



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

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE ELABORAÇÃO SOBRE O PERFIL
VOLÁTIL, COMPOSIÇÃO FENÓLICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
CARACTERÍSTICA SENSORIAL DO ESPUMANTE PROSECCO**

BRUNA DACHERY

PORTO ALEGRE

2020

BRUNA DACHERY

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE ELABORAÇÃO SOBRE O PERFIL
VOLÁTIL, COMPOSIÇÃO FENÓLICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
CARACTERÍSTICA SENSORIAL DO ESPUMANTE PROSECCO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Vitor Manfredi

PORTO ALEGRE

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Dachery, Bruna
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE ELABORAÇÃO
SOBRE O PERFIL VOLÁTIL, COMPOSIÇÃO FENÓLICA,
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERÍSTICA SENSORIAL DO
ESPUMANTE PROSECCO / Bruna Dachery. -- 2020.
140 f.
Orientador: Vitor Manfroi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Aromas. 2. Vinho. 3. Compostos voláteis. 4.
Elaboração de espumante. 5. Compostos fenólicos. I.
Manfroi, Vitor, orient. II. Título.

Bruna Dachery

TESE

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE ELABORAÇÃO DE ESPUMANTES
SOBRE O PERFIL VOLÁTIL, COMPOSIÇÃO FENÓLICA, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E CARACTERÍSTICA SENSORIAL DO ESPUMANTE PROSECCO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de

DOUTORA 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: 18/09/2020.

Pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Orientador – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Plinho Hertz

Banca – Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Banca – Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Coordenador do Programa de Pós Graduação

em Ciência e Tecnologia de Alimentos

(PPGCTA)

Prof. Dr. Guilherme Martins

Banca – Bordeaux Sciences Agro,
França

Prof^a. Dr^a. Simone Hickmann Flores

Diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia

de Alimentos - ICTA/UFRGS

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, que muito cedo tiveram
que lidar com as grandes responsabilidades da vida, e por isso
são meus exemplos de força e perseverança.
Sou grata por sempre me encorajarem!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Vitor Manfroi, por quem sempre cultivei profunda admiração e respeito pela sua pessoa e pelo seu trabalho. A confiança em mim depositada durante meu mestrado e doutorado, me permitiu ir além da pesquisa. Sou grata por você aceitar e incentivar cada novo desafio profissional que surgiu durante esta trajetória, fez toda diferença para a profissional que sou hoje.

A Prof. Juliane Welke, por quem sou imensamente agradecida pela parceria ao longo destes anos. Obrigada pela paciência e compreensão, mas acima de tudo, pela oportunidade de poder aprender contigo e me inspirar a ser uma profissional cada vez melhor.

Aos colegas do Laboratório, em especial ao Flávio Veras, por ter sido um grande parceiro e amigo, com quem cultivei muitos bons momentos. Obrigada por toda a sua ajuda e apoio.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pelo suporte financeiro.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos e Instituto de Química da UFRGS pela disponibilização da infraestrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos seus professores e funcionários, pela presteza e compreensão em todos os momentos.

Aos amigos, pelo apoio, pela compreensão, pelos bons momentos que passamos juntos e por me aguentarem nessa caminhada.

Aos meus pais Volmir e Luciana, minhas irmãs Mônica e Rafaela, pelo amor, pelo carinho e pela forte união que temos, a qual muito me orgulha. Sou grata pelo incentivo em todos os momentos, para a condução e conclusão deste trabalho.

Ao Lucas, meu companheiro e com quem divido meu projeto de vida. Obrigada por ser meu apoio e meu parceiro para compartilhar os bons vinhos (espumantes) da vida, te amo!

RESUMO

O consumo de espumantes brasileiros vêm apresentando grande crescimento no mercado nacional e internacional, acompanhando a tendência mundial a qual demonstra que a demanda por esta bebida deixou de ser sazonal. Atualmente o espumante brasileiro representa 80% do consumo total de espumantes no país, o que comprova a importância dessa bebida para o setor vitivinícola nacional. Aliado a isso, está o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que buscam contribuir para os avanços na melhoria dos processos aplicados na indústria, com vistas na otimização sem perder qualidade do produto. Desta forma, esta pesquisa busca avaliar pela primeira vez, como métodos de elaboração inusuais pela indústria vinícola podem colaborar para a obtenção de espumantes de qualidade, por meio da otimização do processo de elaboração. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de quatro diferentes métodos de elaboração de espumantes, que incluem duas fermentações (Tradicional e Charmat) e uma fermentação (Ancestral e Fermentação Única em Tanque), sobre o perfil volátil, sensorial, composição fenólica e capacidade antioxidante. Os espumantes foram produzidos com a variedade Prosecco (Glera) e avaliados através das técnicas de CG-qMS (composição volátil), ADQ (avaliação sensorial), HPLC-DAD-MS (compostos fenólicos) e ABTS e DPPH (atividade antioxidante). Os resultados mostram que espumantes produzidos a partir de uma única fermentação apresentaram bom desempenho nos parâmetros analisados, destacando-se dos métodos empregados habitualmente pela indústria, principalmente no que se refere a composição volátil e análise sensorial. Compostos voláteis tradicionalmente encontrados nos vinhos espumantes e que contribuem positivamente para o aroma, foram verificados em maior concentração nos métodos Ancestral e STF. O método Charmat apresentou a menor complexidade aromática, comparado aos demais métodos, o que foi atribuído às etapas clarificação e filtração, que podem contribuir para a redução destes compostos. A ADQ revelou que o método Ancestral se destacou na análise visual, olfativa e gustativa, sugerindo que o método preserva melhor a composição química do vinho espumante, o que pode influenciar na efervescência, evitando a perda de aromas e de moléculas que contribuem para a melhor experiência gustativa. Com relação a composição fenólica, diversas classes químicas foram detectadas, as quais o método Tradicional apresentou concentrações significativamente maiores entre os métodos avaliados, resultado referido a atividade enzimática das leveduras durante o período de autólise. A autólise também mostrou influenciar a capacidade antioxidante do espumante, mostrando valores significativamente maiores para os métodos Ancestral e Tradicional. Este estudo traz uma nova visão para o desenvolvimento de uma tecnologia para produção de espumantes de qualidade, como também poderá servir como referência para pesquisas que venham propor mudanças sobre a legislação brasileira, incluindo métodos de elaboração a partir de uma fermentação.

Palavras- chave: espumante, métodos de elaboração, Prosecco, aromas

ABSTRACT

The consumption of Brazilian sparkling wines shows significant growth on the national and international market, which is in line with the world trend of decentralisation of consumption of this beverage. Currently Brazilian sparkling wine represents 80% of the total sparkling wine consumption in the country, which proves your importance to the national wine sector. In addition, there is the development and improvement of techniques that aim to contribute for advances in improving the processes applied in the industry. Therefore, this research seeks to evaluate for the first time, as unusual elaboration methods can collaborate to obtain quality sparkling wines, through the optimization of the elaboration process. The aim of this study was to verify the influence of four different methods of sparkling wines making, which include two fermentations (Traditional and Charmat) and one fermentation (Ancestral and Single Fermentation in Tank), on the volatile, sensory, phenolic composition and antioxidant capacity. The sparkling wines were produced with Prosecco variety (Glera) and evaluated using the techniques of CG-qMS (volatile composition), QDA (sensory evaluation), HPLC-DAD-MS (phenolic compounds) and ABTS and DPPH (antioxidant activity). The results show that sparkling wines produced from a single fermentation showed good performance on analyzed parameters, standing out from the methods commonly used by industry, especially with regard to volatile composition and sensory analysis. Volatile compounds traditionally found in sparkling wines and which contribute positively to the aroma, were found in greater concentration in the Ancestral and STF methods. The Charmat method had the lowest aromatic complexity, compared to the other methods, which was attributed to clarification and filtration steps, which can contribute for reduction of these compounds. ADQ revealed that Ancestral method stood out in visual, olfactory and gustatory analysis. This findings suggests that the method better preserves the chemical composition of sparkling wine, which which can influence effervescence, avoid the loss of aromas and molecules that contribute to the best taste experience. Regarding the phenolic composition, several chemical classes were detected, which Traditional method showed significantly higher concentrations among the evaluated methods, result referred to the enzymatic activity by yeasts during the autolysis period. Autolysis has also been shown to influence the antioxidant capacity of sparkling wine, showing significantly higher values for the Ancestral and Traditional methods. This study brings a new vision for the development of a technology for production of quality sparkling wines, as well as serving as reference for research that may propose changes in Brazilian legislation, including methods of elaboration from only one fermentation.

Keywords: sparkling wine, sparkling wine production, Prosecco, volatile profile

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fluxograma da produção de espumante pelo Método Tradicional. **26**

Figura 2. Fluxograma da produção de espumante pelo Método Charmat.
29

Figura 3. Área delimitada para produção de “Prosecco Wine”, Itália. **36**

CAPÍTULO 2

Figura 1. Fluxograma do processo de elaboração dos espumantes. **65**

CAPÍTULO 4

Figure 1. Flowchart of sparkling wine production methods. **115**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Classificação do espumante no Brasil de acordo com o teor de açúcar **23**

Tabela 2. Espumantes produzidos pelo método Tradicional em regiões vitivinícolas do mundo.

27

CAPÍTULO 3

Table S1. Validation parameters of the HS-SPME-GC/MS method used to quantify the volatile compounds of sparkling wines.

86

Table S2. Volatile profile of sparkling wines quantified in Charmat, Traditional, Ancestral and Single Tank Fermentation (STF) methods. The sparkling wines were evaluated using HS-SPME-GC/MS and the compounds are listed according to their chemical classes. **87**

CAPÍTULO 4

Table 1. Chromatographic, UV-Vis, and Mass Spectroscopy Characteristics of phenolic compounds sparkling wine, obtained by HPLC-DAD-MS **116**

Table 2. Phenolic compounds concentration in the sparkling wine methods. **117**

Table 3: Antioxidant capacity of sparkling wines determined by the ABTS and DPPH methods. **119**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	18
Objetivo Geral	18
Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 VINHO ESPUMANTE	19
1.1.1 Métodos de elaboração de espumantes	21
1.1.1.1 Método Tradicional	24
1.1.1.2 Método Charmat	28
1.1.1.3 Método Ancestral	31
1.1.1.4 Método Asti	33
1.1.1.5 Método de Transferência	34
1.2 ESPUMANTE PROSECCO	35
1.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS	38
1.3.1 Aromas varietais e pré-fermentativos	39
1.3.2 Aromas fermentativos	41
1.3.3 Aromas pós-fermentativos	43
1.3.4 Compostos aromáticos em vinhos espumantes	46
1.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	49
1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS	53
1.5.1 Compostos não flavonóides	54
1.5.2 Compostos flavonóides	57
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.1 Reagentes e padrões analíticos	60
2.2 Elaboração dos espumantes	61
2.3 Parâmetros Enológicos	66
2.4 Extração dos compostos voláteis por HS-SPME	66
2.5 Análise dos compostos voláteis dos espumantes por <i>HS-SPME-GC/MS</i>	66
2.6 Caracterização do perfil sensorial dos vinhos espumantes por análise descritiva quantitativa (ADQ)	68
2.7 Análise de compostos fenólicos de vinho espumante por <i>HPLC-DAD-MS</i>	69
2.8 Avaliação da atividade antioxidante por DPPH e ABTS	70

2.9 Análise Estatística	71
CAPÍTULO 3 – Volatile and sensory profile of sparkling wines produced by faster and alternative methods (Ancestral and Single Tank Fermentation) compared to the usual methods (Charmat and Traditional)	72
CAPÍTULO 4 – Comparative study of phenolic compounds and antioxidant capacity of sparkling wine produced from different methods	92
DISCUSSÃO GERAL	120
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

INTRODUÇÃO

O Brasil vem despontando como referência na produção de vinho espumante de qualidade no mundo, e este reconhecimento pode ser constatado pelo número crescente de premiações que a bebida recebe em concursos nacionais e internacionais. Atualmente o Concurso Nacional de Espumantes, organizado pela Associação Brasileira de Enologia (ABE) a cada dois anos, evidencia a qualidade da bebida produzida no país. O concurso é conduzido de acordo com normas da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) e da União Internacional de Enólogos (UIOE), e em 2019, foram premiados com medalha de ouro espumantes produzidos nos estados da Bahia, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, o que demonstra o alto padrão dos espumantes produzidos em diferentes *terroirs* do país. Sobre o reconhecimento internacional, em 2018, segundo dados do Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), das 302 medalhas internacionais que os vinhos brasileiros receberam, 210 foram premiações para vinhos espumantes (IBRAVIN, 2018).

A qualidade do espumante brasileiro é refletida nos dados sobre a produção da bebida, cujo o aumento foi 240% entre os anos de 2003 e 2013, e sua produção já representa um volume maior que a de vinhos finos tranquilos no país (EMB 2017). Segundo dados da OIV, entre os anos de 2013 e 2017, a comercialização de espumante cresceu 36% (OIV, 2018). Em termos de volume de produção, entre os anos de 2003 e 2013, a produção de vinho no mundo aumentou 7%, enquanto que para espumante o crescimento foi de 40% (OIV, 2014). Estes dados marcam a tendência para um consumo descentralizado da bebida, que anteriormente era

associado a situações de celebração, e atualmente este consumo ocorre de forma regular, ao longo do ano.

Embora países como França, Itália, Espanha e Alemanha sejam responsáveis por 74% da produção mundial da bebida (OIV, 2014), no Brasil, para cada 10 espumantes consumidos, 8 são brasileiros (EMBRAPA, 2017), o que reforça a qualidade e a relação custo x benefício da bebida produzida no país (ARAÚJO et al., 2019).

O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de espumantes do Brasil, representando 85% da produção nacional (EMBRAPA, 2017). Nele destaca-se a região da Serra Gaúcha, que devido às suas condições climáticas, possibilita a obtenção de uvas com adequado índice de maturação, e portanto espumantes com elevado equilíbrio entre açúcares e ácidos, fator determinante para espumantes de qualidade (CAVALCANTI; HOLANDA, 2012). Entre eles encontra-se o espumante Prosecco, elaborado a partir da uva Glera, que por sua característica de leveza e refrescância no paladar é bastante consumido mundialmente. No Brasil, país tropical, o espumante Prosecco se sobressai por ser um espumante leve, ligeiramente ácido e com aromas cítricos bem perceptíveis (CAVALCANTI; HOLANDA, 2012; MARQUES; EBERT, 2014).

O termo espumante se refere exclusivamente a vinhos que tenham sido submetidos a fermentação alcoólica em ambiente fechado, e geralmente, são produzidos em duas etapas. A primeira consiste na elaboração de um vinho base, do qual são produzidos diferentes *blends*, com características particulares, que são submetidos a uma estabilização com uso do frio e então fermentados novamente, por meio da adição de levedura e açúcar. A segunda fermentação, também chamada de tomada de espuma, tem por objetivo a produção e retenção do gás

carbônico natural, obrigatório para a designação “espumante” (RIBÉREAU GAYON et al., 2006).

Os espumantes podem ser obtidos por diferentes métodos (RIBÉREAU GAYON et al., 2006; FLANZY, 2003). O método *Champenoise*, conhecido no Brasil como método Tradicional, consagrou-se como sendo o primeiro método empregado na produção de espumantes no mundo, originário de meados do século XVII, em Champagne, na França (LIGER-BELAIR, 2016). No início do século XX, surgiu o método *Charmat*, que proporcionou a obtenção de volumes maiores da bebida, por meio de um processo mais simples e menos dispendioso (BUXADERAS; LÓPEZ-TAMAMES, 2003). Apesar de haver outros meios de se produzir a bebida, tais como os métodos Asti, Ancestral e de Transferência, são os métodos Tradicional e Charmat os amplamente empregados na produção de espumantes a nível mundial (UBEDA et al., 2019).

A utilização de cada método depende do perfil qualitativo que se busca na bebida, uma vez que o método influencia a composição química e sensorial que o espumante apresenta, bem como na sua aceitabilidade pelo consumidor (UBEDA et al., 2019; UBEDA et al., 2016; STEFENON et al., 2010). Entre as características que podem ser evidenciadas pelo uso de diferentes métodos, o aroma ganha destaque, visto que durante a elaboração do espumante, reações químicas e enzimáticas influenciadas pela variedade de uva, método de elaboração e maturação, são responsáveis pela formação ou transformação de compostos voláteis, modificando o aroma da bebida (UBEDA et al., 2019; MARTINEZ-GARCIA et al., 2017; UBEDA et al., 2016; CALIARI et al., 2015; PEREZ-MAGARIÑO, 2015; WELKE et al., 2014a; RIU-AUMATELL et al., 2006).

Além do perfil volátil, os compostos fenólicos e a atividade antioxidante, sofrem alterações com a aplicação de diferentes métodos de elaboração, e sua composição varia principalmente de acordo com o tempo de maturação sobre as borras, que ocorre após o período de tomada de espuma (CALIARI et al., 2015; CALIARI et al., 2014; STEFENON et al., 2014). Uma vez que estes compostos estão associados aos benefícios do espumante à saúde, como efeito protetor contra doenças cardiovasculares, câncer ou desordens neuronais (STEFENON et al., 2015), verifica-se a importância de compreender a interferência do método na sua composição.

A indústria do vinho está em constante movimentação, e em algumas décadas passou de um setor onde a produção estava fortemente influenciada pela tradição, para uma indústria onde a ciência, a modernização tecnológica e a inovação, são fatores competitivos para sobrevivência do setor (DOLOREUX; FRIGON, 2019). Em decorrência disto, pesquisas estão sendo realizadas com enfoque no desenvolvimento de novos produtos, emprego de novas variedades de uvas e aprimoramento dos métodos de elaboração (CALIARI et al., 2014; CALIARI et al., 2015; GIANVITO et al., 2018). Considerando o cenário atual de produção e consumo de espumantes a nível mundial e principalmente brasileiro, este estudo tem o intuito de avaliar pela primeira vez, como métodos de elaboração inusuais pela indústria vinícola podem colaborar para a obtenção de espumantes de qualidade, por meio da otimização do processo de elaboração. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência de quatro diferentes métodos de elaboração de espumantes, que incluem duas fermentações (Tradicional e Charmat) e uma fermentação (Ancestral e Fermentação Única em Tanque), sobre o perfil volátil,

sensorial, composição fenólica e capacidade antioxidante de espumantes Prosecco *brut*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a influência de quatro métodos distintos de elaboração de espumantes, que incluem duas fermentações (Tradicional e Charmat) e uma fermentação (Ancestral e Fermentação Única em Tanque), sobre o perfil volátil, características sensoriais, composição fenólica e capacidade antioxidante de espumantes Prosecco *brut*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil volátil de espumantes a partir da técnica de cromatografia gasosa GC/qMS;
- Identificar e quantificar compostos fenólicos de espumantes por meio de HPLC-DAD-MS;
- Avaliar a capacidade antioxidante de espumantes em relação aos radicais ABTS e DPPH;
- Verificar as características sensoriais de espumantes por meio da técnica Análise Descritiva Quantitativa (ADQ).

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 VINHO ESPUMANTE

Vinhos com presença de gás são conhecidos desde os tempos do Império Romano, onde eram chamados de *vinum titillum* (vinho que faz cócegas). Também se tem registro em documentos da literatura catalã, sobre vinhos que “saltam”, em meados do século XIV (LIGER-BELAIR, 2016). Os ingleses, grandes compradores de vinhos franceses, já praticavam a técnica de “reavivar” o vinho com o uso de melaço ou suco de outras frutas, o que permitia a formação de borbulhas na bebida, ou seja, uma segunda fermentação (LIGER-BELAIR; ROCHARDS, 2008). Contudo, foi somente no século XVII que este vinho efervescente passou a receber maior notoriedade, devido às técnicas desenvolvidas pelo monge Dom Pierre Perignón, mestre da adega da abadia de Hautvillers, da região de Champagne na França, o grande responsável por aprender a controlar a efervescência dos vinhos e torná-la um atributo de qualidade (BUXADERAS; LÓPEZ- TAMAMES, 2012).

A grandes descobertas acerca da produção de espumantes, iniciaram com o emprego de garrafas de vidro para armazenagem de vinho por volta de 1600. Com este advento, a efervescência do vinho se tornou mais evidente, uma vez que anteriormente os vinhos eram armazenados em barris de madeira, que permitiam a evaporação do gás carbônico através dos seus poros (LIGER-BELAIR; POLIDORI; ZÉNINARI, 2012).

Contudo, essa mudança trouxe desafios para alguns produtores de vinho, principalmente os da região de Champagne, onde o clima esfriava rapidamente após o verão, fazendo com que os vinhos cessassem as fermentações antes que todo o açúcar da uva fosse transformado em álcool e gás carbônico, visto que as leveduras,

microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica, diminuem suas atividades em baixas temperaturas (LIGER-BELAIR, 2013; BUXADERAS; LÓPEZ- TAMAMES, 2012).

Com a parada da fermentação, os produtores de vinhos, acreditando que o vinho estivesse pronto, o engarrafavam. No entanto com o aumento das temperaturas na primavera, a atividade microbiológica era retomada e o dióxido de carbono produzido era aprisionado na garrafa, tornando o vinho efervescente (BUXADERAS; LÓPEZ- TAMAMES, 2003). Esta era uma característica indesejável nos vinhos, e por muitos anos, os produtores de Champagne tentaram evitar este fenômeno, pois havia uma perda de produção muito grande (em torno de 30 a 40 %), devido o aumento da pressão interna da garrafa e conseqüentemente sua explosão. O monge Dom Perignón então, procurou favorecer e controlar as borbulhas na garrafa por meio de uma técnica desenvolvida por ele, chamada de *Champenoise*, o primeiro método oficial para elaboração de espumante, que procurava refermentar o vinho depois de engarrafado (RIANT; VILLEZ, 2015).

Desde então, os vinhos efervescentes da Champagne passaram a ser consumidos pela corte francesa, e logo se tornaram um produto elitizado, símbolo de elegância e riqueza, se posicionando em um patamar acima de qualquer outro vinho produzido (RIANT; VILLEZ, 2015). Com o passar dos anos, muitas técnicas foram desenvolvidas com o intuito de aprimorar a qualidade da bebida, e assim, outras regiões vitícolas passaram a produzir espumantes, tornando a bebida acessível e conhecida mundialmente (GIANVITO, 2019).

Espumantes são vinhos que tenham sido submetidos a fermentação alcoólica em ambiente fechado, e geralmente são produzidos em duas etapas, onde a primeira consiste na elaboração de um vinho base, que pode ser utilizado para a

produção de diferentes *cuvées* (mistura de diferentes vinhos base) e então submetidos a uma estabilização com uso do frio e fermentados novamente, por meio da adição de levedura e açúcar. A segunda fermentação tem por objetivo a produção e retenção do gás carbônico natural, obrigatório para a designação “espumante” (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Segundo dados da OIV, o espumante é o produto derivado da uva, com maior percentual de aumento na produção (36% entre 2013 e 2017) (OIV, 2018), e os países França, Espanha, Itália, Alemanha e Rússia responsáveis por 74% da produção mundial (OIV, 2014). No Brasil, o espumante também tem se tornado uma bebida bastante representativa, em termos de comercialização. Entre os anos de 2005 e 2017, registrou-se um aumento superior a 150 % no consumo, dos quais a maior parte refere-se ao consumo de espumante brasileiro (80 %), que devido ao melhor custo benefício frente aos importados, tem ganhado maior destaque no mercado nacional (ARAÚJO, 2019). De acordo com os dados da União Brasileira de Vitivinicultura, ao longo de 18 anos (1998 - 2015) verificou-se um incremento de 619 % no volume total de espumantes comercializados no Brasil (WÜRZ et al., 2016).

1.1.1 Métodos de elaboração de espumantes

Para a elaboração de espumantes são empregados essencialmente seis métodos, e o uso de cada um dependerá exclusivamente da legislação específica de cada país, bem como as normas previstas nas regiões com indicações geográficas reconhecidas, podendo haver o uso do método que melhor contribui para a qualidade da bebida, naquele local (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; FLANZY, 2003).

De acordo com Flanzy (2003), os espumantes podem ser elaborados segundo os métodos Tradicional, Charmat, Ancestral, Método de Transferência e Método Contínuo. Além dos métodos citados, o método Asti, que no Brasil dá origem ao espumante Moscatel, também pode ser empregado na produção desta bebida, entretanto, diferente dos outros métodos, este é exclusivamente para a obtenção de espumantes doces (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Os métodos mais conhecidos mundialmente são o método Tradicional e Charmat, que são obtidos obrigatoriamente por meio de duas fermentações alcoólicas. O método Tradicional originalmente conhecido como método Champenoise, foi desenvolvido na região de Champagne na França pelo monge Dom Pérignon no século XVII. Apesar de já se consumir vinhos espumantes na França antes desta data, o método Champenoise foi o primeiro método reconhecido para a produção da bebida e responsável por impulsionar a produção a nível mundial (LIGER-BELAIR; ROCHARDS, 2008).

O método Charmat surgiu no século XX, quando o francês Eugène Charmat, aperfeiçoou e patenteou um método desenvolvido pelo italiano Federico Martinotti. Por essa razão, pode-se encontrar alguns espumantes italianos descritos como método Martinotti. Inicialmente foi desenvolvido para produzir vinho espumante com menor custo de produção, através de um processo mais simples e menos dispendioso. Neste formato, são produzidos milhares de litros de espumante de uma só vez (BUXADERAS; LÓPEZ- TAMAMES, 2003).

No Brasil é permitido produzir espumantes por três métodos: Tradicional, Charmat e Moscatel (BRASIL, 2004). Conforme o artigo 11 da Lei nº10.970, de 12 de novembro de 2004, os espumantes produzidos pelo método Tradicional ou Charmat, possuem gás carbônico proveniente exclusivamente de uma segunda

fermentação alcoólica do vinho em garrafas (Tradicional) ou em tanques fechados (Charmat), devendo conter uma pressão mínima de 4 atmosferas de pressão e um teor alcoólico entre 10 e 13 %.

No artigo 12 da mesma legislação, está previsto a definição de espumante Moscatel, que é o vinho cujo gás carbônico é proveniente da fermentação em recipiente fechado, a partir do mosto da uva Moscatel, com pressão mínima de 4 atmosferas de pressão e um teor alcoólico entre 7 e 10 %, com no mínimo 20 gramas de açúcar remanescente (BRASIL, 2004).

Além das classificações referentes ao método de elaboração, os espumantes brasileiros são classificados de acordo com o teor de açúcar (Tabela 1). As classificações se enquadram majoritariamente para espumantes produzidos pelos métodos Tradicional e Charmat, havendo uma única classificação para espumante Moscatel (BRASIL, 2014).

Tabela 1. Classificação do espumante no Brasil de acordo com o teor de açúcar.

Classificação	Teor de açúcar g L⁻¹	Método
Nature	até 3	Tradicional e Charmat
Extra Brut	superior a 3 até 8	Tradicional e Charmat
Brut	superior a 8 até 15	Tradicional e Charmat
Seco, sec ou dry	superior a 15 até 20	Tradicional e Charmat
Demi-sec, meio doce ou meio seco	superior a 20 até 60	Tradicional e Charmat
Doce	superior a 60	Moscatel

Fonte: Brasil (2014)

1.1.1.1 Método Tradicional

O método Tradicional surgiu na França no século XVII, a partir das descobertas do monge Dom Perignon, em Champagne, responsável por aprimorar as técnicas de elaboração de vinhos do mosteiro (LIGER-BELAIR, 2016). Dom Perignon escreveu um livro intitulado “A arte de cuidar dos vinhedos e dos vinhos de Champagne”, onde descreveu orientações sobre a produção de vinhos efervescentes, que até hoje determinam a qualidade do espumante (BARRÈRE, 2003).

Dentre elas, pode-se citar como contribuições importantes de Dom Perignon para produção de espumante: como colher e obter a cor menos pigmentada da uva Pinot Noir; como podar a videira para a obtenção de produções menores; quais as precauções para não danificar a uva após a colheita; classificação das variedades de uvas por critérios de qualidade; vinificação independente de cada variedade; separação do mosto com o uso de diferentes prensagens; controle de fermentação na garrafa através do armazenamento em temperaturas mais baixas; utilização de vidro mais resistentes, para suportar a pressão na garrafa; sistema de vedação com rolha de cortiça presa a um arame, como vedação mais resistente a explosão; criação do corte de diferentes vinhos bases, inclusive com uvas tintas e de diferentes safras, buscando combinar harmonicamente os vinhos para obter um produto final com qualidade superior (RIANT; VILLEZ, 2015).

