas para este tipo de estudo (FRANCIOLI, S. et al., 1999; FRANCIOLI, S. et al, 2003.; FUSTÉ, B., et al., 2007; ZELLNER, B., et al, 2008)

Assim, devido à produção crescente de vinhos espumantes brasileiros de qualidade no Rio Grande do Sul e também devido à escassez de informação sobre os mesmos, estudos científicos são necessários para que se possa avançar no conhecimento a respeito destes espumantes, bem como no seu aprimoramento e controle de sua qualidade. Dentre os vinhos espumantes ganhadores de prêmios está o espumante Gran Reserva Brut utilizado neste estudo, o qual foi premiado no concurso “The wine competition”, realizado em

Ljubllana, Eslovênia, bem como no VI Concurso Internacional de Vinhos do Brasil (ABE, 2012; DECIMA, 2012). Este espumante é produzido a partir de um assemblage inovador, que utiliza uvas Chadonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano e Pinot Noir, as quais lhe conferem características peculiares. Ressalta-se que não existem publicações científicas sobre vinho espumante que inclua a varietal Viognier (ANTONELLI et al., 1999; CASASSA et al., 2012)

Neste contexto, o uso de diferentes leveduras e nutrientes para a fermentação de vinhos espumantes é um aspecto importante para o aprimoramento da qualidade do produto final. Sendo assim, o presente trabalho investigou qualitativamente os componentes voláteis de vinhos espumantes produzidos a partir do assemblage acima citado, cujo vinho base foi produzido na Vinícola Piagentini, localizada na Serra Gaúcha, sendo a segunda fermentação realizada com duas espécies de leveduras *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus*), bem como com diferentes adjuvantes nutricionais.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Caracterizar qualitativamente os vinhos espumantes provenientes de segunda fermentação (método Tradicional), a qual será conduzida com oito adjuvantes nutricionais distintos e duas espécies diferentes de leveduras *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* e *S. bayanus*), sendo o vinho da primeira fermentação elaborado pela vinícola Piagentini da serra Gaúcha, a partir de assemblage de uvas Chadonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano e Pinot Noir.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1º Avaliar parâmetros físico-químicos, como etanol, açúcar residual, acidez fixa (total) e volátil destes vinhos espumantes.

2º Investigar a presença e identidade de componentes voláteis no *headspace* destes vinhos espumantes empregando-se HS-SPME-GC/MS.

3º Comparar o perfil de compostos voláteis dos vinhos em investigação com relatos prévios da literatura científica a respeito de compostos voláteis de vinhos espumantes elaborados com *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, bem como de vinhos produzidos a partir das uvas varietais empregadas.

4º Verificar a existência de semelhanças e diferenças entre os compostos voláteis dos vinhos espumantes obtidos a partir dos 16 tratamentos (oito tratamentos para cada tipo de levedura) durante a segunda fermentação, bem como possíveis implicações resultantes destas semelhanças e diferenças na qualidade do vinho e do processo de segunda fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 VINHO ESPUMANTE

Segundo a Portaria nº 55, de 27 de julho de 2004 do Ministério da Agricultura, o vinho espumante natural é o vinho cujo anidrido carbônico é resultante unicamente da sua própria fermentação alcoólica natural, seja de uma segunda fermentação alcoólica do vinho, em garrafa ou recipiente grande, com graduação alcoólica de 10 (dez) a 13° GL (Gay Lussac), a 20° (vinte graus centígrados) e à pressão mínima de 4 (quatro) atmosferas (BRASIL, 2004). Ainda, segundo a legislação brasileira, os vinhos espumantes podem ser classificados de acordo com o teor de açúcar. A **Tabela 1** mostra esta classificação dos vinhos espumantes em gramas por litro (g L^{-1}) (BRASIL, 2004).

O procedimento para a produção de vinhos espumantes dá-se por três métodos: o tradicional, realizado em garrafas (também conhecido como Método Champenoise), o que se processa em tanques de pressão (Método Charmat), e o processo Moscatel, que ocorre também em tanques, mas em uma única etapa de fermentação, diferentemente dos dois primeiros (FLANZY, 2000).

Nos métodos Tradicional e Charmat, a primeira fermentação transforma o mosto da uva em vinho base. A essência do método Tradicional, utilizado neste estudo, é a segunda fermentação. Nesta re-fermentação do vinho base são adicionados açúcar e leveduras, que vão ocasionar um aumento do conteúdo de álcool e da pressão interna da garrafa em 5 a 7 atmosferas. Após esta re-fermentação, o vinho espumante é deixado em contato com as leveduras por um período determinado pelo enólogo e de acordo com a legislação local (ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006; HIDALGO et al., 2004).

As leveduras comerciais destinadas a primeira e segunda fermentação alcoólica são diferentes. Para a primeira fermentação, são selecionadas leveduras que proporcionem uma fermentação de alta velocidade relativamente à segunda fermentação, também são selecionadas leveduras que estão relacionadas a outras propriedades tecnológicas, como uma maior tolerância a altas concentrações de etanol (até 13°GL e pelo menos 10% (v/v)), capacidade de crescimento e fermentação do vinho a pressões elevadas (5 a 6 atmosferas), habilidades de aglutinação e floculação (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2001),

bem como por sua capacidade autólítica e pela habilidade de influenciar a qualidade do perlage (borbulhas de gás carbônico que se formam quando o vinho espumante é servido) (ALEXANDRE e BENATIER, 2006).

Tabela 1. Classificação dos vinhos espumantes de acordo com o teor de açúcar, segundo a redação dada pela Lei nº 10.970, de 2004 (BRASIL, 2004).

| Vinho Espumante / Teor de Açúcar | Máximo (g L ⁻¹) | Mínimo (g L ⁻¹) |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| EXTRA-BRUT | 5 | 0 |
| BRUT | 15 | 5,1 |
| SECO | 20,0 | 15,1 |
| DEMI SEC | 60,0 | 20,1 |
| DOCE | - | 60,1 |

De acordo com BAUTISTA et al. (2007), uma vez que a fermentação termina, as borras de leveduras liberam diversas substâncias no vinho, que junto aos voláteis formados durante a vinificação, influenciam o balanço complexo de aromas e melhoram a sua qualidade. Este mesmo processo ocorre em vinhos espumantes. Assim, o período de permanência do vinho espumante junto às leveduras é uma etapa estratégica, que enriquece as características sensoriais do vinho, bem como melhora sua estabilidade. Isto se deve principalmente à presença de compostos como ácidos graxos (que, uma vez liberados, podem estar envolvidos na formação de ésteres, aldeídos e outros compostos voláteis), nucleotídeos, nucleosídeos, aminoácidos, peptídeos, manoproteínas e polissacarídeos (estes últimos aumentam a fineza e persistência da perlage) que são liberados durante a autólise das leveduras (BARRIO-GALÁN et al., 2011; FEUILLAT, 2003, SALMON et al., 2002).

A autólise das leveduras pode ser definida como a auto-degradação de constituintes celulares de uma célula pelas suas próprias enzimas, seguida da morte celular. Este processo ocorre com a hidrólise de biopolímeros, a exemplo de proteínas e polipeptídeos, sob ação de enzimas hidrolíticas que liberam os componentes citoplasmáticos (peptídeos, lipídeos, aminoácidos, ácidos graxos

e nucleotídeos) e da parede celular (glucanos e manoproteínas) no vinho. Geralmente, a autólise ocorre no final do crescimento estacionário, que acontece devido à diminuição de nutrientes disponíveis no meio, fazendo-as cessar o crescimento e entrar em um estado não-proliferativo, geralmente associado com a morte celular. (CHARPENTIER e FEUILLAT, 1993; WERNER-WASHBURNE et al., 2003; BAUMES, 2009).

A síntese de ésteres é favorecida pela quantidade de leveduras autolisadas e pelo tempo em que permanecem em contato com o vinho espumante, o que também é importante para o aroma do produto (POSTEL e ADAMS, 1987), já que estes compostos têm sido mencionados, por diferentes autores, como relacionados à melhoria da qualidade do vinho espumante. Dentre estes, podem ser citados caproato de isoamila, acetato de octila, acetato de fenil etila, caprato de feniletila, linoleato de etila e succinato de dietila (LOYAUX et al. 1981; POZO-BAYÓN et al., 2004; PUEYO et al., 1995). Além disto, a quantidade de leveduras autolisadas também favorece a produção de álcoois de cadeia longa e ácidos graxos voláteis, compostos que também possuem grande efeito nas qualidades de sabor e aroma do vinho (FERRARI e FEUILLAT, 1988; FEUILLAT et al., 1989).

Compostos voláteis liberados por leveduras durante a autólise têm sido menos estudados que compostos não aromáticos. Os poucos estudos existentes sobre os mesmos demonstram que muitos compostos são liberados durante a autólise das leveduras e alguns apresentam baixos limiares de percepção, ou seja, são percebidos pelos sentidos de olfato e paladar humano em baixas concentrações (ALEXANDRE e GUILLOUX- BENATIER, 2006). Pueyo et al. (2000) observou, através de um estudo com vinho sintético (solução de etanol 10%, ácido tartárico (4 g L^{-1}), água destilada, ácido málico (3 g L^{-1}), ácido acético ($0,1\text{ g L}^{-1}$), sulfato de potássio ($0,1\text{ g L}^{-1}$), sulfato de magnésio ($0,025\text{ g L}^{-1}$), pH ajustado a 3,0 com hidróxido de sódio), a liberação de lipídios (por exemplo mono-acil-gliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres, etc) durante o contato de vinhos espumantes com leveduras, os quais mostraram-se capazes de influenciar os atributos sensoriais dos mesmos, bem como característica de espuma.

Romano et al. (1998) avaliou a capacidade de geração de um dos principais componentes voláteis produzidos por leveduras em vinhos - 2,3-

butanodiol - por quatro diferentes espécies de leveduras (*Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*) em mosto de uva (90 diferentes cepas). Foi encontrado que a quantidade total de 2,3-butanodiol produzido variou entre 23 mg L⁻¹ a 857,7 mg L⁻¹, de acordo com a espécie de levedura.

Antonelli et al. (1999) também avaliou o perfil volátil da fermentação de vinho Trebbiano por nove cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e quatro cepas de levedura *Saccharomyces bayanus*, tendo sido possível verificar alguns compostos como 2-feniletanol, 2-feniletil acetato, etil lactato, 3-etóxi-propanol, dietil succinato e ácido propiônico como sendo característicos das cepas de leveduras *Saccharomyces bayanus*.

3.2.COMPOSTOS VOLÁTEIS RELACIONADOS AO AROMA DE VINHOS ESPUMANTES

O aroma do vinho é oriundo de compostos químicos de baixo ponto de ebulição, ou seja, compostos voláteis. Pequenas dessemelhanças na concentração destes compostos podem fazer grande diferença na qualidade final do vinho. Como indicativo da complexidade do aroma do vinho, podemos encontrar na literatura mais de 1000 compostos voláteis identificados no vinho e, entre eles, 400 são produzidos por leveduras durante a fermentação (SCHREIER, 1979; NYKANEN, 1986; RAPP,1998; GUTH e SIES, 2002; SWIEGERS et al. 2005).O emprego de técnicas analíticas modernas, como por exemplo a micro-extração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME), juntamente com a cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detecção por espectrometria de massas (GCxGC/MS, do inglês *comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection*) têm ampliado ainda mais a perspectiva associada a estes números, ao ponto de terem sido tentativamente identificados 334 compostos voláteis no headspace de apenas um vinho Merlot(WELKE et al., 2012) e 243 em um vinho Chardonnay (WELKE et al., 2014).

De acordo com SWIEGERS et al. (2005), o aroma dos vinhos, em geral, é a principal característica que define as diferenças entre os inúmeros estilos destes, produzidos ao redor do mundo. O aroma do vinho é resultado de interações de centenas de compostos, que em concentrações individuais, variam

entre 10^{-1} e 10^{-10} g L (RAPP e MANDERY, 1986). Assim, o aroma pode ser classificado de acordo com diferentes compostos que possam vir a contribuir para ele, bem como pode ser alterado por diversas variáveis relativas à matéria prima, processo de produção e à fase pós-fermentativa. O aroma proveniente de compostos da uva, bem como daqueles voláteis que são formados durante operações de extração das uvas e limpeza (processo que consiste na adição, após o esmagamento das uvas, de uma dose de metabissulfito de potássio, a fim de garantir que não haja fermentação espontânea) do mosto é classificado como pré-fermentativo; aquele que se origina nos compostos produzidos pelas leveduras utilizadas durante a fermentação é chamado de fermentativo; e o aroma que provém dos compostos que aparecem por transformações enzimáticas ou ações físico-químicas, durante a maturação do vinho na garrafa, quando em contato com as borras das leveduras, é chamado de pós-fermentativo (SCHREIER, 1979; BOULTON et al, 1995; RAPP, 1998, LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000, SWIEGERS et al. 2005).

Alguns fatores ligados à viticultura também podem influenciar o aroma dos espumantes, como a qualidade das uvas e sua cultivar, a qualidade do solo, manejo de água, estado sanitário da videira e da maturação das uvas (BOULTON et al. 1998, LAMBRECHTS e PROTERIUS, 2000; RIBÉREAU-GAYON et al. 2000 a,b; BARTOWSKY, et al. 2002, SWIEGERS et al. 2005). A maioria das castas de *Vitis vinifera* não possui aromas característicos, com exceção de algumas cultivares, como por exemplo a Moscato, conhecida pela presença de monoterpenoides e algumas outras cultivares, como a Cabernet Sauvignon, onde a 2-alkil-3-metóxi-pirazina é presença característica, entre algumas outras cultivares e como a Gewurtztraminer, onde o monoterpeno cis-óxido de rosa confere a este vinho odor de lichia (GUTH, 1997; BAYONOVE, 1998; BAUMES, 2009). Estas uvas contêm diferentes componentes voláteis que conferem aroma ao vinho, bem como precursores de aroma não voláteis, como os demais vinhos. Alguns destes compostos voláteis estão representados na **Figura 1**, e entre os não voláteis, estão alguns lipídeos insaturados, ácidos fenólicos, carotenóides, conjugados e glicoconjugados de S-cisteína, S-metilmetionina. Os compostos não voláteis e livres de odor são suscetíveis a transformarem-se em compostos voláteis durante o processo de vinificação. Isto ocorre devido à desorganização celular das bagas de uva durante a colheita e

maturação do vinho que acaba por liberar compostos no meio, muitos dos quais são utilizados pelas leveduras em seu metabolismo, sendo então biotransformados em compostos voláteis (MORENO-ARRIBAS e POLO, 2009).

Durante a fermentação alcoólica, as leveduras não convertem açúcares somente em etanol e dióxido de carbono, elas também produzem metabólitos que, embora em pequena quantidade, são de suma importância para as características sensoriais do vinho (**Figura 1**), como álcoois superiores, ácidos graxos, aldeídos, cetoácidos, entre outros (PUEYO et al., 2000; CHREIER, 1979; RAPP, 1998, LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000; ROMANO et al. 2003). Assim, os componentes voláteis identificados em vinhos espumantes geralmente são, majoritariamente, produtos da fermentação, o que corrobora para a individualidade e complexidade de cada processo de vinificação, pois a conversão de açúcares da uva em álcool e outros produtos, por populações específicas de leveduras, levam a distintas qualidades organolépticas. Assim, etanol e dióxido de carbono podem estar presentes em maior quantidade no vinho, mas são os produtos do metabolismo das leveduras, como ácidos orgânicos, álcoois e ésteres que constituem o grupo de compostos voláteis mais significativos (ROMANO et al., 2003; RAPP e VERSINI, 1991).

Muitas vias metabólicas das leveduras estão envolvidas na formação do aroma, as quais são influenciadas por vários fatores, como composição, pH do mosto e prevalência de temperatura da fermentação, o que pode resultar em distintos produtos voláteis. Considera-se, portanto, que o conhecimento a respeito da fração volátil dos vinhos é uma ferramenta importante para que os enólogos possam pré-determinar ou melhorar o aroma do vinho a ser elaborado através de modificações de processo. Neste contexto, as leveduras e as diferentes fontes de nitrogênio, que podem ser administradas para o aprimoramento da biossíntese dos compostos aromáticos, sem afetar o desempenho geral da fermentação, são aspectos importantes e objetos de estudo deste trabalho (SWIEGERS et al. 2005)

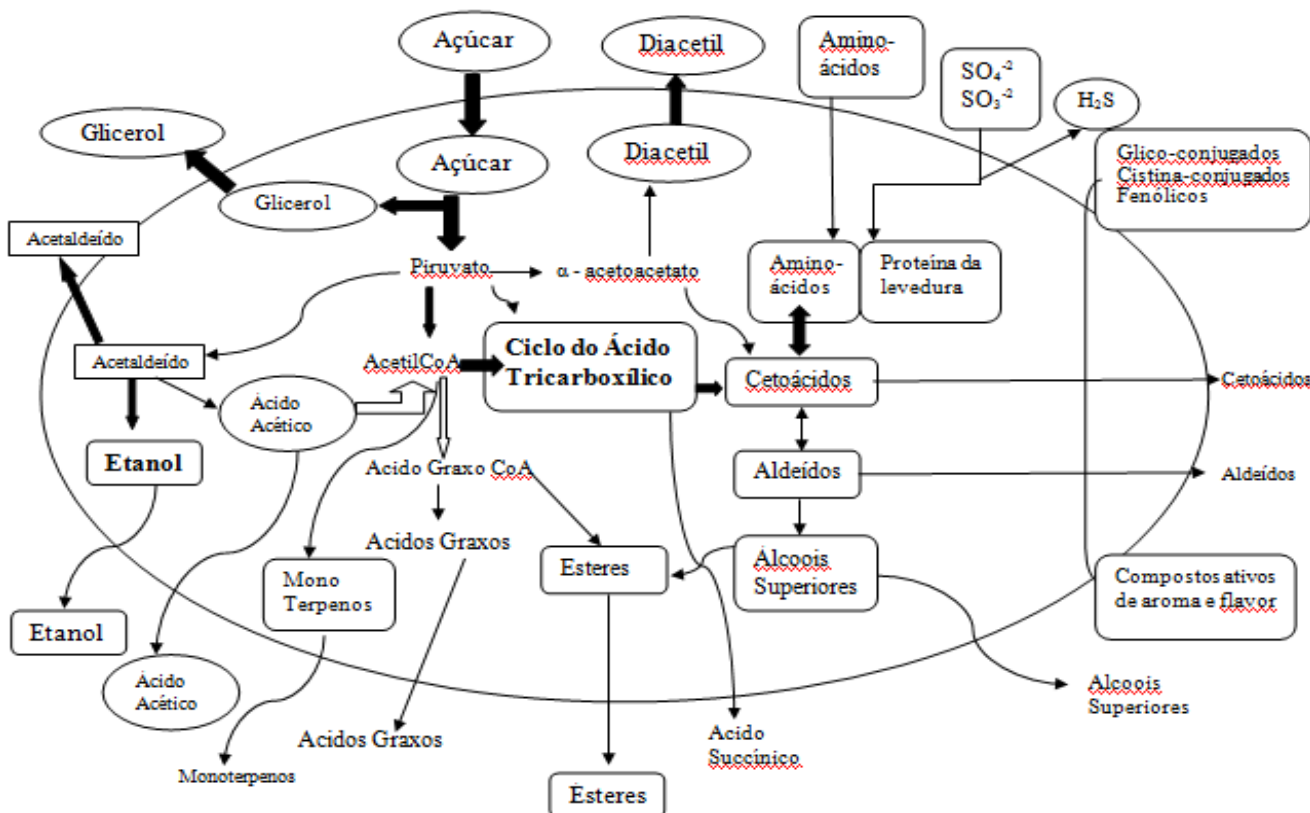


Figura 1. Esquema representativo da formação dos compostos oriundos da fermentação pela levedura *Saccharomyces* sp. A elipse retrata a parede celular de uma célula de levedura. Fonte: Modificado de Swiegers et al., 2005.

