

Saionara Sartor

**VINHOS ESPUMANTES BRASILEIROS ELABORADOS PELO
MÉTODO TRADICIONAL: EFEITO DA ADIÇÃO DE AGENTES
ENOLÓGICOS, E INFLUÊNCIA DO TEMPO DE
ENVELHECIMENTO SOBRE BORRA NA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do grau de
doutor em Ciência dos Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Marilde T.
Bordignon Luiz

Florianópolis, 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sartor, Saionara
VINHOS ESPUMANTES BRASILEIROS ELABORADOS PELO
MÉTODO TRADICIONAL: EFEITO DA ADIÇÃO DE AGENTES
ENOLÓGICOS, E INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ENVELHECIMENTO
SOBRE BORRA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA / Saionara
Sartor ; orientador, Marilde T. Bordignon Luiz,
2019.

199 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Vinho espumante. 3.
Envelhecimento biológico. 4. Polifenóis. 5.
Substâncias nitrogenadas. I. T. Bordignon Luiz,
Marilde . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Saionara Sartor

**VINHOS ESPUMANTES BRASILEIROS ELABORADOS PELO
MÉTODO TRADICIONAL: EFEITO DA ADIÇÃO DE AGENTES
ENOLÓGICOS, E INFLUÊNCIA DO TEMPO DE
ENVELHECIMENTO SOBRE BORRA NA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA**

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de “Doutor em
Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2019.

Prof.a Dr.a Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Marilde T. Bordignon-Luiz
Orientadora - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Eliana Forte Gris
Membro - Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Carlise Beddin Fritzen Freire
Membro - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Vinícius Caliarí
Membro - Universidade do Oeste de Santa Catarina

Dedico a meus pais, Maria e Gentil Sartor.
Meus grandes exemplos de vida!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me deu força e perseverança para nunca desistir apesar das dificuldades.

À família, especialmente aos meus pais, Gentil e Maria, as minhas irmãs Gabriela e Indianara, e meu companheiro Eduardo, pelo apoio, compreensão e incentivo constante. Obrigada a todos pelo inestimável amor, carinho e por acreditarem em mim!

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz pela oportunidade da realização deste trabalho, orientações e ensinamentos. Obrigada pelo seu exemplo como profissional e pela confiança depositada ao longo deste estudo.

À Profa. Dra. Vívian M. Burin pelos grandiosos auxílios prestados em todos os momentos solicitados, pelo apoio, atenção e por compartilhar seus conhecimentos.

À Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina – Epagri, Estação Experimental de Videira, pelo apoio técnico, em especial ao pesquisador Vinícius Caliari que contribuiu para a realização deste trabalho.

À Vinícola Panceri, pelo suporte durante este trabalho. Agradeço, em especial a Profa. Dra. Carolina P. Panceri, pela amizade, orientação e contribuição na realização deste trabalho.

Aos nossos colaboradores do Laboratório de Espectrometria Atômica e de Massa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em especial ao Prof. Dr. Jefferson S. de Gois.

Aos nossos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Carol, Isabela, Vívian, Trilícia, Isabel, Maiara, Nayla, Carla, Robson, Aline, Luiza e Thalita por todas as contribuições e pelos bons momentos juntos. Em especial, agradeço ao Robson, pela inestimável participação e auxílio no planejamento e execução das atividades realizadas.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite de participação. Suas contribuições são imprescindíveis para a excelência deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Aos demais amigos, colegas e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meu humilde e eterno muito obrigada!

*“Feliz é aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina”
(Cora Carolina)*

RESUMO

SARTOR, Saionara. Vinhos espumantes brasileiros elaborados pelo método Tradicional: efeito da adição de agentes enológicos, e influência do tempo de envelhecimento sobre borra na composição química. 2019. 199p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da adição de goma arábica e tanino enológico em duas etapas da vinificação de vinhos espumantes rosé sobre a composição fitoquímica durante o envelhecimento sobre borra (*sur lies*) e armazenamento comercial; avaliar o efeito da adição de manoproteínas em vinhos espumantes rosé sobre a composição de polifenóis, ácidos orgânicos, macro e microelementos durante o envelhecimento biológico (*sur lies*); avaliar a influência do tempo de envelhecimento biológico de vinhos espumantes brancos elaborados com variedades de uvas não-tradicionais quanto à composição fenólica, escurecimento e teor de glutatona; assim como avaliar as alterações na concentração de substâncias nitrogenadas de vinhos espumantes Villenave, Niágara, Manzoni, Goethe e Chardonnay durante o envelhecimento sobre borra, e caracterizar o perfil sensorial. Vinhos espumantes rosé adicionados de goma arábica e tanino no vinho base e no vinho espumante após a degola foram monitorados durante 12 meses de envelhecimento *sur lies* e armazenamento comercial quanto à composição fenólica, capacidade antioxidante e parâmetros de cor. Vinhos espumantes rosé adicionados de manoproteínas foram monitorados durante 12 meses de envelhecimento biológico com base em análises de polifenóis, ácidos orgânicos, macro e microelementos. Mostos e vinhos base das variedades de uvas não-tradicionais foram caracterizados quanto as análises clássicas e de ácidos orgânicos, os vinhos foram monitorados durante 18 meses de envelhecimento quanto à composição fenólica, índice de escurecimento e teor de glutatona. Mostos e vinhos das variedades de uvas Villenave, Niágara, Manzoni, Goethe e Chardonnay foram caracterizados quanto ao perfil nitrogenado, os vinhos espumantes foram analisados durante 18 meses de envelhecimento biológico quanto ao teor de aminoácidos, íon amônio e perfil sensorial. Os resultados demonstraram que a adição de goma arábica e tanino em duas diferentes etapas da vinificação dos vinhos espumantes rosé influenciaram as mudanças das concentrações das substâncias fitoquímicas e da capacidade antioxidante durante o envelhecimento *sur lies* e armazenamento comercial. O experimento com a adição dos agentes

enológicos no vinho base apresentou aumento significativo das concentrações de alguns fenólicos, como o *trans*-resveratrol, ácidos gálico e elágico, catequina, quercetina e miricetina em relação ao experimento com adição dos agentes enológicos após a degola. A adição de manoproteínas nos vinhos espumantes rosé influenciou significativamente o aumento das concentrações dos fenólicos individuais, particularmente o *trans*-resveratrol, quercetina, catequina, ácido *p*-cumárico e ácidos hidroxibenzoicos no final do envelhecimento biológico (12 meses). Os níveis de macro e microelementos permaneceram estáveis durante o envelhecimento biológico em todas as amostras. Observou-se alterações significativas do perfil fenólico, índice de escurecimento e teor de glutatona dos vinhos espumantes brancos durante o envelhecimento biológico. O tempo de envelhecimento influenciou positivamente o aumento do escurecimento, e de alguns fenólicos individuais, como o ácido cafeico, que apresentou alta correlação positiva e significativa com o escurecimento e com o tempo para todos os vinhos espumantes, o que sugere sua utilização como um indicador de qualidade. Alterações significativas foram observadas nas concentrações dos aminoácidos e íon amônio dos vinhos espumantes brancos durante o tempo de envelhecimento biológico. A análise de componentes principais separou os vinhos espumantes de acordo com o tempo de envelhecimento, sugerindo os aminoácidos lisina, citrulina e fenilalanina como possíveis indicadores do envelhecimento biológico. O perfil sensorial dos vinhos espumantes envelhecidos foi caracterizado por descritores de frutos brancos e cítricos, floral e/ou flor de laranjeira, casca de pão e/ou pão torrado, mel, manteiga e vegetal, e cor amarelo palha. Estes resultados são importantes para o setor vitivinícola brasileiro, pois a melhoria da qualidade química e sensorial é dependente do conhecimento sobre a evolução dos vinhos espumantes durante o envelhecimento biológico.

Palavras-chave: Vinho espumante. Envelhecimento biológico. Polifenóis. Substâncias nitrogenadas.

ABSTRACT

SARTOR, Saionara. Brazilian sparkling wines produced by Traditional method: effect of the addition of oenological agents, and influence of aging time on lees in chemical composition. 2019. 199p. Thesis (Doctorate in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis-SC.

The objectives of this study were evaluate the influence of the addition of gum arabic and oenological tannin in two stages of winemaking of rosé sparkling wines on the phytochemical composition during aging on lees (*sur lie*) and commercial storage; evaluate the effect of the addition of mannoproteins in rosé sparkling wines on the composition of polyphenols, organic acids, macro and microelements during the biological aging (*sur lies*); evaluate the influence of the aging time on lees of white sparkling wines elaborated with non-traditional grape varieties on the phenolic composition, browning and glutathione content; as well as to evaluate the changes in the concentration of the nitrogenous compounds of sparkling wines Villenave, Niagara, Manzoni, Goethe and Chardonnay during aging *sur lies*, and to characterize the sensorial profile. Rosé sparkling wines added with gum arabic and tannin in the base wine and to the sparkling wine after disgorging were monitored during 12 months of aging *sur lies* and commercial storage regarding phenolic composition, antioxidant capacity and color parameters. Rosé sparkling wines added with mannoproteins were monitored during 12 months of biological aging based on analyzes of polyphenols, organic acids, macro and microelements. Musts and base wines of the non-traditional grape varieties were characterized as the classic and organic acid analyzes, the wines were monitored during 18 months of aging *sur lies* regarding phenolic composition, browning index and glutathione content. Musts and wines of the Villenave, Niagara, Manzoni, Goethe and Chardonnay grape varieties were characterized for the nitrogen profile, the sparkling wines were analyzed during 18 months of aging on lees in terms of amino acid content, ammonium ion and sensorial profile. The results showed that the addition of gum arabic and tannin in two different stages of winemaking of rosé sparkling wines influenced the changes in concentrations of phytochemical substances and antioxidant capacity during aging *sur lies* and commercial storage. The experiment with the addition of oenological agents in the base wine showed a significant increase in the concentrations of some phenolics, such as *trans*-resveratrol, gallic and ellagic acids, catechin, quercetin and myricetin in

relation to the experiment with addition of oenological agents after disgorging. The addition of mannoproteins in rosé sparkling wines significantly influenced the increase of individual phenolic concentrations, particularly *trans*-resveratrol, quercetin, catechin, *p*-coumaric acid and hydroxybenzoic acids at the end of biological aging (12 months). Macro and microelement levels remained stable during biological aging in all samples. Significant changes in the phenolic profile, browning index and glutathione content of white sparkling wines during aging *sur lies* were observed. The aging time positively influenced the increase in browning, and of some individual phenolics, such as caffeic acid. Caffeic acid presented a high positive and significant correlation with browning and with time for all sparkling wines, which suggests its use as an indicator of quality. Significant changes were observed in the amino acid and ammonium ion concentrations of the white sparkling wines during the time of biological aging. The principal component analysis separated the sparkling wines according to aging time, suggesting the amino acids lysine, citrulline and phenylalanine as possible indicators of biological aging. The sensorial profile of aged sparkling wines was characterized by descriptors of white and citrus fruits, floral and/or orange blossom, bread crust and/or toasted bread, honey, butter and vegetable and straw yellow color. These results are important for the Brazilian viticulture, since the improvement of the chemical and sensorial quality is dependent on the knowledge about the evolution of the sparkling wines during the biological aging.

Keywords: Sparkling wine. Aging biological. Polyphenols. Nitrogen compounds.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Estrutura geral das substâncias fenólicas flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e tirosol indicando a substituição do radical..... 40
- Figura 2.** Principais reações químicas das antocianinas que ocorrem durante a vinificação..... 50
- Figura 3.** Representação das alterações morfológicas e bioquímicas durante autólise da levedura no vinho espumante. Imediatamente após a segunda fermentação (a), entre 3 e 6 meses (b) e entre 9 e 12 meses (c)..... 57

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Evolução das antocianinas monoméricas totais (a), intensidade de cor (b), capacidade de redução do Folin-Ciocalteu (FC) (c) e capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS (d) para os vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos durante o envelhecimento sobre borra (*sur lies*) e armazenamento comercial. AMT, antocianinas monoméricas totais; IC, Intensidade de cor (expressa como índice)..... 84
- Figura 2.** Análise de componentes principais mostrando os escores de plotagem (a) e cargas fatoriais (b) dos resultados para os fenólicos individuais, capacidade de redução do Folin-Ciocalteu (FC), ensaio de eliminação de radicais livres (ABTS), intensidade de cor (IC) e antocianinas monoméricas totais (AMT) para vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos, no final de 12 meses de envelhecimento *sur lies* e armazenamento comercial. CSL, Controle *sur lies*; GSL, Goma arábica *sur lies*; TSL, Tanino *sur lies*; CCS, Controle armazenamento comercial; GCS, Goma arábica armazenamento comercial; TCS, Tanino armazenamento comercial. Os dados são a média de três repetições..... 90

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Cromatograma representativo dos polifenóis nos vinhos espumantes Merlot com e sem adição de manoproteínas após 12 meses de envelhecimento biológico. Picos de absorvância (280 nm): 1. ácido *trans*-caftárico, 2. tirosol, 3. (+)-catequina, 4. ácido cafeico, 5. (-)-epicatequina, 6. ácido *p*-

cumárico, 7. ácido ferrúlico 8. miricetina, 9. *trans*-resveratrol, 10. quercetina..... 109

Figura 2. Espectros no infravermelho próximo (A) e Raman (B) do vinho base e dos vinhos espumantes após 12 meses de envelhecimento biológico. Vinho base: VB; Vinho espumante sem manoproteínas (controle): VEC; Vinho espumante adicionado de manoproteínas: VEM..... 112

Figura 3. ACP mostrando o gráfico de escore (A) para vinhos espumantes adicionados de manoproteínas e amostra controle após 12 meses de envelhecimento biológico, e (B) com as variáveis de polifenóis individuais, ácidos orgânicos e composição elementar dos vinhos espumantes. Atividade antioxidante (ABTS), intensidade de cor (IC), tonalidade de cor (TC), densidade de cor (DC) e antocianinas monoméricas totais (AMT)..... 115

CAPÍTULO 4

Figura 1. Correlação de Pearson e coeficientes de determinação entre os ácidos cafeico e *trans*-caftárico, escurecimento e tempo dos vinhos espumantes Villenave (a), Niágara (b), Manzoni (c) e Goethe (d). Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). R^2 , coeficiente de determinação..... 138

CAPÍTULO 5

Figura 1. Análise de componentes principais (ACP) com os resultados dos aminoácidos e íon amônio (NH_4^+) durante o envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes. Os dados utilizados foram a média de 3 repetições..... 165

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Etapas de elaboração do vinho espumante pelo método Tradicional.....	53
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Evolução durante o envelhecimento sobre borra (<i>sur lies</i>) dos polifenóis dos vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos.....	76
---	----

Tabela 2. Evolução durante o armazenamento comercial (armazenamento em garrafa) dos polifenóis dos vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos.....	78
---	----

Tabela 3. Cargas fatoriais entre as variáveis estudadas e os quatro primeiros componentes principais.....	89
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Parâmetros enológicos clássicos e ácidos orgânicos determinados no vinho base e nos vinhos espumantes adicionados de manoproteínas após 3 e 12 meses de envelhecimento biológico.....	104
--	-----

Tabela 2. Parâmetros de cor e caracterização fenólica das amostras de vinho e evolução dos fenólicos individuais (mg L^{-1}) dos vinhos espumantes rosé adicionados de manoproteínas durante o envelhecimento biológico (<i>sur lies</i>).....	106
--	-----

Tabela 3. Composição elementar (mg L^{-1}) do vinho base e vinhos espumantes rosé tratados com manoproteínas após 12 meses de envelhecimento biológico.....	111
---	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Composição química do mosto e vinho base das variedades de uvas não-tradicionais utilizadas na elaboração dos vinhos espumantes.....	129
---	-----

Tabela 2. Caracterização fenólica e índice de escurecimento das amostras de vinho elaboradas com variedades de uvas não-tradicionais e evolução dos vinhos espumantes durante o envelhecimento biológico.....	132
--	-----

Tabela 3. Concentração de glutatona total, reduzida e oxidada (mg L^{-1}) dos mostos obtidos das variedades de uvas não-tradicionais e dos respectivos vinhos base e vinhos espumantes durante o envelhecimento biológico.....	141
--	-----

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Atributos sensoriais gerados pelos julgadores e seus respectivos descritores e padrões de referência utilizados para a avaliação sensorial dos vinhos espumantes.....	152
Tabela 2. Composição nitrogenada (mg L^{-1}) do mosto e vinho base das variedades de uva Chardonnay, Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe.....	155
Tabela 3. Evolução da composição nitrogenada (mg L^{-1}) de vinhos espumantes elaborados com diferentes variedades de uvas durante o envelhecimento biológico.....	158
Tabela 4. Perfil sensorial dos valores da intensidade média (%) para os descritores de aparência, aroma e sensação bucal dos vinhos espumantes elaborados com as variedades Chardonnay, Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe com 18 meses de envelhecimento biológico.....	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
- ACP: análise de componentes principais (do inglês: *PCA - principal component analysis*)
- ADQ: análise descritiva quantitativa
- ANOVA: análise de Variância
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
- DAD: detector de arranjo de diodo (do inglês: *diode array detector*)
- DEEMM: diethyl ethoxymethylenemalonate
- DMACA: 4-dimetilaminocinamaldeído
- FC: Folin-Ciocalteu
- FT-NIR: espectroscopia no infravermelho próximo (do inglês: *near-infrared spectroscopy*)
- GRP: produto de reação da uva (do inglês: *grape reaction product*)
- GSH: glutationa reduzida
- GSSG: glutationa oxidada
- HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *high performance liquid chromatography*)
- ICP-OES: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês: *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)
- NDA: naftaleno 2,3-dicarboxialdeído
- OIV: Organização internacional da Vinha e do Vinho
- SST: sólidos solúveis totais
- TCEP: tris (2-carboxietil) fosfana
- TROLOX: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
- UV-Vis: ultravioleta-visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
1.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE UVAS DO GÊNERO <i>VITIS</i>	30
1.2 COMPOSIÇÃO DA UVA E DO VINHO.....	32
1.2.1 Açúcares.....	32
1.2.2 Alcoois.....	33
1.2.3 Ácidos orgânicos.....	34
1.2.4 Minerais.....	35
1.2.5 Composição nitrogenada.....	36
1.2.6 Composição fenólica.....	39
1.2.6.1 Flavonoides.....	42
1.2.6.2 Ácidos fenólicos.....	45
1.2.6.3 Estilbenos e tirosol.....	46
1.2.7 Evolução da composição fenólica dos vinhos ao longo do envelhecimento.....	47
1.2.7.1 Reações de oxidação das substâncias fenólicas.....	48
1.2.7.2 Reações químicas das antocianinas.....	49
1.3 ELABORAÇÃO DE VINHO ESPUMANTE.....	52
1.3.1 Autólise das leveduras e as alterações na composição química dos vinhos espumantes.....	55
1.4 AGENTES ENOLÓGICOS.....	61
1.5 ANÁLISE SENSORIAL.....	64
CAPÍTULO 2	
INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE AGENTES ENOLÓGICOS SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE VINHOS ESPUMANTE ROSÉ DURANTE O ENVELHECIMENTO SOBRE BORRA E ARMAZENAMENTO COMERCIAL	67
RESUMO	69
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1 REAGENTES QUÍMICOS.....	71
2.2 PROCEDIMENTO DE VINIFICAÇÃO.....	72

2.3 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, INTENSIDADE DE COR E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	73
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3.1 EFEITO DOS AGENTES ENOLÓGICOS NA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DOS VINHOS ESPUMANTES.....	74
3.1.1 Ácidos fenólicos.....	74
3.1.2 Flavanóis e flavonóis.....	80
3.1.3 Outras substâncias.....	82
3.1.4 Antocianinas e intensidade de cor.....	83
3.1.5 Polifenóis e capacidade antioxidante.....	86
3.2 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	88
4 CONCLUSÕES.....	91

CAPÍTULO 3

ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, ELEMENTAR E DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE VINHOS ESPUMANTES TRATADOS COM MANOPROTEÍNAS DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO.....	93
RESUMO.....	95
1 INTRODUÇÃO.....	96
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	98
2.1 REAGENTES QUÍMICOS.....	98
2.2 VINIFICAÇÃO.....	98
2.3 PARÂMETROS ENOLÓGICOS.....	99
2.4 PARÂMETROS DE COR, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E POLIFENÓIS.....	99
2.5 COMPOSIÇÃO FENÓLICA.....	100
2.6 ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	101
2.7 PERFIL MINERAL.....	101
2.8 MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E RAMAN.....	102
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	102
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
3.1 PARÂMETROS ENOLÓGICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	102
3.2 EFEITO DE MANOPROTEÍNAS E EVOLUÇÃO DOS POLIFENÓIS DO VINHO DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO.....	104

3.3 PERFIL MINERAL.....	110
3.4 MEDIDAS DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E RAMAN DOS VINHOS ESPUMANTES.....	111
3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	114
4 CONCLUSÕES.....	116

CAPÍTULO 4

PERFIL FENÓLICO, TEOR DE GLUTATIONA E ESCURECIMENTO EM VINHOS ESPUMANTES DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO.....	119
RESUMO.....	121
1 INTRODUÇÃO.....	122
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	123
2.1 MATERIAL.....	123
2.1.1 Amostras.....	123
2.1.2 Reagentes químicos.....	124
2.2 MÉTODOS.....	124
2.2.1 Parâmetros enológicos.....	124
2.2.2 Análises espectrofotométricas.....	124
2.2.3 Análises cromatográficas.....	125
2.2.4 Análise estatística.....	127
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	128
3.1 PARÂMETROS ENOLÓGICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	128
3.2 PERFIL FENÓLICO E ÍNDICE DE ESCURECIMENTO DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO DE VINHOS ESPUMANTES.....	130
3.3 GLUTATIONA.....	140
4 CONCLUSÃO.....	142

CAPÍTULO 5

EFEITO DO TEMPO DE ENVELHECIMENTO SOBRE BORRA NA COMPOSIÇÃO NITROGENADA E SENSORIAL DE VINHOS ESPUMANTES.....	145
RESUMO.....	147
1 INTRODUÇÃO.....	148
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	149
2.1 MATERIAL.....	149
2.1.1 Amostras.....	149
2.1.2 Reagentes químicos.....	150
2.2 MÉTODOS.....	150

2.2.1 Análises das substâncias nitrogenadas.....	150
2.2.2 Análise sensorial descritiva.....	150
2.2.3 Análise estatística.....	151
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	152
3.1 COMPOSIÇÃO NITROGENADA DOS MOSTOS E VINHOS BASE.....	154
3.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO NA COMPOSIÇÃO NITROGENADA DOS VINHOS.....	157
3.3 ANÁLISE SENSORIAL.....	167
4 CONCLUSÃO.....	170
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	172
REFERÊNCIAS.....	174
APÊNDICE A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	194
APÊNDICE B – Ficha da análise descritiva quantitativa utilizada para a análise sensorial dos vinhos espumantes brancos.....	198

INTRODUÇÃO

Os vinhos espumantes são produzidos utilizando métodos de elaboração especiais, como o Charmat, Asti ou *Champenoise*. O processo de elaboração pelo método Tradicional (*Champenoise*), de fermentação na garrafa, envolve transformações biológicas e procedimentos tecnológicos que determinam propriedades químicas e sensoriais diferenciadas das outras técnicas de elaboração. Estas propriedades dependem em grande parte do processo de autólise das leveduras durante a fermentação alcoólica e, sobretudo no envelhecimento sobre borra e/ou biológico (*sur lies*) (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; TORRESI; FRANGIPANE; ANELLI, 2011). A autólise das leveduras é um processo lento, associado com a morte celular, e envolve a ação de enzimas hidrolíticas que liberam diferentes substâncias intracelulares como aminoácidos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos, derivados de ácidos nucléicos e lipídios do citosol e da parede celular para o vinho (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006).

Durante o processo de autólise, as moléculas liberadas para o meio contribuem para a composição química dos vinhos espumantes. Estudos mostram que as principais modificações estão relacionadas às substâncias nitrogenadas (MORENO-ARRIBAS et al., 1998; MORENO-ARRIBAS et al., 2000; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002), às substâncias voláteis (CALIARI et al., 2015), às substâncias fenólicas (SERRA-CAYUELA et al., 2013; STEFENON et al., 2014; PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015), aos polissacarídeos, especialmente as manoproteínas (JUEGA et al., 2014), lipídeos e ácidos nucleicos (POZO-BAYÓN et al., 2009), que são os principais responsáveis pela qualidade final dos vinhos espumantes (ZOECKLEIN, 2002; KEMP et al., 2015).

As substâncias nitrogenadas estão presentes na uva e no mosto na forma orgânica e inorgânica, e representam a maior fração de substâncias liberadas pela levedura (MORENO-ARRIBAS et al., 1998). Os aminoácidos são precursores de algumas substâncias voláteis por reações de desaminação e descarboxilação, o que modifica os descritores aromáticos dos vinhos espumantes durante o envelhecimento biológico (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006), e contribui para a qualidade, identidade e tipicidade (RUI-AUMATELL et al., 2006; CALIARI et al., 2014; WELKE et al., 2014). As borras das leveduras também podem adsorver e liberar diferentes substâncias fenólicas durante a autólise e envelhecimento, o que está principalmente associado com a presença de ésteres hidroxicinâmicos, antocianidinas e taninos, que podem modificar o perfil fenólico (GARRIDO; BORGES, 2013;

STEFENON et al., 2014) e o potencial antioxidante dos vinhos espumantes (GALLARDO-CHACÓN et al., 2010; STEFENON et al., 2010).