Outros avanços surgiram após Dom Pérignon, como a adição do licor de tirage (para controlar a quantidade de pressão formada) e eliminação dos sedimentos através do congelamento, que são empregados na produção de espumantes até os dias atuais (RIANT; VILLEZ, 2015). Até o início do século XX os espumantes continham elevados níveis de açúcar, sendo considerada uma bebida

doce ou demi-sec. Espumantes com teores de açúcar reduzidos, estilos extra dry e depois brut, foram produzidos por Louise Pommery e Pierre Jouët, como tentativa de atender ao mercado inglês (JAY; TAYLOR, 2013).

Em Champagne, a *Appellation d'Origine Contrôlée* (AOC) é responsável por estipular um conjunto de regras que estabelecem padrões técnicos, para a produção do espumante. As principais regras para a produção de espumante em Champagne são (AOC CHAMPAGNE, 2019):

- Área estritamente delimitada;
- As uvas permitidas: Chardonnay, Pinot Noir, Pinot Meunier, Pinot Blanc, Pinot Gris, Arbane e Petit Meslier;
- Poda da videira em Royat, Chablis, Guyot ou Marne Valley;
- Limite de produção de uvas por hectare;
- Limite de rendimento da prensagem;
- Potencial alcoólico mínimo para a colheita da uva;
- Segunda fermentação em garrafas, com período mínimo de maturação: 15 meses no mínimo para não safrados e 3 anos para espumantes safrados.

Além disso, o Instituto Nacional de Origem e Qualidade (INAO) da França, estabelece que as designações Champagne e Método Champenoise sejam exclusivos para os espumantes produzidos na região de Champagne, sendo vedada a utilização destes termos para espumantes produzidos pelo método Tradicional, fora das delimitações da região (AOC CHAMPAGNE, 2019).

A elaboração do espumante pelo método Tradicional consiste na colheita das uvas (potencial alcoólico de 11,0 - 11,5 % v/v, aproximadamente 18 a 19,5° Brix); pesagem das uvas; prensagem da uva inteira com separação em mosto flor e mosto prensa (o mosto do vinho rose passa por um período de maceração de 24 a 72

horas com controle de temperatura); debourbage (limpeza do mosto); primeira fermentação alcoólica, para obtenção do vinho base (em tanques de aço inoxidável ou barricas); fermentação malolática (opcional); produção do cuvée; adição de licor de *tirage* (concentração de 20-24 g L⁻¹ açúcar para um aumento na pressão até o final da segunda fermentação de 5 - 6 atm, levedura e clarificantes); engarrafamento; segunda fermentação alcoólica (temperatura em torno de 12°C); autólise (maturação sob as borras de leveduras); *remuage* (técnica para encaminhar a borra até o gargalo de garrafa); *dégorgement* (congelamento do bico da garrafa, para eliminação das borras); licor de expedição (classificação quanto ao teor de açúcar); arrolhamento; rotulagem (Figura 1) (FLANZY, 2003).

Figura 1. Fluxograma da produção de espumante pelo Método Tradicional.



Fonte: adaptado de Flanzzy (2003).

Dentre os espumantes produzidos mundialmente pelo método Tradicional, destaca-se o Champagne em razão de que sempre esteve associado ao glamour e qualidade, como também por seguir normas rígidas de elaboração. Entretanto, espumantes produzidos pelo método Tradicional são comuns em diversas regiões

vitícolas do mundo, como o Cava (Espanha), o Sekt (Alemanha) e o Franciacorta (Itália). Dependendo da legislação local, o método Tradicional pode receber diferentes denominações e também pode-se utilizar diferentes variedades de uvas para a produção do espumante, conforme descrito na Tabela 2 (GIANVITO et al., 2019).

Tabela 2. Espumantes produzidos pelo método Tradicional em regiões vitivinícolas do mundo.

País	Nome	Uvas autorizadas	Denominação do método
França	Champagne	Chardonnay blanc, Pinot noir and Pinot Meunier, Arbanne, Petit Meslier, Pinot Blanc	Champenoise
Itália	Talento	Chardonnay blanc, Pinot blanc, Pinot noir, Pinot Gris, Pinot Meunier	Classic
	Franciacorta	Chardonnay and Pinot blanc, Pinot noir	Classic
	Trento DOC	Chardonnay, Pinot Noir, Pinot Blanc, Pinot Meunier	Classic
Espanha	Cava	Macabeo, Xarel lo, Parellada, Subirat, Chardonnay, Garnacha, Monastrell, Pinot Noir, Malvasia, Trepát	Tradicional
Portugal	Sparkling wine	Bical, Cercial, Maria Gomes and Baga	Tradicional
Alemanha	Sekt	Silvaner, Pinot blanc, Pinot noir, e Pinot gris, Riesling	Traditional *podendo ser produzido por outros métodos.
Inglaterra	Sparkling wine	Chardonnay e outras uvas clássicas de Champagne, Auxerrois, Seyval Blanc, Müller-Thurgau, Reichensteiner, e Bacchus	Traditional
Hungria	Pezsgő	Chardonnay, Pinot Noir, Riesling, Muscat Ottonel, Muscat Lunel, Olaszrizling, Kékfrankos, Furmint, Királyleányka, Hárslevelű, Kéknyelű e Junfark	Traditional *podendo ser produzido por outros métodos.
África do Sul	Cap Classique	Sauvignon Blanc, Chenin Blanc, Chardonnay, Pinot Noir	Cap Classique

Brasil	Espumante	Chardonnay, Pinot Noir, Riesling, Glera	Tradicional *podendo ser produzido por outros métodos.
Austrália	Sparkling wine	Chardonnay, Pinot Noir e Pinot Meunier	Traditional

Fonte: Adaptado de Gianvitto et al., (2019)

A produção de espumantes por este método é mais apreciada que outros, uma vez que dá origem a produtos com maior complexidade e qualidade superior. Este reconhecimento se refere principalmente a etapa de autólise das leveduras, que inicia de 2 a 4 meses após o final da segunda fermentação (ALEXANDRE; GUILLOUX BENATIER, 2006).

O processo de autólise é o resultado da degradação das leveduras, com liberação de seus componentes ao vinho, bem como a interação destes compostos com os constituintes do vinho (KEMP et al., 2015). Regiões vitícolas com denominação de origem protegida para espumante, possuem tempo determinado para autólise de seus espumantes, como o Champagne (mínimo 15 meses) e a Cava (mínimo 9 meses) (EU, 2008). Esta etapa está associada a obtenção de espumantes de qualidade superior, visto que o tempo de autólise modifica as propriedades sensoriais da bebida, por meio do aumento gradual da liberação de aminoácidos, proteínas e polissacarídeos para o meio, favorecendo a produção de compostos aromáticos e aportando estrutura ao espumante (ALEXANDRE; GUILLOUX BENATIER, 2006; MARTÍNEZ- GARCÍA, et al., 2017).

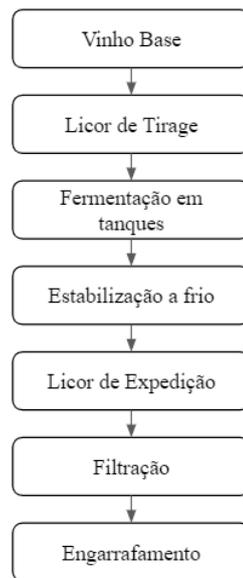
1.1.1.2 Método Charmat

Até 1916 o método Tradicional era o único empregado na produção de espumante. Eugène Charmat foi o engenheiro responsável por aperfeiçoar e patentear um método desenvolvido pelo italiano Federico Martinotti, que consistia

em um sistema para produção de espumante em larga escala. Neste método, a fermentação secundária é realizada em tanques pressurizados, que suportam até 20 atmosferas de pressão, equipados com mecanismos de agitação que misturam as células de levedura no vinho base (FLANZY, 2003). A produção em grande volumes, o torna um método mais simples que o método tradicional, oferece a vantagem de preservar os aromas varietais quando variedades aromáticas de uva são usadas, devido ao menor contato com as borras de levedura (GIANVITO, 2019)

O método *Charmat* é amplamente empregado no Brasil, uma vez que necessita de menor tempo de produção, emprega menos mão de obra e forma produtos mais leves e refrescantes (STEFENON et al., 2010). As etapas constituintes deste processo são colheita da uva, pesagem, prensagem para obtenção do mosto, *debouillage*, primeira fermentação alcoólica (obtenção do vinho base), licor de *tirage*, segunda fermentação alcoólica em tanques, estabilização, licor de expedição, filtração e engarrafamento isobarmétrico. A segunda fermentação ocorre em tanques fechados, com temperatura controlada (em torno de 13 °C), e duração entre 2 a 3 meses, dependendo do tipo de produto que se queira (Figura 2) (AMARANTE, 2005; SPADARI et al., 2014).

Figura 2. Fluxograma da produção de espumante pelo Método Charmat.



Fonte: adaptado de Flanzy, 2003.

Ao final do processo fermentativo em tanques de pressão, diminui-se a temperatura do tanque, e o fermento suspenso decanta para o fundo do recipiente, facilitando o processo de filtração (BUXADERAS; LÓPEZ- TAMAMES, 2012).

Todo o processo de produção leva no mínimo 2 até 10 meses. O método de curta duração (1 a 3 meses) dá origem a vinhos espumantes com aroma jovem, fresco e frutado, principalmente se foram produzidos com temperaturas mais baixas, entre 10 a 14°C (GIOVANNINI; MANFROI, 2009). Entretanto, se o vinho espumante é deixado em contato com borras de leveduras por um período de no mínimo 6 meses, chamado de Charmat longo, a bebida obtida pode apresentar perfil aromático que se assemelha aos vinhos produzidos pelo método Tradicional (BUXADERAS; LÓPEZ- TAMAMES, 2012).

A aplicação deste método também garante um acompanhamento mais eficaz do processo, assegurando, por exemplo, a fermentação completa da bebida (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Além disso, apresenta algumas vantagens frente ao método Tradicional, tais como, a pressão e a temperatura podem ser reguladas, é

possível fazer agitações automáticas, não há necessidade de *remuage* ou *dégorgement* e não há perda de pressão nas etapas finais (FLANZY, 2003).

1.1.1.3 Método Ancestral

O método Ancestral precede o método Tradicional como é conhecido hoje, e originou-se no sul da França, em Languedoc. Há registros de vinhos espumantes na região de Limoux (Languedoc) desde 1531 produzidos por monges beneditinos da Abadia de Saint-Hilaire, e até os dias atuais continuam a produzir espumantes por meio de uma técnica secular, o método Ancestral, também chamado de *rurale*, o qual obteve reconhecimento pela AOC em 1938 (FLANZY, 2003).

Além da região de Limoux, outras três regiões francesas possuem denominação de origem para espumantes produzidos a partir deste método, são elas: Gaillac (sudoeste da França), Clairette de Die (Vale do Rhône) e Bugey et Cerdon (Bugey), e cada uma delas possui peculiaridades quanto a forma como o método é conduzido (FLANZY, 2003). A utilização do método Ancestral para elaboração de espumantes está relacionada basicamente às regiões acima citadas, uma vez que com o aprimoramento do método Tradicional em Champagne, fez com a técnica fosse amplamente difundida e adotada como principal forma de obtenção da bebida (JEANDET et al., 2011).

Espumantes produzidos pelo método Ancestral são obtidos por meio de uma única fermentação, e esta é a principal característica que o difere do método Tradicional. As outras etapas que compõem este método são semelhantes às utilizadas no método Tradicional, contudo, podem variar de acordo com a região onde é produzido e o estilo de espumante almejado, uma vez que não há orientações específicas da OIV, para espumantes produzidos por este método. Comumente inicia-se com a obtenção do vinho base, por meio de uma fermentação

espontânea (sem adição exógena de leveduras) em tanques, seguindo as etapas tradicionais de elaboração de vinhos tranquilos. No caso específico do AOP Limoux Método Ancestral, a colheita da uva deve ser manual e utiliza-se somente a variedade Mauzac, que deve ser colhida com um potencial alcoólico de 10 %. A uva então é prensada com o uso de diferentes pressões para obtenção do mosto, adicionado de dióxido de enxofre e clarificado (*debouillage*). A fermentação alcoólica do vinho base é espontânea, e ocorre até o vinho atingir 5 a 6% de álcool. A parada da fermentação é realizada por meio de trasfegas e filtrações sucessivas, e o mosto parcialmente fermentado é armazenado sob refrigeração, próximo a 0 °C (AOC LIMOUX, 2011).

Em março, quando as temperaturas voltam a subir, o vinho semi fermentado é engarrafado sem adição de licor de tirage. O processo de fermentação é retomado com o aumento da temperatura. Após a tomada de espuma na garrafa, os espumantes devem conter no mínimo 3 atm de pressão e 6 a 7% de teor alcoólico, bem como as garrafas devem permanecer no mínimo 2 meses no processo de maturação (autólise). A levedura é removida através da remuage e não é permitido o uso de licor de expedição (AOC LIMOUX, 2011; PANESAR et al., 2017; TRUJILLO, 2017). Os espumantes resultantes deste método possuem características de serem frutados, e normalmente com sabor adocicado. A tonalidade é um amarelo palha com reflexos esverdeados e borbulhas muito finas, moderadamente persistentes (AOC LIMOUX, 2011).

A recente busca por vinhos com menos intervenção enológica, feitos com base na filosofia “natural” (usando uvas orgânicas ou biodinâmicas), influenciou alguns produtores ao redor do mundo a usar esse método, tornando-o popular novamente. Na França o movimento do vinho natural estimulou a produção de

“vinhos espumantes naturais”, conhecidos como *pétillant naturel*, que usam os fundamentos e técnicas empregadas no método Ancestral, contudo, com muitas variações quanto às características sensoriais, de acordo com o perfil pretendido na bebida (NEIMAN, 2018).

1.1.1.4 Método Asti

O método Asti, no Brasil chamado de Moscatel, é muito empregado na produção de espumantes que valorizam cultivares consideradas aromáticas, como as variedades pertencentes a família Moscato (*Vitis vinifera* sp.), devido a fermentação incompleta do mosto e conseqüente preservação dos aromas (GIOVANNINI; MANFROI, 2009).

Em Asti, região localizada no Piemonte (Itália), é produzido o espumante aromático e doce mais famoso do mundo, o *Asti Spumante*. Este produto possui Denominação de Origem Controlada e Garantida, portanto essa designação somente pode ser utilizada em espumantes produzidos na região. O mesmo método utilizado para obter o Asti Spumante, é empregado na produção do Moscatel Espumante (SOARES et al., 2015; BUXADERAS; LÓPEZ-TAMAMES, 2003).

No Brasil, é considerado espumante Moscatel o vinho cujo anidrido carbônico provém da fermentação em recipiente fechado, de mosto ou de mosto conservado de uva moscatel, com uma pressão mínima de 4 (quatro) atmosferas a 20 °C (vinte graus Celsius), e com um teor alcoólico de 7 % (sete por cento) a 10 % (dez por cento) em volume, e no mínimo 20 (vinte) g L⁻¹ de açúcar remanescente (BRASIL, 2004).

O método consiste na colheita da uva, seguido de prensagem e debourbage. O mosto é inoculado de levedura para a fermentação alcoólica que ocorre em

tanques pressurizados “abertos” (com liberação de gás carbônico), até o vinho atingir o teor alcoólico entre 6 e 7 %. Após atingir o teor alcoólico desejado, inicia-se a tomada de espuma (retenção de gás carbônico) no mesmo recipiente, até o vinho alcançar entre 7 e 10 % de álcool e no mínimo 4 atmosferas de pressão, resultando, portanto, em um processo de única fermentação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Em seguida, o vinho é refrigerado a temperaturas próximas a 0 °C, filtrado e engarrafado. No Brasil, a quantidade de açúcar remanescente deve ser no mínimo 20 g L⁻¹, entretanto a bebida deve ser comercializada com no mínimo 60 g L⁻¹, devido sua classificação como bebida doce (BRASIL, 2004; GIOVANNINI; MANFROI, 2009).

Apesar do método ser utilizado exclusivamente para a produção de espumantes doces, > 60 g L⁻¹ (BRASIL, 2004), a possibilidade de adiar o início da tomada de espuma, pode originar espumantes com níveis mais baixos de açúcar e com teor alcoólico próximo aos métodos que incluem duas fermentações (Charmat e Tradicional). Neste caso, caracterizado como espumante de Fermentação Única em Tanque (FUT), o qual está sendo avaliado neste estudo.

1.1.1.5 Método de Transferência

O método de Transferência foi desenvolvido na Itália com o objetivo de aumentar a qualidade do espumante, por meio de uma segunda fermentação na garrafa, como empregado no método Tradicional, entretanto, com as operações finais realizadas em tanques fechados, como no método Charmat (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Apesar de não ser empregado no Brasil, ocasionalmente pode ser uma alternativa para a produção de espumantes de meia garrafa ou garrafa maiores que as tradicionais, como a magnum com capacidade para 1,5 L (FLANZY, 2003).

Após a elaboração do vinho base, realiza-se o *cuvée* e adiciona-se o licor de tirage para a segunda fermentação na garrafa. Uma vez fermentado e maturado, as garrafas são resfriadas e o líquido é transferido para um tanque com contrapressão, para evitar perda do gás carbônico. O espumante, então, é adicionado do licor de expedição, filtrado para remoção das leveduras e engarrafado (GIANVITO et al., 2019).

Dentre as vantagens desse sistema estão o aumento da complexidade da bebida através da autólise em garrafa, possibilidade de realizar cortes de espumantes após a segunda fermentação, facilidade de estabilizar e eliminar resíduos da bebida. Contudo, não é um método bem visto pelas vinícolas, possivelmente por não apresentar grandes vantagens frente ao método Charmat, além de maior custo energético e maior risco de oxidação. Poucas regiões vitícolas do mundo utilizam este método como uma alternativa para produção de seus espumantes, como Alemanha, Áustria, Grécia, Rússia e Hungria (BUXADERAS; LÓPEZ-TAMAMES, 2003; FLANZY, 2003).

1.2 ESPUMANTE PROSECCO

Nos últimos anos o Prosecco tornou-se um dos vinhos espumantes mais famosos e populares do mundo. Originalmente produzido na região do Vêneto, Itália, a partir da uva Glera, o Prosecco é conhecido por ser um espumante que apresenta coloração amarelo claro, quase transparente, nível médio de acidez, aromas frutados e florais bem marcantes, leveza e refrescância (ONOFRI et al., 2015; THIENE et al., 2013).

O sucesso e a popularidade do Prosecco nas últimas décadas poderiam sugerir que esse espumante foi desenvolvido recentemente pela indústria vinícola do

Vêneto, entretanto, esta variedade é considerada antiga, cujos registros históricos da sua produção datam de meados dos anos 1700 (CRESPAN et al., 2009). O espumante Prosecco atingiu um nível elevado de reputação a nível internacional, e atualmente, do volume total de produção nacional de vinho espumante na Itália, o Prosecco representa 66% (OIV, 2020). Desta forma, com o intuito de proteger a denominação “Prosecco”, o governo italiano decidiu fazer o reconhecimento territorial da produção deste espumante, estabelecendo zonas de proteção (MENEGUETTI et al., 2014).

Desde 2009, o “Espumante Prosecco” é produzido somente nas áreas autorizadas de Treviso, Asolo, Conegliano e Valdobbiadene, no norte da Itália (Figura 3), onde é classificado em Prosecco *Denominazione di Origine Controllata* (DOC), Prosecco DOC Treviso, Asolo Prosecco *Denominazione di Origine Controllata e Garantita* (DOCG) e Conegliano Valdobbiadene Prosecco DOCG (PROSECCO SUPERIORE, 2019).

Figura 3. Área delimitada para produção de “Prosecco Wine”, Itália.



Fonte: Ca' di Rajo Winery, 2019.

De acordo com a legislação italiana, os espumantes devem levar obrigatoriamente pelo menos 85% de Glera em sua composição, embora a maioria dos produtores a utilizem em porcentagem ainda maior. Os 15% restante pode ser composto por outras variedades locais de menor expressão, como a Verdiso, a Perera e a Bianchetta. A DOCG permite, ainda, que se use em pequenas quantidades Chardonnay e Pinot Noir (PROSECCO SUPERIORE, 2019; CHINAZZI, 2011; MILAN, 2014). Devem ser produzidos pelo método Charmat e podem ser, dependendo do grau de açúcar residual (em gramas por litro), Brut (0 a 12), Extra Dry (12 a 17) e Dry (17 a 32) (TOMASI, 2011; MILAN 2014).

Regiões ou países que utilizam a denominação “Prosecco”, em rótulos de espumantes produzidos com a cultivar Glera, deverão se adequar e passar a usar outra designação (PROSECCO SUPERIORE, 2019). No estado do Rio Grande do Sul, principalmente na Serra Gaúcha, se produz excelentes espumantes pelo método Charmat com esta casta, e sua produção cresce anualmente. Entre os anos de 2005 e 2015, a área de vinhedos da uva Glera cresceu acima de 450%, e ultrapassa a área de produção da uva Riesling Itálico, muito empregada na elaboração de espumantes pelo método Charmat (EMPRAPA, 2015).

A qualidade do espumante produzido com a uva Glera, no Brasil, é reconhecida através das muitas premiações e medalhas já recebidas, incluindo medalha de ouro no Concurso *Effervescents Du Monde*, que avalia anualmente a qualidade dos vinhos espumantes produzidos no mundo inteiro (ABE, 2018). Além disso, o clima predominantemente tropical e a melhor relação custo x benefício da bebida produzida no país, impulsionam a venda deste perfil de produto (WURZ et al., 2017).

1.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS

Dentre os compostos que constituem a mistura complexa que é o vinho, apenas as substâncias voláteis, são capazes de estimular os órgãos sensoriais responsáveis pelo olfato. Os compostos aromáticos são moléculas de pequeno tamanho, de hidrofobicidade média e peso molecular compreendido, geralmente, entre 30 e 300 g mol⁻¹ (MORROT; BROCHET, 2000; PINO; QUERIS, 2011).

O aroma é a tradução da sensação recebida pelo cérebro quando o epitélio olfativo é atingido por uma fração de moléculas que se vaporizou no copo – via nasal direta – ou em contato com a boca – via retronasal (DUBOURDIEU, 1988; PORTMANN, 2000). O reconhecimento dessas moléculas depende da sua concentração no vinho, da sua volatilidade, da sua pressão de vapor e do seu limiar de percepção olfativo (OLIVEIRA, 2000; CALIARI et al., 2015). A termodinâmica do desprendimento do odor diretamente da taça no vinho e pela cavidade oral podem apresentar percepções distintas, uma vez que possuem diferentes condições de temperaturas, bem como diferentes pressões de vapor para os mesmos componentes voláteis (DUTCOSKY, 2011).

O aroma do vinho é um dos parâmetros mais importantes ao avaliar a qualidade da bebida, uma vez que este atributo possui relação direta com sua aceitabilidade pelo consumidor, dado que ele é responsável por evocar o prazer em consumi-lo (COELHO, 2009). Portanto, ao se produzir um vinho, busca-se uvas e técnicas de vinificação que tendem a valorizar este atributo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

A presença e a quantidade de compostos voláteis é determinada por alguns fatores, tais como *terroir*, variedade de uva, grau de maturação da uva, condições de fermentação, fatores biológicos (levedura e outros componentes da microflora

enológica), técnicas de produção de vinho, maturação e envelhecimento (ROCHA et al., 2010). Para melhor compreender o comportamento destes compostos no vinho, a literatura os caracteriza de acordo com a sua origem, sendo estes classificados em aromas varietais e pré-fermentativos, os provenientes exclusivamente da uva, aromas fermentativos, os que têm sua origem nas atividades microbiológicas do vinho (fermentação alcoólica e malolática) e aromas pós-fermentativos, oriundos dos processos de maturação e envelhecimento (FLANZY, 2003).

1.3.1 Aromas varietais e pré-fermentativos

Entre todos os compostos aromáticos encontrados em vinhos, os aromas provenientes da uva são responsáveis por caracterizar primariamente a bebida, conferindo ao vinho uma identidade, que reflete as características da variedade, bem como do local de cultivo e das práticas utilizadas pelos viticultores. Aromas complexos e que atribuem maior tipicidade ao vinho, somente são alcançados a partir do uso de uvas sãs e maduras, seguido por um processo de vinificação que vise à conservação desses aromas no vinho (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

A concentração da fração volátil presente na uva evolui na polpa e na casca da fruta, durante o estágio de maturação, e pode ser encontrada na forma livre ou na forma de precursores aromáticos não odorantes, que são liberados com o processo de vinificação. Sua produção depende de fatores relacionados ao *terroir*, como o tipo de solo, sistema de condução da planta, tipo de clone, rendimento/ha, manejo da planta e clima (NICOLLI et al., 2018; RICE et al., 2018; SÁNCHEZ- PALOMO et al., 2017; BINDON et al., 2013).

Rice et al. (2018) analisaram compostos voláteis de vinhos produzidos a partir das variedades Frontenac e Marquette (Dakota, Estados Unidos), colhidas em dois

momentos da maturação (22 e 24°Brix) e verificaram que o tempo de maturação influencia o aroma global do vinho, uma vez que os principais compostos aromáticos detectados (etil hexanoato, etil isobutirato, etil octanoato e etil butirato), determinados pela análise de componentes principais, aparecem em concentrações diferentes, de acordo com o °Brix. Nicolli et al. (2018) comprovaram que o manejo do vinhedo interfere no perfil aromático do vinho produzido com a uva Merlot na região da Campanha Gaúcha (Rio Grande do Sul, Brasil). Ao utilizarem seis tratamentos no vinhedo, que contemplaram diferentes tipos de solos, espaçamento entre plantas, número de gemas por planta e quantidade de folhas por ramo, os autores identificaram que o vinhedo com o menor produção de uva (20 gemas por planta), 15 folhas por ramo e com espaçamento de 1 m entre plantas, foi o que se destacou na análise sensorial descritiva quantitativa e apresentou altos níveis de voláteis que podem influenciar positivamente o aroma do vinho (aromas frutados e florais), e menores concentrações de compostos relacionados a defeitos aromáticos.

Várias classes químicas aromáticas estão entre as que fazem parte dos aromas varietais e pré-fermentativos do vinho, dentre elas os terpenos (Moscatto), C13 norisoprenóides (Pinot Noir), tióis (Chardonnay), metoxipirazinas (Cabernet Sauvignon) e os fenóis voláteis (Cabernet Franc), podendo estes contribuir com o perfil aromático de muitas outras variedades de uvas (BOTEZATU et al., 2014; NOESTHEDEN et al., 2017; ASPROUDI et al., 2018; CAPONE et al., 2018; YANG et al. 2019).

Os compostos aromáticos pertencentes aos grupos dos terpenos representam uma das principais classes desses aromas (PENG et al., 2013). Os terpenos estão presentes na casca e na polpa da uva, tanto na forma livre, mas principalmente na forma de precursores ligados a moléculas de açúcares como a glicose, arabinose,

apiose, ramnose e xilose (PEÑA et al., 2005; ZHANG et al., 2016; YANG et al., 2019). São especialmente encontrados em uvas brancas, como Moscato, Gewürtztraminer e Riesling Renano, com predominância de monoterpenos (moléculas formadas por até 10 carbonos), tais como linalol, geraniol, nerol, terpineol e citronelol, que são álcoois monoterpênicos, com alto poder odorífero, que contribuem para as características floral, frutado e cítrico (DZIADAS & JELEN, 2010).

Entre eles, o linalol é um dos monoterpenos mais significativos, podendo ser encontrado em níveis superiores seu limiar de percepção de $50\mu\text{g L}^{-1}$ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Yang et al. (2019) identificaram 17 terpenos em vinhos produzidos com a uva Meili (*Vitis vinífera*) produzida na China, sendo o linalol o terpeno que mais contribuiu para a tipicidade desta uva. Linalol também foi considerado um marcador aromático de vinhos elaborados com a uva Alvarinho na Espanha (VILANOVA; SIEIRO, 2006). Zocca et al. (2008) identificaram em bagaço da uva Glera (Prosecco) terpenos como citronelol, geraniol e linalol e os ésteres etil acetato e etil lactato.

1.3.2 Aromas fermentativos

O processo de vinificação, apesar de conter muitas diretrizes, não é uma fórmula fixa, podendo haver variações que irão depender basicamente da safra e do “*know-how*” do enólogo (GIOVANNINI E MANFROI, 2009). As técnicas e os parâmetros de vinificação empregados em cada etapa, como sulfitação, extração de precursores, estirpe de levedura, nível de turbidez do mosto, temperatura, nutrição da levedura e nível de oxigênio, podem determinar o perfil dos compostos

produzidos pelo mecanismo de leveduras e bactérias, e conseqüentemente, os aromas do vinho (FLANZY, 2003).