3.3. LEVEDURAS

Dos 100 gêneros representados por 700 espécies de leveduras, 16 são associados à vinificação. São elas: *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* e sua forma assexuada *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces* (PRETORIUS et al. 1999).

As leveduras *Saccharomyces* sp. pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota e são eucariotos unicelulares. O gênero *Saccharomyces* contém as espécies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* e a espécie híbrida *pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis*) (NAUMOV et al., 2000a; KURTZMAN, 2003). As leveduras podem ser

categorizadas pelo seu metabolismo, pela sua capacidade de fermentação, sobrevivência e capacidade de crescimento em presença de oxigênio, sendo este obrigatório ou facultativo (WALKER, G.M., 1998). Para microrganismos facultativos, como *S. cerevisiae*, o oxigênio tem grande importância em todo metabolismo porque ele participa da geração de energia, fundamental para obtenção de uma velocidade de crescimento razoável (SILVA et al., 2001).

Diferentes espécies de *Saccharomyces* estão entre os mais importantes microorganismos empregados na Biotecnologia. A *S. cerevisiae* é uma das espécies de leveduras mais empregadas como microorganismo industrial, ou seja, na produção de cerveja, cidra, vinhos, produtos de panificação, queijo, entre outros alimentos fermentados (JOHNSON, 2013). Assim, destacamos neste trabalho, a importância do estudo do emprego de duas espécies deste gênero em vinhos espumantes.

A Enologia moderna tem como base a chamada de “tecnologia da inoculação de levedura pura”, que teve início com o isolamento de leveduras por Muller-Thurgau (1896). Este processo biotecnológico que envolve a minimização de leveduras selvagens, ou seja, das leveduras existentes na uva que acabam por iniciar a fermentação espontaneamente, quando em condições favoráveis. A minimização destas acontece por processos químicos e/ou físicos e pela adição de uma cultura *starter* (material contendo grande número de leveduras os quais pode ser adicionados para acelerar o processo de fermentação) usualmente de alguma espécie selecionada de *Saccharomyces* sp. (PRETORIUS et al. 1999). O aparecimento de leveduras secas e ativas revolucionou a disponibilidade de seleção de leveduras a serem empregadas no processo de vinificação. Existem atualmente cerca de 200 espécies usadas globalmente para este fim, sendo a maioria delas *Saccharomyces cerevisiae* (FERNANDEZ-ESPINAR et al, 2001; HENSCHKE 2007). Várias espécies de *Saccharomyces*, incluindo *uvarum*, *bayanus* e híbridos de *cerevisiae*, *paradoxus*, e híbridos de *cariocanus* e *kudriavzevii* também têm sido recentemente empregadas. Isto ocorre, em parte, devido a um melhor entendimento dos diversos papéis que as leveduras desempenham na fermentação e na evolução de muitas características no vinho, tornando possível o melhoramento da qualidade do vinho através da seleção de leveduras a serem empregadas. O uso de leveduras secas e ativas permite uma modulação da fermentação, bem como do produto final, por tornar possível um

melhor controle da fermentação (UGLIANO, M. e HENSCHKE, 2009). Modulação pode ser definido como o processo de controle para que somente as leveduras selecionadas fermentem o mosto ou vinho base (no caso de vinhos espumantes), a fim de que se tenha um maior controle da qualidade do vinho como produto final.

Há algumas décadas começaram a ser desenvolvidas pesquisas para elucidação do papel das leveduras no desenvolvimento do aroma do vinho, bem como de suas interações com os componentes da uva, pois estas interações influenciam na aparência, aroma, *flavor* e textura do vinho (UGLIANO, M. e HENSCHKE, 2009; JOLLY et al., 2013; MINK et al., 2014).

A inoculação de uma levedura minimiza a influência das leveduras selvagens na qualidade do vinho, bem como a possível presença de aromas desagradáveis. Além disso, apesar do mosto ser relativamente completo em nutrientes, ele comporta o crescimento de um número limitado de espécies microbianas (HENSCHKE, 1997). O baixo pH e alto teor de açúcar do mosto da uva exercem um efeito seletivo nos microorganismos, onde somente alguns tipos de leveduras podem se proliferar (SWIEGERS et al. 2005). Comparando-se a segunda fermentação à primeira, para o caso dos vinhos espumantes, verifica-se que a segunda fermentação ocorre em um meio cujas concentrações de etanol são maiores e as de dióxido de carbono estão em elevação, submetendo as células de leveduras a uma alteração substancial de ambiente (GANSS et al., 2011), o que requer ainda mais cuidado na escolha da cepa a ser utilizada. As espécies selvagens são capazes de crescer em condições aeróbias e anaeróbias, competindo com a *Saccharomyces* por nutrientes, e podem produzir muitos ácidos graxos, ésteres e outros compostos, afetando o aroma do vinho espumante. Poucas destas leveduras são capazes de sobreviver em alta concentração de etanol como a *Saccharomyces sp.*, portanto, a presença de leveduras selvagens é geralmente indetectável no final da fermentação (LAMBRECHTS e PROTERIUS, 2000).

O metabolismo das leveduras pode ser classificado quanto à sua capacidade de assimilar nutrientes, ou seja, consumir energia, ou de dissimilar, fenômeno oposto da assimilação, que é a capacidade da levedura de gerar energia a partir de nutrientes presentes no meio (fermentação) (WALKER, 1998).

A assimilação é um fenômeno de oxidação, pois neste processo o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória (etapa da oxidação celular), sendo então reduzido à água. Este processo permite que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação (ao longo da Glicólise e Ciclo de Krebs) e, ainda, permite a estocagem de energia através da passagem das moléculas de adenosina difosfato (ADP) para adenosina trifosfato (ATP). ATP e ADP participam das reações de síntese de moléculas para a sobrevivência celular e para o surgimento de células novas, como fontes de energia. Este processo ocorre no início da fermentação, quando ocorre a multiplicação e síntese de compostos celulares essenciais às leveduras, como a síntese da parede celular das leveduras, importantes para que haja uma proteção física ao meio, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva (STRATFORD, 1994). O processo de assimilação explícita, assim, a importância da presença de oxigênio no início da fermentação e na multiplicação das leveduras, visto que o oxigênio é fundamental para a produção de energia através da cadeia de respiração dentro da mitocôndria, essencial para seu crescimento. Já o fenômeno de dissimilação, cujo processo é de redução ao invés de oxidação (oposto à assimilação), ocorre durante a etapa de fermentação anaeróbia onde a levedura utiliza a energia assimilada e converte o piruvato (que pode ser oriundo da assimilação de nutrientes) em etanol e o CO₂, principalmente (PRONK et al., 1996; NEVES, 2003).

Ambos os fenômenos de assimilação e dissimilação só ocorrem devido às diversas reações de oxidação e redução, mediadas por coenzimas, como a dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), que são constantemente oxidadas e reduzidas por enzimas específicas na mitocôndria (PRONK et al., 1996). A formação de NADH e a oxidação deste a NAD acontecem sempre de modo a manter-se o equilíbrio celular (balanço REDOX), a fim de prevenir a estagnação do catabolismo (fase do metabolismo em que ocorre a degradação das macromoléculas nutritivas, com liberação de energia, realizada pelo organismo) (SOUZA et al., 1995) da glicose. Desta maneira, a formação dos compostos aromáticos pelas leveduras (ésteres, ácidos graxos, álcoois superiores, etc.) está intrinsecamente ligada ao metabolismo celular das leveduras, como pode ser observado na **Figura 1**.

Alguns destes compostos aromáticos possuem funções específicas na célula da levedura, enquanto alguns outros possuem funções indefinidas (LAMBRECHTS e PROTERIUS, 2000).

A caracterização das leveduras de diferentes espécies através da formação de compostos secundários oriundos da fermentação tem destacado a escolha das leveduras como fator proeminente na composição do vinho (HOUTMAN et al., 1980; HERRAIZ et al., 1990; BRANDOLINI et al., 2002). A inoculação de cepas selecionadas pode ser capaz de gerar diferentes produtos secundários oriundos da fermentação.

Brandolini et al. (2002) analisou a capacidade de diferentes espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces ludwigii*) na produção do vinho Trebbiano, em relação a produção de glicerol, e concluiu que as cepas de *S. cerevisiae* produziram elevadas quantidades de glicerol, junto da *Z. bailii*, enquanto as cepas de *K. apiculata* produziram as menores quantidades, verificando-se também uma grande variação em relação à produção das cepas. Assim como os níveis de glicerol, os componentes voláteis também podem ser diferentes em relação às cepas de levedura, como demonstraram Wronka e Berovi (2001), através de um estudo onde foram avaliadas 29 diferentes leveduras e sua influência nos aromas primário e secundário de vinho da variedade Chardonnay. Avaliações químicas e sensoriais dos vinhos obtidos pelo emprego de diferentes leveduras demonstraram variação significativa nos compostos aromáticos.

A comparação da composição volátil de vinhos elaborados a partir da *S. bayanus* e da *S. cerevisiae* a partir de um ponto de vista qualitativo e semi-quantitativo pode ser útil para orientação no que tange à seleção destes microorganismos para o processo de vinificação. Podemos citar, como exemplo dentre as muitas diferenças no metabolismo destas duas distintas espécies da levedura *Saccharomyces* sp, que a *Saccharomyces bayanus* var *uvarum* produz quantidades elevadas de ácido succínico, enquanto que na *Saccharomyces cerevisiae*, isto não ocorre. (ANTONELLI et al, 1999; EGLINTON, 2000; UGLIANO, M. e HENSCHKE, 2009). Este aumento ilustra e exemplifica a diferença no metabolismo das leveduras de duas espécies diferentes de *Saccharomyces* sp. A produção de maior quantidade de ácido succínico acontece porque, em princípio, quando as fontes de nitrogênio são pobres ou,

dependendo do metabolismo da levedura, é mais fácil usar o ácido gama aminobutírico (GABA) como fonte de nitrogênio, o que ocorre com a *Saccharomyces bayanus* var *uvarum* naturalmente, o que faz com que esta levedura seja capaz de sintetizar ácido succínico (RAINIERI et al., 1998; COLEMAN et al., 2001). Desta forma, a quantidade elevada de ácido succínico produzida durante a fermentação pode resultar numa diferença no flavor final do vinho. O ácido succínico também pode ser esterificado a etil éster ou dietil éster, contribuindo para o bouquet do vinho. (BAROŇ e FIALA, 2012).

3.4 NUTRIÇÃO E METABOLISMO DAS LEVEDURAS

Nutrição é o processo de fornecimento dos nutrientes necessários para a vida de organismos animais e vegetais. Assim, é através da nutrição que os seres vivos obtêm energia e nutrientes para as inúmeras reações químicas e bioquímicas essenciais aos organismos vivos (TIRAPEGUI, 2013).

As leveduras *Saccharomyces* sp. crescem e sobrevivem devido a nutrientes orgânicos e inorgânicos, sendoos açúcares hexoses, a sua principal fonte de carbono e energia sob condições anaeróbias. Fontes de nitrogênio, fosfato, sulfato, alguns minerais (K^+ , Mg^+ , Zn^+) e elementos traço, sendo elas provenientes do mosto ou adicionadas a ele, provêm os nutrientes necessários para crescimento e reprodução destes microorganismos. Entretanto, pequenas adições de nutrientes estimulam o crescimento e fermentação. Isto ocorre poqueestes nutrientes aumentam a tolerância das leveduras aos efeitos inibitórios do etanol, ao permitirem a síntese de esteróis e ácidos graxos insaturados. Estes compostos são indispensáveis na manutenção da parede celular das leveduras, visto que melhoram a fluidez da membrana celular da levedura (ROSENFELD et al, 2003; UGLIANO e HENSCHKE, 2009), o que é essencial, principalmente na segunda fermentação de vinhos espumantes.

Dentre os compostos necessários para o metabolismo das leveduras, compostos nitrogenados, seguidos dos compostos de carbono em ordem de importância, são essenciais para o seu crescimento, pois são bastante utilizados no seu metabolismo. O conteúdo inicial de nitrogênio total do mosto e a quantidade de constituintes nitrogenados afetam seu crescimento, velocidade de

fermentação e formação de compostos voláteis, como ésteres, alcoóis superiores e ácidos graxos, no vinho espumante (BELL et al, 1979; GARDE-CERDÁN et al., 2011).

A quantidade de nitrogênio total em mostos é muito variável, e depende da cultivar, da região e das condições do solo, entre outros fatores (HENSCHKE e OUGH, 1991; GARDE-CERDÁN et al., 2011). Amônia e aminoácidos são as principais fontes de nitrogênio da levedura *Saccharomyces* sp. e o conteúdo de compostos nitrogenados no mosto pode alterar a cinética de fermentação, sendo os mostos deficientes em nitrogênio suscetíveis à fermentação lenta e/ou à interrupção da fermentação (BISSON, 1991; VARELA, et al., 2004; ARIAS-GIL et al., 2007).

Durante os primeiros estágios da fermentação, estes compostos nitrogenados são rapidamente utilizados pelas leveduras, a fim de preencher seus requisitos para biossíntese proteica e crescimento. Para a continuidade de uma fermentação alcoólica adequada, o mosto precisa conter concentração de nitrogênio assimilável acima de 140 mgN L^{-1} (BELY et al., 1990). As quantidades excedentes de formas de nitrogênio são armazenadas em vacúolos celulares. (HENSCHKE e JIRANEK, 1993; SALMON, 1996). Além do efeito no crescimento da levedura e cinética da fermentação, o nitrogênio assimilável pelas leveduras acaba por regular seu metabolismo, como TORREA et al. (2011) demonstraram em estudo, onde a biomassa das leveduras aumentou e o tempo de fermentação diminuiu em sucos de Chardonnay, com suplemento de nitrogênio. Este metabolismo das leveduras inclui a formação de metabólitos voláteis, como ésteres, que podem ter aromas frutados e florais, e não voláteis, como o glicerol, α -cetogluturato e ácido succínico (ALBERS et al., 1996; BELL e HENSCHKE, 2005; VILANOVA et al., 2007; TORREA et al., 2011).

O fosfato também é um nutriente essencial para o metabolismo das leveduras e para muitas vias metabólicas, entretanto, não há informações disponíveis na literatura científica a respeito de como o fosfato afeta o aroma produzido pelas leveduras. Similarmente, alguns íons metálicos, que funcionam como co-fatores enzimáticos em algumas reações são essenciais no metabolismo das leveduras, mas não há nenhum dado na literatura correlacionando estes elementos ao aromade vinhos (UGLIANO e HENSCHKE, 2009). Portanto, o estudo dos compostos voláteis de vinhos obtidos a partir de

diferentes contribuições nutricionais pode auxiliar a elucidar a influência dos nutrientes na produção de compostos voláteis a partir da ação das leveduras, bem como pode trazer conhecimento sobre a forma de atuação dos mesmos e concentrações necessárias para que se possa direcionar os processos de vinificação de forma a melhorar a qualidade do produto obtido.

3.5. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS DE VINHO

Atualmente existem diversas técnicas empregadas para a investigação de aromas de vinhos e vinhos espumantes. Dentre estas técnicas, podemos citar como exemplos a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*), considerada uma técnica clássica, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), a extração/destilação simultâneas e a extração via *headspace* (HS) estático e dinâmico. Todas estas técnicas de extração apresentam o inconveniente de utilizarem grande quantidade de solventes e a possibilidade de perda de analitos (ANDUJAR-ORTIZ et al. 2009). Como uma técnica alternativa, a micro extração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid phase micro extraction*) desenvolvida em 1990 por Arthur e Pawliszyn (ARTHUR, 1990; KATAOKA, 2000) têm sido utilizada para extração de componentes voláteis de vinhos e vinhos espumantes e possui a vantagem de não empregar solventes (TORRENS et al., 2004; ZHANG, et al., 2011).