Compreender a relação entre a qualidade de um determinado vinho e a sua composição química, especialmente as substâncias fenólicas continua sendo um grande desafio na pesquisa em enologia. Neste cenário, a indústria vitivinícola tem investido em inovação e passou a desenvolver alternativas de vinificação para elaboração de produtos com alto valor agregado. Dentre estas técnicas destacam-se a aplicação de diferentes agentes enológicos durante o processo de vinificação, o qual têm sido foco de pesquisas científicas com o objetivo de melhorar a composição química e sensorial dos vinhos (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007; RODRIGUES et al. 2012; ALCALDE-EON et al. 2014; LARCHER et al., 2015; PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015a; GHANEM et al. 2017; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al. 2017). Em vinho branco, os fenólicos são os principais substratos para as reações de oxidação, com destaque para os ácidos hidroxicinâmicos, especialmente os ácidos *trans*-caftárico e cafeico. Estes ácidos são propensos a reações de oxidação durante o processo de vinificação, formando *o*-quinonas, e contribuindo para o escurecimento dos vinhos durante o envelhecimento (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

A produção de vinho espumante está aumentando em escala global, e existe um foco crescente em variedades de uvas alternativas cultivadas em regiões emergentes para a produção de vinhos espumantes de qualidade (KEMP et al., 2015). A viticultura em países tradicionais produtores se destaca com a utilização de variedades de uvas viníferas como a Chardonnay, Pinot Noir, Pinot Grigio, Riesling Itálico, Prosecco e Moscato Giallo, destinadas a elaboração de vinhos espumantes. No Brasil, as uvas mais cultivadas são as variedades de *Vitis labrusca* L. e híbridas, que destinam-se principalmente à elaboração de sucos e vinhos de mesa, representando 80 % da produção. O uso destas variedades de uvas não-tradicionais para a elaboração de vinhos espumantes é um desafio para a indústria vitícola. Embora a produção de vinhos espumantes no Brasil possa ser considerada pequena, o impacto econômico deste produto é muito importante para o desenvolvimento do mercado regional e internacional. Observa-se que a diversificação do setor que busca diferentes variedades de uva com características particulares são extremamente relevantes (CALIARI et al., 2014).

Em contraste com a viticultura tradicional, no Brasil, a utilização de variedades de uvas não-tradicionais como Moscato Embrapa, Lorena, Niágara, Manzoni, Villenave e Goethe, destinadas a elaboração de vinhos

espumantes pode ser um diferencial para a viticultura. No Estado de Santa Catarina, Brasil, o cultivo destas variedades demonstra grande potencial para o desenvolvimento da viticultura devido a elaboração de vinhos espumantes com características particulares (CALIARI et al., 2014). No entanto, o conhecimento sobre as mudanças que ocorrem na composição química e sensorial destes vinhos espumantes elaborados com variedades de uvas não-tradicionais ao longo do envelhecimento biológico (*sur lies*) a nosso conhecimento ainda não foram relatados na literatura. Ainda, as variedades viníferas Cabernet Sauvignon e Merlot, amplamente cultivadas no Estado de Santa Catarina, também podem apresentar um novo potencial para a elaboração de vinhos espumantes rosé brasileiros. Desta forma, a busca por produtos diferenciados ligados à identidade regional tem se mostrado uma excelente estratégia comercial tanto no âmbito nacional como internacional.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da adição de agentes enológicos sobre a composição fenólica, potencial antioxidante, ácidos orgânicos e teor de macro e microelementos de vinhos espumantes rosé Cabernet Sauvignon e Merlot durante o tempo de envelhecimento sobre borra e armazenamento comercial. Além disto, avaliar as mudanças na composição fenólica, teor de glutatona e escurecimento de vinhos espumantes brancos elaborados com variedades de uvas não-tradicionais (*V. labrusca* e híbridas) durante o envelhecimento sobre borra; bem como avaliar as alterações na composição nitrogenada de vinhos espumantes brancos elaborados com as variedades de uvas Villenave, Niágara, Manzoni, Goethe e Chardonnay, e caracterizar estes vinhos espumantes quanto ao perfil sensorial no final do envelhecimento.

A presente tese está estruturada na forma de capítulos. No Capítulo 1, de revisão bibliográfica, são abordados os principais aspectos das uvas do gênero *Vitis*, com enfoque em variedades de uvas utilizadas para a elaboração de vinhos espumantes no Brasil. A revisão descreve a composição química da uva e do vinho e a sua evolução ao longo do envelhecimento. Esta revisão também contempla as etapas de elaboração de vinhos espumantes pelo método Tradicional (*Champenoise*), o uso de agentes enológicos, e descreve sobre o processo de autólise das leveduras e as principais modificações na composição química e sensorial dos vinhos espumantes durante o envelhecimento sobre borra.

No Capítulo 2, foi investigada a influência da adição de tanino e goma arábica em duas etapas da elaboração de vinhos espumantes rosé Cabernet Sauvignon e Merlot sobre as alterações na composição fenólica e capacidade antioxidante. Os vinhos espumantes foram monitorados

durante 12 meses de envelhecimento sobre borra (*sur lies*, com borras) e armazenamento comercial (em garrafa, sem borras).

No Capítulo 3 foi avaliado o efeito da adição de manoproteínas na composição fenólica, elementar e de ácidos orgânicos dos vinhos espumantes rosé Merlot durante 12 meses de envelhecimento sobre borra.

No Capítulo 4 foi investigada as mudanças na composição fenólica, teor de glutathione e escurecimento de vinhos espumantes brancos elaborados com variedades de uvas não-tradicionais (Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe) durante 18 meses de envelhecimento sobre borra.

No Capítulo 5 foi avaliado a influência do tempo de envelhecimento sobre borra sobre a composição nitrogenada (aminoácidos e amônio) de vinhos espumantes brancos elaborados com as variedades de uvas Villenave, Niágara, Manzoni, Goethe e Chardonnay, e caracterizado estes espumantes quanto ao perfil sensorial no final de 18 meses de envelhecimento sobre borra.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE UVAS DO GÊNERO *VITIS*

A videira é classificada no gênero *Vitis*, família *Vitaceae*. A família *Vitaceae* é constituída por onze gêneros e abrange aproximadamente 600 espécies dispersas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Inclui alguns gêneros como *Ampelopsis* Michaux, *Cissus* L. e *Parthenocissus* Planchon, entre outros, porém apenas o gênero *Vitis* é de importância econômica, sendo amplamente difundida no Brasil. Com destaque as variedades de *Vitis vinifera* L. (*V. vinifera*), de origem euro-asiática, e *Vitis labrusca* L. (*V. labrusca*), de origem americana (GIOVANNINI, 2014). O setor vitivinícola brasileiro apresenta uma característica atípica em relação aos países tradicionais produtores de vinho. No Brasil podem ser elaborados vinhos de cultivares americanas (*V. labrusca*) e viníferas (*V. vinifera*), enquanto que em países como Espanha, França e Itália são elaborados vinhos somente com uvas viníferas (PROTAS; CAMARGO, 2011). As videiras do gênero *Vitis* distinguem-se dos gêneros relacionados principalmente pelas características florais, que são tipicamente unissexuais. As gavinhas crescem inserindo-se nas fendas da estrutura que a suporta, devido ao fototropismo negativo, mantendo a planta erguida (JACKSON, 2008).

A variedade de *V. vinifera* é a mais utilizada para a elaboração de vinhos. Destaca-se pela qualidade de seus frutos e dos vinhos elaborados. Essa variedade se desenvolve com facilidade, no entanto é sensível a doenças que atacam a videira, devendo ser propagada por enxertia. Pela sua qualidade fenológica, é amplamente utilizada em trabalhos de melhoramento genético (GIOVANNINI, 2014). No Brasil, o cultivo da variedade de *V. vinifera* representa pequena parcela da produção, porém o setor está em expansão (PROTAS; CAMARGO, 2011). As condições climáticas em algumas regiões do sul do Brasil, como o Estado de Santa Catarina, são promissoras para o desenvolvimento desta nova vitivinicultura. Pesquisas demonstram o grande potencial fenológico e bioativo de diferentes regiões vitícolas de Santa Catarina para o cultivo de variedades européias *V. vinifera* destinadas a elaboração de vinhos tranquilos (BURIN et al. 2011; SARTOR et al, 2017a; SARTOR et al., 2017b).

A variedade de *V. labrusca* produz uvas com aromas e sabores típicos. Suas uvas são denominadas de “uvas rústicas” ou “uvas de mesa”, apresentam facilidade de enraizamento e resistência a doenças que atacam a videira, como míldio e a podridão cinzenta (GIOVANNINI, 2014). No Brasil as uvas da variedade de *V. labrusca* e as híbridas (originadas do cruzamento entre diferente gênero *Vitis*) são amplamente cultivadas e

representam a maior parte da produção (PROTAS; CAMARGO, 2011). Alguns trabalhos tem sido realizados com as variedades de uvas *V. labrusca* e com variedades híbridas cultivados em diferentes regiões do Brasil com objetivo de caracterizar a uva e o vinho, valorizando assim a tipicidade local (FERREIRA-LIMA; BURIN; BORDIGNON-LUIZ, 2013; TOALDO et al., 2013; BURIN et al., 2014; PADILHA et al., 2017).

No que diz respeito aos vinhos espumantes, as principais variedades de uvas utilizadas no mundo são as viníferas Chardonnay, Pinot Noir, Pinot Grigio, Riesling Itálico, Prosecco e Moscato Giallo. No Brasil, além destas utilizam-se também novas variedades de uvas *V. labrusca* e as híbridas, como Moscato Embrapa, Lorena, Niágara, Manzoni, Villenave e Goethe, sendo que cada uva apresenta características intrínsecas de aroma e sabor. Ainda, as variedades viníferas Cabernet Sauvignon e Merlot podem apresentar um novo potencial para a vinificação de vinhos espumantes rosé brasileiros. Desta forma, a busca por produtos diferenciados ligados à identidade regional tem se mostrado uma excelente estratégia comercial nacional e internacional (CALIARI et al., 2014).

A uva Cabernet Sauvignon é considerada uma das variedades viníferas de maior prestígio no mundo. Originária de Bordeaux na França do cruzamento espontâneo, das variedades Cabernet Franc e Sauvignon Blanc (JACKSON, 2008). Esta variedade foi introduzida no Brasil em 1921, mas somente depois da década de 1980 seu plantio foi incrementado nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, e atualmente apresenta-se difundida na maior parte dos países vitivinícolas, essa cultivar marcou o início da produção de vinhos finos varietais brasileiros (CAMARGO, 2008).

A uva Merlot é uma das principais responsáveis pelas características peculiares dos vinhos tintos da região de Bordeaux, França (JACKSON, 2008). Produz vinho varietal fino de médio envelhecimento. Uva de excelente adaptação às condições de solo e clima do sul do Brasil (CAMARGO, 2008).

A uva Chardonnay originária da Borgonha, França, é a variedade *V. vinifera* branca mais cultivada no mundo. Esta variedade é utilizada na produção de vinho branco varietal, de médio envelhecimento ou espumante, com características frutadas notáveis (JACKSON, 2008; CALIARI et al., 2014).

A variedade Villenave é originária de Bordeaux na França (seleção 9216), por meio de um cruzamento da vinífera Riesling Renano com híbrido 7489. Esta uva apresenta coloração amarelo clara, aroma floral intenso e bom equilíbrio de acidez e estrutura, grande potencial para

elaboração de vinhos brancos aromáticos e espumantes (SCHUCK et al., 1999).

A variedade Niágara Branca também chamada de Francesa Branca, é originária de Nova York, Estados Unidos. Surgiu de um cruzamento entre Concord e Cassady, portanto é predominantemente de *V. labrusca*, sendo muito rústica e resistente às principais doenças. Produz mosto aromático, sendo muito empregada como uva de mesa, pois tem bagas grandes de sabor doce (GIOVANNINI, 2014). É utilizada para a elaboração de vinho, muito típico por suas características de aroma e sabor, amplamente aceito pelo consumidor brasileiro (CAMARGO, 2008).

A variedade Manzoni Bianco é uma variedade obtida do cruzamento obtido das variedades Riesling Renano e Pinot Bianco, apresenta elevada concentração de açúcares e boa acidez apresentando vinhos com boa estrutura, coloração amarelo palha e aroma fino e delicado. A Manzoni (Manzoni Bianco) é um dos cruzamentos com maior sucesso e mais cultivada na Região do Vêneto, especialmente em Treviso onde são elaborados vinhos varietais e cortes (NICOLINI et al., 2003).

A Goethe é uma variedade americana originária de Delaware, Estados Unidos, conhecida também como híbrido Roger's #1 (híbrido complexa). Quando vinificada em branco produz vinho bastante aromático, também é utilizada na elaboração de espumantes. Goethe é uma variedade híbrido (87,5 % de genes de *V. vinifera* e 12,5 % de *V. labrusca*) exclusivamente cultivada na região de Urussanga, no sul do Estado de Santa Catarina, Brasil (FERREIRA-LIMA; BURIN; BORDIGNON-LUIZ, 2013).

1.2 COMPOSIÇÃO DA UVA E DO VINHO

1.2.1 Açúcares

Os açúcares são produzidos durante a fotossíntese nos vegetais, sendo que em uvas os principais são glicose e frutose. Seus teores podem variar dependendo da variedade da uva, sanidade e grau de maturação. No início da maturação há um predomínio da glicose, posteriormente a relação glicose/frutose diminui, sendo que no final da maturação os dois açúcares se equivalem. Em variedades de *Vitis vinifera* L. a sacarose é raramente encontrada, porém pode estar presente em espécies americanas e híbridas. O teor de açúcar da uva é caracterizado em sólidos solúveis totais (SST) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON 2008).

Os açúcares podem participar de reações bioquímicas envolvendo a ação de enzimas como pectinases e celulases, e como resultado dessas

reações diferentes frações de carboidratos são originadas no meio (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Os açúcares como a glicose são precursores da biossíntese de ácidos orgânicos como o ácido cítrico, málico e succínico (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

Os açúcares da uva desempenham um papel essencial na vinificação, pois são substratos para a produção de álcool a partir da ação das leveduras durante a fermentação alcoólica, sendo que a maioria da energia metabólica utilizada é na forma de glicose e frutose. As uvas contêm ainda pequena quantidade de açúcares não fermentescíveis (arabinose, ramnose e xilose) sendo estes também encontrados nos vinhos. Essas substâncias podem participar de diferentes reações durante a fermentação e envelhecimento dos vinhos, como reações com ácidos e bases, oxidação e redução, reação de Maillard, e ainda, contribuem para as propriedades sensoriais dos vinhos, como corpo, aroma e doçura (JACKSON 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

1.2.2 Álcoois

O etanol é o álcool que apresenta maior importância para os vinhos. Este composto é produzido principalmente durante a fermentação alcoólica do açúcar presente no mosto, embora pequenos teores sejam produzidos nas células da uva (JACKSON, 2008). A quantidade de etanol em vinhos é expressa em termos de teor alcoólico ou percentagem de álcool por volume. O teor de etanol de um vinho é proporcional à concentração de sólidos solúveis totais da uva, sendo fortemente influenciado pelo grau de maturação das uvas e pelas condições climáticas, em especial o índice pluviométrico da região de cultivo (JACKSON; LOMBARD, 1993; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

O etanol está relacionado a diversas propriedades do vinho, como químicas, físicas e sensoriais, com efeitos no corpo, viscosidade, sabor, acidez, aroma e textura, além de diminuir a sensação de adstringência de taninos. Durante o envelhecimento, o etanol também pode reagir com ácidos orgânicos produzindo ésteres, ou com aldeídos produzindo acetais (JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Além do etanol podem ser encontrados outros Álcoois, como o glicerol e os Álcoois superiores. Estas substâncias também contribuem significativamente nas propriedades sensoriais do vinho. Os principais efeitos do glicerol são na viscosidade e no corpo, e os Álcoois superiores desempenham um importante papel na composição volátil dos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

1.2.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos representam uma fração significativa em mostos e vinhos (ROMERO; MUÑOZ, 1993). São importantes devido à influência sobre as propriedades sensoriais como sabor, aroma e cor, e também sobre a estabilidade e controle microbiológico. Além de fornecer informações relevantes sobre o acompanhamento do processo de fermentação (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007).

Essas substâncias são derivadas das uvas, e de eventos metabólicos como a fermentação alcoólica e malolática (ROMERO; MUÑOZ, 1993). O desenvolvimento dos ácidos orgânicos na planta é dependente da fotossíntese. A sua redução durante a maturação das uvas está relacionada com a taxa de respiração em função da temperatura do ambiente (JACKSON; LOMBARD, 1993). Suas concentrações nos vinhos variam de acordo com a variedade, local de cultivo, condições climáticas e eventos metabólicos que ocorrem durante a vinificação e armazenamento (BATISTA et al., 2010).

O vinho contém os ácidos orgânicos originários da uva (ácidos tartárico, málico e cítrico) e do processo de fermentação (ácidos succínico, láctico e acético). Além destes, pequenas concentrações de outros ácidos orgânicos que podem ser encontrados nos vinhos, como o galacturônico, glucurônico, citrimálico, dimetilglicérico, pirúvico e α -cetoglutárico (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005; BATISTA et al., 2010). Durante a fermentação malolática, o ácido málico é metabolizado em ácido láctico. Por isso, pequenas concentrações de ácido málico são encontradas nos vinhos tintos (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005). Em vinho base utilizado para a elaboração dos vinhos espumantes, a fermentação malolática é evitada, por isso maiores concentrações de ácido málico são encontradas em relação ao ácido láctico (CALIARI et al., 2015), processo típico da elaboração de vinhos espumantes, uma vez que as uvas são colhidas antes da maturação tecnológica (ZOECKLEIN, 2002).

O ácido tartárico é um dos ácidos mais importantes na uva e no vinho. Caracteriza-se por ser um ácido forte, que interfere diretamente no pH do vinho. Durante a fermentação alcoólica seus teores diminuem por consequência da insolubilização e precipitação sob a forma de cristais de bitartrato de potássio (JACKSON, 2008). Por isso, sua concentração é um importante parâmetro de controle na estabilização do vinho. A concentração de ácidos orgânicos influencia o equilíbrio do sabor, e também a estabilidade química e pH do meio. O equilíbrio de acidez é uma característica essencial nos vinhos, sendo que em excesso realça a

percepção de sabor ácido e adstringência, enquanto que a baixa acidez reduz a harmonia do vinho (ROMERO; MUÑOZ, 1993).

1.2.4 Minerais

Os minerais encontrados em uvas estão localizados principalmente na polpa, sua concentração deriva da absorção dos elementos do solo pelas videiras por meio do sistema radicular da planta (JACKSON, 2008). A composição e a concentração de minerais na uva refletem as características de absorção e transpiração da videira, sendo influenciadas pela espécie, variedade de uva e porta-enxerto, condições das adubações realizadas e dos tratamentos fitossanitários, região de cultivo, sendo dependente do solo e clima. O processo de vinificação utilizado também interfere no teor dos minerais, pela utilização de produtos enológicos, pelas práticas enológicas que favoreçam a extração de substâncias da uva ou pelo contato do vinho com materiais e equipamentos nas fases de elaboração, conservação, estabilização ou engarrafamento (CASTIÑEIRA et al., 2004; JACKSON, 2008; HOPFER et al., 2015).

Os principais macroelementos das uvas e vinhos são sódio, potássio, magnésio e cálcio. Enquanto que os microelementos mais encontrados são alumínio, manganês, ferro, cobre, zinco e rubídio (CATARINO; CURVELO-GARCIA; DE SOUSA, 2008; HOPFER et al., 2015). Uma maceração prolongada contribui para aumentar o teor de minerais nos vinhos, enquanto que, a estabilização do vinho reduz o teor de alguns minerais, principalmente potássio e cálcio (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; GALGANO et al., 2008). A composição mineral do vinho reflete a sua origem e contribui de forma substancial para as características sensoriais, com influência na cor, limpidez, gosto e aroma (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUZA, 2008).

A determinação de minerais é de interesse devido às implicações enológicas e toxicológicas destes elementos e, para a caracterização química dos vinhos e identificação de sua origem geográfica, uma vez que pode fornecer dados determinantes para a garantia da qualidade, tendo em conta que o sabor metálico dos vinhos deriva principalmente da composição do solo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008; HOPFER et al., 2015). Elementos minerais são amplamente utilizados para caracterizar vinhos tranquilos e fortificados (CASTIÑEIRA et al., 2004; GALGANO et al., 2008; ARCARI et al., 2013; HOPFER et al., 2015).

Estudos tem investigado as modificações da concentração de minerais de uvas, mostos, sucos e vinhos frente à diferentes processos

tecnológicos, como o efeito da adição de bentonite em diferente etapas da vinificação em vinhos brancos (CASTIÑEIRA et al., 2004), e o efeito do processo de desidratação em ambiente controlado em uvas Cabernet Sauvignon e Merlot (PANCERI et al., 2013) e nos seus respectivos vinhos licorosos (PANCERI et al., 2015). Entretanto há poucos relatos sobre a composição mineral de vinhos espumantes durante o envelhecimento sobre borra. Jos et al. (2004) avaliaram diferentes vinhos espumantes espanhóis (Cava) e franceses (Champagne) quanto a concentração de minerais, e partir de uma abordagem quimiométrica, observaram uma diferenciação entre os vinhos espumantes Cava e Champagne, decorrente da concentração de zinco, chumbo, sódio, cobre, níquel, arsênio, fósforo, cádmio e estrôncio.

1.2.5 Composição nitrogenada

As substâncias nitrogenadas estão presentes na uva e no mosto na forma orgânica (aminoácidos, peptídeos, amins biogênicas e proteínas) e inorgânica (íon amônio) (JACKSON, 2008). Dentre estas substâncias, destacam-se o íon amônio e os aminoácidos que são os principais constituintes da fração nitrogenada da uva e do mosto (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Eles representam a maior fração de substâncias liberadas pela levedura durante o envelhecimento dos vinhos espumantes e são usados como marcador do processo de autólise das leveduras (MORENO-ARRIBAS et al., 1998; ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006).

O íon amônio (NH_4^+) é um importante composto nitrogenado que representa 80 % do nitrogênio total das uvas, sendo a forma diretamente assimilável pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, onde é rapidamente consumido. No mosto, sua concentração varia de 5 a 325 mg/L (BELL; HENSCHKE, 2005; RIBÉREAU-GAYON, 2006b). Nos vinhos sua concentração é reduzida, especialmente em vinhos que passam por fermentação malolática e envelhecimento sobre borra (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

Os aminoácidos são os principais componentes nitrogenados de mostos e vinhos. Em uvas maduras, os aminoácidos geralmente representam 30 a 40 % do nitrogênio total, sendo geralmente os mais abundantes a arginina e a prolina. O teor de aminoácidos na uva aumenta de acordo com a maturação pois o nitrogênio amoniacal é convertido em aminoácidos livres. Em mostos, a concentração de aminoácido total está entre 100 e 4000 mg L⁻¹, e nos vinhos os teores estão entre 3 e 3000 mg L⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON, 2006b). Os aminoácidos são importantes na

biossíntese de enzimas e proteínas. Eles podem atuar como fonte de nitrogênio e de energia para o metabolismo das leveduras, e ainda podem ser metabolizados em ácidos orgânicos, álcoois superiores, aldeídos, fenóis e lactonas (JACKSON, 2008). Estudos demonstram que o teor de nitrogênio dos mostos pode ser utilizado como uma ferramenta para a obtenção de vinhos com diferente perfil de substâncias voláteis (BURIN et al., 2015).

Nos vinhos, os aminoácidos presentes são provenientes da uva, os quais são parcialmente ou totalmente metabolizados pelas leveduras durante a fermentação, como também podem ser liberados pelas leveduras no final da fermentação ou originados por proteólise durante a autólise das leveduras (MORENO-ARRIBAS et al., 1998). Os principais aminoácidos assimilados pelas leveduras durante o processo de fermentação são a arginina, ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, treonina e serina (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). A arginina é rapidamente consumida pelas leveduras no início da fermentação, e durante a autólise é excretada. A prolina, um aminoácido secundário, tem sua utilização limitada pelas leveduras durante a fermentação (BELL; HENSCHKE, 2005). As alterações na composição de aminoácidos livres têm sido objeto de estudos em mostos e vinhos (ALCAIDE-HIDALGO et al., 2007; BURIN et al., 2015; BURIN et al., 2016), bem como durante o envelhecimento sobre borra de vinhos espumantes (MORENO-ARRIBAS et al., 2000; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002). Segundo Moreno-Arribas et al. (1998) a concentração de aminoácidos em vinhos espumantes é influenciada pelo tempo envelhecimento em contato com as leveduras, variedade de uva e composição do vinho base.