Os aromas fermentativos se originam através da ação das leveduras e bactérias durante as etapas de fermentação alcoólica e maloláctica, sendo essa última quase que exclusivamente empregada em vinhos tintos e base para espumantes. Compostos aromáticos como álcoois, ésteres, ácidos, aldeídos e cetonas são formados durante estes processos. Para a obtenção desses aromas, as fermentações devem ser conduzidas em condições adequadas, a fim de se obter compostos que sejam benéficos para a qualidade olfativa do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Os ésteres são uma ampla classe de compostos aromáticos, que contribuem para o aroma frutado do vinho, e podem ser divididos em ésteres de acetatos (acetato de isobutila, acetato de isoamila, acetato de hexila, 2 - feniletil acetato e acetato de amilo) e ésteres etílicos (hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila) (JEROMEL et al., 2019). Puertas et al. (2018) fermentaram uvas Chardonnay e Verdejo a partir de diferentes microorganismos, *Saccharomyces cerevisiae* (I), *Torulaspota delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* (II) e fermentação espontânea (III), e identificaram os ésteres propanoato de etila, isobutirato de etila e dihidrocinamato de etila, 2-fenil acetato e acetato de isobutila como os marcadores para cada um dos testes realizados, independentemente da variedade.

Jiang & Zhang (2010) analisaram o perfil volátil de três vinhos, produzidos a partir das variedades Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet e Chardonnay, na China. Os autores identificaram como compostos majoritários presentes em todos os vinhos, componentes pertencentes aos grupos álcool, ésteres e ácidos, sendo que octanoato de etila, hexanoato de etila e acetato de isoamila contribuíram

conjuntamente para 92,9%, 93,3% e 98,7%, do aroma global dos vinhos Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet e Chardonnay, respectivamente. Estes aromas estão associados aos descritores de odor frutado.

Lukic et al. (2017) analisaram o efeito da aplicação de diferentes técnicas de maceração do vinho tinto da variedade Teran, na Croácia. As técnicas aplicadas foram maceração tradicional (controle), maceração pré-fermentativa a frio, *saigné* (drenagem de um percentual do líquido da fermentação do vinho tinto), aquecimento pré-fermentativo seguido de maceração, aquecimento pré-fermentativo seguido de prensagem e fermentação do mosto, e aquecimento pós-fermentativo. Todos os tratamentos alternativos apresentaram menor produção de álcoois em relação ao controle. A maceração a frio aumentou a quantidade de ésteres, comparado ao controle, como também foi a técnica que apresentou níveis mais elevados de C6, etil acetato e acetaldeídos. Ayestarán et al. (2019) compararam o efeito da maceração carbônica e da vinificação tradicional sobre a uva Tempranillo Branco, na Espanha, e verificaram que a maceração carbônica é uma alternativa para potencializar aromas de fruta madura, devido o aumento de ésteres etílicos e acetatos durante o processo.

1.3.3 Aromas pós-fermentativos

Considera-se que o vinho adquire complexidade aromática através dos aromas adquiridos após os processos de fermentações, como resultado de modificações como esterificação, hidrólise, redução, clarificação espontânea, eliminação de CO₂, difusão lenta e contínua de oxigênio (CAMARA et al., 2006). A produção e extração destes compostos estão associados principalmente a

maturação do vinho por barrica de carvalho ou sobre as borras e oxidações (UGLIANO, 2013).

Inicialmente o emprego da barrica de carvalho era somente como recipiente para armazenamento de vinhos, e atualmente seu uso está associado a estabilidade da bebida, contribuindo para o perfil aromático, coloração e gosto do vinho. O contato do vinho com a madeira possibilita a extração de compostos da barrica, bem como a produção de novos componentes através de reações químicas que envolvem compostos presente no vinho e no carvalho (COLLINS et al., 2015).

Os aromas extraídos durante a etapa de maturação, são oriundos de processos diferentes. Parte deles estão naturalmente presentes no carvalho, como é o caso das lactonas, que atribuem o aroma de coco, madeira, carvalho (PRIDA; CHATONNET, 2010), e outros são formados durante o processo de tostagem da madeira, por meio da degradação de componentes como lignina, que dá origem ao guaiacol e 4-metil guaiacol, por exemplo, e hemicelulose (vanilina, furfural e 5-metil furfural) (COLLINS et al., 2015).

Considera-se os voláteis como lactonas, furfural, aldeídos fenólicos (vanilina e siringaldeído) e fenóis voláteis (eugenol, guaiacol e vinilfenóis) os que desempenham um papel importante na qualidade organoléptica de vinho amadurecido em madeira (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2016).

A maturação sobre borras, é realizado em alguns vinhos tranquilos brancos e tintos, mas é mais comumente empregado em espumantes quando possuem segunda fermentação na garrafa (UBEDA et al., 2019; UBEDA et al., 2016). Este é o resultado do processo de autólise, sofrido por leveduras ao findar o processo fermentativo: a hidrólise natural e lenta das paredes celulares de leveduras que liberam ao vinho compostos que alteram suas propriedades sensoriais, como

manoproteínas e polissacarídeos (FLANZY, 2003). Quando comparado o perfil aromático de vinhos que passaram ou não por processo de autólise, verifica-se que os ésteres podem ser usados como marcadores do processo de maturação sobre borras (MARTINEZ- GARCÍA et al., 2017; UBEDA et al., 2016; RIU-AUMATELL et al., 2006).

Alterações no aroma do vinho também podem estar associadas ao período de estágio em garrafas (envelhecimento), em que ocorre uma série de reações químicas, principalmente devido as quantidades reduzidas de oxigênio (UGLIANO, 2014). Durante a estocagem dos vinhos, os aldeídos tendem a aumentar sua concentração, devido a oxidação de álcoois, considerado este o grupo de compostos de oxidação que possui o maior impacto sobre vinhos brancos e tintos (MONFORTE et al., 2018).

Esteban et al. (2019) verificaram alterações aromáticas em vinho Malbec envelhecido sob diferentes condições de armazenamento (2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 meses), temperatura (15 e 25°C) e vedações (cortiça e *screw cap*). No geral, a composição química e os atributos organolépticos do vinho foram estáveis quanto ao tipo de vedação, mas sensíveis ao efeito combinado do tempo e temperatura de armazenamento. Os resultados mostraram que quanto maior o processo de armazenamento, menor concentração de ésteres e fenóis voláteis. Álcoois, norisoprenóides, furanos e terpenóides, compostos relacionados a aroma vegetal e frutos secos, aumentaram com o tempo de armazenamento e com a temperatura de 25°C.

1.3.4 Compostos aromáticos em vinhos espumantes

Durante a elaboração dos espumantes, reações químicas e enzimáticas influenciadas pela variedade de uva, método de elaboração e maturação, são responsáveis pela formação ou transformação de compostos voláteis, modificando o perfil sensorial da bebida (MARTINEZ-GARCIA et al., 2017; UBEDA et al., 2016; CALIARI et al., 2015; PEREZ-MAGARIÑO, 2015; WELKE et al., 2014a; RIU-AUMATELL et al., 2006).

Pesquisas relacionadas a fração volátil da bebida, se referem principalmente ao método Tradicional, mais especificamente sobre a influência da etapa da autólise sobre este parâmetro, uma vez que a duração da autólise, a estirpe de levedura e sua atividade autolítica, a adição de coadjuvantes durante esta etapa, pode determinar o perfil sensorial da bebida (KEMP et al., 2015).

Torrens et al. (2010) verificaram que o contato com as leveduras contribui para o aumento da complexidade aromática do espumante. Os autores analisaram Cavas produzidas a partir das uvas Macabeo, Xarel-lo e Parellada das safras 2003, 2004 e 2005, com até 24 meses de autólise, e verificaram que alguns compostos como ésteres acetatos e etílicos (descritos como aromas frutados e florais) diminuiram em quantidade, enquanto outros, como norisoprenóides, acetal, diacetil e furanos, surgiram ou aumentaram com o tempo de contato com as leveduras. Riu-Aumatell et al. (2006) identificaram vitispirano, 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidro-naftaleno (TDN) e dietil succinato como potenciais compostos voláteis marcadores do processo de autólise (mais de 2 anos) em Cavas, visto que a concentração destes compostos aumentou com o período este período.

Com relação a identificação de aromas em outros métodos de elaboração, Caliari et al. (2015) caracterizaram a composição volátil de espumantes produzidos a

partir dos métodos Tradicional, Charmat e Asti, a partir da uva Moscato Giallo. Por meio da análise de componentes principais (PCA) os autores puderam confirmar o efeito dos métodos de produção sobre a composição volátil do espumante, e constataram que os espumantes produzidos pelo método Tradicional apresentaram a maior concentração e complexidade de compostos voláteis, comparado aos outros métodos avaliados. Ubeda et al. (2016) compararam o perfil volátil de 16 amostras de espumantes *brut*, produzidos em quatro regiões diferentes do Chile, pelos métodos Tradicional (n=8) e Charmat (n=8), e identificaram diferença no perfil de ésteres nos dois métodos, através dos 130 compostos detectados. Níveis elevados de ésteres etílicos no método Tradicional, enquanto no método Charmat foram detectados em maior quantidade ésteres acetatos. A formação de ésteres de acetatos e etílicos podem estar associados ao período de autólise do espumante, uma vez que os etílicos tendem a aumentar em contato com a levedura (Tradicional), e os acetatos diminuir com este processo, o que pode estar relacionado com a presença destes compostos no método Charmat (RIU-AUMATELL et al., 2006).

Diferenças significativas podem ser observadas quando comparado os aromas provenientes da primeira fermentação (vinho base) e segunda fermentação (espumante). Welke et al. (2014)a, ao analisarem o perfil aromático do vinho base e do espumante *brut* após a segunda fermentação (Tradicional) da uva Chardonnay, identificaram os compostos voláteis que mais contribuíram para diferenciar os dois produtos, destacando os C13-norisoprenóides (TDN, vitispirano e B-damascenona), ésteres (laurato, 2-hidroxibutanoato, decanoato, 2-hidroxipropanoato, etil ester pentanoato), álcool (4-butoxi butanol, 1-propanol, metionol), aldeídos (3-fenil-2-propenal, nonanal, undecanal), ácidos (acético, 2-etilhexanoico, butanóico),

cetonas (acetoina, diacetil) e fenóis (4-vinilguaiacol, 4-etilfenol), demonstrando o efeito da segunda fermentação sobre o aroma da bebida. Em estudo realizado por Martinez-García et al. (2017) 15 compostos minoritários foram responsáveis por caracterizar Cavas em diferentes estágios do processo no método Tradicional (vinho base, metade da segunda fermentação e após o término da segunda fermentação), dentre os compostos que diferem cada etapa estão dodecanoato de etila, tetradecanoato de etila, acetato de hexila, butanoato de etila e isobutanoato de etila.

Ubeda et al. (2019) verificaram os compostos voláteis de espumantes brut produzidos pelo método Tradicional com a uva tinta País em 8 etapas do processo de elaboração, mosto, vinho base, início da autólise (tempo 0), 3 meses de autólise, 6 meses, 9 meses, 12 meses e após a adição do licor de expedição. Com o aumento do período de autólise, aumentaram os ésteres etílicos, dentre eles, succinato de dietila, lactato de etila e isovalerato de etila, que puderam ser usados como marcadores de maturação. Os vitispiranos foram identificados como os melhores marcadores de maturação de espumantes (12 meses de maturação). Além disso, a análise de componentes principais mostrou que o tempo de contato com as borras afetou principalmente ésteres e terpenos.

Sobre o comportamento dos compostos voláteis durante o envelhecimento do espumante, Bordiga et al. (2013) avaliaram a influência da temperatura durante a estocagem de *Asti Spumante* (5, 15 e 25°C) por 6 meses, os autores constataram que os vinhos armazenados a 5°C por 6 meses não apresentaram alterações significativas na composição volátil, por outro lado, as amostras armazenadas a 15 e 25°C mostraram uma diminuição significativa nos níveis de linalol, b-damascenona, hexanoato de etila e octanoato de etila, e um aumento na concentração de óxido de nerol, óxidos furânicos de linalol A/B e óxido de rosa, confirmando uma evolução

oxidativa do aroma. Torchio et al. (2012) relacionou a concentração de gás carbônico com a mudança nos aromas do espumante italiano tinto doce Brachetto d'Acqui DOCG durante o shelf-life. Os vinhos levemente espumantes (<1.7 bar) apresentaram um conteúdo significativamente menor de quatro terpenóides livres (óxido de linalol trans-pirânico, nerol, citronelol e 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol) em relação a espumantes com maior pressão (>3 bar), enquanto que foi verificado um teor significativo de três compostos voláteis livres (geraniol, óxido de linalol cis-pirano e óxido de linalol cis-furano).

1.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

As mudanças na atmosfera terrestre causadas pelo crescimento de organismos com capacidade fotossintética aumentaram a concentração de oxigênio, induzindo o surgimento de organismos aeróbios (QUEIRÓS, 2008). Alguns defenderam-se dos elevados níveis de oxigênio restringindo-se a habitar locais onde este não existia, outros evoluíram e desenvolveram um sistema de defesa antioxidante capaz de combater a toxicidade do O₂ (BEAL, 2006).

Hoje, o oxigênio é uma molécula vital para a maioria dos organismos, no entanto pode ser fonte de moléculas capazes de danificar sítios biológicos essenciais (GRANATO, 2011). A formação de espécies reativas de oxigênio ocorre tanto de forma endógena, por meio da geração de energia através do processo respiratório (a mitocôndria é tida como a principal fonte), quanto de forma exógena, através de estímulos ambientais, como por exemplo, poluição, radiação solar, agentes químicos, e também pela incidência de algumas práticas como, tabagismo, consumo excessivo de álcool, exercício físico intenso, entre outros (FINKEL e HOLBROOK, 2000).

As espécies reativas de oxigênio são constituídas por moléculas energeticamente instáveis que adquirem estabilidade ao captar elétrons de moléculas vizinhas, de modo a recuperar sua estabilidade (HALLIWELL, 1996). Neste processo, a molécula vizinha torna-se um radical, e assim, provocam uma reação em cadeia que, caso não seja interrompida, pode provocar lesões celulares associadas a algumas patologias (RODRIGUES, 2011).

Quando a geração de radicais é maior que a sua degradação pelas defesas antioxidantes das células, produz-se um desequilíbrio no organismo que promove alterações dos componentes celulares, modificando sua estrutura e função, gerando o estresse oxidativo (VALKO et al, 2007; LIMA, 2008; GRANATO, 2011). Estes danos contribuem para o aparecimento de várias doenças degenerativas como, alzheimer, catarata, esclerose, disfunção cognitiva, inflamações, doenças cardiovasculares, tumores malignos e aceleram o processo de envelhecimento (HALLIWELL, 1996; KAUR e KAPOOR, 2001; PRIOR, 2003; LEE e RENNAKER, 2007; SILVA et al., 2010).

Compostos antioxidantes são substâncias que previnem, retardam ou inibem, significativamente, o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação e, conseqüentemente, o dano celular (VALKO et al., 2007; GRANT, 2010). Diversos estudos reconhecem que existe uma associação inversa entre o consumo de algumas frutas e hortaliças e a mortalidade por doenças relacionadas à idade, o que pode ser parcialmente atribuído à presença de compostos antioxidantes (HUANG et al., 2005; DUDONNÉ et al., 2009).

Dentre as fontes exógenas, a uva e seus derivados destacam-se pela elevada concentração de compostos antioxidantes capazes de diminuir o dano causado pelo estresse oxidativo, sendo os compostos fenólicos, tais como flavonóides,

antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, entre outros, os principais responsáveis por estes efeitos benéficos (ABE et al., 2007; DANI et al., 2009).

Os compostos fenólicos podem agir como protagonistas e/ou coadjuvantes no combate ao estresse oxidativo, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento (CUVELIER et al., 1992). Além disso, são capazes de quelar metais, sequestrar o radical superóxido e o oxigênio singlet (STEFENON, 2013). Vários estudos clínicos têm demonstrado os benefícios desses compostos relacionados à saúde humana, incluindo a proteção contra doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão, câncer, diabetes e problemas neurológicos (JANG et al., 1997; AVIRAM e FUHRMAN, 2002; COIMBRA et al., 2005; DOHADWALA e VITA, 2009; JOSEPH et al., 2009; ZUNINO et al., 2009; MUDNIC et al., 2010).

Existem vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante em vinhos e espumantes, que envolvem diferentes mecanismos. Os métodos químicos são baseados na eliminação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, como peroxinitrito, hidroxila e superóxido. Outros métodos medem o desaparecimento de radicais livres, como o radical catiônico ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ou DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), através da medição espectrofotométrica. Outros ensaios para determinar o poder antioxidante total incluem técnicas como o método poder de redução do íon ferro (método FRAP) ou o uso de bromo gerado eletroquimicamente *in situ* (JORDÃO et al., 2010).

Níveis elevados de compostos quantificados em espumantes podem estar associados à capacidade antioxidante da bebida. Compostos liberados pelas leveduras durante o início da autólise, como β -glucanos e proteínas, podem

contribuir para o aumento da capacidade antioxidante, devido ao aumento da composição fenólica na bebida (KEMP et al., 2015). A relação entre concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante foi demonstrada por Jordão et al. (2010) quando analisaram a atividade antioxidante (FRAP e ABTS) em vinhos espumantes portugueses brancos e rosados elaborados pelo método Tradicional da Denominação de Origem da Bairrada, com diferentes quantidades de açúcares residuais (classificado como brut, demi-sec e doce). Os autores verificaram correlações mais altas em espumantes produzidos com uvas tintas, devido ao perfil fenólico da bebida. Satue-Gracia et al. (1999) mostraram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante dos vinhos espumantes e o teor fenólico total, destacando o ácido trans-cafeico, o ácido cumárico, o ácido protocatecuico e a quercetina-3-glucuronide.

Contrariamente, Stefenon et al. (2010) detectou maior atividade antioxidante em vinhos espumantes brasileiros (brut e demi-sec) produzidos pelo método Charmat, em comparação com o método Tradicional. Alguns fatores relacionados a este resultado podem ser a estirpe de levedura, tipo de recipiente empregado na vinificação, concentração de açúcar, superfície em contato com a levedura e tempo de autólise (RIBÉREAU GAYON et al., 2006). Gallardo-Chacón et al. (2010) verificaram as propriedades antioxidantes da superfície celular das borras dos vinhos espumantes da Cava pelos ensaios DPPH e FRAP, e mostraram que as superfícies das borras parecem perder progressivamente sua atividade antioxidante quanto mais tempo ficam em contato com o vinho (30% após 10 meses, 50% após 18 meses e 80% após 40 meses), devido a modificação estrutural da parede celular e oxidação dos grupos ativos.

1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os constituintes fenólicos da uva e de seus derivados têm uma grande importância na enologia, desempenhando um papel crucial na cor, no sabor, no aroma e também na capacidade de envelhecimento dos produtos, além de contribuírem como fonte de compostos bioativos com propriedades benéficas a saúde dos consumidores.

Os compostos fenólicos constituem uma classe de metabólitos secundários das plantas, no qual as condições ambientais de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros, favorecem a formação desses compostos (NACZK e SHAHIDI, 2004). Nos vegetais também são essenciais no crescimento e reprodução, além de atuarem como agentes antipatogênicos e contribuírem na pigmentação, mas a natureza e as percentagens relativas destas substâncias estão diretamente ligadas à componente genética varietal (CALÒ, 1994).

A forma mais simples deste elemento estrutural é o fenol, que assim dá o nome a esta série de compostos. Normalmente, os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos e podem também ocorrer como derivados funcionais, como ésteres e metil ésteres flavonoides (CABRITA et al., 2002). Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são caracterizados por apresentar um núcleo benzênico agrupado a um ou vários grupos hidroxila, tendo sua classificação baseada na distinção entre compostos flavonóides e não flavonoides (CABRITA et al., 2002). A reatividade desses compostos advém dessa característica estrutural comum a todos eles que é a presença de um anel aromático hidroxilado, variando conforme o número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições no anel aromático (BALASUNDRAM et al., 2006).

Dentre os derivados da uva, os vinhos espumantes são ricos em compostos fenólicos (IBERN-GÓMES et al., 2000; CHAMKHA et al., 2003; POZO-BAYÓN et al., 2003; STEFENON et al., 2010), no entanto, o conteúdo desses compostos depende de vários fatores, incluindo variedade de uva, crescimento e amadurecimento das frutas, qualidade do vinho base, levedura utilizada e tempo de maturação (MAZAURIC e SALMON, 2005; STEFENON et al., 2010; COLETTA et al., 2014). Apesar das implicações já relatadas dos compostos fenólicos para a qualidade sensorial dos vinhos, não há muitos estudos destinados a estabelecer as alterações desses compostos durante a fabricação de vinhos espumantes (CALIARI et al., 2015).

1.5.1 Compostos não flavonóides

Os compostos não flavonóides são a principal classe de compostos fenólicos encontrados nos vinhos espumantes, compreendem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos (FLANZY, 2003). Os ácidos fenólicos são compostos simples formados por um anel aromático e os substituintes ligados à sua estrutura, conferindo capacidade de sequestrar espécies reativas, como o radical hidroxila e o oxigênio singlet (MARINOVA e YANISHLIEVA, 2003). Estes são primariamente armazenados nos vacúolos celulares da casca e da polpa e são facilmente extraídos por prensagem (JACKSON, 2008; GARRIDO e BORGES, 2011).

Diversos tipos de ácidos hidroxibenzóicos são identificados em uvas e seus derivados, os mais abundantes são os ácidos gálico, salicílico, vanílico, hidroxibenzóico, gentísico, siríngico e protocatéquico (CABRITA et al., 2002; GUERRA, 2005). Ao analisar 19 espumantes elaborados por diferentes métodos e

utilizando diferentes variedades de uva, Stefenon et al. (2010) constataram que o principal componente fenólico detectado em todos os espumantes analisados foi o ácido gálico, sendo observado um efeito benéfico da segunda fermentação no aumento da concentração desse composto nos vinhos espumantes brut, provavelmente devido à hidrólise de taninos hidrolisáveis (STEVENS et al., 2002; POZO-BAYÓN et al., 2009), visto que o ácido gálico é descrito como um dos mais importantes compostos fenólicos por ser precursor de todos os taninos hidrolisáveis (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Por outro lado, em vinhos espumantes demi-sec não foi observado o mesmo comportamento, sugerindo que a concentração de açúcar pode compor a composição fenólica.

Já os ácidos hidroxicinâmicos se destacam por serem os compostos fenólicos mais representativos nos vinhos brancos, sendo os ácidos caféico, cumárico, ferúlico e caftárico, os mais relatados (CABRITA et al., 2002; GUERRA, 2005). Estes ácidos são compostos incolores em solução alcoólica diluída, porém podem tornar-se amarelados devido à oxidação. Do ponto de vista sensorial, esses compostos não apresentam um sabor ou odor característico, porém são precursores de alguns compostos voláteis (KALLITHRAKA et al., 2009). Ao analisar a composição fenólica de champagnes monovarietais de Chardonnay e Pinot Noir, Chamkha et al. (2003) identificaram e quantificaram dezenove compostos fenólicos, incluindo ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides, álcoois fenólicos e aldeídos fenólicos, destacando os ácidos hidroxicinâmicos como a principal classe de compostos fenólicos, representando em torno de 50 % do total, sendo o ácido caftárico o derivado mais abundante. Pozo-Bayón et al. (2003) avaliaram os compostos fenólicos em espumantes, revelando que o maior número desses compostos pertence ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, detectando 32

constituintes sendo formados pelos ácidos cis e trans caftárico, fertárico, caféico e p-cumárico e seus derivados ésteres etílicos. Também relataram que os compostos fenólicos de baixo peso molecular dos espumantes não mudam significativamente durante o envelhecimento com leveduras.

Entre os estilbenos, o resveratrol é o mais conhecido, no qual a síntese desse composto na uva é realizada principalmente na casca, onde é produzido como uma fitoalexina em resposta a infecções e estresse causado pelo meio ambiente (GUERRA, 2005; MORENO-ARRIBAS e POLO, 2009). Podem também estar combinados com glicosídeos, denominado piceíde, ou ainda ocorrer em formas oligoméricas e poliméricas chamadas de viniferinas, que são formadas a partir da polimerização oxidativa dos monômeros de resveratrol (MORENO-ARRIBAS e POLO, 2009). Dentre todos os compostos fenólicos, o resveratrol tem atraído atenção especial nas últimas décadas em decorrência de estudos epidemiológicos que mostram correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares (GUERRA, 2005; ABE et al., 2007).

Segundo Stefenon et al. (2010), nos vinhos espumantes elaborados pelo método Charmat, o teor de trans-resveratrol foi menor quando comparado ao vinho base, provavelmente devido às etapas de acabamento, como clarificação e filtração (VRHOVSEK, et al., 1997). Já em relação aos espumantes elaborados pelo método Champenoise foi observado um maior teor deste composto do que no seu vinho base. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a concentração de trans-resveratrol e o tempo de permanência do espumante em contato com as leveduras. Estes resultados podem estar relacionados à ação de leveduras com expressão da enzima β -glicosidase que podem aumentar a liberação de trans-resveratrol ao vinho (VRHOVSEK et al., 1997; STEFENON et al., 2014). No

entanto, Jeandet et al. (2006) mostraram uma redução no conteúdo de resveratrol em vinhos Champagne durante o período de maturação, relacionado a capacidade de adsorção de compostos fenólicos pelas leveduras, visto que a parede celular da levedura pode atuar com uma agente de superfície absorvente (MAZURIC e SALMON, 2005, MAZURIC e SALMON, 2006; STEFENON et al., 2014).

1.5.2 Compostos flavonóides

Os compostos flavonóides pertencem à classe química de compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6), compreendendo dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano (ZOECKLEIN et al., 1995). A atividade biológica dos flavonóides depende da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica pode sofrer uma série de modificações, como glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras, estas irão modular a polaridade, a toxicidade e o direcionamento intracelular destes compostos (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos de hidrogênio e suas conjugações, e também devido à presença de elétrons nos anéis benzênicos (CAO et al., 1997).

Esta grande família de compostos pode ser dividida em algumas subclasses, as quais se distinguem entre si pelo grau de oxidação do anel pirano, sendo elas flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas (BALASUNDRAM et al., 2006). Dentre estas subclasses podem-se destacar os flavonóis, os flavanóis e as antocianinas, pois são quantitativamente os mais importantes e estão diretamente ligados a qualidade sensorial, sendo responsáveis pela cor, sabor, corpo, adstringência e longevidade dos vinhos (CABRITA et al., 2002; GUERRA, 2005; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Grande parte da estrutura dos vinhos deve-se a esta família de compostos que se encontram principalmente nas cascas das uvas. Assim, devido ao menor contato do líquido/casca na etapa de maceração da elaboração dos vinhos e espumantes brancos, estes possuem uma menor concentração desses compostos, principalmente em antocianinas, as quais representam uma parte muito importante, tanto quantitativamente como qualitativamente, dos flavonoides das uvas tintas (FLANZY, 2000). As principais antocianinas das uvas tintas são malvidina, cianidina, peonidina, delphinidina e petunidina, comumente encontradas nas uvas de forma glicosiladas e esterificadas por diferentes ácidos orgânicos (MANFROI, 2007). As antocianinas são pigmentos responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa das cascas das uvas e dos vinhos tinto (GUERRA, 2005). No entanto, apesar da menor concentração, as antocianinas têm um papel fundamental na preparação dos vinhos espumantes rosés.

O aumento da demanda de vinhos espumantes rosés nos últimos anos promove o interesse, por parte dos produtores, em compreender a estabilidade de cor durante o envelhecimento dos vinhos espumantes, bem como na elucidação dos pigmentos envolvidos sobre as características organolépticas desse produto. Segundo Stefenon et al. (2010), a principal antocianina encontrada em espumantes rosés foi a malvidina monoglicosídeo. Pozo-Bayón et al. (2004) mostraram que após a segunda fermentação e maturação durante 9 meses com levedura, ocorreram mudanças quantitativas na concentração de antocianinas e maior estabilidade de cor dos vinhos espumantes rosés foi alcançada. Esse resultado pode estar relacionado às enzimas citoplasmáticas liberadas da auto degradação das leveduras que poderiam estar envolvidas na hidrólise de polímeros de antocianina-taninos (POZO-BAYÓN et al, 2009).