A SPME consiste na extração dos analitos através de uma fase líquida e/ou porosa que reveste uma fibra de sílica fundida. Os analitos são extraídos e concentrados diretamente no revestimento desta fibra. A análise dos compostos envolve dois processos: a sorção dos voláteis, através da exposição da fibra ao *headspace* da amostra, a uma determinada temperatura, que depende da natureza dos compostos voláteis a serem extraídos da amostra e do filme que recobre a fibra e a dessorção térmica no injetor do cromatógrafo utilizado para análise, onde os analitos são termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990; PARREIRA E CARDEAL, 2005). De acordo com Pawliszyn (2003) a permeação através da membrana é um processo de extração única onde sorção e dessorção da fase extratora ocorre simultaneamente. A transferência dos

compostos voláteis do headspace da amostra para o filme que reveste a fibra se baseia na cinética de transferência de massa e nos princípios termodinâmicos que descrevem o equilíbrio de partição do analito entre as fases. A polaridade dos compostos a serem estudados é que determina a escolha da polaridade da fase sorvente a ser utilizada. Para tal finalidade, encontram-se, atualmente, fibras para extração de compostos voláteis por SPME de diferentes polaridades e espessuras.

Fusté et al. (2007) avaliaram o perfil de vinhos espumantes através de três técnicas de extração: SPME, extração por destilação (SDE, do inglês *steam distillation extraction*) e extração e análise em ciclo fechado (CLSA, do inglês *closed-loop stripping analysis*). O emprego de SPME permitiu a identificação e quantificação de compostos que não foram identificados pelos dois outros tipos de extração empregados no estudo. ZHANG et al. (2011) usaram a HS-SPME (revestimento de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano, DVB/CAR/PDMS) acoplada à análise por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas de massas (GC/MS, do inglês *gas chromatography with mass spectrometric detector*) para monitorar as mudanças no tipo e quantidade de compostos aromáticos produzidos durante a fermentação alcoólica de mosto de Syrah. Ao final, foi possível validar o método analítico para uso no controle da fermentação, servindo, portanto, como ferramenta de melhoria de processo. De forma semelhante, GANSS et al (2011) avaliaram os compostos voláteis no vinho base de uvas Chardonnay e Riesling, após a segunda fermentação, com HS-SPME, utilizando dois filmes poliméricos, a fim de comparar a eficiência destes. Um deles foi o filme duplo (carboxen/polidivinilbenzeno, CW/DVB) e o outro, o triplo, (DVB/CAR/PDMS). Foram positivamente identificados e quantificados 37 compostos relevantes para o aroma, sendo que a extração realizada com CW/DVB resultou na extração de álcoois, ácidos de cadeia curta, β -damascenona, monoterpenos e seus óxidos e a extração com DVB/CAR/PDMS resultou na extração majoritária de ésteres. Soares et al. (2012) verificaram que a fibra DVB/CAR/PDMS mostrou-se mais eficiente para a extração de ésteres, sendo que a DVB/PDMS apresentou desempenho superior para a extração de terpenos do headspace de vinhos espumantes Moscatel. A partir destes resultados, a fibra dupla foi empregada para monitorar a evolução dos compostos voláteis de espumante Moscatel durante seu processo de fabricação.

Nicolli et al. (2013) utilizaram o mesmo método para investigar os voláteis de vinhos espumantes Moscatel brasileiros, tendo identificado tentativamente 54 compostos voláteis. Dentre estes, análise semi-quantitativa apontou que as classes predominantes foram ésteres e ácidos, seguidos por terpenos e alcoóis, dos quais se destacaram 17 compostos majoritários.

3.6. CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dentre as técnicas mais comuns para análise de vinhos estão os métodos cromatográficos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) são as mais utilizadas. Em especial, a GC acoplada à detecção por espectrometria de massas (GC/MS) (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas) tem sido amplamente utilizada em estudos investigativos a respeito da composição volátil de vinhos (VILLIERS et al., 2012; TORRENS et al., 2008; SAMPAIO, 2008; SOARES, 2012; ZHANG et al., 2011).

A GC é uma técnica físico-química de separação que permite a análise de componentes voláteis, transportados por uma fase móvel, a partir das diferentes interações dos analitos com uma fase estacionária. Esta separação permite, quando combinada ao espectrômetro de massas, a identificação destes compostos aromáticos, a partir da comparação dos espectros de massas dos analitos da amostra em análise, e dos espectros disponíveis em bibliotecas comerciais de espectros de massas. Além desta comparação, também se emprega o índice de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI, do inglês *linear temperature programmed retention index*), cujos valores obtidos experimentalmente são comparados com aqueles reportados pela literatura científica (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963; GUAN et al., 1989) e cuja fórmula é a seguinte:

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

Onde:

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

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

t_{Rn+1} = tempo de retenção do alcano que elui depois do composto para o qual se quer calcular o índice

n = número de átomos de carbono referentes à estrutura molecular do n -alcano

Desta forma, os LTPRI são obtidos experimentalmente através de dados de retenção de uma série homóloga de alcanos lineares, obtidos nas mesmas condições cromatográficas.

O emprego da HS-SPME para extração e concentração de compostos voláteis associado à GC/MS para separação e identificação de compostos voláteis de vinhos é uma abordagem que vem sendo empregada com sucesso e reportada na literatura científica (PÉREZ-OLIVERO et al., 2013; Jiang e Zhang, 2010). GANS et al. (2011) conseguiram detectar e quantificar 37 compostos voláteis em vinho espumante elaborado a partir de assemblage de uvas Chardonnay e Riesling. Riu-Aumatell et al. (2006) utilizaram-se também da extração por HS-SPME e posterior análise por CG/MS para estudar a evolução de compostos voláteis de vinho espumante CAVA durante longo contato com borras de leveduras, e conseguiram avaliar a evolução (aumento e decréscimo) da quantidade de diversos compostos químicos voláteis durante este período. Robinson et al. (2009), a fim de obter um estudo fatorial completo para avaliação dos efeitos do etanol, glicose, glicerol, catequina e prolina em 20 compostos voláteis considerados por terem papéis fundamentais no aroma do vinho, também utilizaram das SPME e CG/MS como instrumentação. Obtiveram como resultado que o aumento da concentração do etanol reduz significativamente a concentração dos compostos aromáticos voláteis no *headspace*, corroborando estudos anteriores a respeito do etanol contribuir para a supressão de aromas frutados em vinhos. Alvarez et al. (2011) empregaram a CG/MS para correlacionar os aromas do vinho Godello com sua composição química, onde verificaram que os compostos que mais contribuíram para o aroma deste vinho foram os compostos que conferiram aroma frutado, como ésteres etílicos e acetatos, bem como compostos que conferiram aroma floral (terpenos), e aroma picante (ácidos graxos).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.7.1 ANÁLISE DE CLUSTER

A técnica (ou classificação) de *cluster*, análise de agrupamentos em português, usa medidas em um conjunto de elementos a fim de identificar agrupamentos ou grupos, nos quais os elementos são relativamente homogêneos, enquanto são heterogêneos entre os demais agrupamentos. (BASFORD & MCLACHLAN, 1985). Desta forma, um agrupamento (ou *cluster*) é um conjunto de dados similares entre si, porém diferentes dos dados dos demais agrupamentos. Esta análise, por ser um método não supervisionado, difere da classificação, porque os dados não são previamente categorizados. Além disso, a análise de *cluster* não tem a pretensão de classificar, estimar ou prever o valor de uma variável, ela apenas identifica os grupos de dados similares.

A análise de agrupamento hierárquico analisa em cada passo a matriz de dados, onde ela é diminuída em uma dimensão, pela reunião de elementos semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo (BEEBE et al., 1997; CORREIA e FERREIRA, 2008). A exibição dos dados em um espaço bidimensional faz com que haja um destaque entre seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos reflete a similaridade de suas propriedades, objetivando a determinação da semelhança entre amostras. Este método relaciona as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si. Os resultados são apresentados na forma de um dendrograma, na qual agrupa as variáveis em função da similaridade (PANERO et al., 2006; SHARAF et al., 1986).

Segundo Cruz et al. (2011), os principais métodos de agrupamento hierárquicos são: o método do vizinho mais próximo, o método do vizinho mais distante, o método das médias não ponderadas de grupos pareados (UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*), o método do centróide, o método das médias não ponderadas de grupos pareados (WPGMC, *Weighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) e o método da variância mínima de Ward. Todos esses métodos operam sobre a matriz de distâncias, dispensando recorrer aos dados originais. Uma matriz de distâncias

é uma matriz que contém as distâncias (medida da separação de dois pontos), tomadas em pares, de um conjunto de pontos. Esta matriz terá um tamanho de $N \times N$, onde N é o número de pontos, nós ou vértices, na maioria das vezes apresentadas em um gráfico. O Método de Variância Mínima de Ward propicia a visualização de grupos bem definidos em um dendograma (ROSEMBURG, 1984; CRUZ et al., 2011).

A Análise de *Cluster* tem sido utilizada para diversos fins na área da Enologia e Química Analítica. Garcia-Jares et al. (1995) caracterizaram vinhos de denominação de origem controlada *Rias Baixas*, através da análise de compostos voláteis determinados pelas técnicas de *headspace* dinâmico e cromatografia gasosa, aplicando análise de dados multivariada: análise de *cluster* e análise de componentes principais. Assim, neste estudo foi possível diferenciação e agrupamento de vinhos Rias Baixas e vinhos provenientes de outras regiões da Galícia devido ao uso destas ferramentas estatísticas.

Thiel et al. (2004) também utilizaram a análise de *cluster* ao avaliarem a origem e autenticidade de 88 vinhos das variedades Riesling, Silvaner e Weißburgunder, de quatro diferentes regiões da Alemanha, ao analisarem os minerais típicos e elementos traço padrões por testes quimiométricos. Através da análise de *cluster*, foi possível obter uma ideia preliminar sobre a estrutura dos dados. Basicamente dois agrupamentos (*clusters*) foram encontrados, onde o primeiro contém a maior parte dos vinhos provenientes de duas regiões da área de Rheinhesse e o segundo inclui a maior parte das amostras provenientes das outras duas regiões (Bad Dürkheim e Landau).

Welke et al. (2014) investigaram as principais mudanças no perfil volátil de doze (12) vinhos espumantes Chardonnay (método tradicional) oriundos do sul do Brasil, a partir da comparação de seus compostos voláteis com aqueles de seus correspondentes vinhos base. Foi utilizada microextração em fase sólida no modo *headspace* combinada à cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (GCxGC/TOFMS) e ferramentas quimiométricas. A razão de Fisher auxiliou ao apontar os 119 compostos voláteis responsáveis pelas principais diferenças entre os vinhos base e seus respectivos espumantes e a análise de componentes principais explicou 93,1% da variância total relativa aos 78 compostos voláteis selecionados pela mesma. Também foi possível observar, através da análise de

cluster, dois agrupamentos principais, o qual separou os vinhos base de seus respectivos vinhos espumantes. Da mesma forma, foram encontrados cinco sub-grupamentos de vinhos base e quatro de vinhos espumantes, cuja distribuição foi representativa daquelas regiões de onde os vinhos são provenientes.

3.7.2 ANÁLISE DE FISHER

Os métodos não-supervisionados podem ser técnicas estatísticas suscetíveis a falhas, pois podem gerar como resultados agrupamentos incorretos das amostras, devido a variações dentro de uma classe que podem acabar mascarando as variações entre as diferentes classes de amostras analisadas. Desta forma, a seleção de variáveis mais discriminantes se torna uma etapa preliminar fundamental na análise multivariada, principalmente quando o número de variáveis independentes é pequeno em relação ao número de variáveis dependentes. Assim, muitas vezes é necessária a seleção de variáveis que apresentam uma variação entre diferentes classes antes de submeter os dados obtidos a outras ferramentas estatísticas. Para esta seleção, a Razão de Fisher pode ser empregada, visto que ela seleciona as variáveis mais discriminantes entre distintos grupos de amostras. A Razão de Fisher pode ser definida como a variação de um parâmetro relacionado a um determinado composto entre diferentes classes de amostras analisadas, dividida pela soma da variação deste mesmo parâmetro relacionado a este composto, dentro de uma mesma classe de compostos. A maximização da variância entre as classes e minimização da variância entre os compostos das amostras pertencentes a mesma classe é o objetivo principal da utilização desta análise discriminante previamente à análise estatística por métodos não supervisionados. (PIERCE et al., 2006; BERRUETA et al., 2007; HUMSTON et al., 2010; SCHALE et al., 2012; WELKE, 2012)

REFERÊNCIAS

ABE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENOLOGIA. Disponível em: <http://www.enologia.org.br/premiacoes/Concursos%202014>. Acesso em 10/02/2015.

ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDEN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic

growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p.3187–3195, 1996.

AMERINE, M.A.; ROESSLER, E.B. Composition of wines. In **Wines-Their Sensory Evaluation**, M.A. Amerine and E.B. Roessler (Eds.), p 72-77. W.H. Freeman, NewYork, 1976.

ANDUJAR-ORTIZ, I.; MORENO-ARRIBAS, M.V.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J. POZO-BAYÓN, M.A. Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gaschromatography–mass spectrometry analysis of wine volatile compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7351–7357, 2009.

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 20–27, 1998.

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

ALVAREZ, M.G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GANDARA, J. Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromaticfingerprinting obtained by GC/MS. **Food Chemistry**, v. 129 p. 890–898, 2011.

AMERINE, M.A.; R.M. PANGBORN, E.B. ROESSLER. **Principles of sensory evaluation of food**. In: Food Science and Technology Monographs. p. 338-339. Academic Press, NewYork, 1965.

ANTONELLI, A.; CASTELLARI, L.; ZAMBONELLI, C.; CARNACINI, A. Yeast influence on volatile composition of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1139–1144, 1999.

ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1312-1318, 2007.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BAROŇ, M.; JAROMÍR F. Chasing after Minerality, Relationship to Yeast Nutritional Stress and Succinic Acid Production. **Czech Journal of Food Science**, v. 30, n. 2, p. 188–193, 2012.

BARRIO-GALÁN, R.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; ORTEGA-HERAS, M. Techniques for improving or replacing ageing on lees of oak aged red wines: The effects on polysaccharides and the phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 127, p. 528–540, 2011.

BARTOWSKY, E.; COSTELLO, P.; HENSCHKE, P. Management of malolactic fermentation – wine flavour manipulation. **The Australian Grapegrower and Winemaker**, v. 461a, p. 7–12, 2002.

BASFORD, K.E.; MCLACHLAN, G.J. Cluster-Analysis in a Randomized Complete Block Design. **Communications in Statistics-Theory and Methods**, v. 14, p. 451-463, 1985.

BAUMES, R. Wine Aroma Precursors. In: MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Ed. Springer, 2009. Cap. 8A, p. 251-265.

BAUTISTA, R.; FERNÁNDEZ, E.; FALQUÉ, E. Effect of the contact with fermentation-lees or commercial-lees on the volatile composition of white wines. **European Food Research Technology**, v.224, p. 405-413, 2007.

BAYONOVE, C. L'arôme varietal: le potentiel aromatique Du raisin. In: C. Flanzy (Ed.), **Oenologie: fondements scientifiques et technologiques** (p. 165-181). Paris: Lavoisier Tec et Doc.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**, New York: John Wiley & Sons, 1997.

BELL, S. J.; HENSCHKE, P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n.3, p. 242–295, 2005.

BELL, A. A., OUGH, C. S., KLIEWER, W. M. Effects on must and wine composition, rates fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson seedles grapevine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 30, n. 2, p. 124-129, 1979.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J.M.; BARRE, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, p. 246-252, 1990.

BERRUETA, L.A.; ALONSO-SALCES, R.M.; HEBERGER, K.; J. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography. A.**, v. 1158, p. 196-214, 2007.

BISSON, L.F. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. **Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine**, ISBN 0-9630711-0-6, Seattle, Washington, USA, p. 78-89, 1991.

BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F.; KUNKEE, R.E. **Principles and Practices of Winemaking** (Aspen Publishers, Inc: USA), 1995.

BRANDOLINI, V., ROMANO, P., MAIETTI, A., CARUSO, M., TEDESCHI, P., MAZZOTTA, D. Automated multiple development method for determination of glycerol produced by wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 481 – 485, 2002.

BRASIL. Lei n. 10.970, de 12 novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei n. 7.678, de 8 de novembro de 1998, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 nov. 2004.

CASASSA, L.F.; KEIRSEY, L.S.; MIRELES, M.S.; HARBERTSON, J.F. **Cofermentation of syrah with Viognier: Evolution of color and phenolics during winemaking and bottle aging**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 63, p. 538-543, 2012.

CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M. **Wine Microbiology and Biotechnology**. Ed. G.H. Fleet, Harwood Academic Publishers, p. 225–242, 1993.

Concours Mondial. Disponível em: [http://results.concoursmondial.com/index.php?page=results&formular\[Concours ID\]=43](http://results.concoursmondial.com/index.php?page=results&formular[Concours ID]=43). Acesso em 08/01/2015.

COLEMAN S.T.; FANG T.K.; ROVINSKY S.A.; TURANO F.J.; MOYEROWLEY W.S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 244–250, 2001.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. **Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados**. *Química Nova*, v. 30, p. 481, 2007.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 620p., 2011.

DECIMA. Disponível em: <http://www.vinhosdecima.com.br/CatalogoX-2012.pdf>. Acesso em 03/07/15.

EGLINTON, J. M.; McWILLIAM S. J.; FOGARTY, M. W.; FRANCIS, I. L.; KWIATKOWSKI, M. J.; HOJ, P. B.; HENSCHKE, P. A. The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.6, p. 190–196, 2000.

ETIÉVANT, P.X. Wine. In: **Volatile Compounds of Food and Beverages**. Ed. H. Maarse (Marcel Dekker Inc.: New York, USA) pp. 483–546, 1991.

FEDRIZZI, B.; MAGNO, F.; FINATO, F.; VERSINI, G. Variation of Some Fermentative Sulfur Compounds in Italian “Millesimè” Classic Sparkling Wines during Aging and Storage on Lees. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, p. 9716–9722, 2010.