Peptídeos, proteínas e aminas biogênicas também estão presentes em uvas e vinhos, porém em menores concentrações. Os peptídeos formam um grupo heterogêneo de substâncias, devido as diferentes estruturas (composição e sequência de aminoácidos na cadeia). Os peptídeos presentes nos mostos e vinhos apresentam no máximo quatro aminoácidos em sua estrutura, possuem propriedades tensoativas, especialmente em vinhos espumantes, e propriedades bioativas (antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Essas substâncias também são nutrientes para as leveduras durante a fermentação, e são responsáveis pelos sabores doces e amargos importantes para as características sensoriais (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; TORRESI; FRANGIPANE; ANELLI, 2011). Entre um grande número de peptídeos, a glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina; GSH) é um

dos peptídeos mais estudados em uvas, mostos e vinhos. É um importante tripeptídeo formado pela síntese enzimática a partir de três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. A glutatona pode estar presente na sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), geralmente mais de 90 % da glutatona está presente na forma reduzida. A GSSG é formada a partir da oxidação da GSH, e pode ser reduzida novamente pela ação da enzima glutatona redutase (KRITZINGER et al., 2013).

Na elaboração de vinhos, a glutatona desempenha um papel importante na prevenção das reações de oxidação, assim como melhora o potencial de guarda dos vinhos espumantes (JANEŠ; LISJAK; VANZO, 2010; WEBBER et al., 2017). Os primeiros substratos para as enzimas oxidativas como a polifenol oxidase (PPO) são os ácidos hidroxicinâmicos, com destaque ao ácido caftárico. A ação antioxidante da glutatona ocorre devido ao resíduo de cisteína reagir parcialmente com as *orto*-quinonas formadas no processo de oxidação, formando o produto de reação da uva (GRP). A formação desse novo derivado limita o escurecimento de mostos e vinhos, e a medida que esta reação ocorre os níveis de glutatona são consumidos, reduzindo sua concentração no meio (RIBÉREAU-GAYON, 2006b; LI; GUO; WANG, 2008; KRITZINGER et al., 2013).

Em uvas, a concentração de GSH pode variar de acordo com a variedade de uva, as condições ambientais e práticas vitícolas empregadas (KRITZINGER et al., 2013). O teor de GSH em uvas e mostos pode variar entre 0,001 a 100 mg L⁻¹, e fatores como a exposição ao oxigênio, a atividade da enzima tirosinase, tempo de maceração e condições de prensagem podem afetar a sua concentração. A concentração de GSH em vinho e espumantes é menor do que no mosto, podendo variar 0,05 a 30 mg L⁻¹ (DU TOIT et al., 2007; JANEŠ; LISJAK; VANZO, 2010; FERREIRA-LIMA et al., 2016a; WEBBER et al., 2017). Além de prevenir o escurecimento, a glutatona pode prevenir a perda de aroma varietais característicos de vinhos brancos devido aos processos oxidativos. Estudos recentes com vinhos espumantes demonstram que a adição da glutatona no mosto aumentou os níveis de 2-feniletanol, 3-metil-1-butanol e dietil succinato melhorando a composição volátil (WEBBER et al., 2014). Pesquisas demonstram que a adição de glutatona em mostos e vinhos pode ser uma alternativa para prevenir o escurecimento oxidativo, reduzindo os fenômenos de oxidação, preservando a cor do vinho espumante e algumas substâncias voláteis varietais, além de reduzir *off-flavors* de envelhecimento (WEBBER et al., 2014; WEBBER et al., 2017).

1.2.6 Composição fenólica

As substâncias fenólicas são constituintes fundamentais dos vegetais, presentes principalmente em plantas, raízes e frutas. Os fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, são formados em condições de estresse como, infecções, radiações ultravioleta e elevadas precipitações (JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

A composição fenólica dos vinhos apresenta uma grande variação de acordo com as condições ambientais e climáticas, tipo de solo, variedade de uva, grau de maturação e práticas enológicas empregadas, como a duração do processo de maceração, controle da fermentação e armazenamento dos vinhos (GRANATO; KATAYAMA; CASTRO, 2010; STOCKHAM et al., 2013). Na uva estas substâncias são encontradas principalmente nas cascas e sementes. No vinho são produzidas pelo metabolismo das leveduras, extraídos da polpa, casca e semente das uvas durante o período de maceração (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Essas substâncias estão diretamente relacionadas com os parâmetros de qualidade do vinho, como também contribuem para as características sensoriais, como adstringência, cor e aroma (JACKSON, 2008). Os fenólicos também têm atraído interesse devido às suas propriedades antioxidantes e seus efeitos benéficos para a saúde. Os polifenóis são moléculas bioativas que apresentam propriedades anticarcinogênicas, anti-inflamatória, atividade neuroprotetora, hipolipemiante e proteção contra doenças cardiovasculares (GRIS et al., 2011a; GRIS et al., 2013; TOALDO et al., 2015; TOALDO et al., 2016b). As principais substâncias fenólicas presentes na uva e no vinho compreendem os flavonoides, como as antocianinas, flavonóis e flavanóis, os ácidos fenólicos, os estilbenos como o *trans*-resveratrol e o tirosol. As estruturas químicas destes polifenóis estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Estrutura geral das substâncias fenólicas flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e tirosol indicando a substituição do radical.

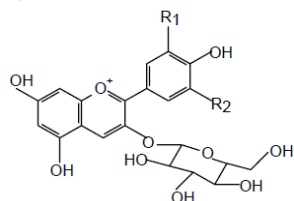
ESTRUTURA GERAL

EXEMPLOS

FLAVONOIDES

Antocianinas

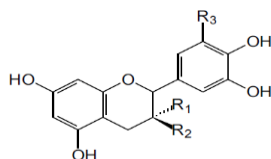
A)



	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OH	OCH ₃
Peonidina	OCH ₃	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

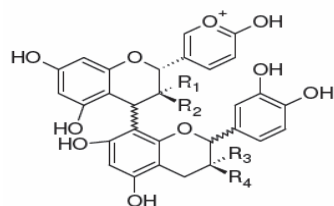
Flavanóis

B) Flavan-3-ols



	R ₁	R ₂	R ₃
(+)-catequina	OH	H	H
(-)-epicatequina	H	OH	H

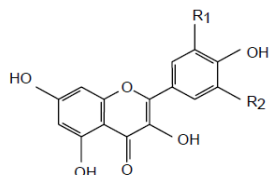
C) Procianidinas



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
B1	OH	H	H	OH
B2	OH	H	OH	H
B3	H	OH	H	OH
B4	H	OH	OH	H

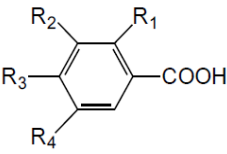
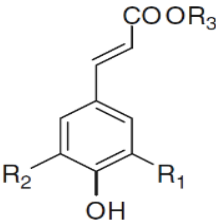
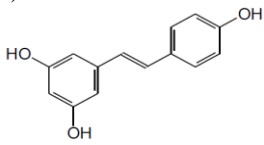
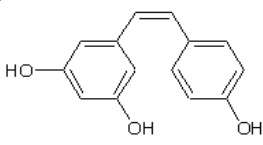
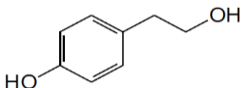
Flavonóis

D)



	R ₁	R ₂
Campferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH

Figura 1. (Continuação)

ESTRUTURA GERAL		EXEMPLOS			
ÁCIDOS FENÓLICOS, ESTILBENOS E TIROSOL					
Ácidos hidroxibenzoicos					
E)		R₁	R₂	R₃	R₄
					
	Ác. gálico	H	OH	OH	OH
	Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H	OH	H
	Ác. protocateico	H	OH	OH	H
	Ác. vanílico	H	OCH ₃	OH	H
	Ác. siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácidos hidroxicinnâmicos					
F)		R₁	R₂	R₃	
					
	Ác. <i>p</i> -cumárico	H	H	H	
	Ác. cafeico	OH	H	H	
	Ác. ferúlico	OCH ₃	H	H	
	Ác. <i>p</i> -caftárico	OH	H	C ₄ H ₅ O ₅	
Estilbenos					
G)	<i>trans</i> -resveratrol				
H)	<i>cis</i> -resveratrol				
Tirosol					
I)					

Fonte: Adaptado de Ribéreau-Gayon et al. (2006b); Jackson (2008); Moreno-Arribas e Polo (2009).

1.2.6.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de substâncias fenólicas que diferem entre si pela sua estrutura química e propriedades particulares. Possuem uma estrutura comum característica (C6-C3-C6) formada por dois anéis benzênicos ligados por um anel pirano, podendo ocorrer em sua forma livre, glicosilada ou acilada. Os principais flavonoides presentes na uva e no vinho são as antocianinas, flavanóis e flavonóis (Figura 1), responsáveis pela cor e estrutura dos vinhos (JACKSON, 2008; GARRIDO; BORGES, 2013).

As antocianinas são as principais substâncias fenólicas responsáveis pela cor da uva e do vinho, uma característica que é determinada pela sua estrutura química, e o seu grau de hidroxilação, metilação e/ou glicosilação. Em uvas estas moléculas são extraídas das cascas, e em algumas variedades da polpa (HE et al., 2010; RIVERO-PÉREZ; MUÑIZ; GONZÁLES-SANJOSÉ, 2008). As antocianinas diferem do restante do grupo dos flavonoides por absorverem fortemente na região visível do espectro e pela capacidade de formar estruturas ressonantes mediante a variação do pH (MAZZA; MINIATI, 1993). A estrutura das antocianinas consiste em dois anéis aromáticos ligados a um anel heterocíclico oxigenado, o cátion *flavílium* (Figura 1A) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). As principais antocianinas da uva tinta são as delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, malvidina e pelargonidina, que diferem entre si pelos radicais de substituição no anel lateral. Em variedades de *Vitis vinifera* L., os pigmentos majoritários são na forma de 3-glicosídeos, sendo a malvidina-3-glicosídeo o pigmento predominante. Em outras variedades americanas e híbridas, as antocianinas 3,5-diglicosídeo são as antocianinas majoritárias (JACKSON, 2008; GONÇALVES; ROCHA; COIMBRA, 2012). As formas glicosiladas podem apresentar-se livres ou esterificados com alguns ácidos, como o ácido acético, *p*-cumárico, ferúlico e caféico (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; GARRIDO; BORGES, 2013).

A biossíntese de antocianina na uva é normalmente influenciada por uma série de fatores ambientais, tais como a exposição à luz solar, irradiação ultravioleta, temperatura do ar e precipitação, assim como a variedade de uva e as práticas vitícolas utilizadas (HE et al., 2010). Outro fator importante é o pH, que exerce forte influência na cor dos vinhos tintos jovens, uma vez que antocianinas encontram-se em equilíbrio dinâmico de cores entre diferentes formas moleculares. O baixo pH do vinho contribui para que as antocianinas estejam em equilíbrio,

conferindo a cor vermelho brilhante ao vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; GARRIDO; BORGES, 2013). Durante a vinificação e envelhecimento, as antocianinas são progressivamente convertidas em pigmentos mais estáveis, associados a importantes mudanças na cor e estabilidade dos vinhos (POZO-BAYÓN et al., 2004). Estudos demonstram que o contato com as borras de levedura durante o envelhecimento de vinhos espumantes podem induzir uma diminuição da concentração de antocianinas devido à adsorção destas moléculas (MAZAUIC; SALMON, 2005).

Os flavanóis presentes nas uvas são representados principalmente pelos flavan-3-ols e as proantocianidinas (Figura 1Be 1C). A composição de flavanóis nas uvas é dependente do desenvolvimento da planta em diferentes climas e das condições genéticas. A síntese destas substâncias ocorre principalmente nas sementes, iniciando após o período de floração, mas também podem ser encontrados em alta concentração nas cascas das uvas. Em geral, maior teor destas substâncias é encontrado no período da *véraison* (momento de troca de cor da baga da uva), depois diminui lentamente até o final da maturação (GONZÁLEZ-MANZANO; RIVAS-GONZALO; SANTOS-BUELGA, 2004; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Os flavan-3-ols encontrados na natureza podem ser classificados como catequinas e galocatequinas. Na uva e no vinho são divididos em catequinas ((+)catequina e (-)epicatequina) e galocatequinas ((+)galocatequina e (-)epigalocatequina), conforme número de hidroxilas presentes no anel lateral (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008). Os principais flavan-3-ols monômeros dos vinhos são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, sendo a catequina o composto majoritário. Os flavan-3-ols são extraídos da casca e semente das uvas durante a vinificação, no envelhecimento passam por transformações estruturais por meio de reações de oxidação e condensação. As interações destas moléculas com as antocianinas por meio dos processos de copigmentação são consideradas cruciais para a definição e a estabilidade da cor dos vinhos tintos, bem como o seu envolvimento na formação de novos pigmentos durante o envelhecimento do vinho, como as proantocianidinas (GONZÁLEZ-MANZANO; RIVAS-GONZALO; SANTOS-BUELGA, 2004; JACKSON, 2008).

As proantocianidinas das uvas e dos vinhos, também conhecidas como taninos condensados, são oligômeros e polímeros de catequina e epicatequina. Estas substâncias são formadas durante o processo de envelhecimento dos vinhos devido às suas capacidades de oxidação, condensação e polimerização (JACKSON, 2008; GARRIDO; BORGES,

2013), sendo que a proantocianidina B1 segundo estudos de Gris et al. (2011b) é majoritária em vinhos tintos, em vinhos espumantes as procianidinas B1, B2 e B4 foram detectadas pela primeira vez (STEFENON et al., 2010). Conforme o grau de polimerização das proantocianidinas a adstringência é diminuída, e a associação destas moléculas com as antocianinas causa alterações da cor durante o período de armazenamento dos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007). A interação entre substâncias de cor e proantocianidinas é extremamente importante, pois pode influenciar a estabilidade de cor e melhorar a qualidade sensorial. Alguns trabalhos (GUADALUPE; PALACIOS; AYESTARAN, 2007; GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008; GUADALUPE; MARTÍNEZ; AYESTARÁN, 2010; RODRIGUES et al., 2012) mostraram que não houve interação positiva entre manoproteínas adicionadas no vinho com a cor, e que a interação entre manoproteínas e proantocianidinas resultou na diminuição do teor de taninos do vinho, contribuindo para uma diminuição na adstringência do vinho.

Os flavonóis, outra classe de substâncias oriundas da biossíntese dos flavonoides, são caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição três (Figura 1D). Essas substâncias encontram-se na forma de glicosídeos em plantas, e nas uvas são sintetizados principalmente nas cascas. Os principais flavonóis da uva e do vinho são a quercetina, campferol e miricetina (JACKSON, 2008; GARRIDO; BORGES, 2013). Outros flavonóis como a isorhamnetina, a laricitrina e a siringetina já foram detectados em uvas e vinhos (MATTIVI et al., 2006; FANG et al., 2007). Os flavonóis exercem papel importante na proteção contra radiação ultravioleta, eles também participam da interação planta patógeno. A biossíntese dessas moléculas acontece na floração e continua após a *véraison*, sendo influenciada pela exposição à luz. Desta forma, cada variedade possui um perfil específico, que está relacionada à quantidade encontrada nas cascas das uvas, fertilização nitrogenada, fatores genéticos e ambientais (MATTIVI et al., 2006; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009), e principalmente as práticas de vinificação como a maceração, que influenciam a extração dos flavonóis por estarem localizados na casca (MAKRIS; KALLITHRAKA; KEFALAS, 2006). Em relação à cor dos vinhos, flavonóis são pigmentos amarelos que influenciam diretamente para a cor dos vinhos brancos. Os flavonóis estão envolvidos na estabilização da cor dos vinhos tintos por processo de copigmentação com as antocianinas (BOULTON, 2001; JACKSON, 2008). São substâncias bioativas amplamente distribuídos em plantas

alimentares (MATTIVI et al., 2006), relacionados com a capacidade antioxidante de vinhos (GRIS et al., 2013; BURIN et al., 2014).

1.2.6.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico, caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Dentre os derivados hidroxibenzoicos presentes na uva e no vinho destacam-se os ácidos gálico, protocateico, vanílico, siríngico, *p*-hidroxibenzoico e elágico, que possuem estrutura comum C6-C1 (Figura 1E); enquanto os derivados hidroxicinâmicos, são moléculas com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6-C3), sendo os mais comuns os ácidos caféico, *p*-caftárico, ferúlico e *p*-cumárico (Figura 1F) (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006b; GARRIDO; BORGES, 2013).

Nas uvas e nos vinhos, os principais ácidos fenólicos são os ácidos hidroxicinâmicos, que se encontram na casca e polpa, sob a forma de ésteres tartáricos. Nas uvas são sintetizados a partir da fenilalanina, via ácido chiquímico, sendo o aminoácido convertido até ácido cinâmico por ação enzimática (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Estas substâncias têm um papel importante nas reações de oxidação que conduzem ao escurecimento dos mostos e vinhos (JACKSON, 2008), principalmente em variedades brancas devido ao ácido caftárico, e ainda em variedades tintas participam de reações com antocianinas, agindo como copigmentos (GARRIDO; BORGES, 2013). O ácido caftárico é o mais comum em uvas brancas, um *orto*-difenol, considerado o principal substrato para a enzima polifenoloxidase (PPO) (JACKSON, 2008). Esta substância está presente em grandes concentrações em mostos e vinhos, especialmente em vinhos de variedades brancas, e muitas vezes desempenha um papel importante no processo de escurecimento oxidativo dos mesmos (FERREIRA-LIMA et al., 2016a).

Os ácidos hidroxibenzoicos encontram-se nas uvas na forma de ésteres e, durante a elaboração e armazenamento do vinho sofrem uma hidrólise lenta, sendo liberados na forma livre (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006). Dentre estes, o ácido gálico é descrito como o mais importante nos vinhos, uma vez que é precursor dos taninos hidrolisáveis (GARRIDO; BORGES, 2013). Em vinhos que passam por envelhecimento em madeira por longos períodos, o ácido gálico pode ser liberado de seus precursores que são extraídos do barril de carvalho para vinho (ALCALDE-EON et al., 2014). Estudos demonstram que o tempo

de envelhecimento é um fator importante que modifica as concentrações desta substância nos vinhos (FERREIRA-LIMA et al., 2016a) e vinhos espumantes (STEFENON et al., 2014). O que pode estar relacionado com às enzimas liberadas durante a autólise da levedura, uma vez que estas podem estar envolvidas na hidrólise dos taninos (POZO-BAYÓN et al. 2009).

1.2.6.3 Estilbenos e tirosol

Os estilbenos constituem um grupo de moléculas que são caracterizados pela estrutura básica com união de dois anéis por uma dupla ligação, para formar o 3,5,4'-trihidroxiestilbeno. Esta ligação dupla é responsável pelas duas formas isômeras *cis* e *trans*-resveratrol presentes em diversas espécies de plantas (Figura 1G e 1H) (STERVBO; VANG; BONNESEN, 2007; GAMBINI et al., 2013). O *trans*-resveratrol é o estilbeno mais abundante em uvas, enquanto que o isômero *cis* é formado durante o processo de vinificação. O *trans*-resveratrol do vinho é proveniente das uvas, principalmente de suas cascas, por isso vinhos tintos apresentam maiores concentração em relação a vinhos brancos e rosés (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012; GAMBINI et al., 2013). Esse isômero é produzido por plantas em resposta à infecção por fungos, ou por exposição ao estresse como tratamentos químicos pós-colheita (luz ultravioleta e aplicação de herbicidas), atuando como fitoalexinas em resposta a estes fatores causado pelo meio ambiente. A presença de resveratrol em uvas e vinhos varia muito conforme os fatores agrônômicos e climáticos, região geográfica, variedade de uva, condições de estresse da planta e práticas enológicas empregadas. É encontrado em concentrações variadas nos vinhos (STERVBO; VANG; BONNESEN, 2007; GARRIDO; BORGES, 2013) e em menores concentrações em vinhos espumantes brancos e rosés, provavelmente atribuído a etapa de maceração durante o processo de elaboração (POZO-BAYÓN et al. 2003; STEFENON et al., 2014).

Estudos demonstram que as mudanças das concentrações de *trans*-resveratrol dos vinhos espumantes ao longo do envelhecimento sobre borra podem estar relacionadas à liberação de enzimas da parede celular de levedura durante o processo de autólise, provavelmente devido à atividade da β -Glucosidase (STEFENON et al. 2014). O *trans*-resveratrol é muito estudado devido a seu potencial benéfico para a saúde humana (GRIS et al., 2011a; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012; TOALDO et al., 2016a).

O metabolismo das leveduras pode formar outros derivados fenólicos, como o tirosol (Figura 1I). O tirosol [2-(4-hidroxifenil)etilalcool] é um metabólito secundário da tirosina [3-(4-hidroxifenil)-alanina] formado pelas leveduras durante a fermentação alcoólica. Sua síntese está diretamente relacionada com a quantidade de aminoácidos presentes no mosto (JACKSON, 2008). Estudos realizados por Gris et al. (2011a) demonstram a grande importância dos teores de estilbenos e tirosol no aumento da capacidade antioxidante e diminuição dos níveis lipídicos promovido pelo consumo do vinho, evidenciando importante atividade biológica desta molécula.

1.2.7 Evolução da composição fenólica dos vinhos ao longo do envelhecimento

A composição fenólica do vinho é conhecida por mudar ao longo do processo de maturação e envelhecimento, o que está principalmente associada com a presença de ésteres hidroxicinâmicos, antocianidinas e taninos. Estas alterações são refletidas na cor e adstringência do produto final (HE et al., 2010; GARRIDO; BORGES, 2013). O processo de maturação é responsável pelas modificações químicas que ocorrem antes do engarrafamento do vinho, influenciadas pela adição de produtos enológicos, trasfegas, fermentação malolática, condições de estocagem e processos de estabilização. O envelhecimento é caracterizado por modificações químicas que ocorrem após o engarrafamento do vinho, ou seja, alterações que ocorrem no vinho durante o período de armazenamento em garrafa ou passagem em barricas de carvalho, e no vinho espumante durante o envelhecimento sobre borra (JACKSON, 2008).

Em geral, a composição química do vinho é mais complexa que a da uva, devido à formação de uma grande variedade de novas substâncias. Essas moléculas formadas, participam de numerosas reações químicas como a copigmentação, cicloadição, polimerização e oxidação (MAZZA; MINIATI, 1993; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Reações enzimáticas e não-enzimáticas iniciam logo após a prensagem da uva e continuam durante a fermentação e envelhecimento dos vinhos, contribuindo para mudanças importantes nas propriedades sensoriais dos mesmos, e à obtenção de uma grande diversidade de novas estruturas fenólicas. O escurecimento não-enzimático pode acontecer tanto em mostos e vinhos, como resultado da fermentação e de reações químicas que prevalecem no vinho (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; LI; GUO; WANG, 2008).

1.2.7.1 Reações de oxidação das substâncias fenólicas

O escurecimento não-enzimático no vinho pode ocorrer por meio de diferentes vias relacionadas com os fenóis, e uma delas é a oxidação dos fenólicos e subsequente polimerização dos produtos oxidados. Outras vias envolvem reações de polimerização entre fenóis e outras substâncias presentes no vinho, incluindo a condensação com acetaldeído ou ácido glioxílico (derivados a partir da oxidação de ácido tartárico) (LI; GUO; WANG, 2008). Durante o processo de oxidação não-enzimático no vinho, como a auto-oxidação dos *orto*-difenois e *orto*-quinonas correspondentes, o peróxido de hidrogênio pode ser formado como subproduto, o qual pode participar da continuação da oxidação de outras substâncias fenólicas (JACKSON, 2008; HE et al., 2010).

Em vinhos, moléculas com estrutura *orto*-difenois, principalmente o ácido caféico e seus ésteres, catequina, epicatequina, antocianinas e seus derivados, e ácido gálico, são considerados como sendo os mais susceptíveis à oxidação (LI; GUO; WANG, 2008). Os níveis de flavan-3-óis são mais significativamente correlacionada com o grau de escurecimento dos vinhos tintos (GONZÁLEZ-MANZANO et al., 2009), assim como os ácidos hidroxicinâmico (ácidos caftárico e caféico), são propensos a reações de oxidação enzimáticas durante o processo de vinificação e armazenamento, formando *orto*-quinonas e favorecendo o escurecimento de vinhos brancos (FERREIRA-LIMA et al., 2016a; FERREIRA-LIMA et al., 2016b). Segundo Moreno-Arribas e Polo (2009) a cor do vinho branco é fortemente influenciada pela presença de ácidos hidroxicinâmicos. As reações oxidativas são uma preocupação importante na indústria do vinho, uma vez que levam ao escurecimento excessivo, com consecutiva perda de substâncias de aroma e cor, alterando as principais características sensoriais dos vinhos durante o armazenamento, bem como dos vinhos espumantes ao longo do envelhecimento sobre borra. Os ácidos hidroxicinâmicos como o ácido *trans*-caftárico, ácido *cis*-caftárico e o ácido 2-Sglutationilcaftárico foram o grupo de fenóis mais suscetíveis à oxidação durante o envelhecimento sobre borra de vinhos espumantes Cava (IBERN-GÓMEZ et al., 200). Estudos de Serra-Cayueta et al. (2013) demonstram que os fenólicos *trans*-cutárico e *p*-cumárico aumentaram suas concentrações com o tempo de envelhecimento sobre borra, e correlacionaram-se significativamente com o escurecimento, indicando a importância destes fenóis no processo de oxidação. A adição de glutatona nos vinhos espumantes, um potente antioxidante, pode ser uma alternativa

para prevenir as reações de oxidação que conduzem ao escurecimento dos vinhos espumantes durante o armazenamento (WEBBER et al., 2017).