Os flavanóis, também conhecidos como taninos da uva e do vinho, caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado, sendo moléculas fenólicas relativamente volumosas, resultantes da polimerização de moléculas elementares de função fenol (CABRITA et al., 2002). Os principais flavanóis monoméricos encontrados nos vinhos são os isômeros (+)- catequina e a (-)-epicatequina, presentes principalmente nas sementes das uvas (ABE et al., 2007). Já os flavanóis poliméricos compreendem as procianidinas e os taninos condensados que tem suas estruturas bases formadas por catequina e epicatequina, e são de extrema importância organoléptica, sendo responsáveis pelo sabor e adstringência do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; ABE et al., 2007). Durante a conservação e o envelhecimento dos vinhos, a condensação dos taninos vai aumentando, influenciando a cor e as características sensoriais (CABRITA et al., 2002; GUERRA, 2005).

A segunda fermentação dos espumantes, independente do método, contribuiu para o aumento dos valores de epicatequina em espumantes brut, no entanto, em espumantes demi-sec não foram observadas alterações comparadas aos respectivos vinhos base (STEFENON et al., 2010). Já em relação ao conteúdo de catequina, segundo Stefenon et al. (2010) foi observado mudanças relacionadas ao tempo de maturação dos espumantes. Em amostras com tempos curtos de autólise não foram observadas diferenças significativas entre o espumante e o vinho base. Em espumantes com tempo médio de autólise, os valores de catequina aumentaram. Por outro lado, em espumantes com tempos longos de autólise, os valores de catequina diminuíram. Essa redução pode estar relacionada às reações de condensação, das catequinas e procianidinas com proteínas e polissacarídeos, assim como ocorre nos vinhos tintos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). No entanto,

essas interações podem ser influenciadas pelas diferentes técnicas adotadas durante o processo de fabricação/maturação (FLANZY, 2003; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; MAZURIC e SALMON, 2005).

Por fim, os flavonóis são compostos caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxila na posição 3. Nas uvas encontram-se nas cascas das variedades brancas e tintas, apresentando cor amarelada, na forma de glicosídeos ou glicurônicos na posição 3 (CABRITA et al., 2002). Dentre os flavonóis pode-se destacar a quercetina, miricetina, e campferol, com conhecida atividade biológica, antioxidante e antiestamínica (STECHEER et al., 2001). Satue-Gracia et al. (1999) mostraram uma positiva correlação da atividade antioxidante de vinhos espumantes com o conteúdo fenólico total, destacando o ácido trans-cafeico, ácido cumárico, ácido protocatecuico e quercetina-3-glicuronídeo.

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e padrões analíticos

Soluções estoque padrão (10.000 mg L^{-1}) de cada composto volátil (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foram preparadas em etanol bidestilado (Nuclear, São Paulo, Brasil). Uma solução modelo de vinho foi preparada de acordo com Soares et al. (2015), usando ácido tartárico (6 g L^{-1}) e 11% (v/v) de etanol em água ultrapura (Milli-Q sistema, Millipore, Bedford, MA). O pH desta solução foi ajustado com NaOH (Nuclear, São Paulo, BR) para 3,2, que é o pH das amostras de vinho espumante.

Uma solução mista contendo os seguintes padrões (Sigma) foi preparada em etanol bidestilado: 1,4-cineol ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), ácido 2-metil pentanoico ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), 3-octanol ($0,125 \text{ mg L}^{-1}$), dodecano ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), nonanoato de metila ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$)

e acetato de fenila ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$). Estes compostos foram usados como padrões internos e foram escolhidos tendo em vista que sua classe e/ou estrutura química são similares aos compostos voláteis avaliados no vinho espumante. Vinte microlitros desta solução mista foram adicionados a 2 mL da solução modelo usada nas curvas analíticas e amostras de vinho espumante antes da HS-SPME (*headspace solid phase micro extraction*, em inglês).

O cloreto de sódio de grau analítico (Nuclear) foi seco em estufa a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 8 horas. Frascos para headspace com tampas de rosca magnéticas seladas com septos de politetrafluoretileno (PTFE)/silicone e a fibra comercial de divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) de 1 cm foram adquiridos da Supelco (Bellefonte, EUA). A fibra foi condicionada de acordo com a recomendação do fabricante antes de sua primeira utilização.

Os padrões e reagentes para análise de HPLC-DAD-MS/MS (ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido hidroxibenzóico, ácido 5-cafeoilquínico, quercetina e rutina), para DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) e ABTS [2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. Ltd. Ácido fórmico, acetonitrila e metanol de grau HPLC foram comprados da Panreac Química SL (Barcelona, Espanha).

2.2 Elaboração dos espumantes

A uva Glera (*Vitis vinifera*) foi colhida com 16° Brix, em Caxias do Sul (latitude: $29^\circ 10' 4''\text{S}$, longitude: $51^\circ 10' 46''\text{W}$; altitude média de 782 m), Brasil. O mosto (4000 L) foi obtido através da prensagem, adicionado de dióxido de enxofre (30 mg L^{-1} , Amazon Group, Brasil) e clarificado (7 mg L^{-1} bentonite, Perdomini IOC, Itália e 20 mg L^{-1} de enzima Lafazym® CL, Lafort, Bordeaux, França). Um total de

1000 L de mosto foi destinado para a elaboração dos espumantes em cada método Ancestral, Tradicional, Charmat and FUT, de acordo com as etapas da Figura 1. A produção dos espumantes por cada método foi realizada em triplicata, totalizando doze procedimentos de vinificação. Todas as vinificações foram feitas nas instalações da Empresa Brasileira de Vinificação (EBV, Empresa Brasileira de Vinificações localizada em Caxias do Sul, Brasil).

O mosto de Ancestral e FUT foi chaptalizado com 25 g L^{-1} de açúcar para obter o teor alcoólico indicado para espumante, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2014). Para todos os métodos, a fermentação alcoólica foi realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* Zymafore X5® (300 mg L^{-1} , Lafort, Bordeaux, França) devido à sua capacidade de adaptação a diferentes condições de fermentação, segundo informações do fabricante (LAFFORT, 2019). A segunda fermentação pelo método Tradicional foi realizada por *S. cerevisiae var. bayanus* Lalvin EC118® (Lallemand, Montreal, Canadá), que é originalmente usada no Champagne (França) devido a sua capacidade fermentar em baixa temperatura, além de sua tolerância ao álcool (LALLEMAND, 2020). Para a segunda fermentação do método Charmat, *S. cerevisiae* Zymafore VL3® (Lafort) foi usada, uma vez que é uma cepa de levedura amplamente utilizada para vinhos brancos e vinhos espumantes varietais (LAFFORT, 2019).

2.2.1 Método Ancestral

O método Ancestral foi conduzido de acordo com Flanzky (2003), com modificações. A fermentação alcoólica ocorreu em tanques de aço inox entre 15 e 18°C , até o vinho alcançar a concentração de 24 g L^{-1} de açúcar, quando foi resfriado para 8°C e engarrafado, para concluir a fermentação e tomada de espuma

na garrafa, com temperatura controlada (12 a 15 °C) durante 30 dias. Após a conclusão da fermentação, o vinho espumante permaneceu em contato com as borras de leveduras por 6 meses (autólise). As borras de leveduras foram removidas por meio de *remuage* (girando e inclinando a garrafa para levar as borras até o gargalo) e *dégorgement* (congelamento do gargalo da garrafa, para remover as borras congeladas). O licor de expedição, o qual determina as diferentes categorias de vinho espumante de acordo com a quantidade de açúcar, foi adicionado conforme classificação brut (< 12 g L⁻¹) (OIV, 2019) e a rolha foi colocada na garrafa.

2.2.2 Método Tradicional

Método Tradicional foi conduzido de acordo com Ribéreau-Gayon et al. (2006). Esta parcela de mosto fermentou em tanques de aço inox entre 15 a 18°C, até o vinho atingir 10% de teor alcoólico. O líquido foi estabilizado (estabilização tartárica), clarificado e filtrado, originando o vinho base. O vinho base foi adicionado de licor de *tirage*, contendo açúcar (4 g L⁻¹) e *Saccharomyces cerevisiae* var. bayanus Lalvin EC118® (300 mg L⁻¹) e engarrafado para condução da segunda fermentação e tomada de espuma na garrafa. A segunda fermentação foi realizada em temperatura controlada (12 a 15°C) por aproximadamente 30 dias, e após seguiu as mesmas etapas do método Ancestral até o arrolhamento.

2.2.3 Método Charmat

Para o método Charmat, o mosto foi adicionado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Zymaflore X5® (300 mg L⁻¹), e fermentou até atingir 9,5% de álcool em temperatura entre 15 a 18°C, seguido de estabilização tartárica, clarificação e filtração. O vinho base foi adicionado de licor de *tirage*, contendo açúcar (4 g L⁻¹) e

Saccharomyces cerevisiae Zymaflore VL3® (300 mg L⁻¹). A segunda fermentação e tomada de espuma foram conduzidas em tanques hermeticamente fechados, pressurizados, a temperatura controlada (12 a 15°C), até o espumante apresentar um teor alcoólico de 10,5%. Foram realizadas as etapas de clarificação, filtração e o espumante foi adicionado de licor de expedição, para categoria brut e engarrafado isobaricamente.

2.2.4 Método FUT

Este método está sendo proposto pela primeira vez neste estudo, como uma variação do método Asti, com objetivo de obtenção de espumantes com níveis mais baixos de açúcar (12 ± 3 g L⁻¹). Para o método FUT, a fermentação alcoólica do mosto foi realizada diretamente em tanques pressurizados, com temperatura controlada (15 a 18°C). A tomada de espuma iniciou com o fechamento do tanque quando o teor alcoólico atingiu 9,5%, e foi conduzida até o espumante obter o teor alcoólico de 10,5%. As etapas seguintes foram as mesmas das realizadas para o método Charmat.

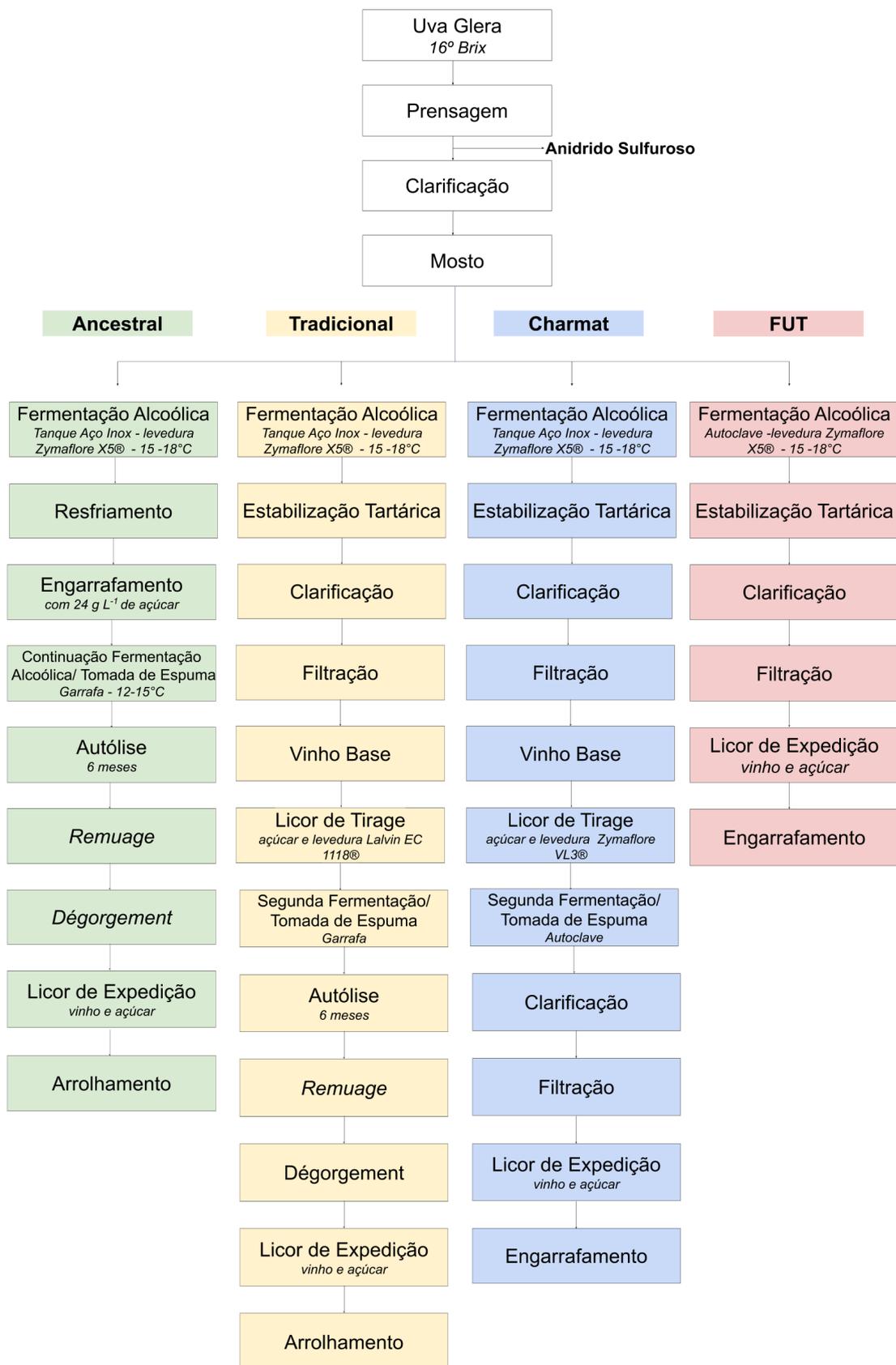


Figura 4. Fluxograma do processo de elaboração dos espumantes.

2.3 Parâmetros Enológicos

Acidez total (g L^{-1} ácido tartárico), acidez volátil (g L^{-1} ácido acético), teor alcoólico ($\text{mL}/100\text{mL}$), açúcar residual (g L^{-1} sacarose) e pH foram determinados de acordo com métodos descritos pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2011).

2.4 Extração dos compostos voláteis por HS-SPME

As amostras de espumante foram desgaseificadas por sonicação por 5 min usando um banho de gelo (Ultronique, modelo Q3.0/40A) para manter a amostra a 4 °C (prevenindo a perda de compostos voláteis) e estocadas a -18 °C até a análise. Os compostos voláteis foram extraídos usando HS-SPME com uma fibra DVB/PDMS de 1 cm, de acordo com as condições otimizadas em trabalhos anteriores (SOARES et al., 2015). A extração no *headspace* foi realizada com CTC CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Suíça) usando 2 mL de amostra e 30% de NaCl, temperatura e tempo de extração foi de 40 °C e 10 min, respectivamente.

2.5 Análise dos compostos voláteis dos espumantes por HS-SPME-GC/MS

Os compostos foram avaliados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas QP 2010S (CG/MS, Shimadzu). As análises foram feitas em coluna polar DB-WAX (100% polietileno glicol) e uma coluna apolar DB-5 (5% de fenil, 95% de polidimetilsiloxano) (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA), ambas medindo 30 m×0.25 mm× 0.25 μm . O forno foi mantido a 45 °C por 5 min, após aquecido a 180 °C a uma taxa de 3 °C min^{-1} , atingindo uma temperatura final de 240 °C a 20 °C min^{-1} . A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 250 °C e o hélio (pureza analítica 99,999%, Linde Gases, Canoas, RS, Brasil) foi empregado como gás de arraste. As análises foram realizadas no modo sem divisão e a taxa de

fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹. Os parâmetros MS incluíam ionização eletrônica a 70 eV e uma faixa de massa (m/z) de 45 a 300.

Os compostos foram identificados positivamente comparando os espectros de massa dos padrões analíticos com os espectros encontrados nas amostras. Para padrões indisponíveis, a identificação tentativa dos compostos voláteis foi realizada comparando seus índices de retenção experimental (IR_{exp}) com o IR relatado na literatura científica (IR_{lit}). Para o cálculo do IR_{exp} foram empregados os dados de retenção de uma série de n-alcenos (C9 – C24, Supelco, Bellefonte, PA) obtidos nas mesmas condições cromatográficas do que as amostras. Um composto foi considerado tentativamente identificado quando o IR_{exp} experimental e relatado não diferiu em >10 unidades, e quando a similaridade entre o espectro de massa de cada pico cromatográfico e o espectro da Biblioteca Espectral de Massa NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Gaithersburg, EUA) foi de pelo menos 80%.

Os dados quantitativos foram obtidos após a normalização da área do pico de cada composto em relação a um padrão interno. O padrão interno usado para cada curva, bem como as faixas de concentração dos compostos padrão usados para obter as curvas analíticas são mostrados na Tabela S1 (material complementar). A validação do método foi avaliada através de linearidade, recuperação, repetibilidade, limite de quantificação (LQ) e detecção (LD). As concentrações mais baixas, intermediárias e mais alta da curva analítica de cada composto foram usadas para determinar os parâmetros de recuperação (ICH, 2005).

2.6 Caracterização do perfil sensorial dos vinhos espumantes por análise descritiva quantitativa (ADQ)

O perfil sensorial dos espumantes produzidos pelos quatro diferentes métodos foi avaliado usando ADQ, de acordo com a metodologia descrita por Dutcosky (2007). Os espumantes foram testados por um grupo de 21 julgadores, que tinham conhecimento sobre degustação de espumante. Os julgadores geraram uma ficha consensual de 20 descritores sensoriais, incluindo sua definição e referência para o treinamento do painel, usando o método de rede de Keily (do inglês, *Keily's method repertory grid*) descrito por Moskowitz (1983). Na ficha descritiva para avaliação do vinho espumante, os descritores foram associados a uma escala não estruturada de 9 cm, ancorado nas extremidades esquerda e direita com os termos "nenhum / fraco" e "forte", respectivamente. Os termos descritivos foram selecionados pelo painel para caracterizar o perfil dos espumantes, incluindo atributos visuais (efervescência, tamanho da bolha, brilhante, cor amarelada), olfativos (fruta cítrica, indesejável, pão/tostado/fermento, láctico, fruta tropical, floral e adocicado) e gustativos (amargor, acidez, pão/tostado/fermento, frutado, floral, nozes/castanhas, cremoso, corpo e persistência). Para a seleção dos painelistas finais, cada julgador avaliou três amostras de espumante, em triplicata. Os resultados individuais de cada julgador, para cada atributo foram analisados através da análise de variância (ANOVA) com dois fatores (amostra e repetição). Nove julgadores foram selecionados com base na sua capacidade discriminatória (pF amostras <50), reprodutibilidade (pf repetição $>0,05$) e julgamento consensual com o restante da equipe de provadores. Para avaliação final, cada julgador avaliou as quatro amostras de espumante em triplicata. Para cada análise, 50 mL de espumante foi servido na taça, na temperatura entre 6 e 8 °C. O procedimento de

análise sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 28739120.9.0000.5347), em conformidade com a Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, Brasil.

2.7 Análise de compostos fenólicos de vinho espumante por HPLC-DAD-MS

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com Rodrigues et al. (2013). As análises cromatográficas foram realizadas usando um aparelho Shimadzu HPLC (Kyoto, Japão) conectado a um detector de arranjo de diodos (DAD). As amostras de vinho espumante foram centrifugadas e filtradas através de filtro de membrana de acetato de celulose de 0,22 μm (Millipore, Massachusetts, EUA), posteriormente, 20 μL foram injetados diretamente no sistema HPLC. Os compostos fenólicos foram separados em uma coluna Synergi 4m HydroRP C18 (4 mm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex, EUA), a uma vazão de 0,7 mL min^{-1} , temperatura da coluna a 29 °C, utilizando uma fase móvel composta por água/ácido fórmico (99,5: 0,5, v/v) (solvente A) e acetonitrila/ácido fórmico (99,5: 0,5, v/v) (solvente B) num gradiente linear de A/B 99:1 a 50:50 em 50 min; então de 50:50 a 1:99 em 5 min. A relação anterior (1:99) foi mantida por mais 5 min. Os espectros UV-vis foram obtidos entre 200 e 800 nm e os cromatogramas foram processados em 280, 320 e 360 nm.

Para a identificação de compostos fenólicos, um espectrômetro de massa com um analisador *Quadrupole-Time-of Flight* (QTOF) e fonte de ionização por eletrospray (ESI) da Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-Q III (Bremen, Alemanha) conectado ao HPLC-DAD Shimadzu (Kyoto, Japão) foi usado. Os espectros de massa foram adquiridos com uma faixa de varredura de m/z 100 a 1000. Os parâmetros MS foram definidos da seguinte forma: fonte ESI nos modos de íons negativos; tensão capilar, -3000 V; deslocamento da placa final, -500 V; temperatura

do gás seco (N₂), 310 ° C; fluxo, 8 L min⁻¹; gás nebulizador, 4 bar. A fragmentação (MS²) foi ajustada no modo automático aplicando 5 a 100 eV para a energia de fragmentação. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base nas seguintes informações: ordem de eluição e tempo de retenção na coluna C18 de fase reversa, características dos espectros UV-Vis e MS comparados aos padrões analisados nas mesmas condições e dados disponíveis na literatura.

Os compostos fenólicos foram quantificados por HPLC-DAD, utilizando curvas analíticas ($r^2 > 0.99$) de treze pontos de ácido gálico de dez pontos de ácido gálico (0,10 e 50 mg L⁻¹), ácido cafeico (0,05 e 25 mg L⁻¹), ácido coumárico (0,04 e 23 mg L⁻¹), ácido ferúlico (0,08 e 21 mg L⁻¹) e quercetina (0,11 e 57 mg L⁻¹).

2.8 Avaliação da atividade antioxidante por DPPH e ABTS

A atividade antioxidante das amostras foi determinada usando diferentes métodos, ABTS e DPPH. O ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolino) -6-sulfônico (ABTS) baseou-se na metodologia descrita por Re et al. (1999) em que ocorre a oxidação do composto ABTS causando a geração do radical cromóforo ABTS^{•+}. O experimento foi realizado com pequenas modificações. O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação entre 7 mM ABTS (Sigma Aldrich, EUA) e soluções de persulfato de potássio 140 mM. A solução de radicais foi diluída em etanol a 95% até uma absorbância de 0,7 (± 0,02) a 734 nm. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi adicionada a 1 mL desta solução e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240, Japão) após 6 min de reação. A solução de etanol foi usada como branco. Foi realizado também um segundo método de radicais livres, o ensaio de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (BRAND et al.,

1995). Neste caso, preparou-se solução de 60 μM de DPPH (Sigma Aldrich) em metanol. A reação começou pela adição de 100 μL da amostra a 3,9 ml da solução de radicais e a absorvância a 515 nm foi medida após 45 min de reação. A cubeta de referência em branco continha metanol. Uma mistura de 50% de metanol/ 70% de acetona/ água (4: 4: 2; v/v/v) foi adicionada em solução de DPPH como controle. Ambos os ensaios foram realizados no escuro e os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC). Soluções padrão de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) foram preparadas em etanol ou metanol para os métodos ABTS e DPPH, respectivamente, em diferentes concentrações (50 - 2000 μM) e avaliadas contra os radicais.

2.9 Análise Estatística

Mapa de calor e análise de agrupamento hierárquico (HCA) foram utilizadas para visualizar as semelhanças/diferenças entre o perfil volátil dos espumantes produzidos pelos métodos distintos. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p = 0,05$) foi usada para comparação do perfil sensorial dos espumantes avaliados pela ADQ, comparar a composição fenólica e a atividade antioxidante dos espumantes nos métodos analisados.



Volatile and sensory profile of sparkling wines produced by faster and alternative methods (Ancestral and Single Tank Fermentation) compared to the usual methods (Charmat and Traditional)

Bruna Dachery^{1,2} · Karolina Cardoso Fernandes² · Cláudia Alcaraz Zini³ · Juliane Elisa Welke² · Vitor Manfro²

Received: 22 March 2023 / Revised: 28 May 2023 / Accepted: 2 June 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

The wine industry intends to boost production of high-quality, innovative and competitive sparkling wines, since they have experienced a growth in consumption. Volatile compounds of sparkling wines produced with faster alternative methods (Ancestral and Single Tank Fermentation, STF) were compared to usual ones (Traditional and Charmat) using headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection (HS-SPME-GC/MS) followed by heat map and hierarchical grouping analysis (HCA). Esters with fruity, floral, honey and sweet characteristics were mainly responsible for the uniqueness of the sparkling wines produced by alternative methods. Five esters (isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, 2-phenylethyl acetate and isopentyl hexanoate) were found at levels above their odour thresholds (30, 55, 580, 250 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) in the Ancestral (122.8, 152.2, 588.0, 293.1 and 120.65 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) and STF (136.8, 172.6, 599.4, 291.7 and 129.76 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) sparkling wines. In contrast, hexanol (herbaceous odour, 790.3 and 845.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) and isoamyl octanoate (oily odour, 159.2 and 161.7 $\mu\text{g L}^{-1}$), which may impair the quality, were found at levels above the odour threshold (110 and 152.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) in the Charmat and Traditional sparkling wines, respectively. Sensory profile evaluated using quantitative descriptive analysis (QDA) showed that alternative sparkling wines were characterised by an enhanced odour of sweet, floral tropical and citrus fruit, in addition to effervescence, intensity of yellow colour, creaminess, body and taste. Therefore, Ancestral and STF resulted in desirable-quality sparkling wines that can be produced through faster processes with fewer steps.

Keywords Flavour · Volatile compounds · Sensory analysis · Quantitative descriptive analysis · Glera · Aroma

Introduction

Sparkling wine production has expanded in recent years, driven by high global consumer demand. Indeed, due to its high added value, the economic impact of sparkling wine is relevant, even though its production is lower than that of

still wine [1]. Different methods can be followed to produce sparkling wines, being the characteristic carbon dioxide obtained through a single fermentation as in the Ancestral (also known as Rural) and Asti methods or using two periods of fermentation as in the Traditional and the Charmat processes [2].

The Ancestral method was introduced in 1531 in the Languedoc region, France. In this pioneer method, a wine (around 24 g L^{-1} residual sugar) is bottled to finish the alcoholic fermentation and undergo the foaming process for 2 to 3 months. Maturation on yeast lees (autolysis) may occur after the fermentation, releasing compounds, such as mannoproteins and polysaccharides, which are important for the sensory characteristics of sparkling wines. The use of this method had been restricted to some regions of France, which present Geographical Indication, such as Gaillac, Limoux, Clairette de Die and Bugey et Cerdon [3]. However, with the

✉ Juliane Elisa Welke
juliane.welke@ufrgs.br

¹ University of Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas, Caxias do Sul, RS 1130, Brazil

² Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Bento Gonçalves Avenue, Porto Alegre, RS 9500, Brazil

³ Institute of Chemistry, UFRGS, Bento Gonçalves Avenue, Porto Alegre, RS 9500, Brazil

current interest of consumers in products that are subject to few oenological interventions, this underused method has reappeared in wineries around the world.

At the end of the seventeenth century, the *Champenoise* method, also known as the Traditional method, was introduced in the Champagne region (France) [2]. This method is common in European countries with a long tradition in sparkling wines elaboration, such as France (Champagne), Spain (Cava) and Italy (Franciacorta). The Traditional method is usually associated with the production of sparkling wines whose quality is guaranteed by a Protected Designation of Origin according to the European Union guidelines [4]. For this method, yeast and sugar (*tirage liqueur*) are added to a base wine (2 to 4 g L⁻¹ residual sugar) to perform the second fermentation and foaming in the bottle. Autolysis step depends on the specifications of the Designation of Origin (e.g. minimum of 18, 15 and 9 months for Franciacorta, Champagne and Cava, respectively) or on the desired sensory profile [5].

Charmat emerged in the twentieth century to produce large volumes of sparkling wines in a shorter time than Traditional method. The *tirage liqueur* is added to the base wine as in Traditional method. However in Charmat, the second fermentation and foaming are conducted in a hermetically sealed tank. Production is completed in 2–3 months without ageing step, originating a lighter and fresher sparkling wine, with enhanced fruity character than those produced by Traditional method [6]. Prosecco (Italy) and Sekt (Germany) are produced following Charmat method [1].

Asti method was developed from Charmat as a proposal to preserve the aromatic richness of Moscato grapes out of a single fermentation (without the prior elaboration of a base wine) in hermetically sealed tanks. The process takes about 45 days when fermentation is stopped by cooling (0 °C) resulting in a sweet (sugar > 50 g L⁻¹) and aromatic sparkling wine. Moscato family grapes are traditionally used in Asti method for the production of Asti (Italy) and Moscatel (Brazil) sparkling wines [7]. A late interruption of fermentation performed in Asti method may be an alternative to produce sparkling wines with low sugar content (under 3 g L⁻¹) through a single fermentation. This method based on Single Tank Fermentation (STF) is proposed for the first time in this study to produce Brut (under 12 ± 3 g L⁻¹) sparkling wines.