FERRARI, G.; FEUILLAT, M. Holding white Burgundy wines on their lees. Nitrogenous compounds, fatty acids and sensor analysis of wines. **Vitis**, v. 27, p. 183–197, 1988.

FERREIRA, D. F. **Estatística Multivariada**. 1 ed. Lavras: Editora UFLA, 662p, 2008.

FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. Autolysis of yeasts in Champagne. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.33, p. 6–13, 1982.

FEUILLAT, M.; FREYSSINET, M.; CARPENTIER, C. Development on lees of whitewines of Burgundy. II. Evolution of macromolecules: Polysaccharides and Proteins. **Vitis**, v. 28, p. 161–176, 1989.

FEUILLAT, M. Yeast macromolecules: Origin, composition, and enological interest. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 54, p. 211–213, 2003.

FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: Mundiprensa, 2002.

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

FRANCIOLI, S.; GUERRA, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; GUADAYOL, J.M.; CAIXACH, J. Aroma of sparkling wines by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 404–408, 1999.

_____, S.; TORRENS, J.; RIU-AUMATELL, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Volatile Compounds by SPME-GC as Age Markers of Sparkling Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 54, p. 158–162, 2003.

GANSS, S.; KIRSCH, F.; WINTERHALTER, P.; FISCHER, U.; SCHMARR, H.; Aroma Changes due to Second Fermentation and Glycosylated Precursors in

Chardonnay and Riesling Sparkling Wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 2524-2533, 2011.

CARMEN GARCIA-JARES, C.; GARCIA-MARTIN, S.; CELA-TORRIJOS, R. Analysis of Some Highly Volatile Compounds of Wine by Means of Purge and Cold Trapping Injector Capillary Gas Chromatography. Application to the Differentiation of Rias Baixas Spanish White Wines. **J. Agric. Food Chem.** v. 43, p. 764-768, 1995.

GARDE-CERDÁN, T.; LORENZO, C.; MARTÍNEZ-GIL, A.M.; LARA, J.F.; PARDO, F.; SALINAS, M.R. Evolution of Nitrogen Compounds During Grape Ripening from Organic and Non-Organic Monastrell – Nitrogen Consumption and Volatile Formation in Alcoholic Fermentation, Research in Organic Farming, Dr. Raumjiti Nokkoul (Ed.), InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/research-in-organic-farming/evolution-of-nitrogen-compounds-during-grape-ripening-from-organic-and-non-organic-monastrell-nitrog>. Acesso em 10 de fevereiro de 2014.

GUAN, Y.; KIRALY, J.; RIJKS, J.A. Interactive Retention Index database for compound identification in temperature-programmed Capillary Gas Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 412, p. 129-143, 1989.

GUTH, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3022–3026, 1997.

GUTH, H. Comparison of different white wine varieties by instrumental analysis and sensory studies. In: Chemistry of Wine Flavour. Eds L.A Waterhouse and S.E. Ebeler (ACS Symposium Series 714: San Francisco, USA) pp. 39–52, 1998.

GUTH, H.; SIES, A. Flavour of wines: Towards an understanding by reconstitution experiments and an analysis of ethanol's effect on odour activity of key compounds. Proceedings of the Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, Australia. **Australian Wine Industry Technical Conference Inc.: Adelaide**, SA, p. 128–139, 2002.

HENSCHKE, P.A.; JIRANEK, V. Metabolism of nitrogen compounds. In G. Fleet (Ed.), **Wine Microbiology and Biotechnology** (pp. 77–164). Harwood Academic Publishers. Hernandez-Orte, 1993.

HENSCHKE, P.A., OUGH, C. S. Urea accumulation in fermenting grapes juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 42, n. 4, p. 317-321, 1991.

HENSCHKE, P.A. Wine yeast. In: **Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications**. Eds F.K. Zimmermann and K.-D. Entian (Technomic: Lancaster, PA) p. 527–560, 1997.

HERRAIZ, T., REGLERO, G., HERRAIZ, M., MARTIN-ALVAREZ, P.J., CABEZUDO, M.D. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. **American Journal of Enology and Viticulture** v. 41, p. 313 – 31, 1990.

HIDALGO, P.; PUEYO, E.; POZO-BAYÓN, M.A.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.J.; MARTIN-ÁLVAREZ, P., POLO, M.C. Sensory and analytical study of rosé sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6640–6645, 2004.

HOUTMAN, A.C.; MARAIS, J.; DU PLESSIS, C.S. Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of

wines: I. Grapes maturity, sugar, inoculums concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. **Vitis** v. 19, p. 37 – 54, 1980.

HUMSTON, E.M.; KNOWLES, J.D.; MCSHEA, A.; SYNOVEC, R.E.; Quantitative assessment of moisture damage for cacao bean quality using two-dimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry and chemometrics **Journal of Chromatography. A.**, v. 1217, p. 1963-1970, 2010.

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

JOHNSON, E.A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 503–517, 2013.

JOLLY, N.P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I.S. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Research**, available online, p. 1–23, Nov. 2013.

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

KURTZMAN, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulaspora*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 233–245, 2003.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.21, Special Issue, 2000.

LOYAUX, D.; ROGER, S.; ADDA, J. The evolution of champagne volatiles during ageing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, p. 1254-1258, 1981.

MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.J.; CARRASCOSA, A.V.; BARCENILLA, J.M., POZO-BAYON, M.A.; POLO, M.C. Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. **Food Microbiology**, v. 18, p.183–191, 2001.

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. Comunicado Técnico, 137. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf . Acesso em 21 de novembro de 2013

MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Ed. Springer, 2009.

MINK, R.; SOMMER, S.; KÖLLING, R.; SCHMARR, H.; BAUMBACH, L.; SCHARFENBERGER-SCHMEER, M. Diacetyl reduction by commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains during vinification. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 23–26, 2014.

NAUMOV, G.I.; JAMES, S.A.; NAUMOVA, E.S.; LOUIS, E.J.; ROBERTS, I.N. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50, p. 1931–1942, 2000.

NEVES, L.C.M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando 'Saccharomyces cerevisiae' W303-181**. 24 de abril de 2003. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2003.

NICOLLI, K.P. **Estudo dos componentes voláteis de vinhos espumantes Moscatéis através do emprego de microextração em fase sólida e cromatografia gasosa**. 96f. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Porto Alegre, 2013.

NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, p. 84 – 96, 1986.

PANERO, F. S.; SILVA, H. E. B.; PANERO, J. S. Application of HCA and PCA in the discrimination of not polluted tubular wells from tubular wells with incidence of anthropogenic pollution in Western Amazon Region. **Chinese Journal of Geochemistry Chinese J. Geochemistry**, v. 25, p. 165, 2006.

PARREIRA, F.V.; CARDEAL, Z.L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de Microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, n.4, p. 646-654, 2005.

PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry**, v.75, p. 2543-2558, 2003.

PÉREZ-OLIVERO, S.J.; PÉREZ, T.; CONDE, J. Minor Volatile Compounds in White Wines from Canary Islands, Madeira, and Pico (Azores) by Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry: A Qualitative Study. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2013, Article ID 529306, 2013.

PIERCE, K.M.; HOGGARD, J.C.; HOPE, J.L.; RAINEY, P.M.; HOOFNAGLE, A.N.; JACK, R.M.; WRIGHT, B.W.; SYNOVEC, R.E.; Fisher ratio method applied to third-order separation data to identify significant chemical components of metabolite extracts. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 5068-5075, 2006.

POSTEL, W.; ADAMS, L. Effect of yeast contact and storage time on the volatile components of wine. **Mitt. Klostern**, v. 37, 54–56, 1987.

POZO-BAYÓN, M.A.; POLO, M.C.; MARTÍN-Álvarez, P.J.; PUEYO, E. Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. **Food Chemistry**, v. 86, p. 413–419, 2004.

PRETORIUS, I.S.; VAN DER WESTHUIZEN, T.J.; AUGUSTYN, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, p. 61–74, 1999.

PRONK, J.T.; STEENSMA, H.Y.; VAN DIJKEN, J.P. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Bognor Regis, v.12, p.1607-1633, 1996.

PUEYO, E.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; POLO, M.C. Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines). **American Journal of Enology and Viticulture**, v.46, p. 518–524, 1995.

_____.E.; ADOLFO MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.; POLO, M.C.; SANTA-MARÍA, G.; BARTOLOME´, B. Release of Lipids during Yeast Autolysis in a Model Wine System. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 116-122, 2000.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873–884, 1986.

_____. A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: RANTZ (Ed.), Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. **American Society for Enology and Viticulture**, p. 156–164, 1991.

RAPP, A. Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. **Nahrung**, v. 42, p. 351-363, 1998.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wines and Vinification (John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK), 2000a.

_____. P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOUDIEU, D. **Handbook of Enology**. Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments (John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK), 2000b.

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

RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J.; GASPARIN, A.M. Sistema de Produção de Vinho Moscatel Espumante. **Embrapa Uva e Vinho**. Sistemas de Produção, v. 17. ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Nov./2008, disponível em: <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoMoscatelEspumante/avaliacao.htm>. Acesso em 09 de janeiro de 2015.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 169–180, 2003.

ROSEMBURG, H. C. **Cluster analysis for researchers**. California, EUA: Lifetime Learning, 334p. 1984.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; BLONDIN, B.; SALMON, J.M. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: Effect on fermentation kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 113-121, 2003.

SALMON, J. M.; FORNAIRON-BONNEFOND, C.; MAZURIC, J.P. Interactions between wine lees and polyphenols: Influence on oxygen consumption capacity during simulation of wine aging. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1604–1609, 2002.

SALMON, J. Sluggish and stuck fermentations: Some actual trends on their physiological basis. **Viticultural and Ecological Sciences**, v. 51, p. 137–140, 1996.

SAMPAIO, J.M.L.I. **Desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho engarrafado com diferentes tipos de vedantes**. 49 f. 2008. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química). Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto, 2008.

SCHALE, S.P.; LE, T.M.; PIERCE, K.M.; Predicting feedstock and percent composition for blends of biodiesel with conventional diesel using chemometrics and gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 94, p. 320-327, 2012.

SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R. **Chemometrics**, New York: John Wiley & Sons, 1986.

SCHREIER, P. Flavour composition of wines: a review. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.12, p. 59-111, 1979.

SILVA, D.P.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl.Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.91, n.3, p.605-613, 2001.

SIMPSON, R.E e MILLER, G.C. Aroma composition of Chardonnay wine. **Vitis**, v. 23, p. 143-158, 1984.

SLUSSZ, T.; PADILHA, A.C.M. Estratégias de internacionalização dos espumantes: um estudo de cinco vinícolas do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 4, n. 4, p. 3-24, set-dez/2008.

SNOW, N.H. Headspace analysis in modern gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9+10, 2002.

SOARES, R.D. **Estudo do perfil cromatográfico dos componentes voláteis do vinho espumante Moscatel através do emprego de micro extração em fase sólida e cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente**. 2012. 102f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SOUZA, J.S.I; PEIXOTO, A.M.; TOLEDO, F.F. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**. [S.l.]: EdUSP, ISBN 9788531401299, 1995.

STRATFORD, M. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. **YEAST**, 10 (13), p. 1741-52, 1994.

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

TIRAPEGUI, J. **Nutrição Fundamentos e Aspectos Atuais**–Atheneu, 3ª Ed. Rio de Janeiro, RJ. 2013.

TONIETTO, J. Espumantes de terroir da Serra Gaúcha: como proteger produtores e consumidores?. **Embrapa Uva e Vinho**. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/espumantes_terroir_serra_gaucha.pdf . Acesso em 09 de janeiro de 2015.

_____. J. Existe “O Espumante Brasileiro?”. **Embrapa Uva e Vinho**. Disponível em: www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/existe_espumante_brasileiro.pdf. Acesso em 09 de janeiro de 2015.

TORREA, D.; VARELA, C.; UGLIANO, M.; Ancin-Azpilicueta, C.; FRANCIS, I.; HENSCHKE, P.A. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1072–1083, 2011.

TORRENS, J.; RIU-AUMATELL, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Volatile Compounds of Red and White Wines by Headspace–Solid-Phase Microextraction Using Different Fibers. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, 2004.

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

TORRESI, S.; FRANGIPANE, M. T.; ANELLI, G. Biotechnologies in sparkling wine production: interesting approaches for quality improvement. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1232-1241, 2011.

UGLIANO, M.; HENSCHKE, P.P. Yeasts and wine flavor. In: MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Ed. Springer, 2009. Cap, 8D, p. 313-292.

UVIBRA – União Brasileira de Vitivinicultura. Dados estatísticos. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm>. Acesso em: 10 fev. 2014.

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

VARELA, C.; PIZARRO, F.; AGOSIN, E. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3392–3400, 2004.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A.B. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and nonvolatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n.1, p. 145–157, 2007.

VILLIERS, A.; PHILLIPUS, A.; TREDoux A.G.J.; NIEUWOUDT, H.H. **Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review**. *Analytica Chimica Acta*, v. 730, p. 2– 23, 2012.

VINITALY. Disponível em: <http://www.vinitaly.com/pdf/concorsi/Vincitori-Concorso-Enologico-Internazionale-2014.pdf>. Acesso em: 25 de julho de 2015.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. John Wiley & Sons, Chichester, England, 1998.

WEBB, A.D.; MULLER, C.J. Volatile aroma components of wines and other fermented beverages. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 15, p. 75-146, 1972.

WELKE, J.E. Uso da microextração em fase sólida e da cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente na caracterização de voláteis de vinhos gaúchos. Porto Alegre, agosto de 2012. 167 f. **Tese de Doutorado**- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química.

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

WERNER-WASHBURNE, M.; BRAUN, E. JOHNSTON, G.C.; SINGER, R.A. Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, v. 57, n. 2, p. 383-401, 1993.

WONDRA, M.; BEROVI, M. Analyses of Aroma Components of Chardonnay Wine Fermented by Different Yeast Strains. **Food Technol. Biotechnol.** v. 39, n. 2, p. 141–148, 2001.

ZELLNER, B. A.; BICCHI, C.; DUGO, P.; RUBIOLO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. **Flavour Fragrance Journal**, v. 23, p. 297–314, 2008.

ZHANG, M.; PAN, Q.; GUOLIANG, Y.; CHANGGING, D. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. **Food Chemistry**, v. 125, p. 743–749, 2011.

ARTIGO

**Qualitative Characterization of the Volatile Profile of Brazilian Sparkling Wines
Elaborated with an Innovative Assemblage Submitted to Different Second
Fermentation Conditions**

Aline Schwertner Palma^a

Gustavo Pires Costa^a

Janaína Aith Barbará^b

Alejandro Cardozo^c

Vinícius Serafini Roglio^d

Elina Bastos Caramão^b

Claudia Alcaraz Zini^b

Vitor Manfroi^a

^a Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500. 91501-970 Porto Alegre-RS, Brazil

^b Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 9500. 91501-970 Porto Alegre-RS, Brazil

^c Grupo Decima, Vinícola Piagentini. Rua Visconde de Pelotas, 2188. 95020-500 Caxias do Sul-RS, Brazil

^d Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500. 91501-970 Porto Alegre-RS, Brazil

Abstract

Sparkling wines elaborated by Traditional Method are usually produced by the grapes Chardonnay, Pinot Noir and Riesling, in which the volatile compounds of these sparkling wines have been calling attention to scientific studies. However, sparkling wines produced by other varietal grapes have not been a target of scientific research yet. The second fermentation occurs inside the bottle, in which confer a greater aromatic complexity to the sparkling wine produced by Traditional Method, due to the contact of it with lees in a reducing medium during a certain period of time. This happens due to secondary products of yeast metabolism, during the conversion of sugar in ethanol and carbon dioxide. This conversion depends on the nutrients added, called fermentation adjuvants, as the yeast used, since each one has a different metabolism for using this

nutrients and sugars presented in the base wine. Thus, this work aims to characterize the volatile compounds of a south Brazilian winery, which use an innovative *assemblage*, using the grapes Chardonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano and Pinot Noir. To the base wine, two different commercial yeasts were added: *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* to the performance of second fermentation. To each yeast used for fermenting the base wine, eight different fermentation adjuvants were used. The determination of volatile compounds were performed by Headspace solid-phase Microextraction (HS-SPME) and gas chromatography coupled to a mass quadrupole spectrometry (GC/MS). In total, 25 compounds were tentatively identified in the studied sparkling wines, being the majority listed as it follows, with their possible contribution to these sparkling wines aroma: ethyl octanoate (fruity), isoamyl alcohol (banana), octanoic acid (green pepper), and phenethyl alcohol (flower). Phenethyl phenylacetate, one of the minority compounds tentatively identified in some of the sparkling wines, is associated with fruity aroma. It was not possible to distinguish subgroups from different conditions during the second fermentation, when submitting the chromatographic areas of volatile compounds to cluster analysis. It implies that, under the experimental conditions of these study, it was not possible to differ the volatile compounds of the fermented (2nd fermentation) with *S. cerevisiae* and those which were fermented with *S. bayanus*. The same cluster analysis showed a subdivision of volatile compounds of the 16 wines in two groups, in which were probably distinguished due to the different nutritional adjuvants used: phosphate and Thiazote. Thus, throughout qualitative analysis by HS-SPME-GC/MS, it was possible to verify the homogeneity of volatile profile of the 16 sparkling wines, obtained by different fermentation adjuvants and two different yeast species of *Saccharomyces* sp, besides the comparison of volatile compounds presented in these sparkling wines with those others reported in the literature.

Keywords: sparkling wines, nutrients, yeasts, volatile compounds, volatiles, solid phase Microextraction, HS-SPME, cluster analysis.

INTRODUCTION

The winemaking process of sparkling wines designated as traditional method is performed through a second fermentation of a base wine inside a bottle, to which a solution containing sugar and yeast is added. This wine fermented by the second time is then aged with the yeasts for a variable period of time that may last from eight months to several years. Several factors contribute to the sparkling wine final quality and among them we may mention the quality of viticultural practices, the harvesting, the processing techniques and fermentation strategies (1-4).