1.2.7.2 Reações químicas das antocianinas

As principais reações químicas (Figura 2) que envolvem as antocianinas durante a vinificação incluem as reações de condensação direta entre antocianinas-flavanóis e antocianinas-antocianinas, reações de condensação mediada por acetaldeído entre antocianinas-flavanóis e antocianinas-antocianinas e reações que levam a formação das proantocianidinas (RIBÉREAU-GAYON, 2006b; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). As antocianinas também podem reagir com substâncias de baixa massa molar para a obtenção de uma família de derivados de pigmento de antocianinas, as piranoantocianinas (MARQUEZ; SERRATOSA; MERIDA, 2013).

As reações de condensação das antocianinas ocorrem quando à uma diminuição gradual das antocianinas monoméricas durante o envelhecimento de vinhos, que podem ser de forma direta com flavonoides, principalmente com os flavanols (na posição C4), ou por um intermediário como o acetaldeído, obtendo-se ambas as espécies dímeras e poliméricas (LI; GUO; WANG, 2008; GARRIDO; BORGES, 2013).

Nas reações de condensação direta, as antocianinas e flavanóis são os precursores atuando tanto como eletrófilos como nucleófilos. Dois mecanismos diferentes têm sido propostos para este tipo de reação, levando a formação de antocianina-flavanol e flavanol-antocianina (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). O mecanismo proposto para a reação de condensação direta entre antocianina-flavanol começa com o ataque nucleofílico na posição C8 e C6 do flavanol para a posição C4 da antocianina na forma de cátion *flavilium*, dando origem tanto a um flaveno, que pode ser oxidado para o correspondente e voltar a forma colorida e, finalmente desidratado a um sal xantilium de cor amarela, ou a um produto incolor. No caso da reação de condensação direta flavanol-antocianina, os carbocátions gerados a partir da clivagem da ligação interflavânica das procianidinas atuam como agentes eletrofílicos, e reagem como sítios nucleofílico na posição C6 ou C8 da antocianina na sua forma hidratada hemiacetal, dando origem a um dímero incolor que pode ser desidratado para a forma correspondente *flavilium* de coloração vermelha (SOMERS, 1971; RIBÉREAU-GAYON, 2006b; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

O acetaldeído presente no vinho é derivado do metabolismo de leveduras durante a fermentação ou envelhecimento biológico, da

com as antocianinas durante a maturação, dada a sua natureza polimérica. Proantocianidinas são divididas em dois grupos: procianidinas e prodelfinidinas, sendo as procianidinas mais susceptíveis de polimerização devido sua estrutura química. As procianidinas são constituídas por unidades de catequina [(+)-catequina e (-)-epicatequina] e as prodelfinidinas apresentam unidades de galocatequina [(+)-galocatequina e (-)-epigalocatequina]. As procianidinas e prodelfinidinas hidrolisam a cianidina e delfinidina, e são conhecidas por serem as proantocianidinas mais abundantes em uvas e vinhos (GONZÁLEZ-MANZANO et al., 2009; GARRIDO; BORGES, 2013).

Durante o envelhecimento dos vinhos, em meio ácido e sem a presença de oxigênio, as procianidinas são capazes de formar carbocátions que são susceptíveis para reagir com outras procianidinas e aumentar o seu grau de polimerização. Este tipo de polimerização ocorre em vinho após algumas semanas de envelhecimento, e sua duração depende da presença de catequina e de seus polímeros (procianidinas) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008). As proantocianidinas desempenham um papel importante no processo de envelhecimento dos vinhos devido à sua capacidade de oxidação, condensação e polimerização (GARRIDO; BORGES, 2013).

As reações de antocianinas com outras substâncias de baixa massa molecular, tais como o ácido pirúvico, vinilfenol, ácido glioxílico, venilcatecol, acetona e 4-vinilguaiacol causam alterações estruturais nas antocianinas e formação de novos derivados de pigmentos, como as piranoantocianinas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010). As piranoantocianinas são produzidos durante os processos de fermentação e envelhecimento dos vinhos. Estas substâncias são responsáveis por uma mudança gradual da cor vermelho-púrpura para tons de laranja (MARQUEZ; SERRATOSA; MERIDA, 2013; PINA; OLIVEIRA; FREITAS, 2015).

A estrutura geral das piranoantocianinas inclui um anel adicional formado entre a hidroxila do C5 e C4 do anel pirano da antocianina. Vitisins são as principais piranoantocianinas dos vinhos, as quais são formadas a partir da reação entre as antocianinas com ácido pirúvico, ácido acetoacético e com acetaldeído (PINA; OLIVEIRA; FREITAS, 2015). As piranoantocianinas também podem ser formadas pelas reações entre as antocianinas e vinil substâncias (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Nestas reações, os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico, caféico e ferúlico), agindo entre si ou por meio de seus produtos de descarboxilação, como os 4-venilfenóis, podem reagir de forma covalente com as antocianinas, dando origem a pigmentos de piranoantocianinas

designados de pinotins, de coloração vermelho-amarelada (MORATA; GONZÁLEZ; SUÁREZ-LEPE, 2007; MARQUEZ; SERRATOSA; MERIDA, 2013).

1.3 ELABORAÇÃO DE VINHO ESPUMANTE

Devido ao processamento específico, os vinhos espumantes pertencem à categoria de “vinhos especiais”, uma vez que exigem métodos de elaboração diferenciados. Dependendo da tecnologia de produção, podem ser classificados em vinhos espumantes produzidos por uma tradicional refermentação em garrafa, e em vinhos espumantes produzidos por fermentação secundária em tanques hermeticamente fechados (TORRESI; FRANGIPANE; ANELLI, 2011). Os diferentes métodos de produção mais utilizados no Brasil são o Tradicional, Charmat e Asti, que podem exibir diferentes características químicas e sensoriais (JACKSON, 2008; STEFENON et al., 2010; CALIARI et al., 2015).

No que diz respeito ao método Tradicional, também conhecido como clássico ou *Champenoise*, a fermentação secundária ocorre na garrafa, seguida por um envelhecimento prolongado em contacto com as borras das leveduras (*sur lies*). Este método foi desenvolvido na região de Champagne, França, sendo também utilizado em outras regiões vitivinícolas do mundo (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Seu processo de elaboração está apresentado na Tabela 1.

O processo de produção de vinhos espumantes pelo método Tradicional começa pela obtenção do vinho base a partir de uvas brancas (*blanc de blancs*) ou de uvas brancas e tintas (*blanc de noirs*). O vinho base branco é obtido sem o contato do mosto com a casca das uvas. Porém, em vinho base rosé, deve-se ter atenção especial como o tempo e a intensidade do processo de maceração, para evitar a extração de pigmentos em excesso das cascas das uvas (JACKSON, 2008).

As uvas são colhidas com base na sanidade e qualidade das plantas. Após colheita, as uvas são desengaçadas e o mosto produzido é separado por frações correspondente as prensagens utilizadas; a primeira fração com pequeno volume geralmente é desprezada por conter poeira e resíduos, e por se encontrar normalmente oxidada; a próxima fração com maior volume é denominada de *curvé* e as últimas frações de *taille* (JACKSON, 2008; CALIARI; ROSIER; BORDIGNON-LUIZ, 2013).

Tabela 1. Etapas de elaboração do vinho espumante pelo método Tradicional.

Primeira fermentação – elaboração do vinho base	<ol style="list-style-type: none"> 1. Colheita das uvas 2. Desengace e prensagem das uvas para obtenção do mosto 3. Adição de dióxido de enxofre 4. Clarificação 5. Adição de leveduras selecionadas 6. Fermentação com temperatura controlada (15-17 °C) 7. Adição de coadjuvante de clarificação 8. Estabilização tartárica 9. Elaboração do <i>cuvée</i> (<i>Assemblage</i> vinhos de diferentes variedades de uvas) 10. Filtração 11. Adição do licor de <i>tirage</i> (sacarose, leveduras selecionadas, nutrientes e clarificante) ao vinho base e envase
Segunda fermentação	<ol style="list-style-type: none"> 12. Envelhecimento na garrafa (autólise das leveduras) 13. <i>Remuage</i> (giro de um quarto da garrafa em pupitre e inclinação deste para facilitar sedimentação das leveduras no gargalo) 14. Degola (remoção das leveduras da garrafa) 15. Adição de licor de expedição 16. Rolhamento, engaiolamento e embalagem final.

Fonte: Adaptado de Moreno-Arribas; Polo (2009); Caliani; Rosier e Bordignon-Luiz (2013).

A *cuvée* é obtida após o descarte do início da prensagem, extrai principalmente a parte central da polpa da baga, que possui maior concentração de açúcares e acidez em ácido tartárico. A parte mais próxima às sementes apresenta elevada acidez em ácido málico e baixa concentração de açúcares, e a parte próxima à casca apresenta elevada concentração de açúcar, e baixa acidez, devido à salificação dos ácidos orgânicos; ambos são extraídos no final da prensagem, formando o *taille* (ZOECKLEIN, 2002; RIBÉREAU-GAYON, 2006a; CALIARI; ROSIER; BORDIGNON-LUIZ, 2013). Após a prensagem, o mosto que escorre da prensa é adicionado de dióxido de enxofre, as doses empregadas para a primeira fração do mosto estão entre 40 a 50 mg L⁻¹ para o *cuvée* e de 50 a 80 mg L⁻¹ para os *tailles*. A quantidade adicionada depende da sanidade e grau de maturação da uva (JACKSON, 2008).

A clarificação é realizada imediatamente, visando à redução da concentração de proteínas e substâncias fenólicas que podem escurecer o vinho base, porém, uma redução drástica de proteínas promove a redução da efervescência e da persistência da espuma. O agente clarificante mais

utilizado é a bentonita, também podem ser usadas enzimas péclicas, agentes a base de sol de sílica e gelatina para auxiliarem neste processo. Após a etapa de clarificação são adicionadas leveduras selecionadas ao mosto e a fermentação primária é efetuada em tanques de aço inox com temperatura controlada entre 15 e 17 °C. O acompanhamento do processo é feito pela densidade e açúcar residual inferior a 2 g L⁻¹. Depois de finalizada a primeira fermentação, procede-se a estabilização tartárica à frio do vinho base visando à precipitação dos ácidos orgânicos salificados (ZOECKLEIN, 2002; RIBÉREAU-GAYON, 2006a; JACKSON, 2008; CALIARI; ROSIER; BORDIGNON-LUIZ, 2013).

Posteriormente, é adicionado no vinho base o licor de *tirage*, elaborado com *cuvée*, composto de leveduras selecionadas, coadjuvantes de clarificação, nutrientes e sacarose na proporção necessária para atingir no final da fermentação pressão de seis atmosfera (atm). O *cuvée* é preparado por misturas diferentes variedades de uvas, sendo indispensável para manter a qualidade sensorial na degustação (RIBÉREAU-GAYON, 2006a; JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Após a adição do licor de *tirage* o vinho base é envasado e colocado o opérculo plástico na garrafa (*bidule*) como invólucro para a sedimentação das leveduras durante a *remuage* (rotação garrafa), fechando com a tampa de metal (corona). A fermentação na garrafa é denominada de segunda fermentação que da origem ao vinho espumante (TORRESI; FRANGIPANE; ANELLI, 2011). A segunda fermentação é de aproximadamente 60 dias, até a completa fermentação, à temperatura constante de 11 a 17 °C. A baixa temperatura durante a fermentação é um fator de qualidade na elaboração de vinhos espumantes, especialmente na persistência do *perlage* e coroa (resultante do desprendimento das bolhas de gás carbônico), no aumento gradual de dióxido de carbono e teor alcoólico dos vinhos espumantes. Terminada essa etapa, a garrafa apresenta uma pressão interna de aproximadamente 6 atm (ZOECKLEIN, 2002; RIBÉREAU-GAYON, 2006a).

Após a segunda fermentação as garrafas são colocadas nos pupitres, em temperatura de 15 a 18 °C (CALIARI; ROSIER; BORDIGNON-LUIZ, 2013). As leveduras que sedimentam entram em processo de autólise. Este processo consiste na hidrólise de biopolímeros intracelulares por enzimas endógenas de leveduras que resultam na liberação de várias substâncias intracelulares como aminoácidos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos, derivados de ácidos nucléicos e lipídios que têm um efeito positivo na qualidade do vinho espumante, especialmente durante o envelhecimento sobre borra (*sur lies*)

(ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006; PÉREZ-SERRADILLA; LUQUE DE CASTRO, 2008).

O período de envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes dura no mínimo nove meses, dependendo da legislação do país produtor, o Brasil ainda não possui uma legislação específica para o tempo de envelhecimento sobre borra. Durante o período de envelhecimento é realizado o procedimento de *remuage*. Os sedimentos de leveduras que se formaram são depositados no bico da garrafa, e removidos pela etapa de degola (*dégorgement*), que consiste em colocar as garrafas de bico para baixo e congelar o pescoço. A degola expele o bloco de gelo contendo os sedimentos que se formam no bico da garrafa, em razão da pressão interna, e faz com que a tampa de metal seja removida. Em seguida, é adicionado imediatamente o licor de expedição (álcool vínico, *blend*, vinhos diversos ou pelo próprio espumante e açúcar em quantidade específica para determinar o tipo de produto), a garrafa é fechada com rolha de cortiça e gaiola de arame, rotulada e embalada para a expedição. De acordo com a legislação brasileira, a quantidade de açúcar diferencia os vinhos espumantes, assim estes são classificados da seguinte forma: nature, até 3 g L⁻¹ de glicose; extra-brut, 3-8 g L⁻¹ de glicose; brut 8-15 g L⁻¹ de glicose; seco ou sec, 15-20 g L⁻¹ de glicose; demi-sec, meio-seco ou meio-doce 20-60 g L⁻¹ de glicose; doce, >60 g L⁻¹ de glicose (BRASIL, 2014).

1.3.1 Autólise das leveduras e as alterações na composição química dos vinhos espumantes

O processo de autólise ocorre durante a elaboração do vinho espumante pelo método Tradicional. É um processo irreversível que ocorre geralmente no final da fase estacionária de crescimento, associado com a morte celular (apoptose), e envolve as enzimas hidrolíticas que agem na liberação citosólica (peptídeos, ácidos graxos, nucleotídeos e aminoácidos) e da parede celular (glucanas, manoproteínas) para o vinho (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006).

A autólise é um processo lento e começa quando açúcares e outros nutrientes são consumidos, em função disso, as células das leveduras começam a utilizar suas próprias reservas de energia, compostas de glicogênio e outros elementos, quando essas reservas se tornam insuficientes para a exigência de energia da célula, inicia a degeneração celular e a autólise é desencadeada (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; TORRESI; FRANGIPANE; ANELLI, 2011). A autólise é um processo natural lento, especialmente se as condições auto catalíticas de pH 3 e 4,

temperatura de envelhecimento de 15 °C, e a presença de etanol (12 % v/v), não são as condições ideais (KEMP et al., 2015). Esse processo começa apenas depois de dois a quatro meses após a conclusão da segunda fermentação. Porém, o tempo antes do início da autólise varia muito, dependendo da composição do vinho base, tempo de envelhecimento e a cepa de levedura utilizada (ZOECKLEIN, 2002; ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006). As proteases são as principais enzimas hidrolíticas envolvidas na autólise. Nos vinhos espumantes, a atividade proteolítica diminui durante a fase inicial de fermentação em garrafa e nos meses seguintes, após nove meses de fermentação e envelhecimento, aumenta gradualmente (KEMP et al., 2015).

Quatro passos são descritos para a autólise da levedura: primeiro as estruturas celulares degradam, libertando proteases no citosol; as proteases liberadas são ativadas devido a degradação dos inibidores citoplasmáticos específicos; no terceiro passo, ocorre a hidrólise de polímeros intracelulares, com acúmulo de produtos na parede da célula; e finalmente, os produtos hidrolisados são liberados da parede celular (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Diferentes eventos ocorrem durante a autólise das leveduras, embora esse processo ainda não esteja completamente elucidado. A Figura 3 representa as alterações morfológicas e bioquímicas durante a autólise das leveduras no vinho espumante segundo Alexandre e Guilloux-Benatier (2006). Imediatamente após a segunda fermentação alcoólica, as células das leveduras são alongadas e ovoides, e a parede celular é grossa e lisa. Dentro da célula um grande vacúolo é rodeado por corpos esféricos (Figura 3a). Entre o terceiro e sexto mês de autólise das leveduras (Figura 3b), a célula e o vacúolo são menores, corpos esféricos são distribuídos por todo o vacúolo, a parede celular é áspera, pequenas rugas ou dobras podem ser observadas. Entre o nono e décimo segundo mês de autólise (Figura 3c), a parede celular degrada, explicando o seu menor tamanho, e as células de levedura perderam a maior parte de seu conteúdo citoplasmático. As alterações bioquímicas durante a autólise e envelhecimento dos espumantes, são principalmente relacionadas com a liberação ou absorção de aminoácidos. Depois de três a seis meses, devido a hidrólise de peptídeos e proteínas, o meio continua enriquecido com aminoácidos, e há um aumento significativo de polissacarídeos da parede celular. Começa a degradação da membrana plasmática, com liberação de lipídios para o meio. Entre o nono e décimo segundo mês, a concentração

de alguns aminoácidos diminui. Polissacarídeos da parede celular, lipídios e ribonucleotídeos aumentam ligeiramente.

Figura 3. Representação das alterações morfológicas e bioquímicas durante autólise da levedura no vinho espumante. Imediatamente após a segunda fermentação (a), entre 3 e 6 meses (b) e entre 9 e 12 meses (c).

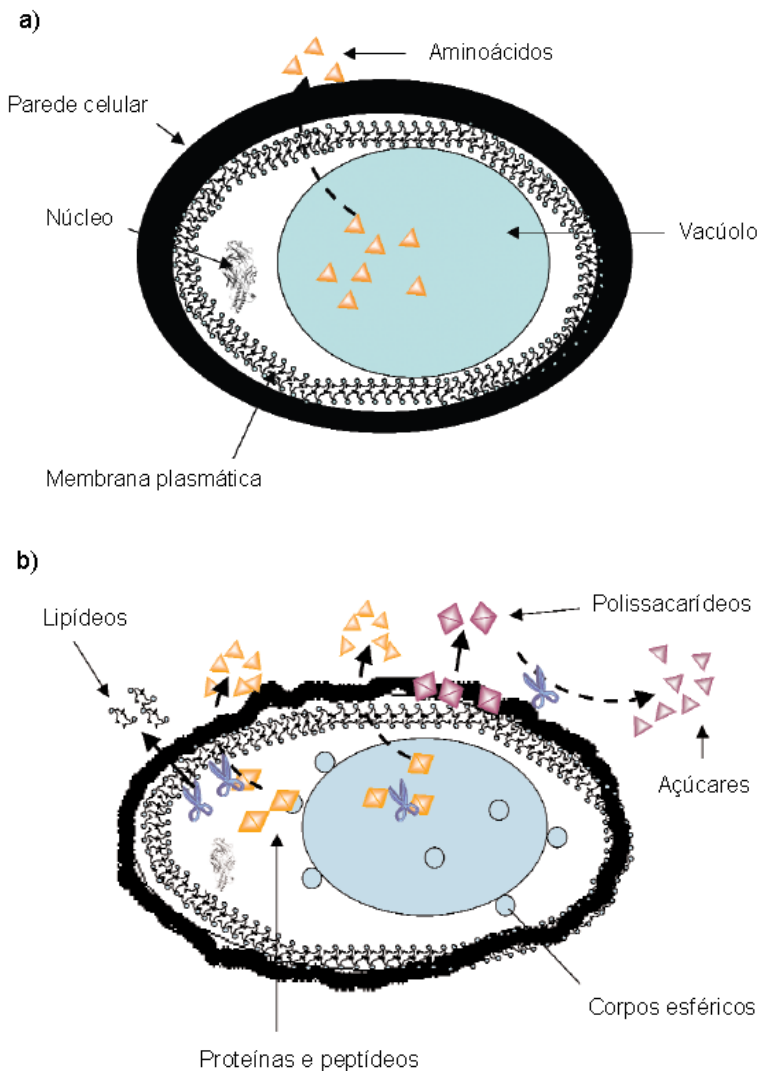
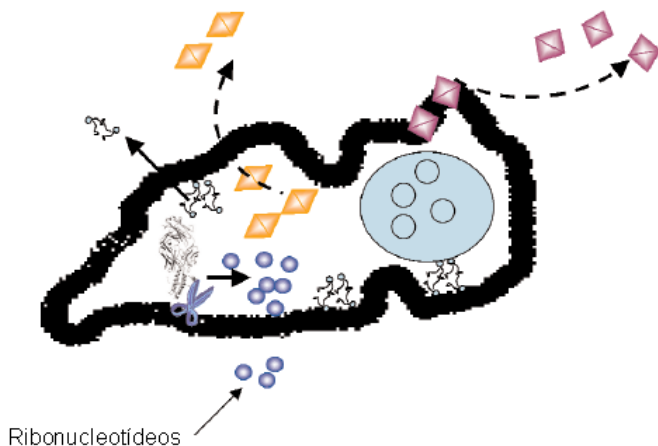


Figura 3. (Continuação)

c)



Fonte: Alexandre e Guilloux-Benatier (2006).

Muitos estudos realizados com vinhos espumantes têm como objetivo as análises das substâncias que podem ser liberadas pelas leveduras durante o processo de autólise, estas substâncias resultam em modificações na composição nitrogenada (MORENO-ARRIBAS et al., 1998; MORENO-ARRIBAS et al., 2000; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002), na composição fenólica (SERRA-CAYUELA et al., 2013; STEFENON et al., 2014; PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015), nos polissacarídeos, especialmente as manoproteínas (NÚÑEZ et al., 2006; JUEGA et al., 2014), e outras macromoléculas durante o envelhecimento sobre borra (*sur lies*) (POZO-BAYÓN et al., 2009; TORRESI; FRANGIPANE; ANELLI, 2011).

As mudanças na composição nitrogenada de vinhos espumantes durante o envelhecimento sobre borra são considerados os melhores marcadores da atividade proteolítica da levedura (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; POLO, 2000; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002). Estudo de Martínez-Rodríguez et al. (2002) demonstraram que a cepa de levedura usada influencia o teor de aminoácidos livres e peptídeos. No processo de elaboração do vinho espumante, peptídeos e aminoácidos são considerados as principais substâncias nitrogenadas liberadas durante a autólise (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Os aminoácidos prolina, lisina, leucina, ácidos glutâmico, isoleucina, fenilalanina, serina e valina

aumentam sua concentração significativamente durante a segunda fermentação em garrafa dos vinhos espumantes (ZOECKLEIN, 2002). Este enriquecimento do meio com aminoácidos pode melhorar o potencial de aroma dos vinhos espumantes. Os aminoácidos são os precursores de algumas substâncias voláteis por reações de desaminação e descarboxilação (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006; KEMP et al., 2015).

A parede celular das leveduras é fonte de polissacarídeos, a qual é constituída por colóides glicídicos, essencialmente β -glucanos e manoproteínas. Os componentes macromoleculares da parede celular da levedura, particularmente as manoproteínas, são parcialmente liberados durante a fermentação alcoólica e, especialmente, no tempo em contato sobre borra durante o envelhecimento. A quantidade de manoproteínas liberada pela levedura da parede celular depende da levedura utilizada na fermentação e das condições de envelhecimento, como o tempo de contato com a levedura e a temperatura (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). As manoproteínas constituem de 25 a 50 % da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). A maioria das manoproteínas liberadas durante a fermentação é excretada pela levedura como material da parede celular não utilizado. Elas também são liberadas devido à autólise enzimática da levedura *endo*- β -(1,3) e *endo*- β -(1,6)-glucanases (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Nos vinhos espumantes, as manoproteínas são responsáveis pelos atributos de efervescência, e ainda podem se ligar a importantes substâncias voláteis, tais como β -ionona, hexanoato de etila e octanol, bem como aumentar a volatilidade de outros, como octanoato de etila e decanoato de etila (JACKSON, 2008). Estudos demonstraram que a inoculação de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* aumenta a extração das manoproteínas da parede celular, produzindo mudanças na composição volátil e fenólica dos vinhos e melhorando as características sensoriais (CARRASCOSA et al., 2012; JUEGA et al., 2014).

As borras das leveduras podem adsorver e liberar diferentes substâncias fenólicas durante a autólise, que modificam o perfil fenólico dos vinhos espumantes (PÉREZ-SERRADILLA; LUQUE DE CASTRO, 2008; STEFENON et al., 2014). Estudos demonstram que a absorção de substâncias fenólicas pela borra das leveduras podem levar a um decréscimo do potencial antioxidante dos espumantes, possivelmente devido a modificação estrutural da parede celular da levedura e a oxidação dos grupos ativos (GALLARDO-CHACÓN et al., 2010; STEFENON et al., 2010). A atividade antioxidante da superfície da borra

foi influenciada pelas características do vinho base, sendo inversamente relacionada ao período de envelhecimento sobre borra (GALLARDO-CHACÓN et al., 2010). Além disso, as interações entre borra do vinho e as substâncias fenólicas também podem influenciar a capacidade de consumo de oxigênio durante o envelhecimento. Este comportamento é devido à forte interação entre os polifenóis adsorvidos e lipídeos da membrana celular, o que diminui a acessibilidade das espécies reativas ao oxigênio com os lipídeos da membrana, tais como ácidos graxos insaturados e esteróis, que são implicados a serem os principais alvos das reações de oxidação em borra de levedura durante o envelhecimento dos espumantes (SALMON; FORNAIRON-BONNEFOND; MAZAURIC, 2002).

O envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes pode aumentar os níveis de resveratrol em espumantes elaborados pelo método *Champenoise*, provavelmente devido a atividade da β -glicosidase, que foi constante ao longo do tempo, mostrando uma relação estreita com todos os polifenóis estudados (resveratrol, piceid, tirosol e os ácidos gálico, caféico e ferúlico) (STEFENON et al., 2014). Pozo-Bayón et al. (2003), verificaram que substâncias fenólicas como o *trans*-resveratrol e os ácidos *trans-p*-cumárico, *trans*-caftárico, *cis*-cutárico, *trans*-cutárico, *cis-p*-cumárico, *cis*-caftárico, siríngico e triptofol, não mudaram significativamente suas concentrações durante o envelhecimento sobre borra. Serra-Cayueta et al. (2013) observaram que o teor de polifenóis não muda com o envelhecimento sobre borra, apesar de algumas moléculas individuais, como o *trans*-cutárico e *p*-cumárico evoluir com o tempo, os quais foram correlacionados com o escurecimento dos vinhos espumantes. As borras das leveduras possuem afinidade com as antocianinas, sendo que a quantidade de antocianinas absorvida varia conforme temperatura, estrutura e concentração inicial do pigmento, bem como do SO₂ e pH. A absorção deste pigmento pode ser de acordo com a polaridade de sua molécula, sendo da seguinte ordem: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, bem como, de acordo com a cepa da levedura utilizada durante a fermentação (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Pozo-Bayón et al. (2004), demonstraram que, após a segunda fermentação e durante o envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes, ocorreram mudanças quantitativas na concentração de antocianinas e piranoantocianinas, acarretando em uma maior estabilidade de cor dos espumantes. Os autores sugerem que as enzimas liberadas durante a autólise das leveduras poderiam estar envolvidas na hidrólise de polímeros de antocianinas-taninos.

Manoproteínas liberadas durante a autólise das leveduras podem interagir com substâncias fenólicas (PÉREZ-SERRADILLA; LUQUE DE CASTRO, 2008). Pesquisas demonstram que a adição de manoproteínas comerciais em vinhos mostrou uma diminuição da estabilidade de cor e aumento da adstringência (GUADALUPE; MARTÍNEZ; AYESTARÁN, 2010; RODRIGUES et al., 2012). Resultados contraditórios foram observados em estudos de Ribeiro et al. (2014) que demonstraram que manoproteínas comerciais podem interagir com os fenólicos e proporcionar um efeito protetor na cor de vinhos brancos, diminuindo o potencial de escurecimento. Estudos de Wu, Guan e Zhong (2015) demonstram que a adição de manoproteínas em solução de antocianina melhora a estabilidade térmica das antocianinas a pH 7,0, a estabilidade de cor e mantém a capacidade antioxidante após o aquecimento, sugerindo que as antocianinas formam complexos com manoproteínas provavelmente devido à atração hidrofóbica. Segundo Pérez-Serradilla e Luque De Castro (2008), o envelhecimento na presença de borra produz espumantes menos adstringentes, com uma cor ligeiramente menos intensa, mas nuances menos amarelados. Estudos de Stefenon et al. (2014) demonstram que o tempo de envelhecimento sobre borra modificou os polifenóis estudados, sendo mais importante do que o próprio método de elaboração do espumante (*Champenoise* ou *Charmat*). As implicações existentes sobre os fenólicos para a qualidade do vinho indicam que evidências mais concretas sobre as modificações destas substâncias durante o envelhecimento sobre borra são necessárias.

1.4 AGENTES ENOLÓGICOS

A tecnologia de elaboração de vinhos está evoluindo continuamente, e existe uma tendência crescente pelo consumo de vinhos de grande potencial de envelhecimento, com alto teor de substâncias fenólicas, melhores características sensoriais e aromáticas, bem como uma melhor estabilidade em garrafa. Para satisfazer as preferências do consumidor atual, o uso de diferentes práticas enológicas, como adição de agentes enológicos, estão em grande expansão na enologia. A adição de produtos enológicos, na forma de taninos enológicos comerciais ou na forma de sementes de uva, agentes estabilizadores como a goma arábica e manoproteínas extraídas da parede celular das leveduras, agentes clarificantes, entre outros, visam melhorar a qualidade química dos vinhos e têm sido amplamente utilizados na vinificação baseada na experiência prática.

O tanino para uso enológico está definido pelo Codex Enológico Internacional da Organização Mundial da Uva e do Vinho (OIV), por meio da resolução OENO 574-2017 (OIV, 2018). Os aditivos a base de tanino comercialmente disponíveis apresentam várias formas, sendo que os mais utilizados são os “taninos enológicos”. Os taninos mais utilizados em enologia provêm de diferentes fontes, como os da própria semente e casca da uva, e a partir de materiais vegetais, notadamente de várias espécies de carvalho (*Quercus* sp.), de castanheira (*Castanea sativa* Mill.), de quebracho (*Schinopsis* sp.), de mirabolano (*Terminalia chebula*), de tara (*Caesalpinia spinosa*), entre outras (HARBERTSON et al., 2012).

Os taninos exógenos podem ser adicionados por uma série de razões, em diferentes etapas da vinificação e em várias formas. A maior utilização de taninos é realizada normalmente nas fases pré-fermentativa e pós-fermentativa (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007; PARKER et al., 2007; LARCHER et al., 2015). Desta forma, um número crescente de preparações comerciais de taninos exógenos estão sendo disponibilizados no mercado para adição durante o processo de vinificação, visando sua contribuição para a qualidade do vinhos (HARBERTSON et al., 2012; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017). Como parte das práticas enológicas, o uso do tanino pode facilitar a precipitação de matérias proteicas em excesso e auxiliar nos processos de clarificação. Outros motivos de interesse na aplicação destes agentes têm sido descritos, dadas suas propriedades antioxidantes, na melhoria da composição fenólica, proteção oxidativa, na estabilização da cor em vinhos tintos e na melhoria de aromas (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007; ALCALDE-EON et al., 2014; LARCHER et al., 2015; GHANEM et al., 2017; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017). Embora, um efeito antagonista em relação a utilização de taninos também foram relatados, principalmente relacionados a diminuição das antocianinas e cor dos vinhos (PARKER et al., 2007; GHANEM et al., 2017), demonstrando que a adição de taninos enológicos pode ter efeitos limitados na qualidade do vinho (HARBERTSON et al., 2012), uma vez que os seus impactos estão intimamente relacionados às características individuais de cada produto, a dose aplicada e o tipo do vinho (GHANEM et al., 2017; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017). Em vinhos espumantes, a nosso conhecimento, os efeitos do uso de taninos enológicos ainda não são relatados na literatura.

As manoproteínas são um dos principais grupos polissacarídicos presentes no vinho (RIBÉREAU-GAYON, 2006b), e estão sendo cada vez mais utilizados como agentes enológicos aos vinhos, sendo que

existem vários produtos enológicos comerciais que contêm manoproteínas na sua composição. As manoproteínas são extraídas da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por métodos físico-químicos ou enzimáticos, e apresentam diferentes estruturas dependendo da sua massa molar, grau e tipo de glicosilação e sua carga. A Codex Enológico Internacional da Organização Mundial da Uva e do Vinho, resolução OENO 26-2004 (OIV, 2018), permite sua utilização na vinificação.

As manoproteínas são conhecidas pelas suas propriedades enológicas positivas, e dependendo de como são extraídas, apresentam diferentes atividades na estabilização tartárica e/ou protéica (OIV, 2018). A interação entre manoproteínas e substâncias fenólicas do vinho é um assunto de grande interesse, uma vez que estudos mostraram o possível impacto na estabilidade de cor (ESCOT et al., 2001; DEL BARRIO-GALÁN et al., 2012), uma melhoria nas características sensoriais, como a redução da adstringência do vinho tinto (GUADALUPE; PALACIOS; AYESTARAN, 2007; GUADALUPE; MARTÍNEZ; AYESTARÁN, 2010; DEL BARRIO-GALÁN et al., 2012), melhoria na composição volátil (PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015a), e na qualidade da espuma dos vinhos espumantes (MORENO-ARRIBAS et al., 2000; NÚÑEZ et al., 2006).

Alguns estudos demonstraram que não houve interação positiva entre manoproteínas e moléculas de cor (GUADALUPE; PALACIOS; AYESTARAN, 2007; GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008; GUADALUPE; MARTÍNEZ; AYESTARÁN, 2010; RODRIGUES et al., 2012). Outros demonstram uma redução de alguns fenólicos e antocianinas em vinhos tintos (GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008; GUADALUPE; MARTÍNEZ; AYESTARÁN, 2010) e vinhos tintos espumantes (PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015a) adicionados de manoproteínas. Em geral, o uso de preparações comerciais ricas em manoproteínas e polissacarídeos para melhorar as propriedades tecnológicas e sensoriais dos vinhos tranquilos tem sido amplamente estudada. No entanto para vinhos espumantes, poucos estudos avaliam o efeito do uso de manoproteínas comerciais sobre as propriedades químicas e sensoriais (NÚÑEZ et al., 2006; PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015a).

A goma arábica é um exsudado gomoso proveniente dos troncos e dos ramos de árvores africanas da família das *Mimosáceas*, principalmente, das espécies *Acácia senegal*, *Acácia seyal* e *Acácia vereck*. É proveniente de uma mistura complexa e variável de polissacarídeos e glicoproteínas de arabinogalactanas, sendo classificada como um

polissacárideo arabinogalactana altamente ramificado, com uma massa molar elevada. A sua composição é de aproximadamente 95 % de uma fração polissacarídica e 1 a 2 % de uma fração proteica. Além disso, contém cerca de 3 % a 4 % de substâncias associadas, como polifenóis e minerais (sais de cálcio, sódio, potássio e magnésio). A fração polissacarídica é constituída por uma cadeia linear de β [1,3]-galactose. Na posição [1,6], está a cadeia ramificada com cadeias laterais de galactose e arabinose (IMESON, 2010). A goma arábica é comumente utilizada como um agente encapsulante, conhecida por sua capacidade de formar emulsões estáveis em uma ampla gama de acidez e condições iônicas. Estudos de Guan e Zhong (2015) avaliaram a estabilidade térmica das antocianinas a pH 5,0 em soluções adicionadas de goma arábica antes e após o aquecimento, e observaram uma melhora na estabilidade das antocianinas com goma arábica, sugerindo sua aplicação durante o processamento térmico dos alimentos com pH em torno de 5,0.

Na enologia, o Codex Enológico Internacional da Organização Mundial da Uva e do Vinho (OIV), resolução OENO 27/2000, permite o uso de goma arábica na vinificação, sendo que a dose utilizada não pode exceder $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (OIV, 2018). No entanto, a nosso conhecimento, escassos são os estudos que demonstraram o efeito potencial da adição da goma arábica como agente enológico durante a vinificação de vinhos e vinhos espumantes. Para tanto, o conhecimento dos efeitos da goma arábica sobre as alterações na composição química dos vinhos, particularmente em vinhos espumantes, são importantes para a pesquisa em enologia, uma vez que este agente enológico pode melhorar a estabilidade dos vinhos em garrafa (IMESON, 2010; OIV, 2018).

1.5 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é uma técnica que utiliza os sentidos humanos para medir e avaliar as características e propriedades dos alimentos e bebidas. O uso da análise sensorial associada aos resultados de análises químicas é amplamente empregado para determinar a qualidade de um vinho e identificar características típicas, sejam elas oriundas da variedade de uva, das regiões de produção ou dos processos de vinificação utilizados (FALCÃO et al., 2007; PANCERI et al., 2015; SOKOLOWSKY; ROSENBERGER; FISCHER, 2015).

A visão, o olfato, o paladar e o tato são os sentidos empregados na análise sensorial. A avaliação de um vinho começa pelo exame visual, o qual permite caracterizar o aspecto do vinho quanto a intensidade de cor, tonalidade e limpidez. O exame olfativo é o segundo passo, considerado

um dos mais complexos e de grande variação entre os avaliadores. São descritas a intensidade, a clareza e a qualidade dos aromas, bem como os aromas específicos de cada vinho. O exame gustativo corresponde a última etapa da análise sensorial. Os quatro gostos elementares do vinho são: doce (dado pelo álcool, glicerol e açúcares), o ácido (originário dos ácidos orgânicos livres), o salgado (dado pelos ácidos salificados) e o amargo (proveniente dos fenólicos, principalmente dos taninos). Essa etapa descreve as características de acidez, doçura, amargor, persistência e equilíbrio do vinho na boca, bem como as sensações táteis do álcool, temperatura e adstringência (JACKSON, 2002).

Para interpretação da análise sensorial diversas técnicas são utilizadas. A análise descritiva qualitativa (ADQ) é uma técnica de análise sensorial que proporciona uma descrição completa de todas as propriedades sensoriais de um produto, sendo um dos métodos mais utilizados (JACKSON, 2002; TORRENS et al., 2010). Outros testes descritivos como tempo-intensidade, tempo de dominância das sensações, testes de escala, perfil de textura e sabor também são empregados para avaliar a interatividade dos atributos percebidos durante a degustação (SOKOLOWSKY; ROSENBERGER; FISCHER, 2015).

A análise sensorial de vinhos espumante possui particularidades, como a efervescência e a espuma que são importantes fatores a serem considerados na aparência, além da coloração de amarelo-palha a ouro brilhante, salmão claro a rosado e ausência de turbidez (JACKSON, 2002). Em estudos realizados por Martínez-Rodríguez e Polo (2000), os atributos avaliados na qualidade da espuma do vinho espumante foram: quanto à sua formação (abundante, normal ou escassa); quanto à espuma (cobrindo total ou parcialmente a superfície do vinho espumante); quanto ao número de núcleos de bolhas (maior ou menor que cinco ou nenhuma); quanto ao tamanho das bolhas (pequena, média ou grande); quanto à efervescência (rápida, normal ou lenta), demonstrando que a qualidade do vinho espumante está associada com a efervescência e com a espuma. Ainda, a presença de espuma deve ser abundante, cobrindo totalmente a superfície do vinho espumante, e as bolhas devem ser pequenas com efervescência rápida.

Na parte olfativa deve apresentar um aroma complexo com notas de tostado, características varietais pouco intensas e gustativamente uma acidez pronunciada mas não agressiva, ausência de adstringência e amargor, e sabor persistente e equilibrado (JACKSON, 2002). Torrens et al. (2010) encontraram no perfil sensorial de vinhos espumantes notas frutadas, tostado, láctico, doce e levedura, e um aumento acentuado das notas de tostado, láctico, doce e levedura com o tempo de envelhecimento

sobre borra. Ganss et al. (2011) na avaliação sensorial descritiva de vinhos espumantes demonstraram um aumento das notas aromáticas frutadas que lembram pêsego e melão, juntamente com um aumento da concentração de derivados de precursores voláteis.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE AGENTES ENOLÓGICOS SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE VINHOS ESPUMANTES ROSÉ DURANTE O ENVELHECIMENTO SOBRE BORRA E ARMAZENAMENTO COMERCIAL

Saionara Sartor^a, Vívian Maria Burin^a, Carolina Pretto Panceri^b, Robson Rodrigo dos Passos^a, Vinícius Caliari^c, Marilde T. Bordignon-Luiz^a

^aDepartamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Urupema, Urupema, Brasil.

^cEmpresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Videira, Santa Catarina, Brasil.

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Sartor, S.; Burin, V.M.; Panceri, C.P.; Dos Passos, R.R.; Caliari, V. e Bordignon-Luiz, M.T., disponível em *Journal of Food Science*, v.83, p.2790-2801, 2018. DOI: 10.1111/1750-3841.14379. Reproduzido com permissão da Wiley Online Library.

RESUMO

O efeito dos agentes enológicos, goma arábica e tanino, adicionados em duas diferentes etapas de elaboração de vinhos espumantes rosé (adição no vinho base e no vinho espumante após a etapa de degola) sobre a evolução da composição fenólica durante o envelhecimento sobre borra e armazenamento comercial foram estudados pela primeira vez. Os vinhos espumantes foram monitorados durante 12 meses de envelhecimento sobre borra (*sur lie*, com borras) e armazenamento comercial (armazenamento em garrafa, sem borras), quanto ao perfil de polifenóis, intensidade de cor e capacidade antioxidante. Pode-se observar que a etapa de adição dos agentes enológicos influenciou a composição fenólica e a capacidade antioxidante dos vinhos espumantes rosé. As maiores alterações foram observadas no experimento com a adição dos agentes enológicos no vinho base, que aumentou significativamente as concentrações de *trans*-resveratrol, ácidos gálico e elágico, catequina, quercetina e miricetina. A adição dos agentes enológicos após a etapa de degola apresentou menor influência sobre os fenólicos dos vinhos espumantes. O ácido cafeico, ácido *trans*-caftárico, catequina, tirosol e ácido gálico foram os polifenóis mais abundantes nos vinhos espumantes rosé. As práticas de vinificação avaliadas neste estudo compreendem uma abordagem importante para a melhoria e/ou manutenção dos polifenóis, de acordo com as práticas de vinificação, além de fornecer novos conhecimentos sobre a evolução dos vinhos espumantes rosé.

Palavras-chave: Envelhecimento *sur lie*. Armazenamento comercial. Polifenóis. Vinhos espumantes. Tecnologias de vinificação.

1 INTRODUÇÃO

Os vinhos espumantes elaborados pelo método Tradicional (*Champenoise*), apresentam propriedades químicas e sensoriais diferenciadas devido as transformações biológicas que ocorrem durante a segunda fermentação em garrafa. Após esta segunda fermentação alcoólica ocorre o processo de autólise, seguido de um envelhecimento prolongado em contato com as borras das leveduras (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Durante a autólise das leveduras, as substâncias liberadas contribuem para a composição química e sensorial dos vinhos espumantes (MARTÍNEZ-LAPUENTE et al., 2018). Entre essas substâncias, destacam-se os polifenóis, que estão diretamente relacionados aos atributos de qualidade. Os polifenóis são essenciais para a evolução dos vinhos, pois participam de reações químicas como a copigmentação, polimerização e oxidação, podendo ser transformados em novas substâncias ou degradadas durante o processo de fermentação e posterior armazenamento (MAZAURIC; SALMON, 2005; MARQUEZ; SERRATOSA; MERIDA, 2013).

Durante a autólise, as borras das leveduras podem adsorver ou liberar diferentes polifenóis, como ésteres hidroxicinâmicos, antocianinas e taninos, que podem modificar o perfil fenólico e a capacidade antioxidante dos vinhos espumantes durante o envelhecimento (GALLARDO-CHACÓN et al., 2010; SERRA-CAYUELA et al., 2013; STEFENON et al., 2014). Diferentes características químicas e sensoriais podem ser evidenciadas nos vinhos espumantes durante o envelhecimento biológico e envelhecimento pelo armazenamento comercial, uma vez que no envelhecimento biológico o vinho está em contato com as borras das leveduras, enquanto no armazenamento comercial as borras foram removidas (SERRA-CAYUELA et al. 2013). É muito importante que as vinícolas tenham conhecimento das etapas do envelhecimento, a fim de compreender como o vinho espumante se desenvolve durante o processo de envelhecimento sobre borra e armazenamento comercial subsequente.

No Brasil, ainda não existe legislação específica que estabelece o tempo mínimo de contato com as borras de levedura para a produção de vinhos espumantes. Pesquisas recentes mostraram que vinhos espumantes brasileiros apresentam grande potencial quanto às características químicas e sensoriais (CALIARI et al., 2014; STEFENON et al., 2014). Portanto, novas estratégias de vinificação podem ser desenvolvidas para promover a melhoria da qualidade química com base na experiência prática.

O conhecimento da relação entre a qualidade de um determinado vinho e suas substâncias fenólicas continua sendo um grande desafio na pesquisa em enologia. As tecnologias de vinificação, como a aplicação de diferentes agentes enológicos, como taninos e enzimas durante o processo de vinificação, têm sido foco de pesquisas científicas com o objetivo de melhorar a composição química e sensorial dos vinhos (GAMBUTI et al., 2007; BAIANO et al., 2009; MULERO et al., 2011; ALCALDE-EON et al., 2014; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017). Estes estudos já demonstraram a eficiência do uso de tanino na vinificação de vinhos, especialmente relacionado à composição fenólica. Os vinhos tratados com tanino enológico apresentaram os maiores valores de fenólicos totais, ácido gálico, ácido siríngico, flavanóis, como (+)-catequina, (-)-epicatequina e galatos de proantocianidina, diidroflavonóis, e oligômeros, monômeros e polímeros de flavanóis (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007; ALCALDE-EON et al., 2014; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017). No entanto, a nosso conhecimento, não existem estudos que demonstrem o efeito da goma arábica como agente enológico, a Codex Enológico Internacional da Vinha e do Vinho (OENO 27/2000) permite a sua utilização (OIV, 2018). Deve-se notar que o uso de tanino e goma arábica durante diferentes etapas do processo de vinificação de vinhos espumantes rosé não foram estudados anteriormente. Além disso, estudos comparando a evolução destes vinhos espumantes durante o processo de envelhecimento biológico e armazenamento comercial ainda não são encontrados na literatura. Neste contexto de buscar novas estratégias na elaboração de vinhos espumantes, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da adição de agentes enológicos em duas etapas da elaboração de vinhos espumantes rosé (adição no vinho base e no vinho espumante após a etapa de degola) sobre as alterações das substâncias fitoquímicas. Os vinhos espumantes foram monitorados durante 12 meses de envelhecimento sobre borra (*sur lie*, com borras) e de envelhecimento em armazenamento comercial (armazenamento em garrafa, sem borras).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES QUÍMICOS

Os padrões das substâncias fenólicas, Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) e ABTS [2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Todos os solventes cromatográficos eram de grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os outros reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

Para os experimentos, foram utilizados os agentes enológicos comerciais goma arábica STABIVIN SP (Laffort®, Bordeaux, França) e tanino Bouquet R36 (Perdomini-IOC®, Verona, Itália). A goma arábica adicionada foi uma solução de gomas selecionadas e purificadas. O tanino enológico comercial adicionado foi uma mistura de taninos condensados extraídos da madeira de frutos vermelhos, que apresenta em sua composição mais de 65 % do total de substâncias fenólicas (principalmente ácido gálico), de acordo com as informações do fabricante. Estes produtos foram selecionados porque foram desenvolvidos especificamente para a produção de vinho espumante sendo amplamente utilizados comercialmente.

2.2 PROCEDIMENTO DE VINIFICAÇÃO

Os experimentos foram realizados com vinhos espumantes rosé produzidos pelo método Tradicional com variedades de uvas Cabernet Sauvignon e Merlot (safra 2015) cultivadas em Marari, estado de Santa Catarina, Brasil (27° 12'24"S, 51° 06'96"W; altitude 1059 m), região classificada com clima moderadamente frio pelo Índice Winkler (SARTOR et al., 2017b). Toda a produção do vinho espumante foi realizada em uma planta piloto. O mosto foi obtido a partir do desengace, esmagamento e prensagem das uvas. A maceração pré-fermentativa do mosto foi de 12 horas a uma temperatura controlada (10 °C). Para elaboração do vinho base, ao mosto foram adicionadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (25 g hL⁻¹, Zymaflore Spark®, Laffort) e ativante de fermentação (35 g hL⁻¹, Fermoplus Milenium®, AEB Group). Após a fermentação alcoólica o vinho base foi clarificado com bentonite (12 g hL⁻¹), e o anidrido sulfuroso livre foi corrigido para 20 mg L⁻¹. Para a segunda fermentação em garrafa, foi adicionado ao vinho base levedura *Saccharomyces cerevisiae* (25 g hL⁻¹, Fermol Perlage®, AEB Group, Brescia, Itália) e sacarose (24 g L⁻¹). O experimento foi dividido em dois grupos:

- I. *Envelhecimento sur lie*: os agentes enológicos goma arábica (0,15 mL L⁻¹) e tanino (0,10 g L⁻¹) foram adicionados no vinho base, antes da segunda fermentação em garrafa, de acordo com as recomendações do fabricante, um tratamento foi mantido como controle. Os vinhos foram armazenados em caves na posição horizontal com temperatura controlada (16 °C) até a segunda fermentação ser completada. Após dois meses, os vinhos espumantes foram estabilizados a frio, degolados e analisados (tempo zero: T0). As garrafas restantes foram

mantidas em contato com a borra (16 °C) e aos 4 (T4), 6 (T6), 9 (T9) e 12 (T12) meses de envelhecimento sobre borra, a mesma operação foi realizada.