The production method can influence the volatile profile of the sparkling wines impacting the sensory characteristics and consequently consumer acceptance [8, 9]. In addition, the grape variety has an important role on the sensory perception. Different grape cultivars have been used to produce sparkling wines using the methods Ancestral, Traditional, Charmat and Asti as Chardonnay, Pinot Noir, Pinot Meunier, Glera, Riesling Muscat and Mauzac [10]. Glera grape is the main grape of Prosecco sparkling wine and is a

native white variety from Northeast Italy. It is considered a semi-aromatic variety, with neutral character, that originates sparkling wines with low alcohol content, floral and fruity aroma, light-bodied and refreshing. These characteristics are desired by the new generation of consumers and resulted in a significant increase of Prosecco production in recent years [11].

The wine industry has constantly improved its processes to respond to the increasing demand for the sparkling wine production. In some decades, wineries have gone from a sector strongly influenced by tradition to an industry where science, technological modernisation and innovation are competitive elements [1]. Therefore, the optimization of processes from an economic point of view considering the sustainability of production and the improvement of wine quality became important tools for the qualification of the sector [12]. Although world consumption of sparkling wine grows steadily, the methods of elaboration have not experienced great technological advances since its creation. Scientific research is mostly focussed on the Traditional and the Charmat method [6, 13, 14] since the world production of sparkling wines occurs mainly by these two methods. Although high-quality sparkling wines have been produced using these two methods, both encompass laborious and time-consuming elaboration steps. Therefore, the optimization of the elaboration steps can be an important economic advantage for the wine industry.

The goal of this study was to verify, for the first time, the potential to produce sparkling wines with satisfactory quality from alternative and faster methods (Ancestral and STF) in comparison with the usual ones (Traditional and Charmat), aiming to create new opportunities for wine producers. This approach was focussed on the evaluation of the volatile composition and the sensory perception of sparkling wines produced with Glera grapes by the following Ancestral, Traditional, Charmat and STF methods.

Materials and methods

Reagents and chemical standards

Stock solutions (10,000 mg L⁻¹) of each standard volatile compound (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) (Tables S1 and S2) were prepared in double-distilled ethanol (Nuclear, São Paulo, Brazil). A model wine solution was prepared according to Soares et al. [7], using tartaric acid (6 g L⁻¹) and 11% (v/v) of double-distilled ethanol in ultrapure water (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA). The pH of this solution was adjusted with NaOH (Nuclear, São Paulo, BR) to 3.2, which is the pH of the sparkling wine samples.

A mixed solution containing the following standards (Sigma-Aldrich) was prepared in double-distilled ethanol:

1,4-cineol (0.05 mg L⁻¹), 2-methyl pentanoic acid (2.5 mg L⁻¹), 3-octanol (0.125 mg L⁻¹), dodecane (0.05 mg L⁻¹), methyl nonanoate (0.025 mg L⁻¹) and phenyl acetate (0.025 mg L⁻¹). These compounds were chosen as internal standards due to the similarity of their class and/or chemical structure with the volatiles of the sparkling wines.

Sparkling wine production

Glera grapes (*Vitis vinifera*) were harvested at 16° Brix, in Caxias do Sul (latitude: 29°10'4"S, longitude: 51°10'46"W; average altitude of 782 m), Brazil. The must (4000 L) was obtained by pressing, added with sulphur dioxide (30 mg L⁻¹, Amazon Group, Brazil) and clarified (7 mg L⁻¹ bentonite, Perdomini IOC, Italy and 20 mg L⁻¹ enzyme Lafazym® CL, Laffort, Bordeaux, France). A total of 1000 L of must were destined to the production of sparkling wine by the Ancestral, Traditional, Charmat and STF methods, according to the steps showed in Fig. 1. The production of sparkling wines by each method was carried out in triplicate, totalling twelve vinification procedures. All the vinifications were made in the facilities of the Brazilian Winemaking Company (EBV, Empresa Brasileira de Vinificações located in Caxias do Sul, Brazil).

The must of Ancestral and STF was chaptalized with 25 g L⁻¹ of sugar in order to obtain the alcohol content indicated for sparkling wine, according to Brazilian legislation [15]. For all methods, alcoholic fermentation was carried out by *Saccharomyces cerevisiae* Zymaflore X5® (300 mg L⁻¹, Laffort, Bordeaux, France) due to its ability to adapt to different fermentation conditions, according to the manufacturer's information [16]. The second fermentation of Traditional method was performed by *S. cerevisiae var. bayanus* Lalvin EC118® (Lallemand, Montreal, Canada), which is originally used in Champagne sparkling wine due its ability to ferment at low temperature, in addition to its alcohol tolerance [17]. For the second fermentation of Charmat method, *S. cerevisiae* Zymaflore VL3® (Laffort) was used since this yeast strain is widely used for white wines and varietal sparkling wines [16].

Ancestral method

Ancestral method was carried out according to Flanzly [18], with modifications. Fermentation occurred in stainless steel tank at 15–18 °C until 24 g L⁻¹ of sugar was reached, when the wine was bottled. The second fermentation and foaming were conducted at 12 to 15 °C for 30 days. The sparkling wine remained in contact with yeast lees for 6 months (autolysis). The lees removal was performed through the steps of ridding (turning and tilting the bottle to lead the lees to the neck) and disgorgement (freezing the neck of the bottle to remove the lees). The *dosage* liquor, which determines

the different categories of sparkling wine regarding to sugar content, was added according to the Brut classification (< 12 g L⁻¹) [19] and the bottle received the cork.

Traditional method

Traditional method was conducted according to Ribéreau-Gayon et al. [2]. The grape must was fermented in stainless steel tank at 15–18 °C until it reached 10% alcohol. The liquid was stabilised (tartaric stabilisation), clarified (7 mg L⁻¹ bentonite) and filtered (cartridge filter), resulting in a base wine. The *tirage* liquor, which contained sugar and *S. cerevisiae var. bayanus* Lalvin EC118® (300 mg L⁻¹), was added to the base wine and bottled to undergo the second fermentation and foaming. Bottles were kept at 12 to 15 °C for approximately 30 days, and the next steps were the same performed in the Ancestral method.

Charmat method

For the Charmat method, *S. cerevisiae* Zymaflore X5® (300 mg L⁻¹) was added to the must and fermentation occurred until alcoholic strength of 9.5% alcohol was achieved, followed by tartaric stabilisation, clarification (7 mg L⁻¹ bentonite) and filtration (cartridge filter). The *tirage* liquor with *S. cerevisiae* Zymaflore VL3® (300 mg L⁻¹) was added to the base wine. The second fermentation took place in hermetically sealed tanks, where fermentation and foaming were carried out at a controlled temperature (15 to 18 °C) until it reached 10.5% alcohol content. Clarification (7 mg L⁻¹ bentonite) and filtration (cartridge filter) were performed and the sparkling wine was added of the *dosage* liquor to Brut classification and bottled isobarically.

STF method

This method was proposed for the first time in this study, as a variation of the Asti method, to produce sparkling wines with lower sugar levels. The alcoholic fermentation was performed in a hermetically sealed tank at 15 to 18 °C. The foaming started when the wine reached 9.5% alcohol content and was conducted until ~ 10.5% alcohol. The following steps were the same used for the Charmat.

Oenological parameters

The International Organization of Vine and Wine (OIV) methods were used to determine the alcohol content (method OIV-MA-AS312-01), total acidity (method OIV-MA-AS313-01), volatile acidity (method OIV-MA-AS313-02), residual sugar (method OIV-MA-AS311-01A) and pH (method OIV-MA-AS313-15) [20].

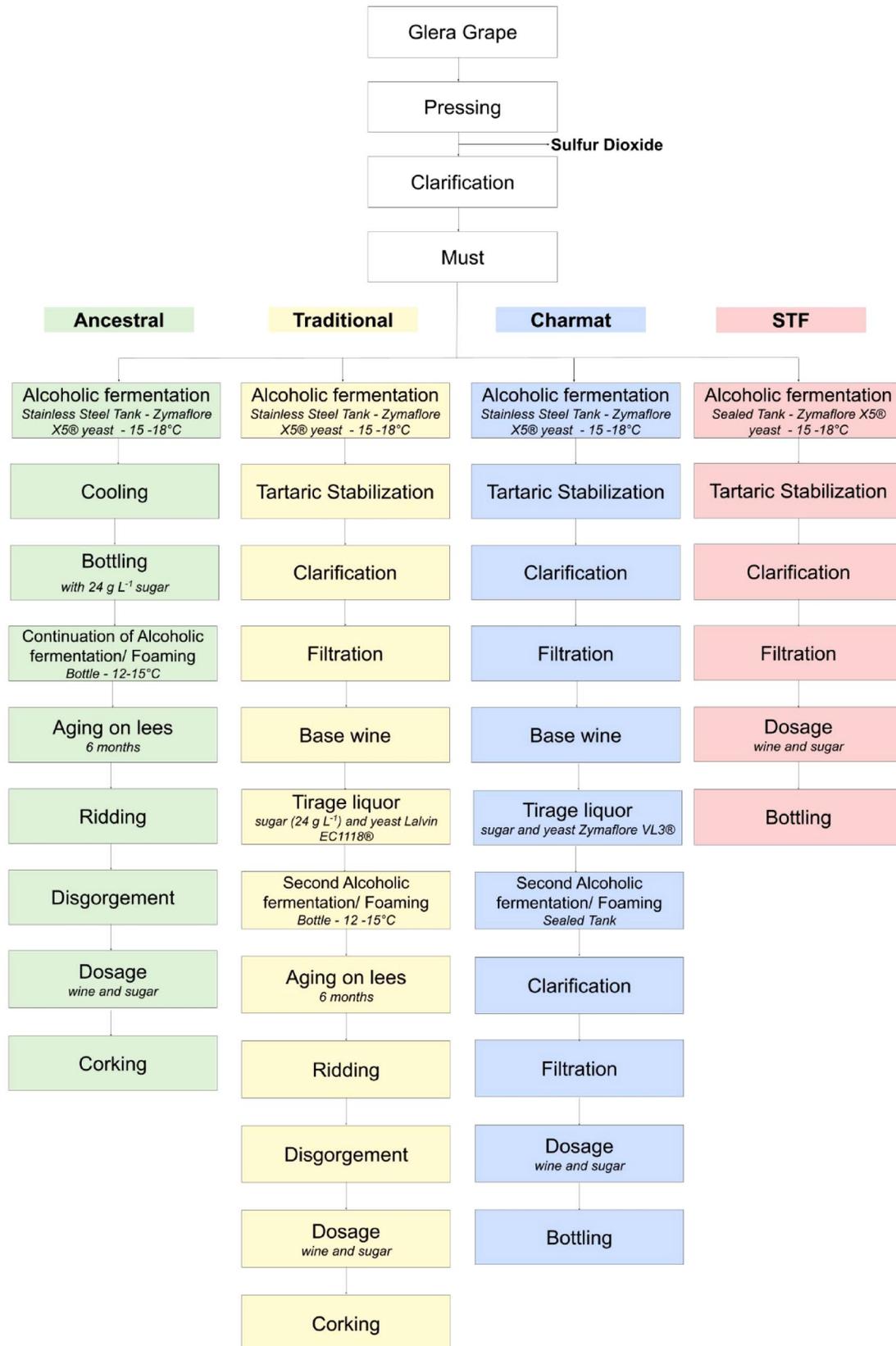


Fig. 1 Flowchart of sparkling wine production using Ancestral, Traditional, Charmat and Single Tank Fermentation (STF) methods

Determination of the volatile compounds

Samples were degassed by sonication for 5 min using an ice bath (Ultronique, Q3.0/40A) to keep the sample at 4 °C. Volatile compounds were extracted by solid-phase micro-extraction in headspace mode (HS-SPME) with a PDMS/DVB fibre, according to conditions optimised in a previous study [7]. Extraction was performed with CTC CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) using 2 mL of sample, 0.6 g NaCl at 40 °C for 10 min.

The compounds were evaluated by gas chromatograph with quadrupole mass spectrometry detection (CG/qMS) (Shimadzu, Kyoto, Japan), using polar DB-WAX (100% polyethylene glycol) and non-polar DB-5 columns (5% phenyl, 95% polydimethylsiloxane) (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm; J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). The oven was kept at 45 °C for 5 min and heated up to 180 °C at a rate of 3 °C min⁻¹, reaching a final temperature of 240 °C at 20 °C min⁻¹. Injector and detector were kept at 250 °C, and helium (99.9%, Linde Gases, Canoas, Brazil) was employed as carrier gas. Analyses were performed in split-less mode and flow rate was 1.0 mL min⁻¹. The MS analysis occurred at 70 eV using 45–300 m/z.

Compounds were identified by comparing the mass spectra of analytical standards with the spectra found in samples. For unavailable standards, tentative identification was performed by comparing their experimental retention indices [RI(exp)] with RI reported in scientific literature [R(lit)]. Calculation of RI(exp) has been performed using retention data of a series of *n*-alkanes (C9–C24, Supelco, Bellefonte, PA). A compound was considered tentatively identified when experimental and reported RI did not differ by 10 units and when similarity between mass spectrum of each chromatographic peak and spectrum of NIST Mass Spectral Library (Gaithersburg, USA) was at least 80%.

Quantitative data were obtained after normalisation of the peak area of each compound in relation to an internal standard. The internal standard used for each analytical curve, as well as the concentration ranges of the standard compounds used to obtain the analytical curves are shown in Table S1). Method validation was evaluated by linearity, recovery, repeatability, limit of quantification (LOQ) and detection (LOD) according to the International Conference on Harmonization [21]. Quantification was obtained by interpolation of the calibration graphs constructed with the respective pure reference compounds. For tentatively identified compounds, the analytical curve of the most structurally similar reference compound was employed for calculation of concentrations of the different compounds, as indicated in Table S2.

Characterisation of the sensory profile of sparkling wines

The sensory profile of sparkling wines produced by four different methods was evaluated using quantitative descriptive analysis (QDA). The samples were evaluated by 21 trained judges, who had knowledge about tasting sparkling wines. The judges generated a consensual list of 20 sensory descriptors, including their definitions and references for the panel's training, using Kelly's Repertory Grid Method described by Moskowitz [22]. In the descriptive sheet, the descriptors were associated with a 9 cm unstructured scale, anchored at the left and right ends with the terms "none/weak" and "strong", respectively. The descriptive terms were selected by the panel to characterise the sensory profile of sparkling wines, including visual (effervescence, yellow colour intensity, bubble size and brightness), olfactory (citrus fruit, tropical fruit, sweet, floral, undesirable, bread/toasted/yeast and lactic) and taste (bitterness, acidity, fruity, floral, nuts, bread/toast/yeast, creaminess, body and persistence) attributes. For the panellist's final selection, each judge evaluated three samples of sparkling wine, in three replicates. The individual results of each taster, for each attribute were analysed through analysis of variance (ANOVA) with two factors (samples and repetition). Nine tasters were selected based on their discriminatory capacity, reproducibility and consensual judgement with the rest of the team of tasters. During the final evaluation, each judge evaluated each sample of sparkling wine in triplicate. For each evaluation, 50 mL of sparkling wine (6–8 °C) was served per glass. The sensory analysis procedure was approved by the Research Ethics Committee (CAAE 28739120.9.0000.5347), in accordance with Resolution 466/12, of the National Health Council, Brazil [23].

Statistical analysis

Heat map and hierarchical grouping analysis (HCA) were used to visualise the similarities/differences between the volatile profiles of sparkling wines produced by distinct methods. The enological parameters and the sensory profile of the sparkling wines were evaluated using the analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test ($p < 0.05$).

Results and discussion

Table 1 shows the enological parameters of the sparkling wines produced by the Ancestral, Traditional, Charmat and STF methods. The sparkling wines produced by the four methods were in accordance with the parameters of Brazilian legislation [24] for alcohol, total acidity and volatile acidity. Furthermore, the pH values were in the usual range

Table 1 Oenological parameters of sparkling wines produced using Ancestral, Traditional, Charmat and STF methods

Method/parameter	Ancestral	Tradicional	Charmat	STF	Brazilian legislation [25]
Alcohol (%)	11.1 ± 0.0 ^a	11.1 ± 0.0 ^a	10.4 ± 0.7 ^{a,b}	10.5 ± 0.3 ^b	10–13
Total acidity (mEq L ⁻¹)*	89.1 ± 0.2 ^b	94.2 ± 1.6 ^a	79.1 ± 0.5 ^c	94.8 ± 2.8 ^a	40–130
Volatile acidity (mEq L ⁻¹) [‡]	5.16 ± 0.1 ^a	3.95 ± 0.0 ^c	3.40 ± 0.0 ^d	4.38 ± 0.1 ^b	0–20
pH	3.4 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.1 ^a	3.2 ± 0.1 ^a	3.2 ± 0.1 ^a	2.9–3.9 ^{**}
Sugar content (g L ⁻¹)	8.5 ± 0.2 ^b	8.4 ± 0.1 ^b	8.3 ± 0.0 ^b	9.6 ± 0.3 ^a	8.3–9.6 < 12 ^{***}

The results are expressed as means ± standard deviation

Different letters on the same line indicate significant difference at 5% significance level ($p < 0.05$) according to Tukey test.

*expressed as milliequivalents per litre tartaric acid

[‡]expressed as milliequivalents per litre acetic acid

**According to Ribéreau-Gayon et al. [2]

***According to OIV [19]

for sparkling wines [2] and can be classified as Brut according to OIV [19] and Brazilian legislation [24].

Influence of the elaboration method on the volatile composition of sparkling wines

Table S1 shows the performance of the method used for quantification of volatile compounds. The calibration curves showed suitable linearity with determination coefficients (r^2) of 0.98 for ethyl dodecanoate and 0.99 for all other compounds. LOD and LOQ demonstrated the adequate sensitivity of the method, whose values were lower than those reported by Tufariello et al. [26]. Linalool presented the lowest LOD (0.2 µg L⁻¹) and the lowest LOQ value was found for both dodecanol and linalool (1 µg L⁻¹), whilst acetic acid had the highest LOD and LOQ (100,000 and 200,000 µg L⁻¹, respectively). The relative standard deviation obtained in the repeatability assay was lower than 9.8%, and recoveries ranged from 90 to 95%, therefore demonstrating that the proposed method is suitable to quantify the volatile compounds of sparkling wine according to AOAC [27].

Table S2 shows the RI experimentally acquired and from the literature for each compound identified in the four types of sparkling wines. Forty-one volatile compounds belonging to the following classes were identified: 21 esters, 10 alcohols, 8 acids, 1 terpene and 1 ketone. Except for the terpene that is part of varietal aroma originated from grapes (also named primary aroma), all other chemical classes came from the fermentative process. Although the role of a volatile compound for the aroma depends on several factors, including concentration, threshold of perception, interactions with other compounds present in the matrix, amongst other aspects, an idea of the possible contribution of each compound to the quality of the sparkling wine was provided in Table S2 and mentioned in the discussion of the results.

The differences and similarities in the volatile profile of sparkling wines produced using the four methods were

visualised in the heat map and HCA in Fig. 2. The average concentration values of each volatile compound (Table S2) obtained in the vinification replicates were used to obtain the heatmap and HCA. The colour scale ranging from red, orange and yellow represent the highest, average and lowest concentrations of each compound, respectively. Seven clusters on the vertical axis were responsible for volatile compounds grouping according to the four methods of sparkling wine production. The discussion is based on compounds found at the highest or lowest levels for each cluster.

The volatile profile of sparkling wines produced following the Ancestral and STF methods was evaluated for the first time in this study. The compounds found at higher levels in sparkling wines produced by **Ancestral and STF** than in Traditional and Charmat methods were grouped in **cluster 1**. **Cluster 1** contains eight compounds that may contribute positively to wine aroma (Table S2), representing 73% of the compounds of this cluster: ethyl hexanoate (#20, fruity), ethyl octanoate (#25, fruity, pear, pineapple), ethyl decanoate (#30, fruity), ethyl hexadecanoate (#38, fruity), 2-phenylethyl acetate (#34, floral, honey), 2-phenylethanol (#17, rose, sweet), isoamyl acetate (#19, banana, fruity, sweet) and 3-hexenol (#12, fruity). # refers to the numbers given for the compounds shown in the Table S2 and Fig. 2, followed by the odour quality according to Table S2.

Amongst these compounds of **cluster 1**, isoamyl acetate (#19), ethyl hexanoate (#20), ethyl octanoate (#25), and 2-phenylethyl acetate (#34) have also been reported as the major esters of sparkling wines produced by other methods as Traditional and Charmat, according to Caliarì et al. [6], González-Jiménez et al. [13], Ubeda et al. [14] and Cisilotto et al. [37]. This result demonstrates that volatile compounds considered important according to literature for sparkling wines produced from two conventional fermentations (Traditional and Charmat) were also relevant for unusual methods that follow one-fermentation (Ancestral and STF). According to Table S2, these four esters (isoamyl acetate, ethyl

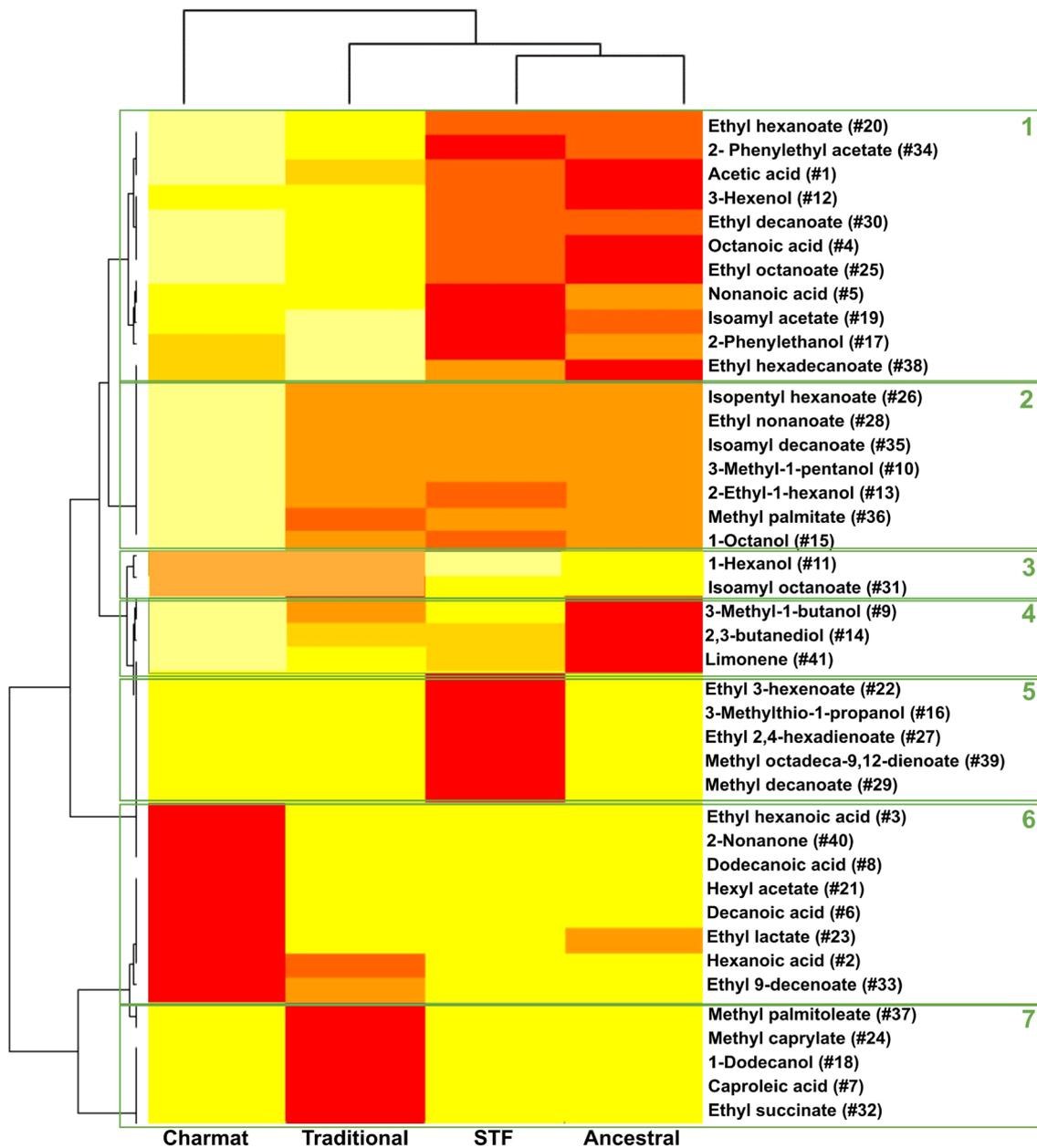


Fig. 2 Heat map obtained using the concentrations of volatile compounds identified in the sparkling wines produced following Ancestral, Traditional, Charmat and Single Tank Fermentation (STF) methods. Red, orange and yellow colours represent respectively high,

medium and low levels of volatile compounds. Clusters related to the group of volatile compounds are on the vertical axis (1 to 7). The number in parentheses corresponds to the number of the compound shown in Table S2

hexanoate, ethyl octanoate and 2-phenylethyl acetate) were found at levels above their odour thresholds (30, 55, 580 and 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) in Ancestral (122.8, 152.2, 588.0 and 293.1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) and STF (136.8, 172.6, 599.4 and 291.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) sparkling wines.

Octanoic (#4, fatty, rancid odour), nonanoic (#5, fatty odour), and acetic (#1, vinegar odour) acids were also detected in higher levels in sparkling wines produced by **Ancestral** and **STF** than Traditional and Charmat methods

as shown in **cluster 1**. The content of medium-chain fatty acids (#5 and #4) is dependent on yeast strain and stress growth conditions, such as low pH, ethanol and carbon dioxide levels [8]. Ancestral and STF are methods of single fermentation, so the yeast remains viable throughout the elaboration of the sparkling wine, which configures a stress condition, potentiating the acids production. On the contrary, Traditional and Charmat are performed following two fermentations with the input of yeasts in two moments of the

sparkling wine elaboration. Although these acids may have a negative role for the sensory profile, they are only perceived at concentrations above 10,000; 3000 and 20,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for octanoic, nonanoic and acetic acid, respectively [28]. Octanoic (#4, 5774.9 and 4848.3 $\mu\text{g L}^{-1}$), nonanoic (#5, 44.4 and 73.2 $\mu\text{g L}^{-1}$) and acetic acids (#1, 105,290.2 and 149,312.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) were found at levels below their perception thresholds in sparkling wines produced by **Ancestral** and **STF**, respectively.

The seven volatile compounds that presented higher levels in sparkling wines elaborated using **Ancestral**, **STF** and **Traditional** methods than in Charmat are presented in **cluster 2**. Six of these compounds have pleasant odour notes: isopentyl hexanoate (#26, sweet, fruity odour), ethyl nonanoate (#28, floral, fruity), isoamyl decanoate (#35, floral), 3-methyl-1-pentanol (#10, fruity, cocoa), 2-ethyl-1-hexanol (#13, floral, sweet, fruity) and 1-octanol (#15, sweet, rose like), whilst methyl palmitate has an unpleasant odour description (#36, waxy type). Amongst these compounds, only isopentyl hexanoate (#26) has been found at levels above the odour threshold (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) in Ancestral (120.65 $\mu\text{g L}^{-1}$), STF (129.76 $\mu\text{g L}^{-1}$) and Traditional (112.65 $\mu\text{g L}^{-1}$). The steps of clarification and filtration were carried out after the first fermentation in STF and Traditional methods but were not performed in Ancestral method. In Charmat, these steps occurred after the first and second fermentation. Therefore, this additional oenological intervention performed in Charmat may result in a reduction of the levels of volatile compounds, as reported for Stoica et al. [29].

Cluster 3 is represented by 1-hexanol (#11, herbaceous odour) and isoamyl octanoate (#31, oily odour), which were found at higher levels in sparkling wines produced by **Charmat** and **Traditional** than by Ancestral and STF methods. These compounds may impair the quality of sparkling wines produced by the Charmat and Traditional method, as 1-hexanol (790.3 and 845.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) and isoamyl octanoate (159.2 and 161.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) have a negative impact on aroma and they were found at levels above the odour threshold (110 and 152.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively). In contrast, 1-hexanol (87.4 and 90.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) and isoamyl octanoate (29.8 and 61.2 $\mu\text{g L}^{-1}$) were found in sparkling wines produced using STF and Ancestral method, respectively, at levels below their odour thresholds.