Parameters associated with sparkling wine quality may be more complex than the ones of still wine, as they include the composition and quality of the base wine, the transformations occurring during the second fermentation and aging with yeasts, and the yeast strains used for the wine fermentation and aging processes (5,6). The complexity of sparkling wines aroma may be also enriched due to addition of nutrients and the time wine remains in contact with lees(7).

Nitrogen is one of the most abundant soil-derived macronutrients in a grapevine, being important in biological functions of grapevine and fermentative microorganisms, yeast and malolactic bacteria. Thus, as nitrogen content in must affects the growth of yeast and speed of fermentation, and it consequently affects the nature and quantity of vinification final products (8). During the winemaking process, the addition of nitrogen supplement is a common practice that aims to prevent slow or stuck fermentations and SH_2 production, but it must be added carefully to the must, because wines with high amounts of ammonium can generate undesirable odours. These nitrogen supplements are added as a large variety of compounds, such as diammonium phosphate, urea, ammonium sulphate, ammonium phosphate, etc (9).

Low levels of yeast assimilable nitrogen compounds in grape juice have already been associated with sluggish or stuck fermentations (10). Moreover, some nitrogen compounds present in wines are related to the generation of desired volatile compounds (11), which may confer positive organoleptic characteristics to wine and sparkling wine. Besides, the nitrogen content of the must can affect fermentation kinetics, production of good or detrimental volatiles and spoilage compounds (depending on the concentration), of ethanol and glycerol (12). The two main sources of yeast-assimilable nitrogen, according to Butzke (13), are primary amino acids and ammonium. Webster et al. (11) have demonstrated that the addition of nitrogen adjuvants to a must affects yeast

metabolism and the fermentation bouquet, yielding a “cleaner” but less complex wine. They also found that wines made with grapes coming from vines fertilized with nitrogen contained more esters, which imparted positively wines’ sensory characteristics.

Another factor to be considered, besides the nitrogen composition of the must, and how it is provided to the wine, is the yeast strain. Several authors have studied how the yeast strain affects the production of secondary metabolites, such as aromatic compounds (14-16). Some researchers have found that the type of yeast used affects the production of aromatic compounds, such as esters and alcohols, which modify the fruity notes of the wines obtained. Independently of the yeast strain, the higher the capacity of the yeast in regards to nitrogen assimilation, the higher the amount of volatile compounds that can be produced (14). Thus, yeasts with greater demand for nitrogen produce higher concentrations of esters during fermentation, and those with lesser demand produce greater concentrations of higher alcohols (17 - 18).

Several nutrient products are commercially available. In this study BioActiv[®], (provides physical support and detoxifying properties to yeast), Nutristart[®], ammonium phosphate, Thiazote SP[®] (a bi ammonium phosphate that promotes yeast growth and presents composition of approximately 49.93% of ammonium phosphate, 49.93% of ammonium sulfate and 0.12% of thiamine hydrochloride)(19) were used alone and in combination.

There are several techniques to extract volatile compounds from wine matrices: liquid/liquid extraction, static headspace (20) solid phase extraction (SPE) – especially for fractionation of free and bound volatile compounds (21), stir bar sorptive extraction (SBSE) (22), and headspace solid phase microextraction (HS-SPME) (23). HS-SPME has already demonstrated unique advantages, since extraction usually takes a short time, does not require solvent, allows the use of the same fiber coating several times, and minimizes

loss/transformation of analytes, as it avoids excess of sample handling due to pre-concentration and extraction in a single step. (24). The most common technique to analyze aroma compounds is gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) (24). Several studies (25, 26) have been developed using GC/MS to qualitatively and quantitatively analyze volatile compounds of several different sparkling wines from different parts of the world (25 -28).

Francioli et al. (27) have quantified 28 volatiles of CAVA sparkling wines made from different base wines, out of 221 tentatively identified compounds through comparison of their experimental and commercially available mass spectra, using HS-SPME coupled with GC/MS and subsequent application of discriminant analysis to data obtained. They have found volatile compounds that would characterize sparkling wines submitted to different ageing periods, while in contact with yeasts, using HS-SPME. The objective was to find out which compounds would be useful to verify the aging period of a sparkling wine.

Fusté et al. (28) has qualitatively evaluated the profile of sparkling wines using retention indices and mass spectra obtained by GC/MS, using three extraction methods [simultaneous distillation extraction (SDE), closed-loop stripping analysis (CLSA) and HS-SPME] of volatile compounds. They have found out that HS-SPME showed the most representative polar compounds of CAVA. Riu-Aumatell et al. (29), also used HS-SPME and GC/MS to evaluate the evolution of volatile compounds of CAVA sparkling wines during long ageing times in contact with lees (more than 2 years), employing retention indices and mass spectra. They concluded that DVB/CAR/PDMS fiber was the coating of choice for this type of study.

Considerable research and development on the viticulture and enological aspects related to volatile compounds of sparkling wines are still necessary, since very little is

known on this regard, and very scarce knowledge exists on this subject in relation to Brazilian sparkling wines. Former publications of this research group have dealt with volatile compounds of Brazilian Moscatel sparkling wines (30), with evolution of Moscatel volatiles during vinification process (31) and also with differences related to volatile compounds between Traditional Chardonnay base and sparkling wines. Due to this gap of knowledge, further research is necessary to characterize the volatile profile of different Brazilian sparkling wines in order to allow the production of higher quality sparkling wines through the optimization of vinification process in regards to yeasts, adjuvants and other related parameters. The present study aims to contribute with a better understanding of the qualitative volatile profile of traditional sparkling wines elaborated in the South part of Brazil, with a peculiar assemblage of Chardonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano and Pinot Noir grapes, using two different *Saccharomyces* in the second fermentation (*S. cerevisiae* e *S. bayanus*) and a variety of vinification adjuvants.

MATERIALS AND METHODS

Samples, Reagents and Materials

Base wine was produced in an industrial scale of the Traditional method with an assemblage of the following cultivars: Chardonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano and Pinot Noir of the years 2008, 2010 and 2012.

The two yeast employed were: ZYMAFLORE[®] SPARK (Laffort[®], Bordeaux, France), which is a *Saccharomyces cerevisiae*. ii) LA CLAIRE[®] SP 665 (Perdomini[®], Perdomini SPA, Verona, Italy), which is composed by *Saccharomyces bayanus* isolated and selected in France, in the region of Champagne. Nutrients were all purchased from Laffort[®]: Phosphate, Thiazote, Nutristart, Nutristart Org. Sodium chloride was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Winemaking

The traditional winemaking process was carried out in a winery (industrial scale: tanks of 91,000 L), located in Caxias do Sul, Serra Gaúcha, RS, Brazil and the grapes were also collected in the Serra Gaucha region (latitude 29° S, longitude 51° W, altitude 600–800m). The winery produces 1,800,000 L of wine and ciders, including 800,000 L of wine per year. From the wines 200,000 are sparkling wines and 30,000 bottles are produced with the traditional method. In order to provide enough sugar for the second fermentation, sugar content of base wine was corrected from 1.81 g L⁻¹ to 33.78 g L⁻¹. After sugar correction, volatile acidity of base wine increased from 80 mEq L⁻¹ to 92 mEq L⁻¹, and ethanol changed from 11.1 % to 10.8 %. Density and pH values of base wine were kept similar (pH: 3.28 to 3.24 and density: 0.99 to 1.00 kg/m³).

Nutrients added to base wine, before the second fermentation are listed in **Table 1** and every distinct treatment (T) is designated as Tx, where x corresponds to the number that specifies the type of treatment. The dosage of nutritional corrections was 30 g hL⁻¹ for each treatment. Two commercial yeasts were employed in the second fermentation of wine: i) ZYMAFLORE® SPARK, which is a *Saccharomyces cerevisiae*. ii) LA CLAIRE® SP 665, which is composed by *Saccharomyces bayanus*. Each treatment, during second fermentation was carried out in two bottles containing base wine coming from the same first fermentation process and is presented in **Table 2**. The second fermentation lasted about a month. These bottles were placed in pupitres, where the *remuage* was carried out inside the winery and the *degorgement* was performed in the laboratory, one month after the start of the *remuage* process. Wines resulting from second fermentation treatments were stored at -16 ± 2 °C until physicochemical and chromatographic analyses were performed. Results of physicochemical and chromatographic analyses are the average of two fermentations performed for each treatment presented in **Table 1**.

Table 1. Nutrients added to the base wine in eight different treatments (fermentations) using different yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*) and descriptions of each nutrient employed.

| Number | Treatment |
|--------|--|
| T 1 | Phosphate: yeast hulls, cellulose and inactivated yeast. |
| T 2 | Thiazote: blend of ammonium sulphate, ammonium phosphate and thiamine hydrochlorate |
| T 3 | Nutristart: 14 mg/L assimilable nitrogen by ammonium phosphate, thiamine and inert yeast |
| T 4 | Nutristart Org vitamins, minerals and trace elements (magnesium, manganese, zinc, iron, etc. |
| T 5 | Bioactive: Phosphate: phosphate salts |
| T 6 | Phosphate/Nutristart Org |
| T 7 | Nutristart/Thiazote / Bioactive |
| T 8 | Nutristart Org/Thiazote/Bioactive |

Sample Preparation and Extraction of Volatile Compounds

The sparkling wine samples (100 mL in 200 mL erlenmeyers) underwent a degasification process under low temperature ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), in order to avoid the loss of volatile compounds and the interference of carbon dioxide. The HS-SPME of volatiles was performed according to a procedure formerly described (32). The samples, which were prepared in quadruplicate for each treatment, were placed, one at a time, in a ultrasound machine, model Unique UltraCleaner[®] 1400 (Unique Group, São Paulo, Brazil). Wine samples were submitted to ultrasonic waves for a period of thirty minutes (three cycles of ten minutes), and subsequently 20 mL of wine samples were placed in two amber glass vials of 20 mL with screw caps (10 mL in each vial) and were kept in a freezer ($-16 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) for approximately one month, until analyses.

A divinyl-benzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) fiber coating was chosen based on previous studies (31), that showed this fiber as presenting the best results regarding efficiency, as it could be seen through the higher number of chromatographic peaks and areas observed for wine volatiles after headspace extraction compared to other fibers. One mililiter of every sparkling wine sample was placed in 10

mL transparent glass vials equipped with screw caps internally filled with Teflon-lined septum (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Sodium chloride (0.3 g) was oven-dried at 150 °C for two hours and stored in a desiccator, before its addition to the same vials. These vials were placed in a thermostatic block at a temperature of 40 ± 0.6 °C for five minutes. Headspace microextraction of wine volatile components was performed during 30 min, using a 20 mm fiber coated with 50/30 DVB/CAR/PDMS (divinylbenzenecarboxen-polydimethylsiloxane) and a manual sampling holder (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The fiber coating underwent desorption during 5 min at 250 °C in the gas chromatograph injection port. SPME fibers were previously conditioned as recommended by the manufacturer. Further details about the extraction process are reported elsewhere (32).

Physicochemical Analysis

The following parameters were evaluated: ethanol, volatile acidity, total acidity, glucose and fructose. Physicochemical analyses of sparkling wine were carried out at Laboratory of Physicochemical Analysis of Beverages and Vinegars at LANAGRO - National Agricultural Laboratory of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brazil). Sparkling wines were analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), employing the WineScan Flex (WineScan FT 120, Foss A/S, Denmark).

Chromatographic conditions

A Shimadzu gas chromatograph coupled to a quadrupole mass spectrometric detector (GC/MS), model QP2010 (Kyoto, Japan) was employed to analyze wine volatile compounds. The two capillary columns employed were: a 5% phenyl and 95% dimethylpolysiloxane (ZB-5ms, 60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) and a polyethylene glycol

(DB-WAXetr, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm), both purchased from Ohio Valley Specialty, Ohio, USA). Detector and injector temperature were 250 $^{\circ}\text{C}$, while oven temperature was kept for 5 min at 70 $^{\circ}\text{C}$ and was heated up to 120 $^{\circ}\text{C}$ at 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and after, it was raised to 200 $^{\circ}\text{C}$ at 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Helium (purity 99.999%, Linde Gases, Canoas, RS, Brazil) flow was 1.0 mL min^{-1} . The quadrupole mass spectrometric detector was operated in the electron impact mode at 70 eV of ionization energy with a mass range of 40 to 450 amu and the acquisition rate was 50 scans s^{-1} . A chromatographic peak was considered detected whenever signal-to-noise ratio was at least three and spectral similarity was above 90%. Spectral similarity matches were obtained mainly from the chromatographic analyses performed in the ZB-5ms, except for compounds that were detected only in the DB-WAXetr. Blank analyses were performed with SPME fibers in order to eliminate potential interfering compounds coming out of the coating or chromatographic stationary phase.

Tentative identification of wine volatile compounds were performed through comparison of their experimentally acquired mass spectra, during chromatographic analyses in a ZB-5ms, with the ones reported in the National Institute of Standards and Technology (NIST 21 and NIST 107) library. Comparison of experimentally obtained linear temperature programmed retention indices (LTPRI) reported in the scientific literature was also considered to confirm tentative identification of compounds. Experimental LTPRI were calculated using retention data obtained with a 1% hexanic solution of *n*-alkanes (*n*-octane, C8 to *n*-triacontane, C30) and retention data from wine volatile, using both capillary columns (ZB-5ms and DB-WAXetr).

Semi-quantitative analyses was performed considering the sum of chromatographic areas of all peaks as 100 % and the individual peaks as different percentage areas according to their corresponding individual chromatographic areas.

Response factors were considered equal for all compounds for the sake of simplicity, as comparison was performed among area percentages of the same compound in several different chromatographic analyses under the same GC/MS conditions (ZB-5ms column), operated uninterruptedly.

Statistical Analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was employed to verify the difference among the treatments and parameters evaluated (ethanol, volatile acidity, total acidity, glucose and fructose) and Duncan test for a comparison of the average values of each parameter among treatments. Fisher ratio employed chromatographic area and was employed to choose the most discriminant compounds among all the volatiles tentatively identified in the heaspace of sparkling wines elaborated from *S. Cerevisiae* and *S. bayanus*. Hierarchical Cluster analysis (HCA) was performed using chromatographic areas of the volatile components preliminary chosen by Cluster analysis a The IBM® SPSS® Statistics software, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), was employed for data processing. Confidence intervals of 99% and significant level of $\alpha = 0.01$ were used.

Analyses of the different fermentation and/or nutrition treatments were performed using Principal Component (PC), where dimensionality of the original data matrix was reduced while the maximum amount of variability was retained. Volatile compounds were also subjected to a hierarchical cluster analysis of cases, where the squared Euclidean distance was used as metric unit and the Ward method as amalgamation rule (33).

RESULTS and DISCUSSION

Table 2 shows the physicochemical data (etanol percentage, total and volatile acidity, and residual sugar) for the sparkling wines coming from 16 different treatments. The designation Tx stands for treatment (T) and x is the number of the specific nutrient employed as described in **Table 1**. Also A stands for *Saccharomyces cerevisiae* yeast (SPARK) and B designates *Saccharomyces bayanus* (SP665).

Table 2. Physicochemical data of the sparkling wines fermented according to the Traditional method with two different *Saccharomyces* sp. yeasts [(A= *Saccharomyces cerevisiae* yeast (SPARK) and B= *Saccharomyces bayanus* (SP665)] submitted to different nutritional supplements in 16 treatments.

| Treatment | EtOH (%v / v) | Total Acidity (mEq L ⁻¹) | Volatile Acidity (mEq L ⁻¹) | Residual Sugar (g L ⁻¹) |
|-----------|-----------------------------|--------------------------------------|--|--|
| T1A | 13.12 ^c ± 0.01 | 93.65 ^{a,b} ± 0.10 | 11.20 ± ± 0.00 | 9.97 ^c ± 0.05 |
| T 1B | 12.88 ^d ± 0.02 | 93.55 ^{a,b} ± 0.06 | 11.10 ± 0.11 | 12.32 ^g ± 0.95 |
| T 2A | 13.24 ^{e,a} ± 0.01 | 93.52 ^{a,b} ± 0.05 | 11.10 ± 0.11 | 7.40 ^h ± 0.82 |
| T 2B | 13.11 ^c ± 0.01 | 92.65 ^a ± 0.17 | 11.17 ± 0.13 | 7.87 ^d ± 0.12 |
| T 3A | 13.47 ^b ± 0.01 | 94.35 ^b ± 0.23 | 11.20 ± ± 0.00 | 3.90 ^b ± 0.08 |
| T 3B | 13.45 ^b ± 0.43 | 94.25 ^b ± 0.19 | 11.22 ± 0.15 | 4.52 ^f ± 0.17 |
| T 4A | 13.17 ^{b,e} ± 0.02 | 97.85 ^d ± 0.19 | 11.25 ± 0.06 | 7.22 ^h ± 0.95 |
| T 4B | 13.14 ^c ± 0.09 | 97.47 ^d ± 1.62 | 11.52 ± 0.52 | 8.40 ⁱ ± 0.34 |
| T 5A | 13.08 ^c ± 0.21 | 96.37 ^d ± 0.25 | 11.20 ± 0.00 | 9.92 ^c ± 0.12 |
| T 5B | 13.14 ^c ± 0.17 | 96.82 ^d ± 0.74 | 11.27 ± 0.37 | 9.85 ^c ± 0.13 |
| T 6A | 13.90 ^b ± 0.14 | 93.62 ^{a,b} ± 0.09 | 11.32 ± 0.13 | 3.85 ^b ± 0.57 |
| T 6B | 13.43 ^b ± 0.12 | 93.60 ^{a,b} ± 0.08 | 11.27 ± 0.50 | 4.40 ^f ± 0.82 |
| T 7A | 13.43 ^c ± 0.03 | 89.72 ^c ± 0.21 | 11.22 ± 0.05 | 5.85 ^e ± 0.57 |
| T 7B | 13.28 ^a ± 0.01 | 92.75 ^a ± 0.30 | 11.15 ± 0.10 | 5.22 ^a ± 0.05 |
| T 8A | 13.25 ^{e,a} ± 0.01 | 92.75 ^a ± 0.06 | 11.30 ± 0.14 | 4.42 ^f ± 0.50 |
| T 8B | 13.41 ^b ± 0.29 | 90.32 ^c ± 0.65 | 11.20 ± 0.40 | 5.70 ^e ± 0.82 |

Each column represents the average value ±SD from four samples (four sparkling wines obtained from four independent second fermentation processes). Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Tukey test. When letters are different, it means they are statistically different. (*) P≤0.01 when compared among groups. Abbreviation: EtOH: ethanol; % v/v: % volume/volume; mEq L⁻¹: milliequivalent per liter; g L⁻¹: grams per liter. Tx stands for treatment (T) and x for the number of the specific treatment employed during 2nd fermentation. The numbers that designate the treatments are listed in **Table 2** and are as follows: 1-Phosphate; 2-Thiazote; 3-Nutristart; 4-Nutristart Org; 5- Bioactive; 6- Phosphate/Nutristart Org; 7-Nutristart/Thiazote / Bioactive; 8-Nutristart Org/Thiazote/Bioactive

No statistical difference (ANOVA) was verified in relation to volatile acidity among different treatment groups, which means that the use of two different yeasts and several different adjuvants has not changed the volatile acidity values. In regards to residual sugar, the most efficient treatments were T 6A (3.85 g L⁻¹) and T 3A (3.90 g L⁻¹), and both employed *Saccharomyces cerevisiae* yeast, (A= SPARK). T 6A and T 3A were followed by T 1B (5.70 g L⁻¹), T 7B (5.22g L⁻¹), where *Saccharomyces bayanus* (B=SP665) was used. The treatment that presented the highest residual sugar content was T 1B (12.32 g L⁻¹), which also showed less alcohol content (12.88 % v/v), demonstrating that phosphate nutrient with SP665 yeast had the lowest yield of fermentation. The higher levels of total acidity were achieved in the treatments T 4A (97.85 mEq L⁻¹), T 5A (96.37 mEq L⁻¹), T 5B (96.82 mEq L⁻¹), T 4B (97.47 mEq L⁻¹), but no correlation was found regarding the treatments or yeasts used.