- II. *Armazenagem comercial*: para este estudo após a segunda fermentação ser completada, e no final de 9 meses de envelhecimento sobre borra, os vinhos espumantes foram estabilizados a frio e degolados. Os agentes enológicos, goma arábica (0,15 mL L⁻¹) e tanino (0,10 g L⁻¹) foram adicionados nos espumantes logo após a degola de acordo com a recomendação do fabricante, um tratamento foi mantido como controle. Depois da adição dos agentes, as garrafas foram vedadas com rolha de cortiça e gaiola, e analisadas após 2 meses (tempo zero: T0). As garrafas restantes foram armazenadas em condições de adega (16 °C) e aos 4 (T4), 6 (T6), 9 (T9) e 12 (T12) meses de armazenagem em garrafa foram analisadas.

2.3 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, INTENSIDADE DE COR E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os vinhos espumantes foram analisados utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U 2900, CA, USA). O teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) foi determinado pelo método do pH diferencial, e os resultados expressos em mg L⁻¹ de malvidina-3-glicosídeo (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). A intensidade de cor (IC) foi determinada com leituras a 420, 520 e 620 nm (GLORIES, 1984). A capacidade antioxidante dos vinhos espumantes foi estudada avaliando o efeito de eliminação de radicais livres com o radical ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), os resultados foram expressos em equivalente Trolox (mmol TEAC L⁻¹ vinho) (RE et al., 1999). Os polifenóis, estimados como capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (FC), foram determinados de acordo com o método de Singleton e Rossi (1965), os resultados foram expressos em mg L⁻¹ de ácido gálico.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), conectado a um detector de arranjo fotodiodo (HPLC-DAD). As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa (C18) (4,6 × 250 mm, 5 µm) (Shimadzu). Neste estudo, dezesseis substâncias fenólicas pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, estilbenos, tirosol e flavonóides (flavonoides e flavonóis) foram quantificados nas amostras de vinhos espumantes rosé utilizando o método descrito por Burin et al. (2014), com modificações.

Em relação aos ácidos hidroxibenzóicos (ácidos gálico, protocateico, serínico, vanílico e elágico), o gradiente de eluição foi modificado para 0 % a 35 % de solvente B (80 % de acetonitrila com 20 % de solvente A; solvente A foi água ultrapura:ácido acético (98:2 v/v)) durante 35 min, 35-0 % B durante 3 min. Para a preparação da amostra, extração líquido-líquido foi realizada conforme descrito por Burin et al. (2014). As antocianinas monoglicosídeos individuais (malvidina, cianidina, delfinidina e peonidina-3-*O*-glicosídeo) foram determinadas de acordo com Revilla et al. (1999).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Utilizou-se o programa Statistica (versão 8.0; StatSoft Inc., Tulsa, EUA) para realizar a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey HSD ($p < 0,05$). Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para associar a composição fenólica e a capacidade antioxidante dos vinhos espumantes. Para fins exploratórios, a análise de componentes principais (ACP) foi o método quimiométrico utilizado para analisar os resultados, seguindo as orientações descritas por Granato et al. (2018). Para a análise de ACP, cargas fatoriais superiores a 0,60 e autovalores superiores a 1,0 foram utilizadas para projetar as amostras no plano bidimensional.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DOS AGENTES ENOLÓGICOS NA COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DOS VINHOS ESPUMANTES

3.1.1 Ácidos fenólicos

Neste estudo observou-se que a etapa de adição dos agentes enológicos (vinho base ou após a degola do vinho espumante) influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o teor de ácidos fenólicos dos vinhos espumantes rosé (Tabela 1 e 2). Independente do agente enológico adicionado, goma arábica ou tanino, as substâncias mais abundantes nos vinhos espumantes foram os ácidos gálico, cafeico e *trans*-caftárico. Para os ácidos hidroxibenzóicos, a adição de tanino enológico no vinho base (antes da segunda fermentação) contribuiu para maiores concentrações dos ácidos gálico e elágico nas amostras em todos os tempos avaliados (T0 até T12) quando comparado a amostra controle e também em relação às amostras adicionadas de goma arábica. Outros estudos também

observaram que a adição de tanino enológico aumentou a concentração de ácido gálico em vinhos tintos em relação a amostra controle (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007; BAIANO et al., 2009; ALCALDE-EON et al., 2014). Este resultado pode estar relacionado com as enzimas que são liberadas durante a autólise das leveduras, uma vez que estas poderiam estar envolvidas na hidrólise dos taninos (POZO-BAYÓN et al., 2009). Além disso, pode-se observar que os vinhos espumantes adicionados de tanino apresentaram maior soma total de todos os ácidos hidroxibenzóicos avaliados neste estudo em relação as amostras controle e aquelas adicionada de goma arábica (25,67 mg L⁻¹ (T0); 26,05 mg L⁻¹ (T4); 27,06 mg L⁻¹ (T6); 34,51 mg L⁻¹ (T9); 35,56 mg L⁻¹ (T12)). Realizando a análise estatística de correlação, foram observadas correlações positivas significativas ($r \geq 0,85$; $p < 0,05$) entre ácidos benzóicos (ácidos gálico, protocateico, vanílico e elágico) e a capacidade antioxidante (método ABTS) para os vinhos espumantes após 12 meses de envelhecimento sobre borra. Essa forte capacidade antioxidante dos ácidos hidroxibenzóicos, pode ser atribuído ao poder nucleofílico em resposta dependente das posições dos três grupos hidroxila no anel (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Com relação as amostras de vinhos espumantes adicionadas de agentes enológicos após a etapa de degola (experimento armazenagem comercial) (Tabela 2), os resultados demonstram que os agentes enológicos não apresentaram influência significativa na concentração dos ácidos hidroxibenzóicos em relação a amostra controle na maioria dos tempos avaliados. Estes resultados indicam que o efeito dos agentes enológicos sobre esta classe de substâncias foi dependente da etapa de vinificação em que os agentes enológicos foram adicionados.

Tabela 1. Evolução durante o envelhecimento sobre borra (*sur lies*) dos polifenóis dos vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos

Substâncias	Envelhecimento <i>sur lies</i>								
	T0			T4			T6		
	Controle	Goma arábica	Tanino	Controle	Goma arábica	Tanino	Controle	Goma arábica	Tanino
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>									
Gálico	13,08±0,07 ^a	12,99±0,01 ^a	15,33±0,09 ^b	12,05±0,07 ^a	12,58±0,01 ^b	15,30±0,12 ^c	12,60±0,03 ^a	12,87±0,04 ^b	15,31±0,15 ^c
Protocateico	4,07±0,02 ^a	4,14±0,03 ^a	3,89±0,03 ^b	4,24±0,19 ^a	4,15±0,05 ^a	4,06±0,14 ^a	4,36±0,07 ^b	4,23±0,03 ^a	4,25±0,04 ^{ab}
Vanílico	3,61±0,19 ^a	3,86±0,03 ^{ab}	3,89±0,01 ^b	3,76±0,34 ^a	3,89±0,01 ^a	4,01±0,19 ^a	3,86±0,07 ^a	3,85±0,02 ^a	4,05±0,01 ^b
Serínico	0,51±0,01 ^a	0,54±0,01 ^b	0,58±0,02 ^c	0,52±0,01 ^a	0,55±0,01 ^b	0,61±0,02 ^c	0,61±0,02 ^a	0,65±0,01 ^{ab}	0,69±0,02 ^b
Elágico	0,90±0,01 ^b	0,50±0,01 ^a	1,98±0,04 ^c	0,87±0,01 ^b	0,34±0,01 ^a	2,07±0,05 ^c	0,17±0,01 ^a	0,19±0,01 ^a	2,76±0,02 ^b
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>									
Cafeico	30,91±0,15 ^c	28,00±0,03 ^a	30,24±0,01 ^b	29,52±0,15 ^a	21,08±0,03 ^b	29,90±0,34 ^a	19,05±0,02 ^b	15,95±0,02 ^a	20,77±0,04 ^c
<i>trans</i> -caftárico	0,82±0,01 ^a	1,74±0,01 ^c	1,19±0,02 ^b	5,29±0,01 ^b	6,21±0,01 ^c	4,54±0,08 ^a	7,11±0,06 ^b	7,50±0,05 ^c	5,63±0,03 ^a
<i>p</i> -cumárico	5,47±0,03 ^c	5,17±0,02 ^a	5,41±0,01 ^b	5,39±0,02 ^a	5,07±0,02 ^b	5,38±0,01 ^a	4,74±0,04 ^a	4,46±0,05 ^b	4,81±0,03 ^a
Ferúlico	1,52±0,03 ^c	1,31±0,01 ^a	1,46±0,02 ^b	1,40±0,01 ^c	1,22±0,02 ^a	1,37±0,01 ^b	0,91±0,03 ^b	0,79±0,02 ^a	0,98±0,01 ^c
<i>Flavonóis (mg L⁻¹)</i>									
Campferol	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹
Quercetina	1,60±0,01 ^b	1,55±0,01 ^a	2,06±0,02 ^c	1,53±0,01 ^b	1,47±0,01 ^a	1,99±0,02 ^c	0,97±0,01 ^b	1,01±0,01 ^a	1,02±0,01 ^a
Miricetina	1,32±0,01 ^a	1,32±0,02 ^a	1,69±0,01 ^b	1,16±0,01 ^a	1,30±0,02 ^b	1,55±0,01 ^c	0,53±0,01 ^a	0,72±0,02 ^b	0,75±0,01 ^c
<i>Flavanóis (mg L⁻¹)</i>									
(+)-catequina	3,70±0,09 ^a	8,47±0,21 ^c	5,10±0,19 ^b	5,39±0,09 ^{ab}	5,94±0,64 ^b	4,26±0,66 ^a	5,74±0,03 ^b	6,27±0,04 ^c	4,75±0,03 ^a
(-)-epicatequina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>									
<i>trans</i> -resveratrol	2,32±0,01 ^a	3,31±0,01 ^c	3,12±0,01 ^b	2,38±0,01 ^a	3,28±0,02 ^c	3,21±0,02 ^b	2,66±0,01 ^a	2,72±0,01 ^b	2,83±0,01 ^c
Tirosol	99,43±0,75 ^c	95,64±0,10 ^a	98,12±0,13 ^b	91,51±0,75 ^a	91,68±3,86 ^a	94,16±4,08 ^a	93,06±0,06 ^c	89,73±0,15 ^a	91,69±0,19 ^b
<i>Antocianinas 3-O-monoglicosídeos (mg L⁻¹)</i>									
Delfinidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Cianidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Peonidina	1,02±0,02 ^a	1,08±0,01 ^b	1,04±0,02 ^{ab}	1,00±0,01 ^b	0,80±0,02 ^a	0,79±0,01 ^a	0,77±0,01 ^a	0,84±0,01 ^b	0,79±0,02 ^a
Malvidina	18,86±0,15 ^a	20,16±0,04 ^c	19,66±0,08 ^b	19,20±0,13 ^a	21,46±0,15 ^c	20,16±0,14 ^b	19,67±0,10 ^a	21,77±0,02 ^c	20,78±0,06 ^b

Tabela 1. (Continuação)

Substâncias	Envelhecimento <i>sur lies</i>					
	T9			T12		
	Controle	Goma arábica	Tanino	Controle	Goma arábica	Tanino
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>						
Gálico	13,35±0,28 ^b	12,62±0,09 ^a	18,56±0,11 ^c	11,89±0,04 ^a	13,33±0,11 ^b	16,30±0,18 ^c
Protocateico	5,48±0,05 ^a	5,57±0,02 ^b	5,69±0,03 ^c	2,50±0,02 ^a	4,43±0,01 ^b	5,21±0,25 ^c
Vanílico	3,95±0,02 ^b	3,83±0,02 ^a	4,20±0,02 ^c	4,71±0,05 ^b	5,63±0,02 ^a	5,64±0,04 ^a
Serínico	0,66±0,04 ^a	0,78±0,01 ^b	0,92±0,05 ^c	0,98±0,01 ^a	1,44±0,02 ^c	1,06±0,03 ^b
Elágico	3,37±0,13 ^a	4,09±0,08 ^b	5,14±0,06 ^c	3,97±0,04 ^a	4,13±0,09 ^a	7,35±0,19 ^b
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>						
Cafeico	16,83±0,04 ^b	14,31±0,05 ^a	18,33±0,26 ^c	15,39±0,03 ^c	12,72±0,02 ^a	15,22±0,06 ^b
<i>trans</i> -caftárico	7,22±0,03 ^a	7,10±0,05 ^a	5,18±0,07 ^b	7,51±0,03 ^c	7,24±0,01 ^b	6,50±0,06 ^a
<i>p</i> -cumárico	5,37±0,02 ^b	4,95±0,01 ^a	5,54±0,07 ^c	5,09±0,01 ^a	5,06±0,01 ^a	5,31±0,02 ^b
Ferúlico	0,84±0,01 ^b	0,71±0,02 ^a	0,91±0,03 ^c	0,78±0,01 ^b	0,70±0,02 ^a	0,83±0,01 ^c
<i>Flavonóis (mg L⁻¹)</i>						
Campferol	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹
Quercetina	1,50±0,01 ^b	1,99±0,03 ^a	1,95±0,02 ^a	1,99±0,04 ^b	2,24±0,04 ^a	2,27±0,02 ^a
Miricetina	0,84±0,02 ^b	1,03±0,02 ^a	1,06±0,01 ^a	0,94±0,02 ^b	1,17±0,08 ^a	1,14±0,01 ^a
<i>Flavanóis (mg L⁻¹)</i>						
(+)-catequina	17,57±0,32 ^a	19,32±0,06 ^b	20,97±0,06 ^c	19,21±0,08 ^a	23,27±0,09 ^b	28,05±0,37 ^c
(-)-epicatequina	19,98±0,47 ^b	17,04±0,91 ^a	17,51±0,13 ^a	6,45±0,08 ^b	4,27±0,09 ^a	6,75±0,11 ^c
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>						
<i>trans</i> -resveratrol	6,36±0,03 ^a	7,38±0,03 ^b	7,77±0,10 ^c	6,91±0,04 ^b	8,04±0,51 ^a	8,19±0,02 ^a
Tirosol	91,43±0,08 ^a	89,91±0,57 ^a	93,99±1,29 ^b	86,64±0,11 ^a	97,68±0,13 ^b	98,73±0,26 ^c
<i>Antocianinas 3-O-monoglicosídeos (mg L⁻¹)</i>						
Delfinidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Cianidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Peonidina	0,30±0,01 ^a	0,44±0,02 ^c	0,32±0,01 ^b	0,29±0,01 ^a	0,30±0,01 ^a	0,29±0,01 ^a
Malvidina	2,83±0,01 ^a	3,16±0,02 ^c	3,07±0,02 ^b	2,10±0,01 ^a	2,15±0,01 ^b	2,54±0,09 ^c

Valores médios ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05). Teste de Tukey realizado separadamente para cada tempo de envelhecimento. nd: não detectado. ¹Valor menor que o limite de detecção do método. T0 (zero): 2 meses de envelhecimento, T4: 4 meses de envelhecimento, T6: 6 meses de envelhecimento, T9: 9 meses de envelhecimento, T12: 12 meses de envelhecimento *sur lies*.

Tabela 2. Evolução durante o armazenamento comercial (armazenamento em garrafa) dos polifenóis dos vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos.

Substâncias	Armazenamento comercial								
	T0			T4			T6		
	Controle	Goma arábica	Tanino	Controle	Goma arábica	Tanino	Controle	Goma arábica	Tanino
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>									
Gálico	2,16±0,01 ^a	2,01±0,01 ^b	2,15±0,01 ^a	2,13±0,01 ^b	2,06±0,01 ^a	2,04±0,04 ^a	4,62±0,01 ^a	5,29±0,07 ^c	4,81±0,04 ^b
Protocateico	3,43±0,01 ^c	3,11±0,01 ^a	3,16±0,02 ^b	3,14±0,32 ^a	3,27±0,01 ^a	3,43±0,06 ^a	2,72±0,02 ^b	2,93±0,02 ^a	2,86±0,04 ^a
Vanílico	0,80±0,01 ^c	0,74±0,01 ^b	0,69±0,01 ^a	0,70±0,02 ^a	0,65±0,01 ^b	0,71±0,02 ^a	0,72±0,02 ^a	0,78±0,03 ^c	0,74±0,01 ^b
Serínico	0,73±0,02 ^b	0,69±0,01 ^a	0,72±0,01 ^{ab}	0,70±0,01 ^a	0,72±0,02 ^b	0,77±0,01 ^c	0,67±0,01 ^a	0,70±0,01 ^b	0,72±0,02 ^c
Elágico	nd	nd	nd	1,92±0,01 ^b	2,37±0,03 ^a	2,50±0,02 ^a	2,06±0,03 ^a	2,27±0,06 ^b	3,04±0,05 ^c
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>									
Cafeico	2,64±0,01 ^b	2,47±0,01 ^a	2,75±0,03 ^c	2,85±0,01 ^c	2,71±0,01 ^a	2,77±0,01 ^b	2,66±0,04 ^a	2,82±0,02 ^c	2,70±0,03 ^b
<i>trans</i> -caftárico	12,85±0,02 ^a	13,34±0,01 ^c	12,97±0,03 ^b	15,41±0,04 ^a	14,96±0,02 ^b	15,35±0,04 ^a	14,60±0,08 ^b	14,45±0,1 ^{ab}	14,43±0,09 ^a
<i>p</i> -cumárico	1,54±0,01 ^a	1,54±0,01 ^a	1,57±0,02 ^b	1,62±0,01 ^c	1,53±0,03 ^a	1,57±0,02 ^b	1,49±0,01 ^a	1,58±0,01 ^c	1,53±0,02 ^b
Ferúlico	0,32±0,01 ^a	0,33±0,01 ^a	0,32±0,01 ^a	0,37±0,01 ^b	0,34±0,01 ^a	0,34±0,02 ^a	0,33±0,01 ^a	0,35±0,02 ^c	0,34±0,01 ^b
<i>Flavonóis (mg L⁻¹)</i>									
Campferol	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹
Quercetina	0,23±0,01 ^a	0,22±0,01 ^b	0,23±0,02 ^a	0,31±0,05 ^a	0,26±0,02 ^a	0,26±0,01 ^a	0,30±0,03 ^b	0,26±0,02 ^{ab}	0,25±0,01 ^a
Miricetina	1,48±0,01 ^a	1,48±0,02 ^a	1,52±0,01 ^b	0,29±0,01 ^{ab}	0,28±0,01 ^a	0,30±0,02 ^b	0,28±0,02 ^a	0,30±0,01 ^b	0,31±0,02 ^c
<i>Flavanóis (mg L⁻¹)</i>									
(+)-catequina	1,43±0,02 ^a	1,45±0,02 ^a	1,51±0,03 ^b	1,71±0,05 ^b	0,92±0,01 ^a	0,95±0,01 ^a	1,62±0,09 ^b	1,56±0,05 ^{ab}	1,42±0,10 ^a
(-)-epicatequina	3,27±0,03 ^c	1,62±0,01 ^a	3,22±0,02 ^b	1,51±0,11 ^a	1,12±0,01 ^b	1,46±0,01 ^a	nd	1,79±0,08 ^a	1,71±0,03 ^a
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>									
<i>trans</i> -resveratrol	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹
Tirosol	73,83±0,11 ^a	76,43±0,15 ^c	75,95±0,15 ^b	81,98±0,02 ^b	72,42±0,08 ^a	87,06±0,11 ^c	75,29±0,05 ^a	86,84±0,78 ^b	89,91±0,28 ^c
<i>Antocianinas 3-O-monoglicosídeos (mg L⁻¹)</i>									
Delfinidina	1,16±0,01 ^c	1,14±0,02 ^a	1,15±0,01 ^b	1,14±0,01 ^b	1,15±0,02 ^c	1,12±0,01 ^a	1,13±0,01 ^b	1,14±0,02 ^c	1,12±0,01 ^a
Cianidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Peonidina	0,32±0,01 ^a	0,27±0,01 ^b	0,32±0,03 ^a	0,21±0,02 ^a	0,20±0,03 ^a	0,15±0,01 ^b	0,18±0,01 ^a	0,19±0,02 ^a	0,12±0,01 ^b
Malvidina	9,07±0,12 ^c	7,24±0,03 ^a	8,69±0,06 ^b	5,69±0,04 ^a	6,19±0,02 ^b	5,71±0,04 ^a	4,53±0,01 ^b	4,94±0,07 ^c	3,04±0,05 ^a

Tabela 2. (Continuação)

Substâncias	Armazenamento comercial					
	T9			T12		
	Controle	Goma arábica	Tanino	Controle	Goma arábica	Tanino
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>						
Gálico	5,12±0,01 ^a	5,12±0,02 ^a	4,87±0,02 ^b	5,67±0,02 ^b	5,16±0,01 ^a	5,14±0,02 ^a
Protocateico	2,88±0,06 ^{ab}	2,91±0,03 ^b	2,77±0,03 ^a	3,21±0,03 ^c	2,88±0,02 ^a	3,09±0,01 ^b
Vanílico	0,83±0,01 ^a	0,85±0,01 ^a	0,74±0,05 ^a	0,90±0,01 ^a	0,91±0,01 ^a	0,88±0,01 ^b
Serínico	0,70±0,01 ^b	0,74±0,01 ^a	0,75±0,02 ^a	0,72±0,01 ^a	0,73±0,02 ^a	0,78±0,01 ^b
Elágico	2,12±0,01 ^a	2,37±0,02 ^c	2,28±0,01 ^b	2,59±0,03 ^a	2,09±0,08 ^b	2,69±0,04 ^a
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>						
Cafeico	2,94±0,01 ^a	2,91±0,01 ^a	2,69±0,02 ^b	2,96±0,02 ^b	2,86±0,01 ^a	3,01±0,01 ^c
<i>trans</i> -caftárico	14,99±0,06 ^c	14,50±0,14 ^b	14,07±0,04 ^a	14,01±0,02 ^a	14,16±0,38 ^{ab}	14,59±0,05 ^b
<i>p</i> -cumárico	1,58±0,01 ^a	1,59±0,01 ^a	1,48±0,01 ^b	1,77±0,01 ^a	1,44±0,02 ^b	1,75±0,03 ^a
Ferúlico	0,35±0,02 ^a	0,35±0,01 ^a	0,33±0,01 ^b	0,34±0,01 ^b	0,21±0,02 ^a	0,35±0,05 ^c
<i>Flavonóis (mg L⁻¹)</i>						
Campferol	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹
Quercetina	0,24±0,01 ^{ab}	0,25±0,02 ^b	0,23±0,01 ^a	0,25±0,01 ^a	0,36±0,02 ^b	0,25±0,01 ^a
Miricetina	0,24±0,01 ^a	nd	0,26±0,02 ^b	0,27±0,01 ^a	nd	0,30±0,02 ^b
<i>Flavanóis (mg L⁻¹)</i>						
(+)-catequina	8,49±0,02 ^a	8,67±0,07 ^a	8,52±0,22 ^a	9,25±0,04 ^a	9,43±0,45 ^a	9,24±0,01 ^a
(-)-epicatequina	nd	1,16±0,01 ^a	1,19±0,02 ^b	nd	nd	nd
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>						
<i>trans</i> -resveratrol	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹	<0,09 ¹
Tirosol	69,69±0,63 ^a	71,19±1,03 ^a	70,73±0,29 ^a	75,41±0,92 ^a	104,88±0,22 ^b	108,23±1,00 ^c
<i>Antocianinas 3-O-monoglicosídeos (mg L⁻¹)</i>						
Delfinidina	1,14±0,01 ^a	1,14±0,01 ^a	1,13±0,02 ^b	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Cianidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Peonidina	0,16±0,01 ^c	0,14±0,01 ^b	0,11±0,01 ^a	0,09±0,01 ^b	0,08±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a
Malvidina	4,22±0,02 ^c	3,68±0,01 ^b	2,78±0,01 ^a	2,50±0,03 ^c	2,02±0,01 ^a	2,08±0,02 ^b

Valores médios ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05). Teste de Tukey realizado separadamente para cada tempo de armazenamento. nd: não detectado. ¹Valor menor que o limite de detecção do método. T0 (zero): 2 meses de armazenamento, T4: 4 meses de armazenamento, T6: 6 meses de armazenamento, T9: 9 meses de armazenamento, T12: 12 meses de armazenamento em garrafa.

Em geral, os agentes enológicos não apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) no teor dos ácidos hidroxicinâmicos quando comparados a amostra controle, independentemente da etapa de vinificação em que foram adicionados (no vinho base ou no vinho espumante após a degola) (Tabela 1 e 2). Estudos anteriores também demonstraram que a concentração de ácidos hidroxicinâmicos no vinho não é significativamente influenciada pela adição de agentes de vinificação, tais como taninos (ALCALDE-EON et al., 2014; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017), ou enzimas (MULERO et al., 2011). No entanto, observou-se que o tempo de envelhecimento apresentou maior influência nas mudanças das concentrações dos ácidos hidroxicinâmicos do que as práticas enológicas empregadas. Ao final do envelhecimento sobre borra (T12) (Tabela 1), observou-se uma diminuição das concentrações dos ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico nos vinhos espumantes em relação ao tempo inicial (T0), enquanto que, para as amostras do experimento armazenamento comercial (Tabela 2), observou-se um aumento nas concentrações dos ácidos cinâmicos livres, considerando as concentrações iniciais (T0) e final (T12). A concentração do ácido *trans*-caftárico aumentou ao longo do tempo (T0 a T12) em ambos os experimentos (Tabela 1 e 2). Esses achados são consistentes com os relatos anteriores sobre alterações dos ésteres tartáricos e seus correspondentes ácidos hidroxicinâmicos em vinhos espumantes envelhecidos (SERRA-CAYUELA et al., 2013) e vinhos tintos (ALCALDE-EON et al., 2014).