Cluster 4 encompasses compounds that have the highest concentration in sparkling wines produced using the **Ancestral** method: 3-methyl-1-butanol (#9, chemical) 2,3-butanediol (#14, buttery), and limonene (#40, lemon-like). Although 3-methyl-1-butanol has a negative odour, in moderate concentrations as verified in this study (<400.000 $\mu\text{g L}^{-1}$), this alcohol can have the positive influence on wine complexity and aroma, contributing positively with fruity characters [30]. 2,3-Butanediol and limonene are

associated with ageing on lees, as previously reported by Martínez-García et al. [8] and López de Lerma et al. [31]. Their presence is desirable, although both, 2,3-butanediol and limonene have been found at levels (4966.9 and 13.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) below their odour threshold (150,000 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively).

The compounds found in the highest levels in **STF** than other methods are in **cluster 5**. Amongst these compounds, three esters [ethyl-3-hexenoate (#22, fruity odour), ethyl 2,4-hexadienoate (#27, fruity odour) and methyl octadeca-9,12-dienoate (#39, oily odour)] were found in sparkling wines for the first time and may be potential markers of STF sparkling wines. The fruity odour of ethyl-3-hexenoate and ethyl 2,4-hexadienoate is desirable, whilst the oil odour of methyl octadeca-9,12-dienoate can give a negative perception to the quality of the sparkling wine. Other two compounds were responsible for the differentiation of sparkling wines produced by the STF method, 3-methylthio-1-propanol (#16, cooked vegetable odour) and methyl decanoate (#29, fruity, floral odour). Although 3-methylthio-1-propanol has an odour description that can impair the quality of the sparkling wine, this sulphur compound was found at a level (372.7 $\mu\text{g L}^{-1}$) that is lower than its odour threshold (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Unlike that, methyl decanoate has a positive odour description and was found at a level (27.9 $\mu\text{g L}^{-1}$) above its odour threshold (1.2 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Cluster 6 includes compounds found at higher levels in sparkling wines obtained by **Charmat** method, such as ethyl lactate (#23, raspberry odour), hexanoic acid (#2, cheese, fatty odour), hexyl acetate (#21, apple, pear odour), decanoic acid (#6, rancid odour), ethyl 9-decenoate (#33, rose), ethyl hexanoic acid (#3, herbal), dodecanoic acid (#8, dry, metallic odour) and 2-nonanone (#40, fruity odour). All these compounds were previously reported in sparkling wines produced by the Charmat [14] and Traditional [13, 32] methods. Amongst the compounds that have a pleasant odour description, only ethyl lactate (453.3 $\mu\text{g L}^{-1}$) was found at levels above its odour threshold (128 $\mu\text{g L}^{-1}$). Ethyl 9-decenoate is also a compound that has a positive influence on aroma. Although the highest levels were found in the Charmat sparkling wine, this ester was found at levels above the odour threshold in the sparkling wines produced by the four methods under study. Hexanoic acid is amongst the compounds that impair quality and was found at levels (3232.6 $\mu\text{g L}^{-1}$) above the odour threshold (3000 $\mu\text{g L}^{-1}$) in Charmat sparkling wine. All the other compounds in this cluster were present in levels below the odour threshold.

In **cluster 7**, there are five compounds that differentiate the sparkling wines produced by the Traditional method from the other methods, including ethyl succinate (#32, melon odour), 1-dodecanol (#18, flowery odour), caproic acid (#7, waxy, fatty, soapy odour), methyl caprylate (#24, fruity, citrus odour) and methyl palmitoleate (#37, not

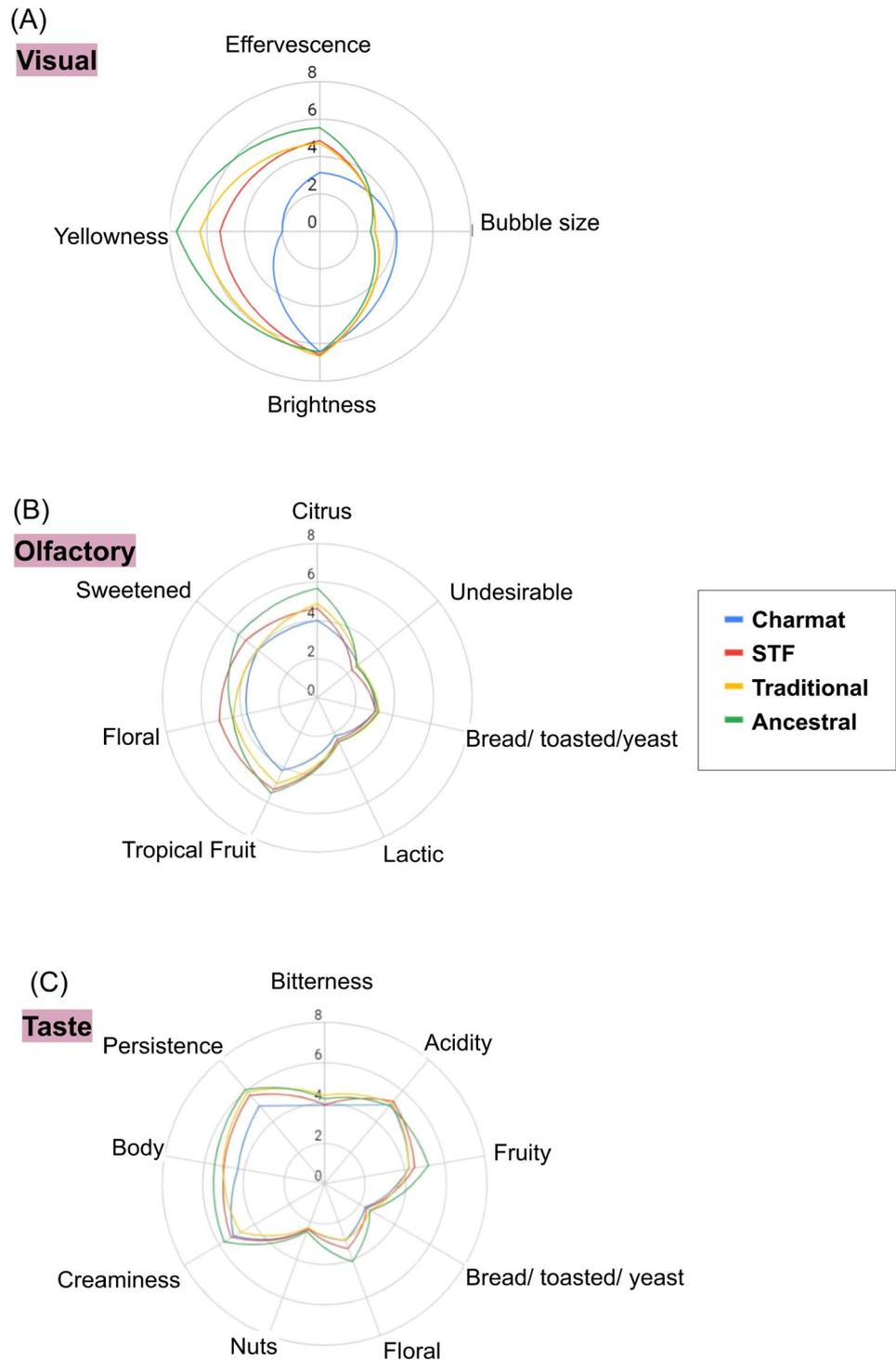
found odour). Amongst these compounds, only caproic acid has an odour description that can impair the quality of the sparkling wine; however, this compound was found at levels lower ($14 \mu\text{g L}^{-1}$) than the odour threshold ($40 \mu\text{g L}^{-1}$). Ethyl succinate was the only compound found at a concentration ($1898.3 \mu\text{g L}^{-1}$) above its threshold odour ($1200 \mu\text{g L}^{-1}$). This ester has been reported as indicator of

autolysis in sparkling wines produced by the Traditional method [33].

Sensory profile of sparkling wines

Figure 3 shows the sensory descriptors evaluated using QDA of the sparkling wines produced by Ancestral, Traditional,

Fig. 3 Quantitative descriptive analysis (QDA) of (A) visual, (B) olfactory and (C) taste sensory attributes of sparkling wines produced following Ancestral, Traditional, Charmat and Single Tank Fermentation (STF) methods



Charmat and STF. Table 2 presents the ANOVA and Tukey test results of the average scores obtained in QDA for visual (effervescence, yellow colour intensity, bubble size, brightness), olfactory (citrus fruit, tropical fruit, sweet, floral, undesirable, bread/toasted/yeast and lactic) and taste (bitterness, acidity, fruity, floral, nuts, bread/toast/yeast, creaminess, body and persistence) attributes. According to ANOVA and Tukey test, the sparkling wines produced by the four methods under study were similar in relation to seven sensory attributes: visual (brightness), olfactory (undesirable, bread/toasted/yeast and lactic), and gustatory (acidity, nuts and bread/toasted/yeast).

The visual attributes of effervescence and yellow colour intensity were perceived with greater intensity in the sparkling wine produced by the Ancestral than in other methods (Fig. 3A and Table 2). In addition, the Ancestral, STF and Traditional sparkling wines had smaller bubbles than Charmat, which is associated with a perception of superior quality by consumers.

Regarding the olfactory parameters evaluated in QDA (Fig. 3B), the odour of citrus fruit was perceived with greater intensity in sparkling wines from the Ancestral method, whilst the odours of tropical fruit and sweet had

the highest scores in both sparkling wines produced by the Ancestral and STF method. The perception of floral odour was statistically similar for the sparkling wines produced by the STF, Ancestral and Traditional methods, and there was no significant difference in relation to the score of this attribute for the sparkling wines produced by the Traditional and Charmat method. Figure 4 summarises the volatile compounds responsible for the differentiation of sparkling wines according to heatmap (Fig. 2) and that were found at levels above their odour thresholds in each elaboration method (Table S2). The four elaboration methods contain compounds that can contribute to the perception of floral odour [34] including 2-phenylethyl acetate (Ancestral and STF), methyl decanoate (STF) and ethyl 9-decanoate (Ancestral, STF, Traditional and Charmat).

Considering the taste attributes, bitterness perception was statistically greater in the sparkling wines produced by Traditional than STF methods (for Ancestral and Charmat, similarities were found in relation to this attribute) (Table 2). Fruity taste was perceived with greater intensity in the sparkling wines produced by the **Ancestral** method than in the other methods (Table 2). Floral perception was more pronounced in the sparkling wines of

Table 2 Average score of sensory attributes (visual, olfactory and taste) obtained in the quantitative descriptive analysis (QDA) of sparkling wines produced following Ancestral, Traditional, Charmat and Single Tank Fermentation (STF) methods

Attributes	Average score \pm standard deviation			
	Ancestral	Traditional	Charmat	STF
Visual				
Effervescence	5.54 \pm 0.46 ^a	4.70 \pm 0.41 ^b	3.18 \pm 0.26 ^c	4.87 \pm 0.35 ^b
Yellow colour intensity	7.59 \pm 0.28 ^a	6.35 \pm 0.35 ^b	2.04 \pm 0.20 ^d	5.32 \pm 0.41 ^c
Bubble size	2.67 \pm 0.41 ^b	2.95 \pm 0.50 ^b	4.11 \pm 0.39 ^a	2.90 \pm 0.38 ^b
Brightness	6.43 \pm 0.30 ^a	6.67 \pm 0.37 ^a	6.43 \pm 0.21 ^a	6.63 \pm 0.19 ^a
Olfactory				
Citrus fruit	5.72 \pm 0.41 ^a	4.92 \pm 0.50 ^b	4.04 \pm 0.33 ^c	4.64 \pm 0.34 ^b
Tropical fruit	5.45 \pm 0.29 ^a	4.86 \pm 0.30 ^b	4.16 \pm 0.31 ^c	5.25 \pm 0.28 ^a
Sweet	5.23 \pm 1.01 ^a	3.92 \pm 0.26 ^b	3.94 \pm 0.32 ^b	4.72 \pm 0.54 ^a
Floral	4.51 \pm 0.49 ^a	4.40 \pm 1.13 ^{ab}	3.72 \pm 0.37 ^b	5.16 \pm 0.67 ^a
Undesirable	2.58 \pm 0.39 ^a	2.73 \pm 0.34 ^a	2.65 \pm 0.37 ^a	2.25 \pm 0.49 ^a
Bread/toasted/yeast	3.21 \pm 0.30 ^a	3.33 \pm 0.18 ^a	3.14 \pm 0.27 ^a	3.07 \pm 0.23 ^a
Lactic	2.46 \pm 0.38 ^a	2.50 \pm 0.38 ^a	2.18 \pm 0.28 ^a	2.41 \pm 0.24 ^a
Taste				
Bitterness	4.18 \pm 0.44 ^{ab}	4.37 \pm 0.41 ^a	3.98 \pm 0.35 ^{ab}	3.85 \pm 0.41 ^b
Acidity	5.02 \pm 0.33 ^a	5.16 \pm 0.36 ^a	5.09 \pm 0.29 ^a	5.25 \pm 0.34 ^a
Fruity	5.18 \pm 0.41 ^a	4.18 \pm 0.45 ^b	4.20 \pm 0.40 ^b	4.46 \pm 0.36 ^b
Floral	4.11 \pm 0.82 ^a	3.03 \pm 0.43 ^b	2.97 \pm 0.51 ^b	3.44 \pm 0.76 ^{ab}
Nuts	2.46 \pm 0.46 ^a	2.27 \pm 0.44 ^a	2.37 \pm 0.41 ^a	2.35 \pm 0.46 ^a
Bread/toasted/yeast	2.61 \pm 0.28 ^a	2.62 \pm 0.30 ^a	2.33 \pm 0.17 ^a	2.38 \pm 0.28 ^a
Creaminess	5.69 \pm 0.43 ^a	4.80 \pm 0.31 ^c	5.17 \pm 0.42 ^b	5.33 \pm 0.37 ^{ab}
Body	5.54 \pm 0.45 ^a	5.09 \pm 0.29 ^{ab}	4.28 \pm 0.32 ^c	5.00 \pm 0.39 ^b
Persistence	6.14 \pm 0.45 ^a	5.85 \pm 0.31 ^{ab}	5.02 \pm 0.29 ^c	5.65 \pm 0.39 ^b

Data were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. Different letters horizontally indicate significant difference at 5% significance level ($p < 0.05$) according to Tukey test

Fig. 4 Summary of the results obtained by the chromatographic and sensorial analyses showing the compounds found above the odour threshold and that were considered responsible for the differentiation of the sparkling wines produced using Ancestral, Traditional, Charmat and Single Tank Fermentation (STF) methods

	Chromatographic			Sensory
	#	Compound	Odor	Attributes
Ancestral	19	Isoamyl acetate	Fruity, sweet	Visual: effervescence and yellow color intensity Olfactory: citrus fruit, tropical fruit, sweet and floral Taste: fruity, floral, creaminess, body
	20	Ethyl hexanoate	Fruity	
	25	Ethyl octanoate	Fruity	
	26	Isopentyl hexanoate	Fruity, sweet	
	30	Ethyl decanoate	Fruity	
	33	Ethyl 9-decenoate	Rose	
	34	2-phenylethyl acetate	Floral, honey	
Traditional	11	1-Hexanol	Herbaceous	Taste: bitterness, body
	26	Isopentyl hexanoate	Fruity, sweet	
	32	Ethyl succinate	Melon	
	31	Isoamyl octanoate	Oily	
	33	Ethyl 9-decenoate	Rose	
Charmat	2	Hexanoic acid	Cheese, fatty	Visual: size of the bubbles
	6	Decanoic acid	Fatty, rancid	
	11	1-Hexanol	Herbaceous	
	23	Ethyl lactate	Raspberry, buttery	
	31	Isoamyl octanoate	Oily	
	33	Ethyl 9-decenoate	Rose	
STF	19	Isoamyl acetate	Fruity, sweet	Olfactory: tropical fruit, sweet and floral Taste: floral, creaminess
	20	Ethyl hexanoate	Fruity	
	25	Ethyl octanoate	Fruity	
	26	Isopentyl hexanoate	Fruity, sweet	
	29	Methyl decanoate	Floral	
	30	Ethyl decanoate	Fruity	
	33	Ethyl 9-decenoate	Rose	
	34	2-Phenylethyl acetate	Floral, honey	

Influence on quality: -- Positive -- Negative

the Ancestral and STF methods than Charmat (sparkling wines from Traditional method were statistically similar to the Charmat). In fact, the Ancestral and STF generate sparkling wines that predominantly contain esters as

distinguishing components at levels above the olfactory threshold (Fig. 4).

The perception of creaminess was higher for sparkling wines produced by the STF and Ancestral method, whilst

the sparkling wine of the Traditional method had the lowest score for this attribute. Creaminess is associated with the sensation caused by the dissolution of carbon dioxide on the palate. A sparkling wine is considered creamy (higher scores in QDA) when the effervescence sensation is pleasant (low tingling sensation) [35]. The sparkling wines elaborated using the Charmat method obtained the lowest scores for body and persistence, whilst the sparkling wines from the other methods showed some similarity for these attributes (Fig. 3 and Table 2).

According to Fig. 4, amongst the compounds present above the odour threshold and that were considered the most discriminating, only the sparkling wines produced following the Traditional and Charmat methods presented volatiles that impair quality. These two methods had also resulted in sparkling wines that presented detrimental sensory characteristics, such as bitterness and larger bubble size, when compared to wines of the Ancestral and STF processes. All volatile compounds that are associated with sparkling wines produced by the Ancestral and STF are desirable for quality as they can provide fruity, floral, honey and/or sweet characteristics.

Therefore, our results indicate that the production process influences both the volatile and sensory profile of sparkling wines. Regarding Charmat and Traditional sparkling wines, Vecchio et al. [36] reported that information on the production process influences consumer expectations. Charmat sparkling wines were preferred when there was no information about the production method, however, when detailed information was provided to consumers, traditional sparkling wines were the most accepted due to the greater reputation of these products. However, Cisiloto et al. [37] reported that the subtle differences in the volatile and sensorial profile of Charmat and Traditional sparkling wines produced using the same base wine, yeast and ageing time on lees were not able to modulate the general characteristics of the products. Therefore, factors prior to the second fermentation have a greater impact on the product.

It is also important to recognise that alternative yeasts can be used to reduce production time and improve the organoleptic characteristics of sparkling wines [9, 38]. The use of flocculent *S. cerevisiae* with accelerated autolytic capacity was suggested by Di Gianvito et al. [9] for the second fermentation of Traditional sparkling wines. Tofalo et al. [38] found that co-inoculation of *S. cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* improved yeast autolysis and resulted in Traditional sparkling wines of superior sensory quality. In addition, the authors suggested that co-inoculation could also be used for the production of sparkling wines using the Charmat method.

Conclusions

The characterisation of the volatile and sensorial profiles of Glera sparkling wines produced by alternative methods that include a single step of alcoholic fermentation (Ancestral and STF) has been shown for the first time and compared to the usual methods (Traditional and Charmat), in which alcoholic fermentation is conducted in two processing stages. Sparkling wines produced by all methods reached the oenological parameters (alcohol content, total acidity, volatile acidity, sugar content and pH) established by Brazilian and international legislation. The ones produced by the Ancestral and STF methods stood out in relation to the presence of esters that give characteristics described as fruity, floral, honey and sweet. Desirable sensory parameters for quality were also attributed to these sparkling wines, including the odour of tropical fruit, citrus fruit, sweet and floral, in addition to effervescence, intensity of yellow colour, creaminess, body and taste (fruity, floral). Furthermore, Ancestral and STF sparkling wines had lower bitterness and bubble size than the Traditional and Charmat method sparkling wines. Although this study was limited to a single grape variety, vintage and vineyard, it was found that it is possible to produce sparkling wines with satisfactory quality using faster methods, which employ a smaller number of processing steps, to meet the high demand for sparkling wines that wineries have faced.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04303-z>.

Funding This study was funded by the National Council of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, project 408625/2016-3), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES) and Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS, PQG 19/2551-0001855-0).

Data availability All data included in this manuscript are available upon request by contacting the corresponding authors.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The sensory analysis procedure in this study was approved by the Research Ethics Committee (CAAE 28739120.9.0000.5347), in accordance with Resolution 466/12, of the National Health Council, Brazil.

References

- OIV. International Organisation of Vine and Wine (2020) The global sparkling wine market OIV Focus. 21. <https://www.oiv.int/public/medias/7291/oiv-sparkling-focus-2020.pdf>. Accessed 21 May 2023
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2006) Handbook of Enology, 2nd edn. Wiley, Chichester
- INAO. Institut National de L'Origine et de la Qualité (2020) Appellation d'origine protégée/contrôlée (AOP/AOC). <https://www.inao.gouv.fr>. Accessed 21 May 2023
- Europe Commission (E.C.) (2008) Council Regulation (E.C.) N° 479/2008 of 29 April 2008 on the common organisation of the market in wine, 1–114
- Ubeda C, Kania-Zelada I, del Barrio-Galán R, Medel-Marabolí M, Gil M, Peña-Neira A (2019) Study of the changes in volatile compounds, aroma and sensory attributes during the production process of sparkling wine by traditional method. *Food Res Int* 119:554–563. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.032>
- Caliari V, Panceri CP, Rosier JP, Bordignon-Luiz MT (2015) Effect of the traditional, charmat and asti method production on the volatile composition of moscato giallo sparkling wines. *LWT Food Sci Technol* 61:393–400. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.039>
- Soares RD, Welke JE, Nicolli KP, Zanús M, Caramã EB, Manfroí V, Zini CA (2015) Monitoring the evolution of volatile compounds using gas chromatography during the stages of production of Moscatel sparkling wine. *Food Chem* 183:291–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.013>
- Martínez-García R, García-Martínez T, Puig-Pujol A, Mauricio JC, Moreno J (2017) Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO₂ pressure in sealed bottle. *Food Chem* 237:1030–1040. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.066>
- Di Gianvito P, Perpetuini G, Tittarelli F, Schirone M, Arfelli G, Piva A, Patrignani F, Lanciotti R, Olivastri L, Suzzi G, Tofalo R (2018) Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on traditional sparkling wines production. *Food Res Int* 109:552–560. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.070>
- Welke JE, Dachery B, Dal Magro L, Hernandez KC, Zini CA (2022) Volatile compounds formation in sparkling wine. CRC Press, Boca Raton
- Boatto V, Pomarici ELB (2018) Conegliano Valdobbiadene Prosecco PDO's Wine Market - Annual Report 2018. <https://www.prosecco.it>. Accessed 21 May 2023
- Benoît L, William A, Lindsey H, Adrienne LF, Marianne MW (2018) Wine sector: Definitions and nuances from global to country analysis-A comparison between old world, new world, and emerging wine countries from 2005 to current. Elsevier, Duxford
- del González-Jiménez MC, Moreno-García J, García-Martínez T, Moreno JJ, Puig-Pujol A, Capdevilla F, Mauricio JC (2020) Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration. *Microorganisms* 8:403. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030403>
- Ubeda C, Callejón RM, Troncoso AM, Peña-Neira A, Morales ML (2016) Volatile profile characterisation of Chilean sparkling wines produced by traditional and Charmat methods via sequential stir bar sorptive extraction. *Food Chem* 207:261–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.117>
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (2014) Decreto N° 8.198, de 20 de fevereiro de 2014. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/decreto/d8198.htm. Accessed 21 May 2023
- Laffort (2019) Catalog. <https://laffort.com/en/catalogs>. Accessed 21 May 2023
- Lallemand (2020) Catalogue Lallemand Enologia. <https://www.lallemandwine.com>. Accessed 21 May 2023
- Flanzly C (2003) Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos, 2nd edn. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- OIV. International Organisation of Vine and Wine (2021) International Code Of Oenological Practices. <https://www.oiv.int/public/medias/7713/en-oiv-code-2021.pdf>. Accessed 21 May 2023
- OIV. International Organisation of Vine and Wine (2021) Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. <https://www.oiv.int/public/medias/7907/oiv-vol1-compendium-of-international-methods-of-analysis.pdf>. Accessed 21 May 2023
- ICH. International Conference on Harmonisation (2005) Validation of Analytical Procedures. <https://database.ich.org>. Accessed 20 May 2023
- Moskowitz HR (1983) Product testing and sensory evaluation of foods: marketing and R and d approaches. Food & Nutrition Press, Westport
- Brasil. Conselho Nacional de Saúde (2012) Resolução n° 466, de 12 de dezembro de 2012, Brasília. <http://saudelegis.saude.gov.br/saudelegis/secure/norma/listPublic.xhtml>. Accessed 19 May 2023
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (2019) Regras gerais sobre o padrão de identidade e qualidade das bebidas, fermentado acético, vinho e derivados de uva e do vinho importados, Brasília. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A>. Accessed 15 May 2023
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (2004) Lei N° 10.970, de 12 de novembro de 2004, Brasília. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A>. Accessed 15 May 2023
- Tufariello M, Pati S, D'Amico L, Blevé G, Losito I, Grieco F (2019) Quantitative issues related to the headspace-SPME-GC/MS analysis of volatile compounds in wines: the case of Maresco sparkling wine. *LWT Food Sci Technol* 108:268–276. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.063>
- AOAC International (2016) Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Int Off Method Anal, Rockville. <https://www.aoac.org>. Accessed 15 May 2023
- Korenika AMJ, Preiner D, Tomaz I, Jeromel A (2020) Volatile profile characterization of croatian commercial sparkling wines. *Molecules* 25:4349. <https://doi.org/10.3390/molecules25184349>
- Stoica F, Muntean C, Băducă-Cîmpeanu C, Giurgiulescu L (2017) Influence of clarification treatment on oenological and quality characteristics on young white wine sauvignon. *Carpathian J Food Sci Technol* 9:112–118
- Jeromel A, Korenika AMJ, Tomaz I (2019) An influence of different yeast species on wine aroma composition, 1st edn. Elsevier, Cambridge
- López de Lerma N, Peinado RA, Puig-Pujol A, Mauricio JC, Moreno J, García-Martínez T (2018) Influence of two yeast strains in free, bioimmobilized or immobilized with alginate forms on the aromatic profile of long aged sparkling wines. *Food Chem* 250:22–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.036>
- Welke JE, Zanús M, Lazzarotto M, Pulgati FH, Zini CA (2014) 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* 164:427–437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.025>
- Di Gianvito P, Arfelli G, Suzzi G, Tofalo R (2019) New trends in sparkling wine production: yeast rational selection, 1st edn. Elsevier, Cambridge

34. Nicolli KP, Welke JE, Closs M, Caramão EB, Costa G, Manfroi V, Zini CA (2015) Characterization of the Volatile Profile of Brazilian Moscatel Sparkling Wines Through Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J Braz Chem Soc.* 26:1411–1430. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150110>
35. Kemp B, Condé B, Jégou S, Howell K, Vasserot Y, Marchal R (2018) Chemical compounds and mechanisms involved in the formation and stabilization of foam in sparkling wines. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59:2072–2094. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1437535>
36. Vecchio R, Lisanti MT, Caracciolo F, Cembalo L, Gambuti A, Moio L, Siani T, Marotta G, Nazzaro C, Piombino P (2019) The role of production process and information on quality expectations and perceptions of sparkling wines. *J Sci Food Agric* 99:124–135. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9153>
37. Cisilotto B, Scariot FJ, Schwarz LV, Mattos Rocha RK, Longaray Delamare AP, Echeverrigaray S (2023) Are the characteristics of sparkling wines obtained by the Traditional or Charmat methods quite different from each other? *OENO One* 57:321–331. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.1.7313>
38. Tofalo R, Perpetuini G, Rossetti AP, Gaggiotti S, Piva A, Olivastri L, Cichelli A, Compagnone D, Arfelli G (2022) Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts to improve traditional sparkling wines production. *Food Microbiol* 108:104097. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104097>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Supplementary material

Table S1. Validation parameters of the HS-SPME-GC/MS method used to quantify the volatile compounds of sparkling wines.