Chromatographic area percentage of tentatively identified volatile compounds are shown in **Table 3**. Compounds are listed in ascending order of LTPRI values in a ZB-5-ms column, and CAS numbers are also reported, along with LTPRI in a polar column (WAXetr) (literature references are quoted in **Table 3**). Experimental LTPRI values were in good agreement with literature data (34-56). Only six compounds were not properly identified, since they had the signal to noise ratio smaller than 3:1 and/or have shown low mass spectra quality, which are listed in of the final part **Table 3**.

Table 4 shows the semi-quantitative results for the same volatile compounds shown in **Table 3**. Even though a more rigorous quantitative analysis along with a sensorial evaluation would be required in order to correlate the presence of specific volatile compounds and the sparkling wine quality, comments based on information reported in the scientific literature related to the possible role of several tentatively identified volatile compounds are presented. This is an attempt to clarify the potential

contribution of some important well-known volatile compounds present in sparkling wines. In the end of **Table 4**, the sum of total area (%) of tentatively identified compounds are shown, and the remaining value in order to achieve 100% is related to those compounds mentioned above, in the end of **Table 3**.

Table 3. Compounds tentatively identified in the headspace of sparkling wines produced with Chardonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano and Pinot Noir grapes and with using two different yeasts in the second stage of fermentation, employing gas chromatography with mass spectrometric detection and the stationary phases ZB-5MS and DB-WAXetr column.

| Number | Compound (synonyms and/or IUPAC names) | CAS Number | LTPRIcal ZB-5-ms | LTPRIlit [ZB- 5-ms Ref] | LTPRIcal WAXetr | LTPRIlit [WAXetr Ref] | Chemical Class |
|--------|---|------------|---------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------|
| 1 | Ethyl acetate (ethyl acetate) | 141-78-6 | - | - | 886 | 885 ⁽³⁴⁾ | Ester |
| 2 | Ethyl butanoate (ethyl butanoate) | 105-54-4 | - | - | 1037 | 1033 ⁽³⁴⁾ | Ester |
| 3 | Propyl lactate (propyl 2-hydroxypropanoate) | 616-09-1 | 805 | 808 ⁽³⁵⁾ | - | - | Ester |
| 4 | Ethyl lactate (ethyl 2-hydroxypropanoate) | 97-64-3 | 809 | 813 ⁽³⁶⁾ | - | - | Ester |
| 5 | Hexanol (hexan-1-ol) | 111-27-3 | 861 | 867 ⁽³⁷⁾ | 1354 | 1351 ⁽²⁸⁾ | Alcohol |
| 6 | Isoamyl acetate (3-methylbutyl acetate) | 123-92-2 | 868 | 877 ⁽³⁸⁾ | 1125 | 1123 ⁽²⁸⁾ | Ester |
| 7 | Dibutyl succinate (diethyl butanedioate) | 141-03-7 | - | - | 1177 | 1179 ⁽³⁹⁾ | Ester |
| 8 | Isoamyl alcohol (3-methyl-1-butanol) | 123-51-3 | - | - | 1210 | 1210 ⁽²⁸⁾ | Alcohol |
| 9 | Hexanoic Acid (syn. Caproic acid) | 142-62-1 | 965 | 969 ⁽³⁸⁾ | - | 1885 | Carboxylic Acid |
| 10 | Ethyl hexanoate (syn. Ethyl caproate) | 123-66-0 | 996 | 997 ⁽³⁸⁾ | 1237 | 1232 ⁽²⁸⁾ | Ester |
| 11 | Phenylethyl Alcohol (2-phenylethanol) | 60-12-8 | 1116 | 1116 ⁽⁴³⁾ | 1907 | 1903 ⁽⁴⁴⁾ | Alcohol |
| 12 | Octanoic acid (syn. caprylic acid) | 124-07-2 | 1172 | 1178 ⁽³⁸⁾ | 2066 | 2072 ⁽⁴⁷⁾ | Carboxylic Acid |
| 13 | Diethyl succinate (diethyl butanedioate) | 123-25-1 | 1178 | 1179 ⁽³⁹⁾ | 1684 | 1678 ⁽²⁸⁾ | Ester |
| 14 | Ethyl octanoate (syn. ethyl caprylate) | 106-32-1 | 1196 | 1196 ⁽³⁵⁾ | 1439 | 1430 ⁽²⁸⁾ | Ester |
| 15 | 2,3-Butanediol (butane-2,3-diol) | 513-85-9 | - | - | 1544 | 1545 ⁽³⁴⁾ | Alcohol |
| 16 | Phenethyl phenylacetate (2-phenylethyl 2-phenylacetate) | 102-20-5 | 1246 | 1250 ⁽⁴⁵⁾ | - | - | Ester |
| 17 | Decanoic acid (syn. capric acid) | 334-48-5 | 1360 | 1364 ⁽⁴⁶⁾ | 2259 | 2261 ⁽⁴⁷⁾ | Carboxylic Acid |
| 18 | Ethyl 9-decenoate (ethyl dec-9-enoate) | 67233-91-4 | 1386 | 1386 ⁽³⁸⁾ | 1687 | 1691 ⁽²⁸⁾ | Ester |
| 19 | Ethyl decanoate (syn. ethyl caprate) | 110-38-3 | 1393 | 1393 ⁽³⁸⁾ | 1644 | 1639 ⁽²⁸⁾ | Ester |
| 20 | Diethyl hydroxybutanoate (diethyl 2-hydroxybutanedioate) | 626-11-9 | - | - | 2050 | 2041 ⁽⁴⁸⁾ | Ester |
| 21 | Nerolidol (<i>trans</i> -nerolidol or 1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-) | 7212-44-4 | 1568 | 1570 ⁽⁵²⁾ | - | - | Terpene |
| 22 | Nerolidol Acetate (3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-yl acetate) | 2306-78-7 | - | - | 2045 | 2039 ⁽⁵⁰⁾ | Ester |
| 23 | Spathulenol (1,1,7-trimethyl-4-methylidene-1a,2,3,4a,5,6,7a,7b-octahydrocyclopropa[h]azulen-7-ol) | 77171-55-2 | 1569 | 1578 ⁽⁵²⁾ | - | - | Terpene |
| 24 | Methyl hexadecanoate (syn. methyl palmitate) | 112-39-0 | 1922 | 1927 ⁽⁵²⁾ | - | - | Ester |
| 25 | Famesene ((3 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,7,11-trimethyldodeca-1,3,6,10-tetraene) | 502-61-4 | - | - | 1672 | 1676 ⁽⁵⁴⁾ | Terpene |
| | Monoethyl succinate (Butanedioic acid, monoethyl ester) | 1070-34-4 | | | | | Ester |
| | Hexyl Acetate (syn. capryl acetate) | 142-92-7 | | | | | Ester |
| | Limonene (1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene) | 138-86-3 | | | | | Terpene |
| | Linalool (3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol) | 78-70-6 | | | | | Terpene |
| | Methyl hexadecanoate | 112-39-0 | | | | | Ester |

| | | |
|--|------------|-------|
| Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester | 140-77-5 | Ester |
| Ethyl tetradecanoate (syn. ethyl myristate) | 124-06-1 | Ester |
| Ethyl heptadecanoate (syn. heptadecanoic acid ethyl ester) | 14010-23-2 | Ester |

- : non-detected compounds due to signal to noise ratio smaller than 3:1 and/or have shown low mass spectra quality and/or absence of LTPRI data from scientific literature. LTPRI: linear temperature programmed retention index. LTPRIcal ZB-5-ms: experimentally determined LTPRI, using a ZB-5-ms column. LTPRIlit [ZB-5-ms Ref]: LTPRI data obtained from literature related to a ZB-5-ms column or similar stationary phase. LTPRIcal WAXetr: experimentally determined LTPRI, using a WAXetr column. LTPRIlit [WAXetr Ref]: LTPRI data obtained from literature related to a WAXetr column or similar stationary phase. Chromatographic conditions are described in item Materials and Methods/Chromatographic Conditions. Compounds not numbered are the ones that did not reach the criteria for a proper tentative identification. Compounds present in Table 3, but not in Table 4 presented signal to noise ratio below requirements explained in section Results and Discussion, however their mass spectra was of good quality.

Table 4. Chromatographic area percentage of volatile compounds tentatively identified in the headspace of 16 sparkling wines produced with Chadonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano and Pinot Noir grapes and two different species of *Saccharomyces sp.* in the second fermentation stage and with eight different nutritional adjuvants.

| COMPOUND / TREATMENT | 1A | 1B | 2A | 2B | 3A | 3B | 4A | 4B | 5A | 5B | 6A | 6B | 7A | 7B | 8A | 8B |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. Ethyl acetate | 2.56 | 3.00 | 4.09 | 3.35 | 2.66 | 2.34 | 3.64 | 0.71 | 1.11 | 0.79 | 1.12 | 1.11 | 1.17 | 2.58 | 1.13 | 3.42 |
| 2. Ethyl butanoate | 0.24 | 0.29 | 0.52 | - | 0.25 | - | 0.34 | 0.32 | 0.35 | 0.34 | - | - | - | 0.24 | - | 0.26 |
| 3. Propyl lactate | 1.76 | 1.49 | 1.59 | 0.98 | 1.33 | 0.61 | 1.85 | 0.76 | 0.73 | 0.58 | 1.79 | 0.89 | 1.66 | 1.06 | 0.78 | - |
| 5. Hexanol | 0.51 | 0.47 | 0.50 | - | 0.56 | 0.47 | 0.48 | 0.24 | 0.23 | 0.19 | 0.37 | 0.28 | 0.32 | 0.64 | 0.28 | 0.50 |
| 6. Isoamyl acetate | 1.49 | 1.23 | 1.45 | 2.45 | 0.31 | 1.30 | 0.87 | - | - | - | 0.97 | 0.49 | 1.15 | 1.19 | 0.60 | 1.19 |
| 7. Dibutyl succinate | - | - | - | 3.84 | 4.28 | - | - | - | 5.27 | - | - | - | - | - | - | - |
| 8. Isoamyl alcohol | 19.27 | 17.40 | 17.06 | 19.74 | 13.94 | 18.46 | 16.93 | 7.82 | 6.54 | 5.30 | 9.50 | 8.77 | 8.98 | 15.68 | 8.88 | 14.74 |
| 9. Hexanoic Acid | - | 2.98 | 3.07 | - | 3.36 | - | 3.36 | 3.56 | 3.88 | 3.45 | 3.35 | 3.58 | - | 3.67 | 3.39 | 4.34 |
| 10. Ethyl hexanoate | 9.06 | 7.67 | 8.08 | 11.51 | 6.86 | 3.65 | 6.93 | 5.11 | 3.53 | 4.06 | 7.44 | 4.39 | 7.38 | 5.45 | 4.95 | 6.46 |
| 11. Phenylethyl Alcohol | 6.88 | 6.85 | 7.05 | 7.43 | 8.31 | 9.15 | 7.12 | 9.52 | 10.13 | 8.96 | 8.00 | 11.02 | 9.51 | 8.80 | 10.33 | 10.38 |
| 12. Octanoic acid | 11.26 | 11.14 | 11.56 | 11.61 | 13.91 | 14.36 | 13.90 | 17.40 | 18.68 | 16.98 | 13.12 | 16.93 | 14.54 | 15.58 | 16.16 | 16.98 |
| 13. Diethyl succinate | 3.79 | 3.29 | 3.42 | - | - | 3.44 | 3.86 | 4.94 | - | 4.76 | 3.87 | 4.87 | 4.37 | 4.60 | 4.52 | 5.48 |
| 14. Ethyl octanoate | 33.22 | 30.48 | 27.58 | 30.58 | 28.10 | 25.13 | 25.40 | 27.70 | 25.09 | 30.28 | 37.67 | 26.05 | 38.15 | 26.98 | 27.21 | 23.80 |
| 15. 2,3-Butanediol | 0.44 | 0.48 | 0.50 | - | - | 0.57 | 0.53 | 0.27 | 0.19 | 0.21 | 0.45 | 0.42 | 0.43 | 0.60 | 0.29 | 0.59 |
| 16. Phenethyl phenylacetate | 0.40 | 0.57 | 0.62 | 0.45 | 1.17 | 0.57 | 0.53 | 0.88 | 0.82 | 0.94 | 0.72 | 0.94 | 0.87 | 1.39 | 0.89 | 0.88 |
| 17. Decanoic acid | 1.01 | 1.59 | 2.05 | 1.92 | 3.06 | 2.01 | 2.10 | 0.21 | 3.47 | 3.60 | 1.92 | 2.78 | 1.29 | 4.24 | 2.68 | 2.72 |
| 18. Ethyl 9-decenoate | - | - | - | 0.25 | - | - | - | 0.92 | - | 1.27 | - | - | - | - | - | 0.66 |
| 19. Ethyl decanoate | 2.35 | 4.13 | 4.10 | 2.84 | 4.68 | 4.14 | 4.23 | 5.50 | 4.47 | 7.72 | 6.49 | 4.16 | 5.32 | 5.86 | 4.42 | 3.53 |
| 20. Diethyl hydroxybutanoate | 0.45 | 0.19 | 0.20 | 0.44 | 0.49 | 0.48 | - | 0.25 | 0.35 | 0.24 | 0.22 | - | 0.47 | - | - | 0.30 |
| 21. Nerolidol | - | - | - | - | - | 0.13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1.03 |
| 22. Nerolidyl Acetate | - | 4.09 | 5.09 | - | 5.19 | - | 5.59 | 7.37 | 8.94 | 7.05 | - | 9.05 | - | - | 7.40 | - |
| 23. Spathulenol | - | 0.38 | 0.39 | - | - | - | 0.49 | 0.74 | 1.03 | 0.68 | 0.13 | 1.01 | - | - | 0.82 | - |
| 24. Methyl hexadecanoate | - | - | 0.19 | - | - | 0.13 | 0.10 | - | - | - | 0.12 | - | - | - | - | - |
| 25. Farnesene | - | - | - | - | - | - | - | 0.51 | - | 0.46 | - | 0.43 | - | - | 0.59 | - |
| Sum of Total area (%) of tentatively identified compounds | 94.69 | 97.72 | 99.11 | 97.39 | 98.46 | 86.94 | 98.25 | 94.73 | 94.03 | 97.86 | 97.25 | 97.17 | 95.61 | 98.56 | 95.32 | 97.26 |

Results are expressed as percentage of chromatographic area of each tentatively identified compound, taken the whole chromatographic area (including non-identified compounds) as 100 %. LTPRI: linear temperature programmed retention index. -: compound was not detected in neither of the two columns employed (ZB-5ms and DB-WAXetr) due to signal to noise ratio smaller than 3:1 and/or due to low mass spectra quality and/or absence of LTPRI data from scientific literature. Chromatographic conditions are described in item Materials and Methods/Chromatographic Conditions.

The higher chromatographic area percentages were related to ethyl octanoate (23.80% to 33.22%) and its corresponding acid - octanoic acid (11.14% to 18.68%). Isoamyl alcohol (5.30 % to 17.40%), ethyl hexanoate (2.65% to 11.51%), and phenyl ethyl alcohol (6.85 % to 11.02%) also presented higher contributions in terms of chromatographic area percentage.