3.1.2 Flavanóis e flavonóis

A concentração de flavanóis e flavonóis nos vinhos espumantes rosé foi significativamente influenciada ($p < 0,05$) pela etapa em que o agente enológico foi adicionado (Tabela 1 e 2). Em geral, a adição dos agentes enológicos no vinho espumante após a degola (Tabela 2) mostrou poucas alterações nos níveis dos flavanóis e flavonóis dos vinhos espumantes estudados. Assim, as maiores mudanças destas substâncias foram observadas no experimento com a adição dos agentes enológicos no vinho base, antes da segunda fermentação (Tabela 1).

A Tabela 1 mostra que os vinhos espumantes tratados com goma arábica apresentaram maiores concentrações de catequina do que a amostra controle até seis meses de envelhecimento (T0, T4 e T6), enquanto que aquelas amostras com adição de tanino apresentaram maiores concentrações de catequina com nove e doze meses (T9 e T12). Em relação ao agente enológico, observou-se que o tanino contribuiu para

maiores níveis de catequina nas amostras. Esse resultado pode estar relacionado a um aumento na concentração de monômero pelo fornecimento direto de tanino (BAIANO et al., 2009; ALCALDE-EON et al., 2014). Pesquisadores mostraram que a adição de tanino enológico pode levar a maiores concentrações de flavanóis nos vinhos (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017), bem como a adição de enzimas pectolíticas e SO₂ (GAMBUTI et al., 2007). Durante o envelhecimento dos vinhos espumantes, observou-se um aumento na concentração de catequina, considerando as amostras no tempo inicial (T0) e final (T12). A epicatequina apresentou evolução não linear (Tabela 1 e 2). Essas mudanças nos monômeros livres nos últimos meses de envelhecimento podem estar associadas à clivagem das ligações interflavânicas das proantocianidinas, que são constituídas de polímeros de catequina e epicatequina. Os flavanols são particularmente importantes em termos das características sensoriais dos vinhos. Eles também participam de reações de polimerização e condensação direta com antocianinas, levando à formação de pigmentos importantes para a estabilidade de cor dos vinhos (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Assim, no presente estudo, uma forte correlação significativa ($r = 0,98$; $p < 0,05$) foi observada entre a catequina e as antocianinas monoméricas totais e malvidina-3-*O*-glicosídeo detectadas nos vinhos espumantes com 12 meses de envelhecimento sobre borra. Além disso, uma forte correlação positiva entre catequina e capacidade antioxidante (método ABTS) ($r = 0,96$; $p < 0,05$) foi observada (T12). A capacidade antioxidante dos flavonóides, como a catequina, pode ser atribuída à posição e ao número de grupos hidroxila e duplas ligações, bem como a posição *o*-3,4-di-hidroxi na estrutura química dos flavonóides, importantes por seu efeito antioxidante e capacidade de eliminação de radicais livres (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Entre flavanóis estudados, os resultados para o experimento de envelhecimento sobre borra (Tabela 1) mostram que a adição dos agentes enológicos no vinho base influenciou o aumento das concentrações de quercetina e miricetina em relação à amostra de controle. O campferol não foi detectado nos vinhos espumantes avaliados. No entanto, a adição de tanino proporcionou maiores concentrações de miricetina em relação à amostra controle e a amostra com adição de goma arábica para todos os tempos avaliados. Nos estudos de Bautista-Ortín et al. (2007), o vinho tinto adicionado com tanino apresentou maiores concentrações de flavonóis do que a amostra controle no momento do engarrafamento.

Observou-se um aumento na concentração de quercetina nos vinhos espumantes no final de 12 meses de envelhecimento (Tabela 1 e 2), provavelmente devido à hidrólise das formas glicosiladas durante o armazenamento. A quercetina foi positivamente correlacionada ($r = 0,88$; $p < 0,05$) com a capacidade antioxidante (método ABTS) dos vinhos espumantes após 12 meses de envelhecimento sobre borra, demonstrando a importância deste composto em termos de potencial antioxidante.

3.1.3 Outras substâncias

O tirosol foi detectado em altas concentrações em todas as amostras de vinhos espumantes analisadas (Tabela 1 e 2). A concentração de tirosol nos vinhos espumantes rosé deste estudo é superior aos valores reportados anteriormente para vinhos espumantes (POZO-BAYÓN et al., 2003; STEFENON et al., 2014) e vinhos tintos (GRIS et al., 2011; SARTOR et al., 2017b). Observou-se que a adição dos agentes enológicos influenciou a concentração de tirosol dos vinhos espumantes no final do envelhecimento (T12) em relação à amostra controle (Tabela 1 e 2). Em estudos de Vazallo-Valleumbrocio et al. (2017) concentrações mais elevadas de tirosol também foram encontradas em vinhos tintos tratados com taninos (chips de carvalho tostado) no final do tempo de envelhecimento em relação a amostra controle. Há poucas informações sobre a evolução do tirosol durante o armazenamento de vinhos espumantes. A presença de alta concentração deste composto pode ser atribuída ao processo de segunda fermentação em garrafa, uma vez que o tirosol é formado a partir do metabolismo da tirosina pelas leveduras durante o processo de fermentação. Este composto teve uma forte correlação positiva com a capacidade antioxidante (método ABTS) ($r > 0,90$; $p < 0,05$) dos vinhos espumantes no final do envelhecimento sobre borra. Em um estudo de Gris et al. (2011) com vinhos tintos, também foi observada uma correlação significativa entre o tirosol e a capacidade antioxidante *in vivo*, o que sugere uma importante atividade biológica deste composto. Com relação ao *trans*-resveratrol, a adição de agentes enológicos no vinho base, antes da segunda fermentação (Tabela 1) proporcionou um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de *trans*-resveratrol nos vinhos espumantes em relação à amostra controle para todos os tempos avaliados (T0 a T12).

3.1.4 Antocianinas e intensidade de cor

Das antocianinas individuais determinadas neste estudo, a malvidina-3-*O*-glicosídeo apresentou as maiores concentrações em todas as amostras, enquanto que a antocianina cianidina-3-*O*-glicosídeo não foi detectada (Tabela 1 e 2). O teor de antocianinas das amostras de vinhos espumantes demonstrou que a etapa de adição dos agentes enológicos (vinho base, antes da segunda fermentação) influenciou significativamente ($p < 0,05$) as concentrações de malvidina-3-*O*-glicosídeo e antocianinas monoméricas totais dos vinhos espumantes rosé em relação à amostra controle (Tabela 1 e Figura 1a). Além disso, os resultados demonstram que a capacidade antioxidante (método ABTS) apresentou forte correlação positiva ($p < 0,05$) com a malvidina-3-*O*-glicosídeo ($r = 0,88$) e antocianinas monoméricas totais ($r = 0,96$) após 12 meses de envelhecimento. Comparando os agentes enológicos, observou-se que a adição de goma arábica ao vinho base teve um efeito significativo na concentração de malvidina-3-*O*-glicosídeo nos vinhos espumantes ao considerar o tempo inicial (T0) até o nono mês de envelhecimento (T9), enquanto que, o tanino teve um efeito mais forte na concentração de malvidina-3-*O*-glicosídeo ao final de 12 meses de envelhecimento (T12). Estudos de Baiano et al. (2009) e Alcalde-Eon et al. (2014) demonstraram que a adição de taninos durante a vinificação do vinho tinto apresentou significativa proteção do teor de antocianinas. Em relação ao experimento de armazenamento comercial (Tabela 2 e Figura 1b), em geral, os resultados demonstram que a adição de agentes enológicos após a degola não influenciou a concentração de antocianinas nos vinhos espumantes em relação à amostra controle. Observou-se também correlação significativa e negativa ($p < 0,05$) entre a capacidade antioxidante (método ABTS) e a peonidina-3-*O*-glicosídeo ($r = -0,73$), malvidina-3-*O*-glicosídeo ($r = -0,79$) e antocianinas monoméricas totais ($r = -0,88$) após 12 meses de armazenamento comercial.

Figura 1. Evolução das antocianinas monoméricas totais (a), intensidade de cor (b), capacidade de redução do Folin-Ciocalteu (FC) (c) e capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS (d) para os vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos durante o envelhecimento sobre borra (*sur lies*) e armazenamento comercial. AMT, antocianinas monoméricas totais; IC, Intensidade de cor (expressa como índice).

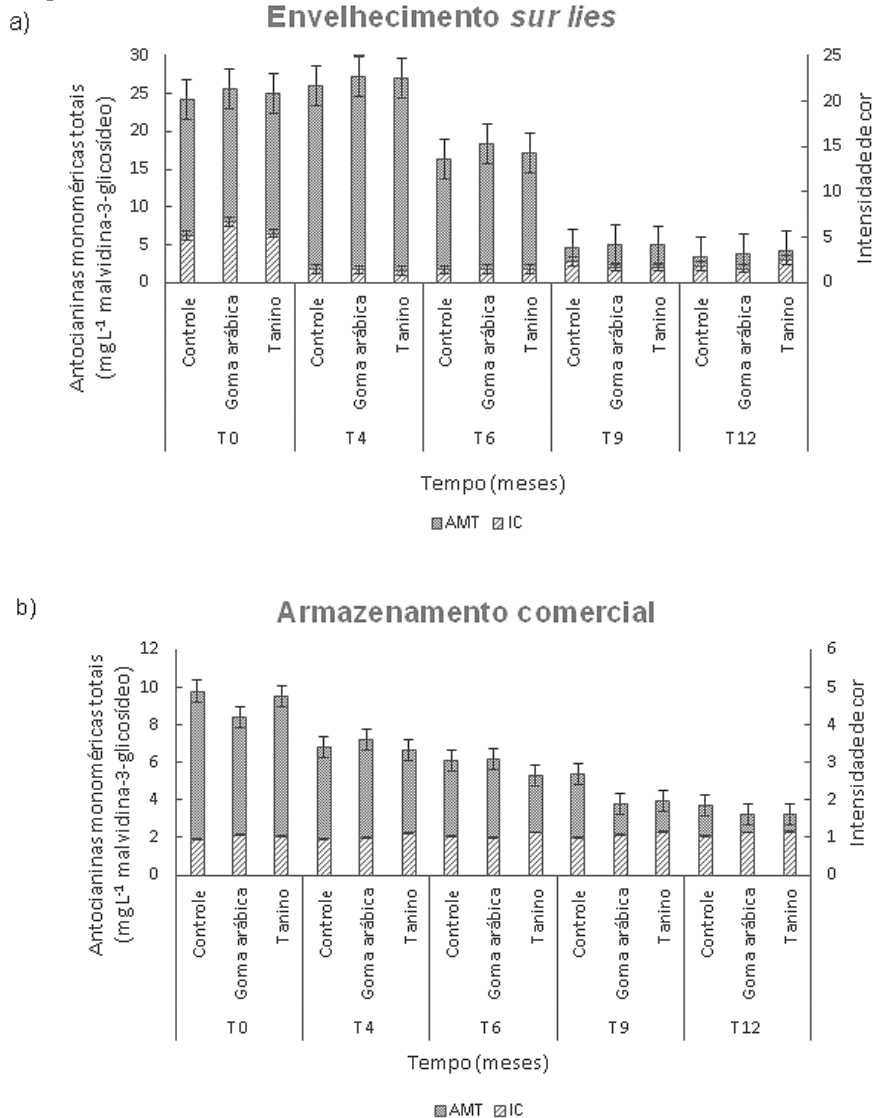
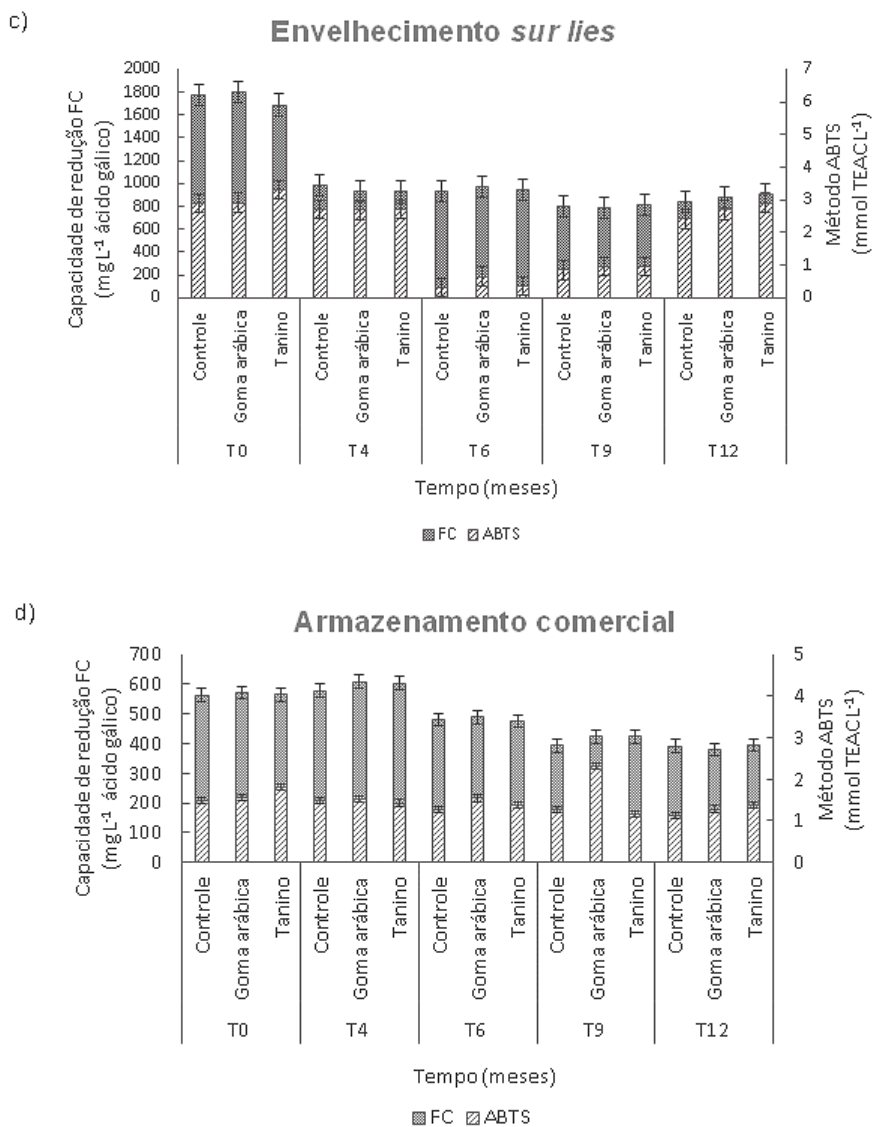


Figura 1. (Continuação)



Observou-se que o teor de antocianinas monoméricas totais e as antocianinas individuais apresentaram uma diminuição média de concentração de 80 % no final do envelhecimento sobre borra para todos os vinhos espumantes (controle, tanino, goma arábica) em relação ao tempo inicial (T0) (Figura 1a). Para o armazenamento comercial (Figura 1b), esta diminuição foi de aproximadamente 70 % em comparação com as concentrações iniciais para todas as amostras. Estes resultados são consistentes com os obtidos em outros estudos sobre a evolução das antocianinas durante o armazenamento de vinhos, ou seja, houve uma queda na concentração de antocianinas ao longo do tempo (MULERO et al., 2011; DEL BARRIO-GALÁN et al., 2015; VAZALLO-VALLEUMBROCIO et al., 2017). Essa diminuição pode ser atribuída às reações que envolvem a antocianina, que resultam na formação de novos pigmentos, como as piranoantocianinas, e às reações de degradação, oxidação ou polimerização nas quais essas substâncias participam durante o processo de envelhecimento (MARQUEZ et al., 2013). É importante ressaltar que o contato com as borras de levedura durante o envelhecimento pode induzir uma diminuição ainda maior devido à adsorção dessas substâncias (MAZAURIC; SALMON, 2005; DEL BARRIO-GALÁN et al., 2015).

A diminuição observada nas concentrações de antocianina é consistente com os resultados obtidos para a intensidade da cor das amostras (Figura 1a e b). Assim, foi observada uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre as antocianinas (malvidina-3-*O*-glicosídeo e antocianinas monoméricas totais) e a intensidade de cor avaliada neste estudo durante o envelhecimento sobre borra ($r \geq 0,72$) e armazenamento comercial ($r \geq -0,95$). Uma diminuição na intensidade de cor foi observada durante o envelhecimento sobre borra (Figura 1a), sugerindo a formação de pigmentos poliméricos. No entanto, durante o armazenamento comercial dos vinhos espumantes, não foram observadas mudanças significativas na intensidade de cor das amostras (Figura 1b).

3.1.5 Polifenóis e capacidade antioxidante

A evolução dos polifenóis, estimado como a capacidade de redução do Folin-Ciocalteu (FC), e a capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS durante o envelhecimento sobre borra e armazenamento comercial dos vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos estão apresentados na forma de gráfico (Figura 1c e d). A adição dos agentes enológicos no vinho base, antes da segunda

fermentação (Figura 1c), influenciou significativamente ($p < 0,05$) a capacidade de redução do FC nas etapas finais de envelhecimento dos vinhos espumantes em relação à amostra controle. Observou-se que os vinhos espumantes adicionados com goma arábica apresentaram uma capacidade de redução do FC significativamente maior nas amostras com 6 meses de envelhecimento (T6). No entanto, os vinhos espumantes adicionados de tanino apresentaram maior capacidade de redução do FC nas amostras com 9 e 12 meses de envelhecimento sobre borra (T9 e T12) quando comparados com o controle e com a amostra adicionada de goma arábica. A adição de agentes enológicos no vinho espumante após a etapa de degola (Figura 1d) não influenciou a capacidade de redução do FC nos vinhos espumantes na maioria dos tempos avaliados em relação à amostra controle (exceto com 9 meses de armazenamento comercial).

Para todos os vinhos espumantes rosé (controle, tanino, goma arábica) os valores de capacidade redutora do FC no final do envelhecimento sobre borra e de armazenamento comercial (T12) foram menores em relação aos valores iniciais de FC (T0) (Figura 1c e d). Pode-se observar que no final do envelhecimento sobre borra (T12) os vinhos espumantes adicionados de tanino enológico apresentaram uma diminuição de 46 % nos valores de FC em relação aos valores iniciais. As demais amostras (controle e goma arábica) apresentaram uma diminuição de aproximadamente 50 %. No final do armazenamento comercial dos vinhos espumantes (T12), houve decréscimo de aproximadamente 31 % nos valores de FC para todas as amostras.

De maneira geral, observou-se que os agentes enológicos influenciaram a capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS dos vinhos espumantes no final do envelhecimento (T12) quando comparados ao controle em ambos os experimentos (Figura 1c e d). A adição de tanino proporcionou maiores valores de ABTS nos vinhos espumantes do que as amostras adicionadas de goma arábica. Esses resultados concordam com os relatados de Baiano et al. (2009). No entanto, com 9 meses de armazenamento comercial (T9), a adição de goma arábica proporcionou vinhos espumantes com maiores valores de ABTS (Figura 1d). Os vinhos espumantes do experimento envelhecimento sobre borra (Figura 1c) apresentaram maiores valores de capacidade antioxidante no final de 12 meses de envelhecimento, correlacionando-se positivamente com os valores de capacidade de redução do FC ($r = 0,95$; $p < 0,05$).

Neste estudo, a capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS foi significativamente correlacionada com diferentes substâncias fenólicas. Indicando que a capacidade antioxidante do vinho espumante não está relacionada a apenas uma molécula, e sim com a sinergia entre o

potencial antioxidante de diferentes polifenóis de baixa massa molar. Correlações entre os polifenóis e capacidade antioxidante também foram encontradas anteriormente em estudos com vinhos tintos brasileiros (GRANATO; KATAYAMA; CASTRO, 2010). Os resultados deste estudo indicam que todas estas substâncias fitoquímicas presentes nas amostras estão envolvidas na atividade sequestradora de radicais livres e podem contribuir fortemente para o potencial bioativo dos vinhos espumantes rosé.

3.2 ANÁLISE MULTIVARIADA

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a composição fenólica dos vinhos espumantes rosé foram influenciados tanto pelas práticas enológicas realizadas quanto pelo tempo de envelhecimento. Assim, a análise de componentes principais (ACP) foi realizada com os dados obtidos nos dois experimentos após 12 meses de envelhecimento sobre borra e armazenamento comercial (T12) na tentativa de diferenciar os vinhos espumantes rosé de acordo com as práticas de vinificação aplicadas com base nos constituintes fitoquímicos e capacidade antioxidante. Antes de executar a análise de componentes principais, o nível de correlação (cargas fatoriais, $p < 0,05$) entre as variáveis estudadas (substâncias fenólicas, capacidade antioxidante e intensidade de cor) e os quatro primeiros componentes principais (PC1, PC2, PC3 e PC4) foram verificados, a fim de determinar quais variáveis contribuem para os componentes principais. Assim, todas as variáveis que foram detectadas nas amostras de vinhos espumantes deste estudo apresentaram valores superiores a 0,6 (cargas fatoriais) para os componentes 1 e/ou 2 (com exceção do tirosol) (Tabela 3). Cargas fatoriais inferiores a 0,6 indicam que as variáveis que não se encaixam bem com a solução fatorial devem ser descartadas da análise, especialmente se a projeção das amostras em um plano de fator for baseada em um gráfico bidimensional (GRANATO et al., 2018).

As cargas fatoriais (Tabela 3) de cada variável original para os dois primeiros componentes principais mostraram que, as amostras de vinhos espumantes foram diferenciadas em PC1 com base no teor de todas as substâncias fenólicas (exceto malvidina-3-*O*-glicosídeo), intensidade de cor e capacidade antioxidante. A PC2 separou as amostras de acordo com o teor de antocianinas (malvidina-3-*O*-glicosídeo e antocianinas monoméricas totais). As cargas fatoriais do PC3 e PC4 foram muito baixas e não diferenciaram as amostras.

Tabela 3. Cargas fatoriais entre as variáveis estudadas e os quatro primeiros componentes principais.

Fator	PC1	PC2	PC3	PC4
Ácido gálico	-1,00	-0,04	-0,05	-0,04
Ácido protocateico	-0,68	-0,47	-0,51	0,21
Ácido vanílico	-0,99	0,12	0,02	0,08
Ácido serínico	-0,81	0,19	-0,08	0,55
Ácido elágico	-0,88	-0,29	-0,24	-0,27
Ácido <i>trans</i> -caftárico	0,99	-0,11	-0,09	0,00
Tirosol	0,06	0,45	-0,88	-0,06
(+)-catequina	-0,99	-0,05	-0,13	-0,01
Ácido cafeico	-0,97	0,17	0,15	-0,13
(-)-epicatequina	-0,95	0,13	0,14	-0,24
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0,98	0,14	0,12	0,00
Ácido ferúlico	-0,97	0,06	0,14	-0,10
Miricetina	-0,96	0,09	0,09	0,17
<i>trans</i> -resveratrol	-0,99	0,13	0,04	0,05
Quercetina	-0,98	0,15	0,04	0,04
Campferol	-	-	-	-
Delfinidina-3- <i>O</i> -monoglicosídeo	-	-	-	-
Cianidina-3- <i>O</i> -monoglicosídeo	-	-	-	-
Peonidina-3- <i>O</i> -monoglicosídeo	-0,98	0,16	0,13	0,06
Malvidina-3- <i>O</i> -monoglicosídeo	-0,40	-0,90	0,10	0,06
FC	-0,99	0,13	0,06	0,03
AMT	-0,76	-0,62	-0,07	0,07
ABTS	-0,99	0,12	-0,09	0,00
Intensidade de cor	-0,90	-0,11	-0,16	-0,39
Autovalores	16,90	1,95	1,29	0,71

Nota: números em negrito são cargas fatoriais maiores que 0,60.

O gráfico bidimensional (Figura 2) demonstrou que os dois componentes principais (PC1 x PC2) foram responsáveis por 93,78 % da variância total dos resultados. O primeiro componente (PC1) explicou a maior parte da variabilidade dos dados (84,46 %) e foi responsável pela

separação dos vinhos espumantes de acordo com a etapa em que os agentes enológicos foram adicionados. Foi possível observar uma clara separação dos vinhos espumantes após 12 meses de envelhecimento sobre borra e armazenamento comercial. Em relação à composição fenólica dos vinhos espumantes, observa-se que todos os polifenóis, exceto o ácido *trans*-caftárico, apresentaram uma forte correlação negativa (PC1) com os vinhos espumantes adicionados de agentes enológicos no vinho base (envelhecimento *sur lies*).

Além disso, observou-se que os vinhos espumantes com a adição de agentes enológicos no vinho de base (*sur lies*) foram separadas, estando localizado no segundo (GSL, goma arábica) e terceiro quadrante (TSL, tanino), enquanto que as amostras com a adição de agentes enológicos após a etapa de degola (armazenamento comercial) não apresentaram separação no plano em relação à caracterização fenólica.