Compound	Range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Analytical curve	r^2 ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^b	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^c	Recovery (%) ^d	Repeatability (%) ^e
Acetic acid ^f	200000 - 450000	$y = 0.0138x - 2.5275$	0.9956	100000	200000	91	9.0
Octanoic acid ^f	10 - 4000	$y = 0.6728x - 0.024$	0.9974	1	10	90	9.4
Decanoic acid ^f	5 - 400	$y = 0.9612x - 0.0016$	0.9945	1	5	90	6.4
Hexanol ^f	80 - 2000	$y = 2.0769x - 0.7637$	0.9926	50	80	90	9.0
Dodecanol ^f	1-1000	$y = 1.6335x - 0.0828$	0.9904	0.4	1	92	9.8
Phenylethyl alcohol ^g	250- 1700	$y = 3.3683x - 0.1926$	0.9964	10	250	95	8.6
Benzaldehyde ^h	250-2000	$y = 2.0968x - 0.0109$	0.9956	10	250	90	7.8
Ethyl dodecanoate ⁱ	50- 1000	$y = 27.829x - 2.7491$	0.9897	1	50	91	6.9
Ethyl hexanoate ⁱ	10- 1000	$y = 11.964x + 0.2955$	0.9971	5	10	95	7.2
Ethyl octanoate ⁱ	50-1000	$y = 41.468x - 1.1358$	0.9933	1	50	93	8.0
Isoamyl acetate ^j	10-2000	$y = 6.7757x + 0.0328$	0.9987	5	10	91	8.8
Phenylethyl acetate ^j	5-750	$y = 8.6308x - 0.082$	0.9924	1	5	92	7.5
Linalool ^l	1- 250	$y = 10.219x + 0.0262$	0.9974	0.2	1	90	6.2

^a r^2 : Determination coefficient

^b LOD: Limit of detection

^c LOQ: Limit of quantification

^d Recovery was performed for the medium point of the analytical curve (in $\mu\text{g L}^{-1}$ for acetic acid: 320000 $\mu\text{g L}^{-1}$; decanoic acid: 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; octanoic acid: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; dodecanol: 200 $\mu\text{g L}^{-1}$; hexanol: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; phenylethyl alcohol: 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$; benzaldehyde: 750 $\mu\text{g L}^{-1}$; ethyl dodecanoate: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; ethyl hexanoate: 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; ethyl octanoate: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; isoamyl acetate: 750 $\mu\text{g L}^{-1}$; phenylethyl acetate: 250 $\mu\text{g L}^{-1}$; and linalool: 75 $\mu\text{g L}^{-1}$)

^e Coefficient of variation of seven independent assays performed under the same analytical conditions on the same day

The internal standard used for each analytical curve was as follows: ^f 2-methyl pentanoic acid, ^g 3-octanol, ^h dodecane, ⁱ methyl nonanoate, ^j phenyl acetate, ^l 1,4-cineol.

Table S2. Volatile profile of sparkling wines quantified in Charmat, Traditional, Ancestral and Single Tank Fermentation (STF) methods. The concentration of volatiles of sparkling wines were evaluated using HS-SPME-GC/MS and the compounds are listed according to their chemical classes.

Compound	DB-WAX		DB-5		OTS ^c (µg L ⁻¹)	STF (µg L ⁻¹)	Charmat (µg L ⁻¹)	Traditional (µg L ⁻¹)	Ancestral (µg L ⁻¹)	Odor Descriptor ^d	
	RI ^a (exp)	RI ^b (lit)	RI ^a (exp)	RI ^b (lit)							
Acids											
1	Acetic acid ^g	1442	1451[1]	NF	-	200000[2]	149312.1±2412.7	< LOD ^f	41024.3±2225.3	105290.2±4958.8	Vinegar[3]
2	Hexanoic acid ^g	1841	1844[4]	992	991[5]	3000[2]	50.7	3232.6±184.8	602.1±13.4	104.0±8.6	Cheese, fatty[6]
3	Ethyl hexanoic acid	1938	1937[7]	NF	-	NF	< LOD	2820.73±52.8	< LOD	< LOD	NF
4	Octanoic acid ^g	2038	2035[8]	1192	1197[9]	10000[10]	4848.3±496.1	1537.1±65.4	1734.5±49.64	5774.9±14.7	Fatty, rancid[10]
5	Nonanoic acid	2149	2149[11]	1273	1265[9]	3000[12]	73.2±0.5	< LOD	< LOD	44.4±2.9	Fatty[12]
6	Decanoic acid ^g	2244	2244[8]	1370	1380[13]	15000[2]	1074.1±20.8	4938.4±542.7	106.2±13.7	1309.3±56.2	Fatty, rancid[10]
7	Caproic acid	2309	2305[14]	NF	-	40[6]	< LOD	< LOD	14.0±0.8	< LOD	Waxy, fatty, soapy[15]
8	Dodecanoic acid	2457	2465[8]	NF	-	1000[10]	12.1±0.1	156.8±79.9	14.10±1.5	31.5±2.0	Dry, metallic[6]
	<i>total acids</i>						<i>356601.4</i>	<i>10862.1</i>	<i>243495.3</i>	<i>413634.4</i>	
Alcohols											
9	3-Methyl-1-butanol ^g	1231	1229[16]	NF	-	600000[10]	10074.3±983.7	8727.5±523.5	12244.4±1351.8	15645.9±626.1	Chemical[10]
10	3-Methyl-1-pentanol	1326	1323[17]	NF	-	50000[18]	380.2±1.8	< LOD	384.3±0.3	385.0±3.1	Fruity, cocoa[18]
11	1-Hexanol ^g	1347	1352[17]	869	871[19]	110[10]	87.4±4.5	790.3±56.3	845.5±27.2	90.1±9.2	Herbaceous[10]
12	3-Hexenol	1375	1377[20]	NF	-	1000[10]	392.9±6.4	< LOD	< LOD	399.5±22.2	Fruity[10]
13	2-Ethyl-1-hexanol	1473	1483[1]	1029	1025[21]	8000[16]	416.2±17.5	< LOD	385.4±3.4	380.6±0.2	Floral, sweet fruity[16]
14	2,3-Butanediol ^g	1528	1524[20]	801	7924[22]	150000[18]	2617.2±198.7	1274.72±139.9	2660.8±96.3	4966.9±542.8	Buttery[18]
15	1-Octanol	1540	1543[20]	1070	1063[9]	875000[23]	395.2±2.3	384.1±0.9	392.7±1.1	393.6±1.4	Sweet, rose-like[23]
16	3-Methylthio-1-propanol ^g	1694	1706[20]	NF	-	1500[2]	372.7±0.3	< LOD	< LOD	< LOD	Cooked vegetable[18]
17	2-Phenylethanol ^g	1889	1898[1]	1109	1107[19]	200000[10]	1231.5±141.1	1048.5±66.2	845.5±27.2	1139.9±22.2	Rose, sweet[24]

18	1-Dodecanol ⁹	1954	1957[17]	NF	-	1000[6]	< LOD	< LOD	55.2±0.2	< LOD	Flowery in low concentration[6]
	<i>total de alcohols</i>						16499.2	12225.2	17813.9	24518.8	NF
Esters											
19	Isoamyl acetate ⁹	1109	1113[16]	877	876[17]	30[10]	136.8±8.6	68.0±6.7	46.5±1.9	122.8±9.4	Fruity, sweet[10]
20	Ethyl hexanoate ⁹	1215	1223[17]	1000	1001[25]	55[10]	172.6±10.0	< LOD	< LOD	152.2±7.8	Fruity[10]
21	Hexyl acetate	1243	1251[26]	1013	1015[13]	670[10]	26.7±2.3	88.8±10.6	28.9±0.1	31.9±0.2	Apple, pear[10]
22	Ethyl 3-hexenoate	1265	1270[27]	NF	-	NF	20.2±1.3	< LOD	< LOD	< LOD	Fruity[28]
23	Ethyl lactate ⁹	1343	1345[29]	NF	-	128[10]	< LOD	453.3±40.1	8.3±1.1	274.0±28.0	Raspberry, buttery[10]
24	Methyl caprylate	1374	1378[1]	1124	1120[25]	200[30]	< LOD	< LOD	27.8±0.1	< LOD	Fruity, citrus like[30]
25	Ethyl octanoate ⁹	1409	1405[16]	1199	1188[25]	580[10]	599.4±22.9	269.9±18.6	339.8±11.7	588.0±21.4	Fruity[10]
26	Isopentyl hexanoate	1431	1429[12]	1248	1254[31]	100[6]	129.76±1.4	< LOD	112.65±3.1	120.65±5.1	Fruity, sweet[32]
27	Ethyl 2,4-hexadienoate	1481	1490[33]	NF	-	NF	29.9±0.1	< LOD	< LOD	< LOD	Fruity[28]
28	Ethyl nonanoate	1506	1509[12]	1295	1295[34]	1300[6]	27.7±0.2	< LOD	27.8±0.2	27.7±0.1	Floral, fruity[12]
29	Methyl decanoate	1566	1573[35]	1322	1326[13]	1.2[6]	27.9±0.1	< LOD	< LOD	< LOD	Floral[28]
30	Ethyl decanoate ⁹	1614	1623[16]	1396	1394[36]	500[10]	266.9±18.29	40.8±0.35	90.5±3.31	266.8±18.37	Fruity[10]
31	Isoamyl octanoate	1631	1640[37]	1453	1450[38]	152[16]	29.8±0.9	159.2±1.3	161.7±0.1	61.2±1.5	Oily[16]
32	Ethyl succinate ⁹	1659	1664[16]	1180	1183[39]	1200[10]	158.8±6.0	244.6±5.0	1898.3±19.6	175.7±9.0	Melon[10]
33	Ethyl 9-decenoate	1664	1664[40]	1387	1386[33]	100[41]	119.5±1.5	128.4±6.0	124.0±2.9	119.2±11.9	Rose[32]
34	2-phenylethyl acetate ⁹	1790	1786[16]	1253	1243[31]	250[10]	291.7±1.0	< LOD	26.1±1.9	293.1±5.6	Floral, honey[42]
35	Isoamyl decanoate	1859	1863[17]	1647	1647[27]	NF	99.9±0.1	< LOD	99.1±0.1	100.3±0.2	Floral[28]
36	Methyl palmitate	2203	2207[43]	1926	1926[44]	NF	102.2±1.0	< LOD	106.6±7.4	100.4±0.6	Waxy[10]
37	Methyl palmitoleate	2230	2225[45]	1907	1912[14]	NF	< LOD	< LOD	99.27±0.39	< LOD	NF
38	Ethyl hexadecanoate	2242	2243[1]	1926	1976[36]	1500[16]	123.5±4.3	99.5±0.1	< LOD	173.08±7.0	Fruity[10]
39	Methyl octadeca-9,12-dienoate	2485	2472[46]	NF	-	NF	100.0±0.9	< LOD	< LOD	< LOD	Oily[28]
	<i>total esters</i>						2039.9	1474.1	1768.9	2546.9	

Ketones

40	2-Nonanone	1361	1366[16]	1090	1090[5]	41[23]	< LOD	10±0.4	< LOD	< LOD	Fruity[23]
	<i>total ketones</i>						0	10	0	0	

Terpenes

41	Limonene ^g	1155	1154[47]	NF	-	200[10]	11.2±0.6	9.1±0.8	10.1±0.3	13.4±1.7	Lemon-like[23]
	<i>total terpenes</i>						26.4	9.1	10.0	13.3	

The results are expressed as mean ± standard deviation with three repetitions for each sample analyzed.

^a *R*_I: Retention index calculated using *n*-alkanes (C9-C24) in DB-Wax column (100% polyethylene glycol) and DB-5 (5% phenyl methylpolysiloxane)

^b *R*_I: Literature retention index for polar (DB-Wax or similar) and nonpolar (DB-5 or similar) columns.

^c OTS: odor threshold determined in 10–12% (v/v) ethanol obtained from literature.

^d Odor descriptor obtained from literature.

^e NF, Not found: The IR, OTS or odor descriptor of the compounds in the literature were not found.

^f Limit of detection: compounds that are below of limit of detection.

^g Compounds identified using analytical standards.

REFERENCES

1. Welke JE, Manfroi V, Zanus M, et al (2012) Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1226:124–139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.002>
2. Guth H (1997) Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J Agric Food Chem* 45:3022–3026. <https://doi.org/10.1021/jf9608433>
3. Pino JA, Quijano CE (2012) Study of the volatile compounds from plum (*Prunus domestica* L. cv. Horvin) and estimation of their contribution to the fruit aroma. *Food Sci Technol* 32:76–83. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000006>
4. Gyawali R, Kim K (2012) Bioactive volatile compounds of three medicinal plants from Nepal. *Kathmandu Univ J Sci Eng Technol* 8:51–62
5. Pellicer L V. (2007) Comparison of Sensory Characteristics, and Instrumental flavor Compounds Analysis of Milk Produced by Three Proction Methods. University of Missouri-Columbia
6. Li H, Tao YS, Wang H, Zhang L (2008) Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). *Eur Food Res Technol* 227:287–292. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0722-9>
7. Supriyadi S, Suzuki M, Yoshida K, et al (2002) Changes in the Volatile Compounds and in the Chemical and Physical Properties of Snake Fruit (*Salacca edulis* Reinw) Cv. Pondoh during Maturation. *J Agric Food Chem* 50:7627–7633. <https://doi.org/10.1021/jf020620e>
8. Parada F, Duque C, Fujimoto Y (2000) Free and bound volatile composition and characterization of some glucoconjugates as aroma precursors in melón de olor fruit pulp (*Sicana odorifera*). *J Agric Food Chem* 48:6200–6204. <https://doi.org/10.1021/jf0007232>

9. Hamm S, Bleton J, Connan J, Tchaplá A (2005) A chemical investigation by headspace SPME and GC–MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples. *Phytochemistry* 66:1499–1514. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.025>
10. Peinado RA, Moreno JA, Muñoz D, et al (2004) Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *J Agric Food Chem* 52:6389–6393. <https://doi.org/10.1021/jf049369o>
11. Weckerle B, Bastl-Borrmann R, Richling E, et al (2001) Cactus pear (*Opuntia ficus indica*) flavour constituents - Chiral evaluation (MDGC-MS) and isotope ratio (HRGC-IRMS) analysis. *Flavour Fragr J* 16:360–363. <https://doi.org/10.1002/ffj.1012>
12. Fan W, Xu Y, Jiang W, Li J (2010) Identification and quantification of impact aroma compounds in 4 nonfloral *vitis vinifera* varieties grapes. *J Food Sci* 75:. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01436.x>
13. Xu Y, Fan W, Qian MC (2007) Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. *J Agric Food Chem* 55:3051–3057. <https://doi.org/10.1021/jf0631732>
14. Pino J, Marbot R, Vázquez C (2004) Volatile Components of the Fruits of *Vangueria madagascariensis* J. F. Gmel. from Cuba. *J Essent Oil Res* 16:302–304. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698727>
15. Samappito S, Butkhup L (2010) Effect of skin contact treatments on the aroma profile and chemical components of mulberry (*Morus alba* Linn.) wines. *African J Food Sci* 4:52–61
16. Luo T, Fan W, Xu Y (2008) Characterization of volatile and semi-volatile compounds in Chinese rice wines by headspace solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J Inst Brew* 114:172–179. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00323.x>
17. Zhao Y, Xu Y, Li J, et al (2009) Profile of volatile compounds in 11 brandies by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J Food Sci* 74:. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01029.x>
18. García-Carpintero EG, Sánchez-Palomo E, Gallego MAG, González-Viñas MA (2011) Volatile and sensory characterization of red wines from cv. Moravia Agría minority grape variety cultivated in La Mancha region over five consecutive vintages. *Food Res Int* 44:1549–1560. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.04.022>
19. Nivinskienė O, Butkienė R, Gudalevič A, et al (2007) Influence of urban environment on chemical composition of *Tilia cordata* essential oil. *Chemija* 18:44–49
20. Selli S (2007) VOLATILE CONSTITUENTS OF ORANGE WINE OBTAINED FROM MORO ORANGES (*CITRUS SINENSIS* [L.] OSBECK). *J Food Qual* 30:330–341. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00124.x>
21. Chung S-J, Heymann H, Grün IU (2003) Application of GPA and PLSR in correlating sensory and chemical data sets. *Food Qual Prefer* 14:485–495. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00010-7)
22. Mateo J, Aguirrezábal M, Domínguez C, Zumalacárregui JM (1997) Volatile Compounds in Spanish Paprika. *J Food Compos Anal* 10:225–232. <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0535>
23. Qian MC, Wang Y (2005) Seasonal variation of volatile composition and odor activity value of “Marion” (*Rubus* spp. hyb) and “Thornless Evergreen” (*R. laciniatus* L.) blackberries. *J Food Sci* 70:13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09013.x>
24. Peinado RA, Moreno J, Bueno JE, et al (2004) Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem* 84:585–590. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00282-6)
25. Miyazaki T, Plotto A, Goodner K, Gmitter FG (2011) Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. *J Sci Food Agric* 91:449–460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4205>
26. Brat P, Rega B, Alter P, et al (2003) Distribution of Volatile Compounds in the Pulp, Cloud, and Serum of Freshly Squeezed Orange Juice. *J Agric Food Chem* 51:3442–3447. <https://doi.org/10.1021/jf026226y>
27. Ledauphin J, Saint-Clair JF, Lablanquie O, et al (2004) Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac using

- preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 52:5124–5134. <https://doi.org/10.1021/jf040052y>
28. (2021) The Good Scents Company Information System. <http://www.thegoodscentcompany.com/>. Accessed 18 Feb 2021
 29. Charles M, Martin B, Ginies C, et al (2000) Potent Aroma Compounds of Two Red Wine Vinegars. *J Agric Food Chem* 48:70–77. <https://doi.org/10.1021/jf9905424>
 30. Zheng L-Y, Sun G-M, Liu Y-G, et al (2012) Aroma Volatile Compounds from Two Fresh Pineapple Varieties in China. *Int J Mol Sci* 13:7383–7392. <https://doi.org/10.3390/ijms13067383>
 31. Beaulieu JC, Lancaster VA (2007) Correlating Volatile Compounds, Sensory Attributes, and Quality Parameters in Stored Fresh-Cut Cantaloupe. *J Agric Food Chem* 55:9503–9513. <https://doi.org/10.1021/jf070282n>
 32. Gürbüz O, Rouseff JM, Rouseff RL (2006) Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography–Olfactometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 54:3990–3996. <https://doi.org/10.1021/jf053278p>
 33. Pino JA, Marbot R, Vázquez C (2001) Characterization of volatiles in strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit. *J Agric Food Chem* 49:5883–5887. <https://doi.org/10.1021/jf010414r>
 34. Engel E, Ratel J (2007) Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication. *J Chromatogr A* 1154:331–341. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.012>
 35. Teai T, Claude-Lafontaine A, Schippa C, Cozzolino F (2001) Volatile Compounds in Fresh Pulp of Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) from French Polynesia. *J Essent Oil Res* 13:314–318. <https://doi.org/10.1080/10412905.2001.9712222>
 36. Andrade EHA, Maia JGS, Zoghbi M das GB (2000) Aroma Volatile Constituents of Brazilian Varieties of Mango Fruit. *J Food Compos Anal* 13:27–33. <https://doi.org/10.1006/jfca.1999.0841>
 37. Vemin G, Lageot C, Párkányi C (1998) GC-MS(EI, PCI, NCI, SIM, ITMS) data bank analysis of flavors and fragrances. *Kovats indices*. pp 245–301
 38. Robinson AL, Adams DO, Boss PK, et al (2012) Influence of Geographic Origin on the Sensory Characteristics and Wine Composition of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon Wines from Australia. *Am J Enol Vitic* 63:467–476. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12023>
 39. Zhao Y, Li J, Xu Y, et al (2008) Extraction, preparation and identification of volatile compounds in Changyu XO brandy. *Chinese J Chromatogr (Se Pu)* 26:212–222. [https://doi.org/10.1016/s1872-2059\(08\)60014-0](https://doi.org/10.1016/s1872-2059(08)60014-0)
 40. Peña RM, Barciela J, Herrero C, García-Martín S (2005) Optimization of solid-phase microextraction methods for GC-MS determination of terpenes in wine. *J Sci Food Agric* 85:1227–1234. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2121>
 41. Tao Y, Zhang L (2010) Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine in Changli County (China). *LWT - Food Sci Technol* 43:1550–1556. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.003>
 42. Vilanova M, Genisheva Z, Masa A, Oliveira JM (2010) Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchem J* 95:240–246. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.12.007>
 43. Krings U, Zelena K, Wu S, Berger RG (2006) Thin-layer high-vacuum distillation to isolate volatile flavour compounds of cocoa powder. *Eur Food Res Technol* 223:675–681. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0252-x>
 44. Wang X, Jin Z, Xu X (1992) Analysis of fatty acids in bacteria by using gas chromatographic retention indices. *Chin J Chromatogr* 10:92–94
 45. Pino JA, Almora K, Marbot R (2003) Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., Maradol variety) fruit. *Flavour Fragr J* 18:492–496. <https://doi.org/10.1002/ffj.1248>
 46. Wu S, Krings U, Zorn H, Berger RG (2005) Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus *Fistulina hepatica* (Schaeffer: Fr.) Fr. *Food Chem* 92:221–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.013>
 47. Hallier A, Prost C, Serot T (2005) Influence of Rearing Conditions on the Volatile Compounds of Cooked Fillets of *Silurus glanis* (European Catfish). *J Agric Food Chem* 53:7204–7211. <https://doi.org/10.1021/jf050559o>

CAPÍTULO 4 – Comparative study of phenolic compounds and antioxidant capacity of sparkling wine produced from different methods

Bruna Dachery¹, Lucas Dal Magro², Flávio Fonseca Veras³, Juliane Elisa Welke³ e Vitor Manfroi^{1*}

¹ Laboratory of Oenology and Beverages. Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Laboratory of Food Toxicology. Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7793; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: manfroi@ufrgs.br (V. Manfroi) - www.ufrgs.br/bbb

Abstract

The aim of this study was to compare the profile e content phenolic and antioxidant capacity of sparkling wines produced by different methods, which include two fermentations (Traditional and Charmat) and one fermentation (Ancentral and STF). The content and phenolic profile were conducted by HPLC-DAD-MS, and the antioxidant capacity by ABTS and DPPH assay. Traditional method showed

significantly higher concentrations of total phenolic content (42.98 mg L^{-1}), which is related with enzymatic activity during aging lees, that potentiate phenolic compounds hydrolysis present in sparkling wine, favoring these substances increase. On the other hand, the Charmat method presented the lowest contents of total phenolic compounds (8.79 mg L^{-1}), showing a low release and a possible loss of these compounds during processing. Hydroxycinnamic acids were predominant class of phenolics detected in all method evaluated, among then, caffeic and fertaric acids can be highlighted. However, ethyl gallate was the phenolic compound found in the highest concentration independent of the method. Antioxidant capacity was significantly higher in methods that include the autolysis stage, Traditional and Ancestral, since the compounds hydrolyzed during this step, can contribute to increased antioxidant capacity. However, the sparkling wine made by the STF method showed high content of total phenolic compounds and antioxidant capacity compared to the Charmat method, showing that this method can be an efficient alternative for the production of sparkling wines in sealed tanks without loss of phenolic compounds. Further investigations must be carried out to identify and quantify the phenolic compounds during the steps of process, in order to verify the factors related with the final concentrations of these compounds according to the method used.

keywords: sparkling wine, autolysis, winemaking, bioactive compounds

DISCUSSÃO GERAL

O processo de elaboração de vinho, na essência, não mudou muito ao longo dos anos, e as inovações no setor ficaram por conta dos avanços tecnológicos, tanto em termos de equipamentos e maquinários, como na técnica de chegar até o produto final. As novas tecnologias surgem para auxiliar a indústria do vinho a se adaptar às mudanças constantes do setor, seja por meio da modernização tecnológica, do desenvolvimento de novos produtos, emprego de novas variedades de uvas e aprimoramento dos métodos de elaboração. Com este enfoque, a presente Tese de Doutorado teve como objetivo principal aprofundar o estudo sobre o vinho espumante, uma vez que dentre os derivados alcoólicos da uva, este é considerado um produto economicamente importante para o setor vitivinícola no Brasil, assim como apresenta as maiores taxas de crescimento em consumo e produção, a nível mundial (OIV, 2020). Buscou-se avaliar novas alternativas de métodos de elaboração de vinho espumante, que pudessem atingir o mesmo nível de qualidade que os métodos tradicionalmente utilizados pela indústria, priorizando, contudo, a otimização do processo.

Verificou-se a influência de quatro diferentes métodos de elaboração, que incluíam duas fermentações (Tradicional e Charmat) e uma fermentação (Ancestral e Fermentação Única em Tanque - FUT), sobre o perfil volátil, sensorial, composição fenólica e capacidade antioxidante de espumantes Prosecco *brut*.

A uva utilizada para realização do trabalho foi a variedade Glera, conhecida como Prosecco. A escolha dessa variedade se deu pela notoriedade e crescimento do espumante Prosecco italiano, que devido ao seu sabor, preço acessível e versatilidade, têm atraído o paladar do consumidor brasileiro, o que impactou o

notável aumento da produção desta uva na Serra Gaúcha, Brasil, justamente para produção de espumante. Optou-se por trabalhar com espumante da categoria *brut*, por ser o mais consumido mundialmente.

As motivações para realização deste estudo surgiram como uma demanda da indústria vitivinícola, primeiramente pela necessidade de compreender se havia diferença sensorial entre espumantes produzidos pelo método Charmat e FUT, uma vez que este último não é considerado método oficial no Brasil, por prever somente uma fermentação. Cabe salientar que o método Charmat é o mais utilizado do Brasil e que o aumento expressivo no consumo de espumantes com melhor custo x benefício no país, potencializou o interesse dos produtores em investir e de buscar alternativas mais eficazes na elaboração do produto.

Com este mesmo propósito, buscou-se investigar a comparação entre o método Tradicional e Ancestral, visto que são métodos que empregam etapas semelhantes ao longo do processo e também motivados pela recente busca por vinhos e métodos de elaboração “naturais”, que tornou o método Ancestral popular novamente. Neste estudo os dois métodos que incluem uma fermentação (Ancestral e FUT) são baseados em métodos já existentes. O método FUT como uma variação do método Moscatel (Asti), em que a diferença se deu pelo momento que se iniciou a tomada de espuma (retenção de gás). E o método Ancestral seguiu as principais etapas previstas para espumantes produzidos por este método na França, como Gaillac (sudoeste da França), Clairette de Die (Vale do Rhône) e Bugey et Cerdon (Bugey), com algumas modificações.

Todos os espumantes foram elaborados pela mesma vinícola, situada na cidade de Caxias do Sul, Serra Gaúcha, em escala industrial. O estudo iniciou em 2016, contudo teve que ser interrompido, devido às condições sanitárias

inadequadas das uvas deste ano, o que poderia acarretar em muitas intervenções enológicas ao longo do processo, influenciando os parâmetros que seriam avaliados neste estudo. O trabalho foi retomado em 2017, ano em que os espumantes puderam ser elaborados, sem restrições.

O principal enfoque da pesquisa foi na composição volátil e análise sensorial, uma que vez que estas avaliações poderiam levar ao resultado esperado pela indústria vitivinícola. A composição volátil seria avaliada por meio da combinação de diferentes métodos cromatográficos, incluindo cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-FID), cromatografia gasosa/olfatometria (CG-O) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG x CG), contudo, foi possível utilizar somente CG-MS, o qual forneceu informações suficientes sobre composição volátil, para que o objetivo fosse alcançado. Também optou-se por adicionar à pesquisa a análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de diodos e a espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS, do inglês *high performance liquid chromatography, with diode array detection and mass spectrometry*) e capacidade antioxidante por ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolino) -6-sulfônico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Ao final do processo de elaboração, todos os métodos atingiram os principais parâmetros enológicos estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2019) e internacional (OIV, 2019). Sobre a composição volátil, análise sensorial, composição fenólica e capacidade antioxidante, verificou-se que os métodos incluem etapas que podem influenciar diretamente estes parâmetros.

A análise do perfil volátil por CG-MS, com o auxílio do mapa de calor e análise de agrupamento hierárquico ajudaram a mostrar os componentes voláteis que contribuíram para caracterizar cada método. Compostos voláteis tradicionalmente encontrados em pesquisas que detectaram aromas presentes em vinhos espumantes (CALIARI et al., 2015; UBEDA et al., 2016; LÓPEZ DE LERMA et al., 2018; UBEDA et al., 2019) e que contribuem positivamente para o perfil aromático, tais como octanoato de etila (odor de abacaxi) e acetato de isoamila (odor de banana), foram identificados em maior concentração nos métodos Ancestral e FUT. Além disso, os ésteres, que representam a classe química de compostos identificados em maior variedade e quantidade em todos os métodos, obtiveram a maior concentração nos métodos que incluem uma fermentação. Este resultado foi relacionado com os dados sobre a análise sensorial olfativa, que mostrou maior intensidade de aromas frutados, adocicados e florais nestes métodos, contudo, especialmente no método Ancestral.

O método Charmat apresentou a menor complexidade aromática entre os quatro métodos, a qual foi atribuída ao maior número de etapas de limpeza do vinho empregadas neste método em comparação aos demais, como clarificação e filtração, que são responsáveis pela redução desses compostos (ARRIAGADA-CARRAZANA, SÁEZ NAVARRETE, BORDEU, 2005; STOICA et al., 2017).