Ethyl octanoate was the major volatile compound found in all wines, and it was also found by Welke et al. (23) in a Chardonnay sparkling wine elaborated by the Traditional method and by Caliaro et al. (57) while characterizing the aromatic profile of Brazilian sparkling wines (traditional method) produced with classical and innovative grape varieties: Sauvignon Blanc, Riesling, Renano, Pinot Gris, Pinot Noir and Chardonnay. The grape varieties mentioned were fermented with a *Saccharomyces cerevisiae* strain. The corresponding acid - octanoic acid- was the second higher chromatographic area in the wine profile. Fatty acids, such as the ones present in the wine samples under study (hexanoic, octanoic and decanoic acids) may impart fat, rancidity and soap notes. The aroma perception thresholds for these acids are 0.087, 0.5, 1.0 mg L⁻¹, respectively (58, 59). Straight-chain fatty acids are by-products of saturated fatty acids metabolism and their production is modulated by yeast strain, nutrient status of the must and fermentation conditions, many of which affect growth or induce physiological stress and contribute to accumulation of acetic and other fatty acids in wine (60).

Another ethyl ester, ethyl decanoate, was also present in all wines under study. It has also shown expressive area percentages in all 16 wines (2.35% in T1A to 6.49% in T6A). Zoecklein et al. (61) found ethyl hexanoate and ethyl decanoate in Viognier still wines, while differentiating treatments included vertical shoot-positioned (VSP), Smart-Dyson (SD), and Geneva double curtain (GDC) at three different places in Northern Virginia, using HS-SPME-GC-MS. *Saccharomyces cerevisiae* was used and also

fermentation adjuvants containing diammonium phosphate, magnesium sulfate, thiamin chlorhydrate (Fermaid K - Lallemand, Montréal, Québec), and Go-Ferm (Lallemand), a natural yeast rehydration agent.

They were also found in Meili sparkling wines made by Meili grapes by Charmat method, using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. They have reported that ethyl hexanoate adds fruity notes to the wine (62). According to Coelho et al. (63), ethyl decanoate is a descriptor of the fruity aroma of grapes and it presents a low odour threshold ($200 \mu\text{g L}^{-1}$). In another study, the same research group (64) found this ethyl ester in sparkling wines of Fernão-Pires and Baga varieties, using a stir bar sorptive extraction (SBSE) method followed by liquid desorption (LD) and sample large volume injection (LVI) coupled to gas chromatography and mass spectrometric detection (SBSE-LD/LVI-GC/MS). They have also quantified varietal and fermentative volatiles in sparkling wines of two grape varieties (Fernão-Pires and Baga) made by traditional method. The remaining ethyl esters found in the wines in the present study were also found by Coelho et al (64) (ethyl acetate, ethyl butanoate, ethyl 9-decenoate) showed area percentages mainly below 4.00 %.

Isoamyl alcohol has been described as a sweet, fruity and banana-like aroma (65) and has been found in all wines under study, which quantities varied from 5.30% (T5B) to 20.28% (T1A) of the chromatogram relative area. Song et al. (62) has also reported this compound as a major volatile in sparkling wines from a new wine grape cultivar 'Meili' (*Vitis vinifera* L.) produced by Charmat method. Mamede et al (65) reported its presence in headspace of sparkling wines (Traditional method) produced with Chardonnay and Pinot Noir grape musts from the “Serra Gaúcha” region (RS, Brazil). In this case, yeasts commonly found in the natural grape microflora performed fermentation. Welke et al. (67) have also reported the presence of isoamyl acetate in base and sparkling wines made with Chardonnay grapes with the Traditional method.

The fourth major compound in terms of chromatographic area that was also present in all wines was phenylethyl alcohol and it is usually known to have a positive impact to wine aroma, imparting fruity and floral notes, however concentrations above 300 mg L⁻¹ may have an adverse impact on wine aroma and flavour (specifically, a pungent smell and taste) (68).

Antonelli et al. (1) have mentioned phenylethyl alcohol as a characteristic compound found in Trebbiano still wines produced with *Saccharomyces bayanus*, however the present work has shown no significant differences in the area percentage of this compound in wines produced with *S. Sacharomiceae* and *S. bayanus*.

Soares et al. (31) and Nicolli et al. (30) have also found this volatile compound in Brazilian Moscatel sparkling wine, using HS-SPME-GC/MS. Phenylethyl alcohol is formed as part of the branched-chain amino acid metabolism (69). Campo et al. (70) have found phenylethyl alcohol in four sparkling wines produced with four grape varieties: Pedro Ximénez (PX), Fino, Sauternes, and CAVA sparkling wines.

Among the esters, the presence of diethyl succinate has been reported as a post-fermentative volatile formed during the ageing of CAVA in contact with lees of the second fermentation. Its presence conferred faint pleasant odour to the wine (29). Interestingly, another succinate - dibutyl succinate - was seen only in the wines coming from treatments 2B, 3A and 5A, and chromatographic area percentages were 3.84, 4.28 and 5.27 %, respectively.

Fermentation-derived esters play an important role in the sensory composition of wines and they are largely responsible for wine fruitiness (60). Ugliano and Henschke (60) suggest that organoleptic synergy existing between different esters determines the overall sensory characteristics of esters mixtures. In this study, 58% of the chromatographic area of compounds found was esters. Besides the above mentioned major compounds, the

following esters were found in all treatments: ethyl lactate (from 1.43% to 1.48% in T7B and T8B respectively), ethyl acetate (from 0.79% in T5A to 4.09% in T2B), isoamyl acetate (from 0.3% in T3B and 1.56% in T1A), diethyl succinate (from 3.42% in T2A to 5.48% in T8A), phenylethyl phenylacetate (from 0.42 in T1A to 1.39% in T7B) and ethyl 9-decenoate (from 0.22% in T2B to 1.29% in T5B). Among these esters, ethyl lactate, ethyl acetate, isoamyl acetate, diethyl succinate were also found by Torrens et al. (71) while studying the volatile profile of CAVA wine during its aging. All of above mentioned esters were found in all stages of measurements, during CAVA ageing, except ethyl octanoate, which was not present in CAVA base wine. A trend of higher concentration for all these compounds while wines were ageing was observed, except in the case of isoamyl acetate, which was present in higher concentration in base wine.

Ethyl heptadecanoate showed up in wines from all treatments, except T 7B. It was also found by Francioli (26) in volatile compounds of CAVA sparkling wines through HS-SPME and high resolution GC/MS, among other esters.

Phenethyl phenylacetate (0.40 to 1.39 % in T1A and T7B respectively) was present in all sparkling wines under study. The presence of this compound in sparkling wines has not yet been reported, but it was found in linden and is known to present a fruity flavor. It belongs to the family of phenylacetic acid derivatives, compounds that contain a phenylacetic acid moiety, which consists of a phenyl group substituted at the second position by an acetic acid.

Diethyl hidroxybutanoate was found as a small relative area percentage in sparkling wines of almost all treatments, except T4A, 6B, 7B, and 8A. It was also found by Welke (23) in Chardonnay base wines from South Brazil, but to the knowledge of the authors, it has not yet been found in sparkling wines.

Ethyl tetradecanoate, hexyl acetate and monoethyl succinate were found in all almost all wines. Even though their signal to noise ratio was below 1:3 in this study, their presence was taken into account because of good mass spectral quality. Ethyl tetradecanoate and hexyl acetate compounds were also found by Riu-Aumatell et al. (29) in CAVA sparkling wine. Nicolli et al. (30) tentatively identified this ester in Moscatel sparkling wines using HS-SPME-GC/MS and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) with mass spectrometric detection, while investigating the profile of Brazilian Moscatel wines and other origins.

Monoethyl and dibutyl succinate were present in sparkling wines of some of the treatments (All except T2B and T7B, and T2B, T3A and T5A, respectively), although they have not yet been reported in sparkling wines. According to a previous study (72), they are indicators of wine age and are derivatives of succinic acid. Their concentrations increase with ageing time.

Another ester, propyl lactate (from 0.58 to 1.85 %) was found in all treatments, except T 8B. According to Wu et al. (73), propyl lactate has a fruity aroma like grape, and ester odor, and there is no report of this compound in sparkling wine. The ester methyl hexadecanoate was also found by Fusté (28) in CAVA wines using simultaneous distillation extraction (SDE) and closed-loop stripping analysis (CLSA) followed by GC/MS analysis.

Nerolydol acetate is among the esters found in some of the treatments (T 1B, T 2A, T 3A, T 4A, T 4B, T 5A, T 5B, T 6B and T 8A) ranging its representation from 4.09% (T1B) to 9.05% (T6B) of the total area of the chromatogram. It is found especially in essential oils, as for example in the essential oil of *Psidium rotundatum* Griseb, *Curcuma salisb* and native *Myrcia* from Rio Grande do Sul state, Brazilxx, and yy. (73-77). Its presence in sparkling wine was never reported before.

Besides the above mentioned compounds responsible for wine aroma, higher alcohols are quantitatively one of the most important groups of volatile compounds produced by yeast during alcoholic fermentation of sugars. Higher alcohols are formed by yeast metabolism by decarboxylation and subsequent reduction of α -ketoacids produced as intermediates of aminoacids biosynthesis and catabolism (60). One of the higher alcohols found in the present study is hexanol. The origin of hexanol can be related to the lipooxygenase activity in the the grapes and/or must aeration. The limit of perception for hexanol was estimated as 8 mg L^{-1} and, as well as other C6 alcohols, it may present intense herbaceous and greasy odours. (68,78).

The compound 2,3-butanediol was another alcohol found in most of the treatments of sparkling wines of the present study (except T 2B and T 3A). Due to its very high threshold value (about 150 mg l^{-1}) (79,80), it generally does not affect sensory qualities of alcoholic beverages, although if present in high concentrations, it may may affect wine aroma due to its slightly bitter taste and wine body because of its viscosity. Its concentration in wine may vary from 0.2 to 3 g L^{-1} (81). Welke et al (32) have also found 2,3-butanediol in the headspace of Chardonnay sparkling wines in higher proportion than in their corresponding base wines.

Another important chemical class in sparkling wine composition is carboxylic acids. Besides the major presence of octanoic acid (11.14% to 18.68%), hexanoic acid (2.98% to 4.34%) and decanoic acid (1.01% to 4.24%) were also found in several sparkling wines. Hexanoic acid is known for its cheese and rancid aroma, with a odor threshold of $420 \mu\text{g L}^{-1}$ (82). Octanoic acid was correlated to green pepper aroma by Tao and Zhang (83) and decanoic acid was correlated to fatty and unpleasant aroma (82).

Hexanoic acid, octanoic acid and decanoic acid were tentatively identified by Welke et al. (67) in the headspace of a Chardonnay base wines and also in its

corresponding sparkling wines produced by Traditional method, using the same procedure employed in this work. They found the first two acids in higher normalized area percentage in the sparkling wines, when compared to corresponding base wines. However, decanoic acid was found in higher concentrations in the base wines when compared to its sparkling wines.

Minor compounds in terms of chromatographic area percentage may be also mentioned, as some of them belong to chemical groups that are well known for its positive and primary flavor impact to sparkling wine aroma and also for their low odour threshold, such as for example terpenoids; they represent a significant group of compounds of *Vitis vinifera* L. wines due to their aroma properties, such as magnolia flowers, having citrusy notes with green, woody, vegetative odor with hints of lavender (60).

The monoterpenes limonene and linalool and the sesquiterpenes nerolidol, and farnesene were found in the wine studied. Limonene was present in the headspace of wines of almost all treatments, although it was not possible to properly evaluate its share in the sum of all chromatographic areas because of its signal to noise ratio was too low.

Linalool was also identified and quantified in a study which aimed to characterize Brazilian sparkling wines made with five different sparkling wines produced with grapes of Sauvignon Blanc, Riesling Renano, Pinot Gris, Pinot Noir and Chardonnay by traditional method (57).

The oxygenated sesquiterpene spathulenol (0.13 to 1.01 % in T 2A to T 6A, T 8A, T 1B, T 5B and T 6B sparkling wines) is reported as fruity, herbaceous and herbal according to Choi (84) and can be found in some floral and wood shrub essential oils. According to Salem et al. (85), Spathulenol is a volatile compound abundant in leaves of *Eucalyptus* sp. and is present also in oak wood (86). During wine aging, spathulenol contained in wood might solubilize in aged wines, however there is no report in the

literature regarding the presence of this compound in sparkling wines so far. The presence of spathulenol in the sparkling wine of our study may be due to the fact that the vineyard where the grapes were grown is located very close to a eucalyptus plantation.

Farnesene, a sesquiterpene hydrocarbon, was present in sparkling wines of T4B (0.51%); T5A (0.46%); T6B (0.43%); T8A (0.59%). It was the major sesquiterpene quantified by Coelho et al (64) in sparkling wine made with 'Fernão-Pires' grapes (Traditional method).

Cluster analysis was performed using chromatographic areas of fourteen volatile compounds of the 16 sparkling wines under investigation: ethyl acetate, ethyl butanoate, ethyl lactate, hexanol, isoamyl acetate, isoamyl alcohol, hexanoic acid, ethyl hexanoate, propyl lactate, linalool, phenylethyl alcohol, octanoic acid, diethyl succinate and diethyl hydroxybutanoate. These fourteen compounds were chosen because of their higher Fisher ratio. The aim was to verify the presence of different clusters of second fermentation treatments (different yeasts and/or adjuvants) due wine to volatile profiles.

Figure 1 shows that the grouping in the dendrogram can be divided in two clusters by the Euclidian distance between 20 and 25. This multivariate statistical analysis was

able to separate the treatments (T) 1A, 1B, 2A, 2B, 3B and 4A from other treatments.

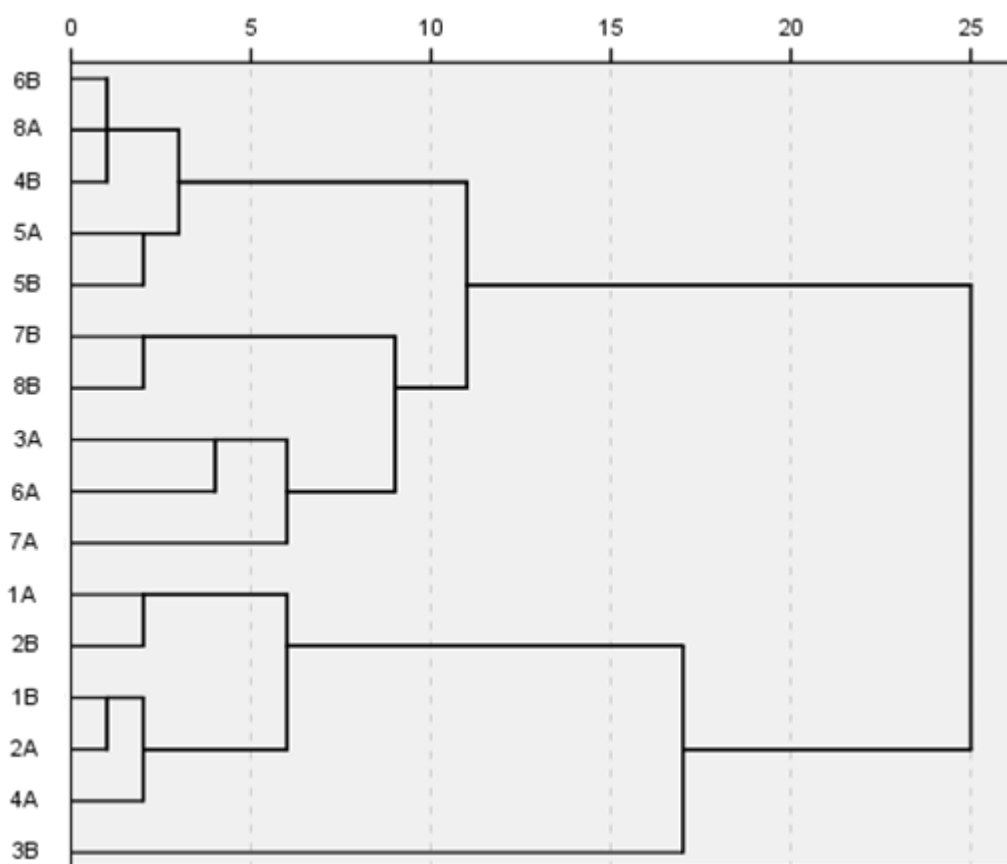


Figure 1. Dendrogram obtained using Ward's method and Euclidean distances for the chromatographic areas of volatile compounds of sparkling wines made by an assemblage of Chardonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano and Pinot Noir grapes that were submitted to different adjuvants during second fermentation and fermented with two different commercial yeasts: *S. bayanus* and *S. cerevisiae*. A and B refer to the use of *S. cerevisiae* and *S. bayanus*, respectively. Experimental conditions are reported in Materials and Methods, item Winemaking.

Chromatographic areas of the volatile compounds of the sixteen sparkling wines produced using two different yeasts and eight (8) different adjuvants were submitted to cluster analysis. Wines produced in treatments T1A, T 1B, T 2A, T 2B were part of the same cluster in Figure 1, which means that these wines showed similar volatile profile, independently of the type of yeasts employed. In this case the use of the adjuvants and Thiastozol helped producing similar a similar volatile profile.

A qualitative characterization of the volatile compounds of sixteen sparkling wines from the South of Brazil, using HS-SPME with GC/MS analyses was performed,

having the same base wine as starting point and using two different yeasts (*S. bayanus* e *S. cerevisiae*) and adjuvants during second fermentation. Cluster analysis of chromatographic areas of the 16 sparkling wines has not shown significant differences among the distinct second fermentation treatments. Future studies are necessary to further elucidate differences among volatile compounds of sparkling wines coming from distinct second fermentation treatments and ageing, using more sensitive chromatographic techniques, such as GC×GC, along with sensorial analyses.

Acknowledgements

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for MSc Aline's scholarship, CNPq and FAPERGS for project resources. We would also like to acknowledge Paulo Celso for allowing us to carry out the physico-chemical analyses at Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO).

Abbreviations Used

PC = principal component

LTPRI = linear temperature programmed retention indices

Lit = data reported in scientific literature

g / hL = gram per hectoliter

mEq / L = milliequivalents per liter

v/v = volume per volume

FTIR = Fourier transform infrared spectroscopy

EtOH = ethanol

GC = gas chromatography

MS = mass spectroscopy

Disclosure Statement

There were no conflicts of interest in the preparation of this manuscript.