A ADQ revelou que o método Ancestral se destacou na análise visual, olfativa e gustativa. Esses resultados sugerem que o método preserva melhor a composição química do vinho espumante, uma vez que possui menos etapas de limpeza do líquido, o que pode influenciar na formação e tamanho da borbulha, através da preservação de componentes importantes como proteínas e polissacarídeos,

evitando também a perda de compostos voláteis e moléculas que contribuem para a melhor experiência do paladar. Aliado a estes fatores, está a etapa de autólise, realizada neste método, que é amplamente investigada como uma etapa determinante para a qualidade sensorial da bebida (KEMP et al., 2015; LIGER-BELAIR, 2016), a qual foi associada como benéfica para os atributos corpo e cremosidade do espumante.

Os resultados sobre a composição fenólica dos espumantes mostram que foram detectados ácidos hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos, estilbenos, flavonóis e flavanóis. Dentre eles, os ácidos hidroxicinâmicos foram os compostos fenólicos predominantes em todos os métodos avaliados, destacando-se os ácidos caféico e fértrico. Este resultado já era esperado, uma vez que são considerados a classe química de compostos fenólicos mais comuns em vinhos produzidos sem a etapa de maceração, potencializando a extração destes componentes presentes na polpa da uva (VALLVERDU-QUERALT et al., 2014). O composto fenólico presente em maior concentração em todos os métodos foi a galato de etila, composto produzido a partir da fermentação por esterificação do ácido gálico com etanol, o qual foi anteriormente detectado em Champagne (Chamkha et al., 2003) e Cavas (Izquierdo-Llopart e Saurina, 2019), e neste estudo a concentração mais elevada foi verificada no método Tradicional.

O método Tradicional também se destacou em termos de composição fenólica total, apresentando níveis mais elevados destes compostos, diferenciando-se significativamente dos outros métodos. Este resultado foi atribuído a atividade enzimática das leveduras durante o período de autólise, potencializando a hidrólise dos compostos fenólicos presentes no vinho espumante e favorecendo o aumento dessas substâncias. Em relação aos métodos produzidos por uma única

fermentação (Ancestral e FUT), não houve diferença significativa na concentração de compostos fenólicos, e o método Charmat apresentou a menor concentração.

Sobre a capacidade antioxidante, os valores encontrados foram significativamente maiores nos métodos que incluem a autólise, Tradicional e Ancestral, o que sugere a forte influência desta etapa sobre este parâmetro, que possui relação com a hidrólise enzimática e química de componentes que podem contribuir para o aumento da capacidade antioxidante.

De forma geral, comparando os métodos Charmat e FUT, que foram a primeira motivação para a realização deste estudo, verificou que o método FUT mostrou-se superior ao método Charmat em todos os parâmetros analisados. Ao comparar os métodos que incluem fermentação na garrafa e autólise, o método Ancestral se destacou quando a composição volátil, análise sensorial e capacidade antioxidante, enquanto o método Tradicional apresentou a maior concentração de compostos fenólicos.

Como complemento deste estudo e com o objetivo de compreender melhor o efeito das etapas de elaboração sobre o perfil volátil dos espumantes elaborados por estes métodos, está sendo produzido um terceiro artigo, cujo objetivo é verificar a evolução dos compostos voláteis destes espumantes durante a elaboração, a partir do mosto até o produto final.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, avaliou-se a influência dos métodos de elaboração de espumantes Tradicional, Charmat, Ancestral e Fermentação única em tanques (FUT), sobre o perfil volátil, composição fenólica, característica sensorial e capacidade antioxidante de espumantes *brut* produzidos a partir da uva Glera, também conhecida como Prosecco, e pode-se afirmar que o trabalho atingiu os objetivos propostos. Dada a excelente qualidade dos espumantes produzidos no país e a importância do mesmo para o setor vitivinícola brasileiro, esta pesquisa busca contribuir para os avanços na melhoria dos processos aplicados na indústria, com vistas na otimização dos processos, sem perder o foco na qualidade do produto. As principais conclusões obtidas foram:

- Espumantes produzidos a partir de uma única fermentação apresentaram bom desempenho em todos os parâmetros analisados, destacando-se dos métodos empregados habitualmente pela indústria.
- As etapas de elaboração, principalmente ao que se refere a clarificação e filtração, têm efeito sobre a composição da bebida e por isso, podem influenciar a composição volátil e conseqüentemente a análise sensorial, como confirmado para o método Charmat.
- Compostos voláteis tradicionalmente encontrados nos vinhos espumantes e que contribuem positivamente para o aroma, foram verificados em maior concentração e acima do limiar de percepção, nos métodos Ancestral e STF.

- A presença ésteres, considerada uma classe química importante para a qualidade sensorial de bebidas, foi verificada principalmente nos espumantes que incluem somente uma fermentação.
- O ADQ revelou que o método Ancestral se destacou na análise visual, olfativa e gustativa, sugerindo que o método preserva melhor a composição química do vinho espumante, o que pode influenciar na efervescência, evitando a perda de aromas e de moléculas que contribuem para a melhor experiência gustativa.
- O método Tradicional apresentou concentrações significativamente maiores de compostos fenólicos, o qual foi atribuído a atividade enzimática das leveduras durante o período de autólise.
- A capacidade antioxidante de métodos que incluem autólise foi significativamente maior que os outros métodos avaliados.

Este trabalho traz uma nova visão para o desenvolvimento de uma tecnologia para produção de espumantes de qualidade, contudo, estudos são necessários para avaliar os compostos voláteis e fenólicos, capacidade antioxidante e características sensoriais em diferentes condições de armazenamento e envelhecimento do espumante. Além disso, a correlação entre estirpes específicas de levedura e perfil sensorial de produto, pode ser investigada, como aliada para aprimorar os resultados obtidos a partir desta pesquisa.

Espumantes das categorias *nature*, *extra brut*, *brut*, *seco* e *demi-sec* devem ser provenientes exclusivamente de duas fermentações no Brasil, desta forma, os resultados encontrados nesta pesquisa abrem perspectivas para trabalhos futuros, no sentido da busca por inovação e aprimoramento de técnicas, como também poderá servir como referência para pesquisas que estejam dispostas a propor

mudanças na legislação atual e incluir a produção de espumantes com uma fermentação, como método oficial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Food Science and Technology**. v. 27, p. 394-400, 2007.

ABE. Associação Brasileira de Enologia. **Effervescents du Monde - Brasil traz 10 medalhas da França**. Disponível em: <https://www.enologia.org.br/noticia/-effervescents-du-monde-brasil-traz-10-medalhas-da-franca>. Acesso em: junho, 2019.

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

AMARANTE, J. O. A. do. **Os segredos do vinho para iniciantes e iniciados**. São Paulo, Mescla, p. 260, 2005.

AOC CHAMPAGNE. Appellation d'Origine Contrôlée Champagne. Disponível em: <https://www.champagne.fr/en/terroir-appellation/appellation/appellation-origine-contrôle-aoc>. Acesso em: junho, 2019.

AOC LIMOUX. Le vins de Limoux. Disponível em: <https://www.limoux-aoc.com/>. Acesso em: junho, 2009.

ARAÚJO, M.V.; DA SILVA, M.A.C.; BRUCH, K.L. The phenomenon of moscatel sparkling wine in Brazil. **BIO Web of Conferences**. v. 12, 2019.

ARRIAGADA-CARRAZANA J.P, SÁEZ NAVARRETE C., BORDEU E. Membrane filtration effects on aromatic and phenolic quality of Cabernet Sauvignon wines. **Journal of Food Engineering**. v. 68, p.363-368, 2005.

ASPROUDI, A. et al. Key norisoprenoid compounds in wines from early-harvested grapes in view of climate change. **Food Chemistry**. v. 268, p. 143–152, 2018.

ASTI DOCG CONSORTIUM. The ASTI Docg consortium. Disponível em: <http://www.astidocg.it/en/>. Acesso em: junho, 2019.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. **Alcohol and Wine in Health and Disease**. New York Acad Sciences, New York, v. 957, p. 146-161, 2002.

AYESTARÁN, B. et al. Effect of the winemaking process on the volatile composition and aromatic profile of Tempranillo Blanco wines. **Food Chemistry**. v. 276, p. 187–194, 2019.

BALASUNDRAN, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARRERE C. Un processus évolutif de création institutionnelle d'une convention de qualité : l'histoire exemplaire de la création d'un produit de luxe, le Champagne. **Economie Appliquée**, v.3, p. 133-169, 2003.

BEAL, B. H., Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos de gengibre. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2006, 140p.

BINDON, K. et al. Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon: grape and wine chemistry. **Food Chem.** v. 138, p. 1696–1705, 2013.

BLUMBERG, L. M. Theory of Gas Chromatography. **Gas Chromatography**. p. 19–78, 2012

BOTEZATU, A.; PICKERING, G.J.; KOTSERIDIS, Y. Development of a rapid method for the quantitative analysis of four methoxypyrazines in white and red wine using multi-dimensional Gas Chromatography – Mass Spectrometry. **Food Chemistry**. v. 160, p. 141–147, 2014.

BRAND, W; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**. v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **LEI Nº 10.970, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2004**. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências.

BUXADERAS, S.; TAMAMES, E.L. Production of Sparkling Wines. 2003.

BUXADERAS, S.; TAMAMES, E.L. Sparkling Wines: Features and Trends from Tradition. **Advances in Food and Nutrition Research**. Chapter 1. v. 66, p. 1-45, 2012.

CABRITA, M. J.; SILVA, J. R. da; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **Revista árvore**, v. 26, p. 485-492, 2002.

CALIARI, V.; BURIN, V. M.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Aromatic profile of Brazilian sparkling wines produced with classical and innovative grape varieties. **Food Research International**, v. 62, p. 965-973, 2014.

CALIARI, V. et al. Effect of the Traditional, Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. **Food Science and Technology**. v. 61, p. 393-400, 2015.

CALO, A. et al. (1994). Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoi tartarici della buccia di varietà a bacca rossa. *Annali dell'Istituto Sperimentale per L'Enologia Asti*. Vol XXV, pp.47-61

CAMARA, J.S.; ALVES, M.A.; MARQUES, J.C. Evolution of oak-related volatile compounds in a Spanish red wine during 2 years bottled, after aging in barrels made of Spanish, French and American oak wood. **Analytica Chimica Acta**. v. 563, p. 189–203, 2006.

CAO, G.; SOFIC E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CAPONE, D.L. et al. The role of potent thiols in Chardonnay wine aroma. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. v. 24, p. 38–50, 2018.

CAVALCANTI, M.C.B.; HOLANDA, C.M.; Evolução do vinho espumante da Serra Gaúcha. **História Econômica & História de Empresas**, v.2, p. 1-32, 2012.

CHAMKHA, M. et al. Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 3179–3184, 2003.

CHINAZZI, G. **Revisione dei disciplinari del prosecco e propensione all'acquisto dei consumatori: un'analisi con un esperimento di scelta**. TESI DI LAUREA, Padova, Itália, 2011.

COIMBRA et al. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 1339-1347, 2005.

COLETTA, A. et al. Effect of viticulture practices on concentration of polyphenolic compounds and total antioxidant capacity of Southern Italy red wines. **Food Chem**. v.52, p.467–474, 2014.

COLLINS T. et al. Targeted volatile composition of oak wood samples taken during toasting at a commercial cooperage. **Tetrahedron**. v. 71, p. 2971-2982, 2015.

CORDERO, C. et al. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications. **Gas Chromatography**. Academic Press. p. 311–373, 2012.

CRESPAN, M. et al. Molecular contribution to the knowledge of two ancient Varietal populations: 'Rabos' and 'Glere'. **Acta Horticulturae**. v. 827, p. 217–220, 2009.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, p.324-325,1992.

Dani, C.; Oliboni, L. S.; Umezu, F. M.; Pasquali, M. A.; Salvador, M.; Moreira, J. C.; Henriques, J. A. Antioxidant and antigenotoxic activities of purple grape juice--organic and conventional--in adult rats. *Journal of Medicinal Food*, v. 12, p. 1111-1118, 2009.

DOHADWALA, M. M.; Vita, J. A. Grapes and Cardiovascular Disease. *The Journal of Nutrition*, v. 139, p. 1788-1793, 2009.

DOLOREUX D.; FRIGON, A. Understanding innovation in Canadian wine regions: an exploratory study. **British Food Journal**. v. 121, p. 882-896, 2019.

DUBOURDIEU D. Compostos aromáticos. In: **I Jornadas de Enologia** - Escola Superior de Biotecnologia, Porto, p. 19-21, 1988.

DUDONNÉ, S.X. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p.1768-1774, 2009.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 2 ed. Champagnat, 2007.

DZIADAS, M.; JÉLEN, H.H. Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach. **Analytica Chimica Acta**. v. 677, p. 43–49, 2010.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cadastro vitícola. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cadastro-viticola> Acesso: junho, 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Panorama da Viticultura Brasileira 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/187913/1/Comunicado-Tecnico-207.pdf>. Acesso em: junho, 2019.

EUROPEAN UNION. **Council Regulation (EC) N° 479/2008 of 29 April 2008 on the common organisation of the market in wine**. Official Journal European Union, p. 1-114, 2008.

FENG, T. et al. **Gas chromatography for food quality evaluation**. Evaluation Technologies for Food Quality. p.219. 2019.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 408, p. 239-247, 2000.

FLANZY, C. **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. 2ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p.783, 2003.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols-A chemical perspective. **Food Research International**, v.44, p.3134-3148, 2011.

GIANVITO, P.D. et al. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on traditional sparkling wines production. **Food Research International**, v. 109, p. 552-560, 2018.

GIANVITO, P. Di.; ARFELLI, G.; SUZZI, G.; TOFALO, R. **New Trends in Sparkling Wine Production: Yeast Rational Selection**. Alcoholic Beverages, p. 347-386, 2019.

GIOVANINNI, E.; MANFROI, V. **Viticultura e enologia** – Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros. Bento Gonçalves, 2009.

GONZÁLEZ-CENTENO, M.R. et al. Ellagitannin content, volatile composition and sensory profile of wines from different countries matured in oak barrels subjected to different toasting methods. **Food Chemistry**. v. 210, p. 500–511, 2016.

GRANATO, D. Associação entre atividade antioxidante in vitro e características químicas, sensoriais cromáticas e comerciais de vinhos tintos Sul-americanos. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011. 140p.

GRANT, B. Terapia Nutricional para o cancro. In: Grant, B. (Ed.). Alimento, nutrição e dietoterapia, Brasil, Elsevier Editora Ltda. 2010.

GRAYSON, M. A. A History of Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). **The Encyclopedia of Mass Spectrometry**. p.152–158, 2016.

GUERRA, C. C. Compostos fenólicos do vinho. In: Souza Filho, J. M. de; Manfroi, V. **Vinho e saúde: vinho como alimento natural**. Bento Gonçalves: Ibravin, p. 39, 2005.

HALLIWEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HUANG, D. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food chem.** v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

IBERN-GOMES, M. et al. Browning of Cava (sparkling wine) during aging in contact with less due to the phenolic composition. **American Journal Enology and Viticulture**, 51, 30–36, 2000.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Medalhas no exterior crescem 80%. 2018. Disponível em: <https://www.ibravin.org.br/Noticia/medalhas-no-externo-crescem-80-/402>. Acesso em: junho, 2019.

JACKSON, R. S. Wine Science – Principles and Applications. London, UK. 3ed. Academic Press, 2008, 789p.

JANG, M. et al. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.

JAY, T.; TAYLOR, M. A case of champagne: a study of geographical indications. p. 7-15, 2013.

JEANDET, P. et al. Determination of the *trans*-resveratrol content of Champagne wines by reversed-phase HPLC. **Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin**. v. 40, p. 117-119, 2006.

JEROMEL, A.; KORENIKA, A.; M. J.; TOMAZ, I. **An influence of different yeast species on wine aroma composition**. Chapter 6. Fermented Beverages. 2019.

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.

JOSEPH, J. A. et al. Grape Juice, Berries, and Walnuts Affect Brain Aging and Behavior. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1813-1817, 2009.

KALLITHRAKA, S.; SALACHAA, M. I.; TZOUROUA, I.. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. **Food Chemistry**, v. 113(2), p. 500–505, 2009.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 36, n. 7, p. 703-725, 2001.

KEMP, B. et al. Review: Effect of production phases on bottle fermented sparkling wine quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2014

LEE, J.; RENNAKER, C. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. **Food Chemistry**. v. 105, n. 1, p. 195-203, 2007.

LIGER-BELAIR, G.; POLIDORI, V.; ZÉNINARI, V. Unraveling the evolving nature of gaseous and dissolved carbon dioxide in champagne wines: a state-of-the-art review, from the bottle to the tasting glass. **Anal. Chim. Acta**. v. 732, p. 1–15, 2012.

LIGER-BELAIR, G. Wines: Champagne and Sparkling Wines. Production and Effervescence. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 526-533, 2016.

LIGER-BELAIR G.; ROCHARDS J. **Les vins effervescents – du terroir à la bulle**. Ed. Dunod, Paris, 2008.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (Caryocar brasiliense, Camb). 2008 p. 182. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

LUKIC, I. et al. Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of Gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest. **Food Chemistry**. v. 196, p. 1048-1057, 2017.

MANFROI, V. Taninos enológicos e goma arábica na composição e qualidade sensorial do vinho Cabernet Sauvignon. 2007. 133f. Tese de Doutorado em Ciências, Universidade Federal de Pelotas, 2007.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p.189-197, 2003.

MARQUES, F.N.; EBERT, L.C. Motivações e inibições para o consumo de vinhos espumantes no mercado brasileiro. **Rev. Bras. Vitic. Enol.**, n.6, p.74-79, 2014.

MARTINEZ-GARCIA et al. Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO₂ pressure in sealed bottle. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1030–1040, 2017.

MAZAURIC, J. P.; SALMON, J. M. Interactions between yeast less and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analyses of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 5647–5653, 2003.

MENEGUETTI, S. et al. Genetic variability and geographic typicality of Italian former Prosecco grape variety using PCR-derived molecular markers. **Mol Biotechnol.** v. 56, p. 408, 2014.

MILAN, E. **Novos ares em Prosecco**: Entenda as nuances e a pirâmide qualitativa de Prosecco depois das mudanças nas regras de sua denominação de origem. 2014. Disponível em:
http://revistaadega.uol.com.br/artigo/novos-ares-em-prosecco_9900.html#ixzz3c7kG4SU Acesso em: junho, 2018.

MONFORTE, A. R. et al. Formation in Wine: New Insights into the Role of Gallic Acid, Glucose, and Metals in Phenylacetaldehyde Formation. **Journal of agricultural and Food Chemistry**. v. 66, p.2459-2466, 2018.

MORAES, M.S. et al. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente aplicada à análise qualitativa dos componentes majoritários do bio-óleo da pirólise de bagaço de laranja. **Scientia Chromatographica**, v.3, p. 301-314, 2011.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Science, New York, USA, 2009.

MORROT G.; BROCHET, F. Ce que le nez peut dire. In: La Dégustation, **J. Int. Sci. Vigne et Vin**, n° Hors Série, p.15-18, 2000.

MUDNIC, I. et al. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1205-1210, 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NICOLLI, K.P. et al. Characterization of the Volatile Profile of Brazilian Moscatel Sparkling Wines Through Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography. **Braz. Chem. Soc.**, p. 1-20, 2015.

NICOLLI K. et al. Sensory, olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography analyses as appropriate tools to characterize the effects of vine management on wine aroma. **Food Chemistry**. v. 243, p. 103–117, 2018.

NOESTHEDEN, M. et al. Quantitating organoleptic volatile phenols in smoke-exposed *Vitis vinifera* berries. **J. Agric. Food Chem.** v.65, p. 8418–8425, 2017.

OIV. International Organization of Vine and Wine. OIV's Focus. **The sparkling wine market.** 2017.

OIV. International Organization of Vine and Wine. **Statistical Report on World Vitiviniculture. 2014.** Disponível em: <http://www.oiv.int/> Acesso em: junho, 2019.

OIV. International Organization of Vine and Wine. **World Vitiviniculture Situation. 2018.** Disponível em: <http://www.oiv.int/public/medias/6371/oiv-statistical-report-on-world-vitiviniculture-2018.pdf>. Acesso em: junho, 2019.

OLIVEIRA, J.M.M. **Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas loureiro e alvarinho.** 2000. 267f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) Universidade do Minho, Portugal , 2000.

ONOFRI, L.; BOATTO, V.; DAL BIANCO, A. Who likes it “sparkling”? An empirical analysis of Prosecco consumers' profile. **Agricultural and Food Economics**, p. 3-11, 2015.

PANESAR, P.S. et al. Technology for production of fortified and sparkling fruit wines. Chapter 9. **Science and Technology of Fruit Wine Production.** 2017.

PEÑA, R. et al. Optimization of solid-phase microextraction methods for GC-MS determination of terpenes in wine. **J Sci Food Agric.** v. 85, p. 1227-1234, 2005.

PENG, C. T. et al. Modulating the formation of Meili wine aroma by pre fermentative freezing process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 61, p. 1542–1553, 2013.

PEREZ-MAGARINO, S. et al. Grape variety, aging on lees and aging in bottle after disgorging influence on volatile composition and foamability of sparkling wines. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 47-55, 2015.

PINO, J.A.; QUERIS, O. Characterization of Odor-Active Compounds in Guava Wine. **J. Agric. Food Chem.**, v.59, p. 4885–4890, 2011.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. **Gas chromatography- olfactometry of alcoholic beverages.** Alcoholic Beverages. p. 101–130, 2012.

PORTMANN, M. Anatomie des organes des sens. In: La Dégustation, **J. Int. Sci. Vigne Vin**, n. Hors Série, 10-13, 2000.

POZO-BAYON, M.A. et al. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2089–2095, 2003.

POZO-BAYON, M. et al. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. **Trends in Food Science and Technology**. v. 20, p. 289-299, 2009.

POZO-BAYON, M. et al. Occurrence of pyranoanthocyanins in sparkling wines manufactured with red grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v 52, p. 1300-1306, 2004.

PRIDA, A.; CHATONNET, P. Impact of oak-derived compounds on the olfactory perception of barrel-aged wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 61, p. 408–413, 2010.

PRIOR R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 570S-578S, 2003.

PROSECCO SUPERIORE. **The world of Prosecco**. Disponível em: <https://www.prosecco.it/en/prosecco-superiore-docg/> Acesso em: junho, 2019.

PUERTAS, B. et al. The influence of yeast on chemical composition and sensory properties of dry white wines. **Food Chemistry**. v. 253, p. 227–235, 2018.

QUEIRÓS, R. B. Capacidade antioxidante de Bebidas. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**. Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, Portugal, 2008, 107p.

RE, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. v.26, p. 1231-1237, 1999.

RIANT, R.; VILLEZ, D. Champagne Slopes, Houses and Cellars. 2015.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of Enology**. 2ed. v. 2. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 2006.

RICE, S. et al. Determination of Selected Aromas in Marquette and Frontenac Wine Using Headspace-SPME Coupled with GC-MS and Simultaneous Olfactometry. **Separations**. v. 5, p. 20, 2018.

RIU-AUMATELL, et al. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. **Food Chem**. v. 95, p. 237-242, 2006.

ROCHA, S. M. et al. Relationships between the varietal volatile composition of the musts and white wine aroma quality. A four year feasibility study. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, p. 1508–1516, 2010.

RODRIGUES, J. A. Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011, 143p

RODRIGUES, R.C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

RUIZ-MATUTE, A.I. et al. **Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC)**. Modern Techniques for Food Authentication. 2ed, chapter 12. p. 415-458, 2018.

SANCHEZ-PALOMO, E. Aroma profile of malbec red wines from La Mancha region: Chemical and sensory characterization. **Food Research International**. v. 100, p. 201–208, 2017.

SATUE-GRACIA, M.T. et al. Spanish sparkling wines (cavas) as inhibitors of in vitro human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 2198-2202, 1999.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, no 3, p. 669-682, 2010.

SKOOG, D.A.; HOLLE, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios da análise instrumental**. Bookman, 2009.

SOARES, F. D. et al. Monitoring the evolution of volatile compounds using gas chromatography during the stages of production of Moscatel sparkling wine. **Food Chemistry**, v. 183, p. 291–304, 2015.

SPADARI, L. et al. Influência da cepa de levedura nas características físico-químicas e organolépticas de vinhos espumantes. **Rev. Bras. Vitic. Enol.**, n.6, p.58-64, 2014.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. E.; KITSON, F. G. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide**. Gas Chromatography. p. 15–83, 2011.

STECHEER, G.; HUCK, C. W.; POPP, M.; BONN, G. K. Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 371, 73-80, 2001.

STEFENON, A.C.; BONESI, C.M.; Novas abordagens sobre vinhos espumantes: uma breve revisão. **Rev. Bras. Vitic. Enol.**, n.7, p.82-91, 2015.

STEFENON, A.C. et al. Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods. **Food Chemistry**, v.119, p. 12–18, 2010.

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

STEFENON, A.C. Avaliação de Parâmetros Enológicos, Sensoriais e Biológicos em Vinhos Espumantes: efeito de agentes moduladores. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2013, 152p.

STEVENS, J.F. et al. Identification and in vitro biological activities of hop proanthocyanidins: Inhibition of nNOS activity and scavenging of reactive, nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3435–3443, 2002.

THIENE, M. et al. Determinant of WTP for Prosecco wine: a latent class regression with attitudinal responses. **Br. Food J.**, v. 115, p. 279–299, 2013.

TOMASI, D.; GAIOTTI, F.I. Terroirs della Denominazione Conegliano Valdobbiadene. Studio sull'origine della qualità. **Centro di Ricerca per la Viticoltura– Consorzio di Tutela del Conegliano Valdobbiadene D.O.C.G.**, Soave, Verona, 2011.

TRUJILLO, L.M. Estudio de los factores que influyen en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Cava); influencia de la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas. Universitat Rovira I Virgili, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Tarragona, 2017.

UBEDA, C. et al. Study of the changes in volatile compounds, aroma and sensory attributes during the production process of sparkling wine by traditional method. **Food Research**. v. 119, p. 554-563, 2019.

UBEDA, C. et al. Volatile profile characterisation of Chilean sparkling wines produced by traditional and Charmat methods via sequential stir bar sorptive extraction. **Food Chemistry**. v. 207, p. 261–271, 2016.

UGLIANO, M. Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. **J. Agric. Food Chem.** v. 61, p. 6125–6136, 2013.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2017.

VICENZI, S.; CAPRISI, A.; CURIONI, A. Foamability of Prosecco wine: Cooperative effects of high molecular weight glyco-compounds and wine PR-proteins. **Food Hydrocolloids**. v. 34, p. 202–207, 2014.

VILANOVA, M. et al. Changes in free and bound fractions of aroma compounds of our Vitis Vinifera cultivars at the last ripening stages. **Phytochemistry**. v. 74, p.196–205, 2012.

VRHOVSEK, U.; WENDELIN, S.; EDER, R. Effects of various vinification techniques on the concentration of cis- and trans-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 48, p.214–219, 1997. .

WELKE, J. E.; ZANUS, M.; LAZZAROTTO, M.; ZINI, C. A. Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine. **Food Research International**, v. 59, p. 85–99, 2014b.

WELKE, J. E. 2014. 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 Chemistry**, v. 164, p. 427–437, 2014a.

WÜRZ, D. A. et al. PANORAMA E PERSPECTIVAS DA COMERCIALIZAÇÃO DE ESPUMANTES NO BRASIL. II Simpósio de inovação em cadeias produtivas do agronegócio. 2016.

YANG Y. et al. Chemical profiles and aroma contribution of terpene compounds in Meili (*Vitis vinifera* L.) grape and wine. **Food Chemistry**. v. 284, p. 155–161, 2019.

ZHANG, P. et al. Comparison data of common and abundant terpenes at different grape development stages in Shiraz wine grapes. *Data in Brief*. v. 8, p. 1127-1136, 2016.

ZINI, C. A. **Scientia chromatographica**, p.31-39, 2009.

ZOCCA, F.; LOMOLINO, G.; SPETTOLI, P.; LANTE, A. A Study on the Relationship Between the Volatile Composition of Moscato and Prosecco Grappa and Enzymatic Activities Involved in its Production. **J. Inst. Brew.** v.114, n.3, p. 262–269, 2008

ZOECKLEIN, B. W. et al. **Wine analysis and production**. The Chapman & Hall Enology Library. International Thompson Publishing, p. 621, 1995.

Zunino, S. Type 2 Diabetes and Glycemic Response to Grapes or Grape Products. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1794-1800, 2009.