References

- (1) Antonelli, A.; Castellari, L.; Zambonelli, C.; Carnacini, A. Yeast influence on volatile composition of wines. *J Agric Food Chem.* **1999**,*47*, 1139–1144.
- (2) Delfini, C.; Cocito, C.; Bonino, M.; Schellino, R.; Gaia, P.; Baiocchi, C. Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas. *J Agric Food Chem* **2001**,*49*, 5397–5408.
- (3) Estevez, P.; Gil M.; Falque, E. Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines. *Int J Food Sci Technol.* **2004**, *39*, 61–69.
- (4) Regodon, J.M.; Perez-Nevado, F.; Ramirez, M.F. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme Microb Technol.* **2006**,*40*, 151–157.
- (5) Hidalgo, P.; Pueyo, E.; Pozo-Bayón, M.A.; Martinez-Rodriguez, A.J.; Martín-Álvarez, P.; Polo, M.C. Sensory and analytical study of rosé sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *J. Agric. Food Chem*, **2004**, *52*, 6640–6645.
- (6) Swiegers, J.H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2005**, *11*, 139–173.
- (7) Hernández-Orte, P.; Ibarz, M.J.; Cacho, J.; Ferreira, V. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem.* **2005**,*89*, 163–174.
- (8) Bell, A. A.; Ough, C. S.; Kliewe, W. M. Effects on must and wine composition, rates fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson seedles grapevine. *Am. J. Enol. Viticult.*, **1979**, *30*, 124–129.
- (9) Pérez-Serradilla, J.A.; Castro, L.M.D. Role of lees in wine production: A review. *Food Chem.*, **2008**, *111*, 447–456.
- (10) Monteiro, F.F.; Bisson, L.F. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Viticult.*, **1991**,*42*, 47–57.

- (11) Webster, D.R.; Edwards, C.G.; Spayd, S.E.; Peterson, J.C.; Seymour, B.J. Influence of vineyard nitrogen fertilization on the concentrations of monoterpenes, higher alcohols, and esters in aged Riesling wines. *Am. J. Enol. Viticult.*, **1993**, *44*, 275–284.
- (12) Albers, E.; Larsson, C.; Liden, G.; Niklasson, C.; Gustafsson, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1996**, *62*, 3187–3195.
- (13) Butzke, C. Survey of Yeast Assimilable Nitrogen Status in Musts from California, Oregon, and Washington. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1998**, *49*, 220–224.
- (14) Perez-Coello, M.S.; Briones P.A.I.; Ubeda Iranzo, J.F.; Alvarez, P.J. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiology*. **1999**, *16*, 563–573.
- (15) Lurton, L.; Snackers, G.; Roullannd, C.; Galy, B.; Versavaud, A. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 485–491.
- (16) Patel, S.; Shibamoto, T. Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine. *J. Food Compos. Anal.*, **2003**, *16*, 469–476.
- (17) Pérez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Martínez-Lapuente, L.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Multivariate analysis for the differentiation of sparkling wines elaborated from autochthonous Spanish grape varieties: volatile compounds, amino acids and biogenic amines. *Eur Food Res Technol.* **2013**, *236*, 827–841.
- (18) Torrea, D.; Fraile, B.; Garde, T.; Ancín, C. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control.* **2003**, *14*, 565–571.
- (19) Salmon, J.M.; Vincent, O.; Mauricio, J.C.; Bely, M.; Sugar Transport Inhibition and Apparent Loss of Activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a Major Limiting Factor of Enological Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 56–64.
- (20) Ortega-Heraz M.; González-SanJosé M.L.; Beltrán S., 2002. Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, *458*, 85–93.
- (21) Piñeiro Z., Palma M., Barroso C.G. Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *513*, 209–214.
- (22) Zalacain A., Marín J., Alonso G.L., Salinas M.R. Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta.* **2007**, *71*, 1610–1615.
- (23) Welke, J.E.; Zanus, M.; Lazarotto, M.; Schmitt, K.G.; Zini, C.A. Volatile characterization by multivariate optimization of headspace-solid phase microextraction and sensorial evaluation of Chardonnay base wines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2012**, *23*, 678–687.

- (24) Butkhup, L. Jeenphakdee, M. Jorjong, S. Samappito, S. Samappito, W. Chowtivannakul, S. HS-SPME-GC-MS analysis of volatile aromatic compounds in alcohol related beverages made with mulberry fruits. *Food Sci. Technol.* **2011**, *20* (4),1021-1032
- (25) Zellner, B. A.; Bicchi, C.; Dugo, P.; Rubiolo, P.; Dugo G.; Mondello, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 297–314.
- (26) Francioli, S.; Guerra, M.; López-Tamames, E.; Guadayol, J.M.; Caixach, J. Aroma of sparkling wines by headspace-solid phase microextraction and gaschromatography/mass spectrometry. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 404-408.
- (27) Francioli, S.; Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Volatile Compounds by SPME-GC as Age Markers of Sparkling Wines. *Am J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 158-162.
- (28) Bosch-Fusté.; Riu-Amatell, M.; Guadayol, J.J.; Caixach, J.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. *Food Chem.*, **2007**, *105*, 428
- (29) Riu-Aumatell, M.; Bosch-Fuste´, J; Lo´pez-Tamames, E.; Buxaderas, S. Development of volatile compounds of CAVA (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry.* **2006**, *95*, 237–242.
- (30) Nicolli, K.P.; Welke, J.E.; Closs, M. Caramão, E.B.; Costa, G.; Manfroi, V.; Zini, C.A. Characterization of the Volatile Profile of Brazilian Moscatel Sparkling Wines through Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *00*, 1-20.
- (31) Soares, R.D.; Welke, j.e.; Nicolli, K.P.; Zanus, M.; Caramão, E.B.; Manfroi, V.; Zini, C.A. Monitoring the evolution of volatile compounds using gas chromatography during the stages of production of Moscatel sparkling wine. *Food Chem.* **2015**, *18*, 291–304.
- (32) Welke, J.E.; Zanus, M.; Lazzarotto, M.; Alcaraz Z.C. Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine. *Food Research International*, **2014**, *59*, 85-99.
- (33) Johnson, R.A.; Wichern, D.W. Applied multivariate statistical analysis. *Rio de Janeiro: Prentice-Hall.* **1999**, *4th ed.*
- (34) Gurbuz, O.; Rouseff, J.M.; Rouseff, R.L. Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography-Olfactometry and gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Agric. Food. Chem.*, **2006**, *54*, 3990-3996.

- (35) Hierro, E.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J.A. Headspace volatile compounds from salted and occasionally smoked dried meats (cecinas) as affected by animal species, *Food Chem.*, **2004**, *85*, 649-657.
- (36) Mondello, L.; Dugo, P.; Basile, A.; Dugo, G. Interactive use of linear retention indices, on polar and apolar columns, with a MS-library for reliable identification of complex mixtures, *J. Microcolumn.*, **1995**, *7*, 581-591.
- (37) Deport, C.; Ratel, J.; Berdagué, J.L.; Engel, E. Comprehensive combinatory standard correction: A calibration method for handling instrumental drifts of gas chromatography-mass spectrometry systems, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1116*, 248-258.
- (38) Engel, E.; Ratel, J. Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication, *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1154*, 331-341.
- (39) Su, Y.C.; Ho, C.L.; Wang, E.I.C.; Chang, S.T., Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts, *Taiwan J. For. Sci.* **2006**, *21*, 49-61.
- (40) Dickens, J.C. Predator-prey interactions: olfactory adaptations of generalist and specialist predators, *Agric. For. Entomol.*, **1999**, *1*, 47-54.
- (41) Rojas, L.B.; Usubillaga, A. Composition of the essential oil of *Satureja brownei* (SW.) Briq. from Venezuela. *Flavour Fragr. J.*, **2000**, *15*, 21-22.
- (42) Welke, J. Uso da microextração em fase sólida e da cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente na caracterização de voláteis de vinhos gaúchos. PhD Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2012**.
- (43) Lalel, H.J.D.; Singh, Z.; Tan, S.C. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity. *Postharvest Biol. Technol.* **2003**, *29*, 205-218.
- (44) Robinson, A.L.; Ebeler, S.E.; Solomon, P.S.; Trengove, R.D. Interactions between Wine Volatile Compounds and Grape and Wine Matrix Components Influence Aroma Compound Headspace Partitioning. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10313-10322.
- (45) Mallia, S.; Escher, F.; Dubois, S.; Schieberle, P.; Schlichtherle-Cerny, H. Characterization and quantification of odor-active compounds in unsaturated fatty acid/conjugated linoleic acid (UFA/CLA)-enriched butter and in conventional butter during storage and induced oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 7464-7472.
- (46) Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, **2001**.
- (47) Boido, E.; Lloret, A.; Medina, K.; Farñia, L.; Carrau, F.; Versini, G.; Dellacassa, E. Aroma composition of *Vitis vinifera* Cv. tannat: the typical red wine from Uruguay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5408-5413.

- (48) Garcia-Carpintero, E.G.; Sanchez-Palomo, E.; Gonzalez-Vinas, M.A. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in LaMancha region. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 61-70.
- (49) Gudzic, B.; Dordevic, S.; Palic, R.; Stojanovic, G. Essential oils of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum* L. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 201-203.
- (50) Apel, M.A.; Sobral, M.; Schapoval, E.E.S.; Henriques, A.T.; Menut, C.; Bessiere, J.-M. Essential oil composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*. *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 321-322.
- (51) Wu, S.; Zorn, H.; Krings, U.; Berger, R.G. Characteristic Volatiles from Young and Aged Fruiting Bodies of Wild *Polyporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Fr. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 4524-4528.
- (52) Judzentiene, A.; Budiene, J. Variability of *Artemisia campestris* L. essential oils from Lithuania. *J. Essent. Oil Res.*, **2014**, *26*, 328-333.
- (53) Senatore, F.; Rigano, D.; de Fusco, R.; Bruno, M., Composition of the essential oil from flowerheads of *Chrysanthemum coronarium* L. (Asteraceae) growing wild in Southern Italy, *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 149-152.
- (54) Schossler, P.; Schneider, G.L.; Wunsch, D.; Soares, G.L.G.; Zini, C.A. Volatile Compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using Solid Phase Microextraction and Hydrodistillation. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 277-287.
- (55) Moio, L.; Addeo, F., Grana Padano cheese aroma. *J. Dairy Res.* **1998**, *65*, 317-333.
- (56) Woerdenbag, H.J.; Windono, T.; Bos, R.; Riswan, S.; Quax, W.J. Composition of the essential oils of *Kaempferia rotunda* L. and *Kaempferia angustifolia* Roscoe rhizomes from Indonesia. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 145-148.
- (57) Caliari, V.; Burina, V.M.; Rosier, J.P.; BordignonLuiz, M.T.; Aromatic profile of Brazilian sparkling wines produced with classical and innovative grape varieties. *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 965–973.
- (58) Peinado, R. A.; Moreno, J.; Bueno, J. E.; Moreno, J. A.; Mauricio, J. C. Comparative study of aromatic compounds in two young white wine subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem.* **2004**, *84*, 585–590.
- (59) Santos, J. P.; Arroyo, T.; Aleixandre, M.; Lozano, J.; Sayago, I.; García, M. A comparative study of sensor array and GC–MS: Application to Madrid wine characterization. *Sensors and Actuators B.* **2004**, *102*, 299–307.
- (60) Ugliano, M.; Henschke, P.A. Yeasts and wine flavor. In *Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas, M. V, Polo, C.; Eds.; Publisher: Springer, New York, USA. **2009**, 313-392.

- (61) Zoecklein, B.W.; Tony K. Wolf, T.K.; M, L.P.; Miller, K.; Birkenmaier, S.S. Effect of Vertical Shoot-Positioned, Smart-Dyson, and Geneva Double-Curtain Training Systems on Viognier Grape and Wine Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 1
- (62) Song, J.Q.; Li, H.; Liang, Y.Y.; Tao, Y.S.; Mi, C.Q.; Qian, M.C.; Wang, H. Characterisation of volatile components of red and sparkling wines from a new wine grape cultivar 'Meili' (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*. **2013**, *52*, 1-8.
- (63) Coelho, E.; Coimbra, A. M.; Nogueira, J.M.F.; Rocha, S. M. Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption. *Anal. Chim. Acta.*, **2009**, *635*, 214–221.
- (64) Coelho, E.; Perestrelo, R.; Nengb, N. R.; Câmara, J. S.; Coimbra, M. A.; Nogueira, J.M.F.; Rocha, S. M. Optimisation of stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry for the determination of volatile compounds in wines, *Anal. Chim. Acta*, **2008**. *624*, 79–89.
- (65) Simpson, R.F. Some important aroma components of white wine. *Food Technol. Aust.* **1979**. *31*, 516-522.
- (66) Mamede, M. E.O.; Cardello, H.M.A.B.; Pastore, G. M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. *Food Chem.* **2005**, *89*, 63-68.
- (67) Welke, J.E.; Zanus, M.; Lazzarotto, M.; Pulgati, F.H.; Zini, C.A. Main differences between volatiles of sparkling and base wines accessed through comprehensive two dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection and chemometric tools. *Food Chem.* **2014**, *164*, 427–437.
- (68) Rapp, A.; Versini, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. *Vitic. Enol. Sci.* **1996**. *51*, 193-203.
- (69) Lilly, M.; Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S.; Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavour profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol*, **2000**. *66*, 744–753.
- (70) Campo, E.; Cacho, J.; Ferreira V. The chemical characterization of the aroma of dessert and sparkling white wines (Pedro Ximénez, Fino, Sauternes, and Cava) by gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative analysis. *J Agric Food Chem.* **2008**, *56*, 2477-2484.

- (71) Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; Vichi, S.; López- Tamames, E.; Buxaderas, S. Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *J Agric Food Chem.* **2010**, *58*, 2455–2461.
- (72) Moreira, M.; Hogg, C.; Revel, G. Recherche des Composés Volatils Temoins du Vieillissement dans le Vin de Porto, type Tawny. *Proceedings of I congresso internacional de la vitivinicultura atlântica.* **1994**.
- (73) Wu, J.; Li, A.; Huang, M.; Chen, H.; Sun, J.; Sun, B. Discovery and research of propyl lactate from 30 kinds of Chinese Liquors. *J. Chinese Inst. Food Sci. and Technol.* **2015**, *15*, 194-200.
- (74) Pino, J. A.; Rosado, A.; Bello, A.; Urquiola, A.; Garcia, S.; Essential Oil of *Psidium rofundafum* Griseb. from Cuba, *J. Essent. Oil Res.* **1999**, *11*, 783-784.
- (75) Al-Rezaa, S.M.; Rahmanb, A.; Sattar, M.A.; Rahmanc, M.O.; Fida, H.M. Essential oil composition and antioxidant activities of *Curcuma aromatica* Salisb. *Food Chem Toxicol.* **2010**, *48*, 1757–1760.
- (76) Hachicha, S. F.; Skanji, T.; Barrek, S.; Zarrouk, H.;Ghrabi, Z.G. Chemical composition of *teucrium alopecurus* essential oil from tunisia. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 413-415.
- (77) Limberger, R.P.; Sobral, M.; Henriques, A.T.; Menut, C.; Bessière J-M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quím. Nova*, **2004**, *27*, 6-11.
- (78) Roussis, I.G.; Patrianakou, M.; Drossiadis, A. Protection of Aroma Volatiles in a Red Wine with Low Sulphur Dioxide by a Mixture of Glutathione, Caffeic Acid and Gallic Acid. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2013**, *34*.
- (79) Dubois, P. Les arômes des vins et leurs défauts. *Revue Française d'Oenologie.* **1994**, *145*, 27-40.
- (80) Shinohara, T.L. L'importance des substances volatiles du vin. Formation et effets sur la qualité. *Bul. O.I.V. Paris.* **1984**, *57*, 607-618.
- (81) Sponholz, W.R.; Dittrich, H.H.; Muno, H. Diols in wine. *Vitic. Enol. Sci.* **1993**, *49*, 23-26.
- (82) Cullere, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 1653-1660.
- (83) Tao, Y.S.; Zhang, L. Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine in Changli County (China). *LWT - Food Sci. Techn.* **2010**, *43*, 1550-1556.

(84) Choi, H.-S. Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2687-2692.

(85) Salem, M.Z.M.; Ashmawy, N.A.; Elansarycd, H.O.; El-Settawy, A.A. Chemotyping of diverse Eucalyptus species grown in Egypt and antioxidant and antibacterial activities of its respective essential oils. Short Communication. *Natural Product Research.* **2014**

(86) Pérez-Coello, M.S.; Sanz, J.; Cabezudo, M.D. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatile compounds in oak wood used for ageing of wines and spirits. *Chromatographia.* **1998**, *47*, 427-432.

CONCLUSÕES

Este trabalho caracterizou qualitativamente o perfil dos compostos voláteis de 16 vinhos espumantes produzidos em uma vinícola gaúcha a partir de um *assemblage* inovador (Chadonnay, Riesling, Viognier, Trebbiano e Pinot Noir), os quais foram submetidos a diferentes tratamentos durante a segunda fermentação, através de HS-SPME seguida de análises em GC/MS. Os compostos voláteis encontrados no *headspace* dos vinhos em estudo se mostraram semelhantes na maior parte dos vinhos investigados, o que indicou que o uso das leveduras *S. bayanus* e *S. crevevisiae* não alterou significativamente o perfil de voláteis destes vinhos em termos qualitativos. O mesmo ocorreu no que diz respeito aos diferentes adjuvantes nutricionais empregados durante a segunda fermentação. Nenhum dos compostos majoritários tentativamente identificados é reportado por efeito deletério ao aroma dos vinhos. Entretanto, estudos futuros são necessários, no que tange à análise sensorial, bem como no que diz respeito a técnicas cromatográficas mais abrangentes e sensíveis (por exemplo, cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector espectrométrico de massas), de forma que se possa melhor definir possíveis diferenças entre os compostos voláteis dos vinhos devidas à ação das diferentes leveduras e nutrientes empregados neste trabalho.