Figura 2. Análise de componentes principais mostrando os escores de plotagem (a) e cargas fatoriais (b) dos resultados para os fenólicos individuais, capacidade de redução do Folin-Ciocalteu (FC), ensaio de eliminação de radicais livres (ABTS), intensidade de cor (IC) e antocianinas monoméricas totais (AMT) para vinhos espumantes rosé adicionados de agentes enológicos, no final de 12 meses de envelhecimento *sur lies* e armazenamento comercial. CSL, Controle *sur lies*; GSL, Goma arábica *sur lies*; TSL, Tanino *sur lies*; CCS, Controle armazenamento comercial; GCS, Goma arábica armazenamento comercial; TCS, Tanino armazenamento comercial. Os dados são a média de três repetições.

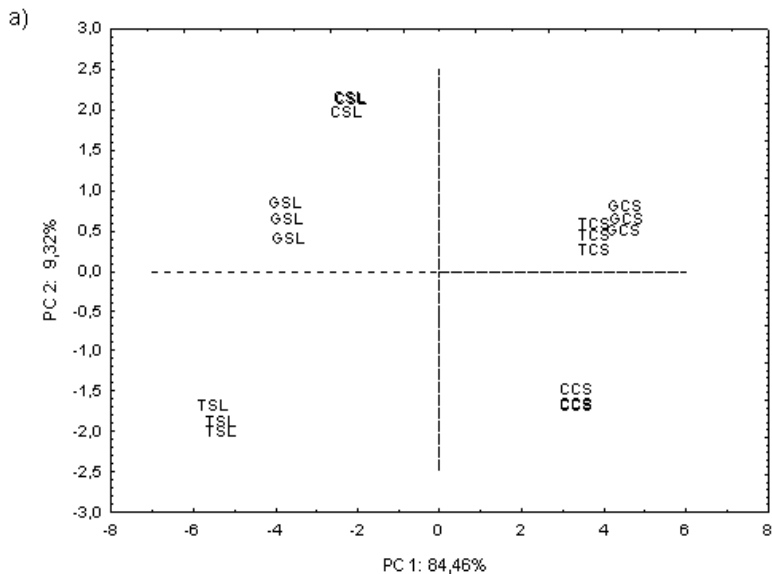
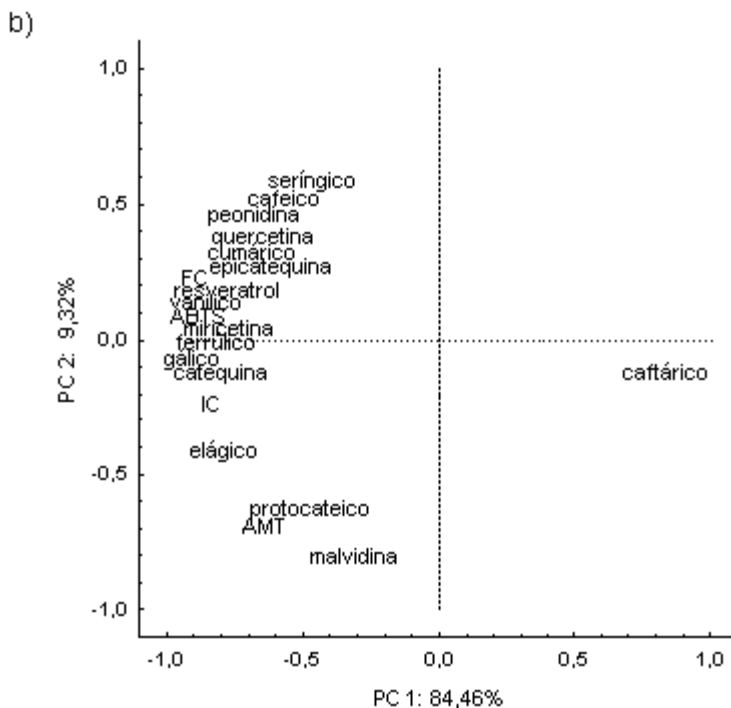


Figura 2. (Continuação)



4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que a adição dos agentes enológicos goma arábica e tanino enológico no vinho base, antes da segunda fermentação, pode aumentar significativamente as concentrações das substâncias fenólicas nos vinhos espumantes rosé durante o envelhecimento sobre borra em relação à amostra controle. A adição dos agentes enológicos após a etapa de degola teve menor influência sobre os polifenóis dos vinhos espumantes em comparação com a adição dos agentes no vinho base. Esses resultados foram verificados pela análise de componentes principais, que demonstrou uma clara separação das amostras no último mês de envelhecimento (T12) de acordo com a etapa em que os agentes enológicos foram adicionados. Além disso, a adição dos agentes enológicos no vinho base teve forte influência nas alterações

da composição fenólica e na capacidade antioxidante, contribuindo para o potencial bioativo dos vinhos espumantes rosé.

Mais estudos são necessários para obter uma melhor compreensão do uso de outros agentes enológicos na produção de vinho espumante rosé, assim como avaliar a influência de diferentes concentrações.

CAPÍTULO 3

ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, ELEMENTAR E DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE VINHOS ESPUMANTES TRATADOS COM MANOPROTEÍNAS DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO

Saionara Sartor¹, Isabela M. Toaldo¹, Carolina P. Panceri^{1,2}, Vinícius Caliari^{3,4}, Aderval S. Luna⁵, Jefferson S. de Gois⁵ e Marilde T. Bordignon-Luiz¹

¹Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Urupema, Urupema, Brasil.

³Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Videira, Santa Catarina, Brasil.

⁴Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, Santa Catarina, Brasil.

⁵Departamento de Química Analítica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Maracanã, Rio de Janeiro, Brasil.

Nota: O texto e os dados discutidos neste capítulo são reproduzidos ou adaptados da publicação de Sartor, S.; Toaldo, I.; Panceri, C.P.; Caliari, V.; Luna, A.S.; De Gois, J.S. e Bordignon-Luiz, M.T. Disponível como artigo completo na Edição Especial da Food Research International, v.xx, p.xxx-xxx, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.012>. Reproduzido com permissão da Elsevier.

RESUMO

O efeito de manoproteínas na evolução dos vinhos espumantes rosé durante o envelhecimento biológico foi investigado com base na caracterização química de polifenóis, ácidos orgânicos, macro e microelementos usando uma abordagem analítica combinada. As variações desses constituintes foram avaliadas usando espectroscopia Raman e de infravermelho próximo. Durante o envelhecimento biológico, o ácido cafeico, catequina, ácido gálico e malvidina-3-*O*-glucosídeo foram os polifenóis presentes em maiores concentrações nos vinhos espumantes rosé. O tirosol, um derivado da fermentação, foi encontrado em concentrações de até 98,07 mg L⁻¹. A adição de manoproteínas influenciou significativamente as concentrações dos ácidos orgânicos e substâncias fenólicas individuais, particularmente o *trans*-resveratrol, quercetina, catequina, ácido *p*-cumárico e ácidos hidroxibenzoicos, que apresentaram um aumento de suas concentrações ao longo do tempo. Estes efeitos das manoproteínas foram observados principalmente no final do envelhecimento biológico. A composição elementar não alterou durante o período avaliado, o potássio foi o mineral encontrado em maiores concentrações em todas as amostras. As mudanças observadas envolvendo esses constituintes podem oferecer novos conhecimentos sobre o comportamento dos vinhos durante o envelhecimento e sobre a qualidade bioativa e nutricional dos vinhos espumantes rosé.

Palavras-chave: Vinhos espumantes. Envelhecimento *sur lie*. Polifenóis. Minerais. NIR. Espectroscopia Raman.

1 INTRODUÇÃO

Vinhos espumantes são elaborados a partir de um vinho base que é submetido a uma segunda fermentação em garrafas seladas ou em grandes recipientes para que ocorra a incorporação de CO₂ e liberação de produtos secundários do metabolismo fermentativo de leveduras (CALIARI et al., 2015). Durante o envelhecimento biológico, os vinhos espumantes permanecem em contato com as células de levedura liberadas no processo conhecido como envelhecimento sobre borra ou *sur lie*. As transformações decorrentes da autólise da levedura afetam o corpo, a sensação na boca e os atributos aromáticos do vinho espumante final (PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015).

Muitas substâncias químicas que ocorrem naturalmente, como os polifenóis, açúcares, ácidos e componentes inorgânicos são responsáveis pelas transformações e estabilidade dos vinhos sendo importantes para sua evolução (PRAKASH et al., 2016). No caso dos vinhos espumantes, a segunda fermentação que ocorre durante o processo de elaboração contribui para a complexidade química e sensorial.

É uma prática comum na indústria do vinho o uso de agentes enológicos. Muitos agentes que constituem lisados de levedura, antioxidantes e misturas pectinolíticas, taninos e manoproteínas são utilizados comercialmente com o objetivo de controlar a evolução do vinho e podem modificar principalmente as características químicas dos mesmos (DEL BARRIO-GALÁN et al., 2012; GUADALUPE; PALACIOS; AYESTARÁN, 2007; PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015 GHANEM et al., 2017). As manoproteínas estão particularmente associadas a uma maior estabilidade dos vinhos envelhecidos, além de promoverem propriedades tecnológicas e sensoriais. Estes proteoglicanos são constituídos principalmente de manose, glicose e proteínas e são liberados da parede celular da levedura durante o processo de autólise (GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008).

As manoproteínas têm diferentes estruturas que variam de acordo com sua massa molar, grau e tipo de glicosilação e suas cargas. Dependendo de como são extraídas, apresentam diferentes atividades de estabilização tartárica ou proteica. Sua adição é uma prática comum na produção de vinho, permitida pelo Codex Enológico Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2018). As manoproteínas da parede celular da levedura desempenham um papel importante no processo de vinificação. Quando adicionados ao vinho, podem promover diferentes propriedades tecnológicas, tais como um efeito positivo na estabilidade de espuma e nas características sensoriais, como a redução da adstringência

(GUADALUPE et al., 2007) e a melhoria do perfil aromático dos vinhos espumantes (PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015). A interação entre manoproteínas e as substâncias fitoquímicas do vinho é um assunto de grande interesse (GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008) que ainda não foi bem elucidado em relação aos vinhos espumantes.

Além da influência da videira e da variedade na composição do vinho, há um interesse crescente em conhecer as modificações do perfil composicional dos vinhos e às interações determinantes que contribuem para sua tipicidade. A caracterização dos constituintes naturais tem sido proposto como método de autenticação de uvas e vinhos (SNYDER et al., 2014; SEM et al., 2016). Juntamente com o potencial bioativo dos polifenóis, o valor nutricional dos vinhos depende muito do seu teor multi-elementar. O vinho pode ser fonte de elementos essenciais e/ou tóxicos. Sua composição é influenciada por diferentes fatores ambientais, incluindo a composição do solo, práticas vitícolas e processos de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; HOPFER et al., 2015).

O uso de técnicas analíticas para avaliação da qualidade de vinhos é indispensável e bem estabelecida em pesquisas. Cromatografia líquida acoplada à detecção UV/Vis/arranjos de diodo (LC-UV/Vis/DAD) ou espectrometria de massa (MS) são idealmente utilizadas para caracterização de composição fitoquímica de uvas e vinhos (LUCCI; SAURINA; NÚÑEZ, 2017). Estas técnicas são geralmente adequadas para a discriminação da origem geográfica, variedade de uva e safra de cultivo ou para o monitoramento da fermentação/envelhecimento (BAI et al., 2013; IVANOVA-PETROPULOS et al., 2015; SARTOR et al., 2017a). Técnicas de espectroscopia vibracional, por outro lado, podem fornecer informações úteis sobre as mudanças na composição do vinho, uma vez que a formação de novas substâncias pode modificar os espectros das amostras. Além disso, essas técnicas apresentam uma abordagem de análise de custo relativamente baixo, simples e não destrutiva para o controle da qualidade do vinho (SNYDER et al., 2014).

Diferentes reações químicas ocorrem durante o processo de vinificação e podem influenciar a autenticidade e a qualidade dos vinhos espumantes, devido a segunda fermentação e o contato com a levedura, juntamente com a complexidade de seus constituintes. Além da composição fenólica, as modificações dos constituintes orgânicos e inorgânicos podem ser particularmente determinantes da qualidade bioativa e nutricional desses vinhos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi utilizar a caracterização química e análise vibracional para avaliar o efeito da adição de manoproteínas na composição fenólica, elementar e

de ácidos orgânicos de vinhos espumantes rosé, e suas alterações químicas durante o envelhecimento biológico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES QUÍMICOS

Os padrões analíticos de ácidos orgânicos (ácidos tartárico, málico, láctico, succínico e cítrico) (pureza ≥ 95 %), fenólicos (malvidina-3-*O*-glicosídeo, delfinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, peonidina-3-*O*-glicosídeo, ácido gálico, ácido protocateico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico, *trans*-caftárico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, miricetina, quercetina, campferol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, *trans*-resveratrol e tirosol, todos com pureza ≥ 90 %), e os reagentes 2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) e 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Soluções padrão (1000 mg L^{-1}) de elementos (Ca, K, Mg, Fe, Mn, Zn, Sr e Cu) foram obtidos da Spex Certiprep Chemical (Metuchen, Nova Jersey, EUA). Ácido nítrico, peróxido de hidrogénio, etanol, acetato de sódio, cloreto de potássio, ácido acético, ácido fosfórico, ácido fórmico de qualidade analítica, e metanol e acetonitrila de grau HPLC foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Hesse, Alemanha).

Todas as soluções e diluições das amostras foram realizadas utilizando água ultrapura obtida de um sistema ultra-purificador (Gehaka, Brasil). O ácido nítrico 14 mol L^{-1} foi purificado por destilação em um sistema de sub-ebulição Teflon® modelo Distill acid BSB-939-IR (Berghof, Alemanha) e H_2O_2 puro 30 % (w/w) foi obtido da Proquimios, Brasil.

2.2 VINIFICAÇÃO

Uvas *Vitis vinifera* L. da variedade Merlot cultivada na região de Videira, Santa Catarina, safra 2015, foram utilizadas para este estudo. A elaboração do vinho espumante foi realizada na estação experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), seguindo o método Tradicional ou *Champenoise*. Inicialmente, o mosto foi obtido a partir do desengaçace, esmagamento e prensagem das uvas. Para obter o vinho base, o mosto foi fermentado com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PB2019 (Fermol Blanc, AEB Spa, Brescia, Itália) em tanques de aço inoxidável com temperatura controlada entre 15 e 17 °C, com monitoramento de açúcar residual e densidade. Após a

primeira fermentação, o vinho base foi estabilizado a frio (4 °C) e foi adicionado dióxido de enxofre (30 mg L⁻¹, Vinaromax, AEB Spa, Brescia, Itália).

Para a produção dos vinhos espumantes pelo método Tradicional, adicionou-se xarope de açúcar invertido na concentração de 26 g L⁻¹ ao vinho base para atingir a pressão de 6 atm, juntamente com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PB2002 (Fermol Reims Champagne, AEB Spa, Brescia, Itália) e 15 g hL⁻¹ de solução de bentonite, coadjuvante para o processo de remuage, que age como clarificador (Gel compacto, AEB, Brescia, Itália). Juntamente com o licor de tiragem, manoproteínas (0,30 g L⁻¹, Oenolees®, Laffort, Bordeaux, França) foram adicionadas ao vinho base antes da segunda fermentação em garrafa, de acordo com a recomendação do fabricante. Posteriormente, os vinhos foram engarrafados e armazenados na posição horizontal (17 °C) até a segunda fermentação ser completada. Vinte e quatro garrafas de vinho (750 mL) foram engarrafadas após a adição do licor de tiragem (n = 24). Metade das garrafas (n = 12) foram adicionados de manoproteínas e a outra metade (n = 12) correspondeu às amostras controle (vinho espumante sem adição de manoproteínas). Após a segunda fermentação, e após 3 meses de contato com a borra das leveduras, três garrafas de vinho espumante de cada tratamento (n = 6) foram estabilizados a frio, degolados e analisadas. As garrafas remanescentes foram mantidas em contato com as leveduras (17 °C) e degoladas após 6 (n = 6), 9 (n = 6) e 12 (n = 6) meses de envelhecimento biológico.

2.3 PARÂMETROS ENOLÓGICOS

Acidez titulável, acidez volátil, teor de álcool, pH, dióxido de enxofre livre e total foram determinados no vinho base e nos vinhos espumantes com 3 e 12 meses de envelhecimento biológico de acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2012).

2.4 PARÂMETROS DE COR, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E POLIFENÓIS

As amostras de vinhos espumantes rosé foram inicialmente degaseificadas por agitação magnética por 25 min e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U 2900, CA, EUA) para antocianinas monoméricas totais (AMT) pelo método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001), os resultados foram expressos em mg L⁻¹ de malvidina-3-*O*-glicosídeo. A intensidade da cor, a densidade da cor e a

tonalidade da cor foram determinadas com leituras a 420, 520 e 620 nm utilizando uma cubeta de 10 mm de caminho óptico (GLORIES, 1984). A capacidade antioxidante foi determinada pela atividade de eliminação de radicais livres usando o radical ABTS (RE et al., 1999), os resultados foram expressos em equivalentes Trolox (mmol TEAC L^{-1} vinho).

2.5 COMPOSIÇÃO FENÓLICA

A identificação e quantificação de polifenóis individuais das amostras de vinho durante todo o processo de envelhecimento foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em arranjo diodo (HPLC-DAD) (Shimadzu, Kyoto, Japão). Para todas as substâncias fenólicas, a separação do analito foi realizada em uma coluna de fase reversa CLC-ODS Shim-pack ($4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$) da Shimadzu. Para a análise, $20 \mu\text{L}$ da amostra foi injetado no sistema HPLC.

Dezesseis substâncias fenólicas pertencentes às subclasses de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis, flavanóis, tirosol e estilbenos foram quantificados nas amostras de vinhos e seus níveis foram monitorados até 12 meses de envelhecimento biológico. O preparo das amostras e a análise por HPLC foram realizadas segundo Burin et al. (2014). No procedimento, as amostras de vinho foram submetidas a extração líquido-líquido antes da injeção no sistema de cromatografia. A fase móvel A foi constituída de água:ácido acético (9:2 v/v) e a fase móvel B de água:acetonitrila:ácido acético (58:40:2 v/v/v). O gradiente de eluição foi o seguinte: 0-80 % de solvente B durante 55 min, 80-100 % B durante 15 min e 100-0 % B durante 5 min, com taxa de fluxo de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo total de corrida cromatográfica de 75 min. A detecção dos fenólicos foi de 280 nm para tirosol, catequina e epicatequina, a 320 nm para os ácidos cafeico, *trans*-caftárico, *p*-cumárico e ferúlico, 360 nm para miricetina, quercetina e campferol, e a 306 nm para o *trans*-resveratrol.

A separação dos ácidos hidroxibenzoico (gálico, protocateico, vanílico, serínico e elágico) foi realizada utilizando-se uma fase móvel composta de água ultrapura:ácido acético (98:2, v/v) (A) e acetonitrila:solvente A (80:20, v/v) (B). O gradiente de eluição foi o seguinte: 0–35 % B por 35 min, 35–0 % B por 3 min. A taxa de fluxo foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e a detecção dos ácidos benzóicos foi a 280 nm, com exceção do ácido elágico que foi detectado a 254 nm.

As antocianinas 3-*O*-monoglicosídeos (malvidina, cianidina, delfinidina e peonidina) foram determinadas de acordo com Revilla et al., (1999). Utilizou-se uma fase móvel constituída por água:ácido fórmico

(90:10 v/v) como solvente A, e água:metanol:ácido fórmico (45:45:10 v/v/v) como solvente B. O gradiente de eluição foi de 35-95 % de solvente B por 20 min, 95-100 % de solvente B por 5 min, 100-35 % de solvente B por 5 min, mantendo-se por mais 5 min, com um tempo total de 35 min de corrida cromatográfica. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL min⁻¹ e a detecção das antocianinas foi no comprimento de onda de 520 nm.

A identificação e quantificação de todas as substâncias fenólicas foi realizada comparando os picos dos analitos com os respectivos padrões de soluções na faixa de concentração de 0,01 a 200 mg L⁻¹, utilizando curva de calibração por adição de padrão na matriz.

2.6 ÁCIDOS ORGÂNICOS

O mesmo sistema cromatográfico foi utilizado para a quantificação de ácidos orgânicos (tartárico, succínico, málico, cítrico e láctico), seguindo o método descrito por Escobal et al. (1998), com modificações. Para a análise, as amostras de vinho foram diluídas em água ultra pura e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico. A separação dos analitos foi realizada utilizando eluição isocrática com a fase móvel constituída de água acidificada 1,2 % (v/v) com ácido fosfórico a pH 2,4. As modificações foram as seguintes: taxa de fluxo foi de 0,7 mL min⁻¹ e o tempo total de corrida cromatográfica foi de 40 min. A detecção foi realizada em 212 nm para todos os ácidos orgânicos. A quantificação foi executada utilizando curva de calibração por adição de padrão na matriz no intervalo de concentração de 0,003 a 0,5 g L⁻¹.

2.7 PERFIL MINERAL

A determinação dos elementos foi realizada utilizando um modelo ICP-OES da série iCAP 6000 (Thermo Scientific) equipado com um nebulizador do tipo Meinhard® e uma câmara de nebulização ciclônica. Argônio com pureza mínima de 99,95 % foi utilizado como gás principal, auxiliar e nebulizador. Os parâmetros operacionais para todas as medições foram: potência de frequência de rádio de 1300 W, fluxo de gás auxiliar de 1,00 L min⁻¹ e vazão de gás nebulizador de 0,45 L min⁻¹. Os comprimentos de onda de emissão monitorados foram 396,8 nm (Ca), 324,7 nm (Cu), 259,9 nm (Fe), 766,4 nm (K), 279,5 nm (Mg), 257,6 nm (Mn), 421,5 nm (Sr), 334,5 nm (Zn) e 361,3 nm (Sc - Internal Standard).

A digestão da amostra foi realizada em um forno micro-ondas modelo DGT100 Plus (Provecto Analítica, Brasil) equipado com frascos Teflon® fechados (volume interno de 80,0 mL). A digestão assistida por

micro-ondas foi realizada adicionando 2,0 mL de cada amostra diretamente dentro dos recipientes de Teflon®; a mistura de digestão foi composta por 4,0 ml de HNO₃ 14 mol L⁻¹, e 1,0 mL de H₂O₂, que foi adicionada à amostra. Os recipientes foram fechados e submetidos ao programa de potência da seguinte maneira: 250 W por 2 min, 0 W por 2 min, 250 W por 6 min, 400 W por 5 min, 600 W por 5 min e resfriamento por 10 min. As amostras foram removidas, diluídas e analisadas.

2.8 MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E RAMAN

Espectros de infravermelho próximo foram coletados usando um espectrômetro FT-NIR Frontier 400 (Perkin Elmer, EUA) e a aquisição do espectro foi realizada a partir de 9090,91 cm⁻¹ a 4000,00 cm⁻¹. Enquanto a análise de espectroscopia Raman foi realizada usando um PeakSeeker Pro-785, Agiltron, (Ocean Optics, EUA). As medidas Raman foram realizadas de 250 a 1800 cm⁻¹, com uma potência de laser de excitação de 100 mW (785 nm), o tempo de integração de 60 s, e o quadro de 10 s. Todas as análises foram realizadas em cada amostra sem diluição, as medidas foram realizadas em cinco repetições para cada amostra e o espectro foi coletado como o espectro médio para cada amostra.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

ANOVA e análises estatísticas multivariadas foram realizadas usando o software Statistica versão 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP). O teste t de Student foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Diferenças significativas foram avaliadas usando o teste t e o teste de múltiplas frequências de Duncan (p<0,05). A variabilidade de dados influenciada pelo tempo de envelhecimento e a adição de manoproteínas foi avaliada pela análise de componentes principais (ACP).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PARÂMETROS ENOLÓGICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

A Tabela 1 mostra os parâmetros enológicos clássicos e os ácidos orgânicos determinados nas amostras de vinho base e nos vinhos espumantes no início do experimento e após 12 meses de envelhecimento biológico. Observou-se que a adição de manoproteínas não alterou

significativamente ($p > 0,05$) o pH e a acidez titulável dos espumantes após 3 e 12 meses de envelhecimento. No entanto, observou-se que estes vinhos apresentaram menor acidez volátil em comparação com a amostra controle (vinhos sem manoproteínas). Além disso, os vinhos tratados com o agente apresentaram maiores concentrações de SO_2 livre e total e teor de álcool nas amostras com 3 e 12 meses de envelhecimento. As características enológicas do vinho base e dos vinhos espumantes estão de acordo com os parâmetros estabelecidos para vinhos em práticas internacionais (OIV, 2012). Com exceção do ácido cítrico, quatro ácidos orgânicos presentes nas uvas e vinhos foram detectados nas amostras de vinho. O ácido málico foi o ácido orgânico mais abundante no vinho base e nos vinhos espumantes, com concentrações variando de 3,35 a 3,74 g L⁻¹, seguido dos ácidos láctico e tartárico.

Os ácidos orgânicos foram quantificados em concentrações variadas nas amostras de vinho. As concentrações médias foram semelhantes às encontradas em outros estudos com vinhos espumantes (GALLARDO-CHACÓN et al., 2010; CALIARI et al., 2015). Estas substâncias contribuem para a acidez total e volátil dos vinhos (OIV, 2012). As altas concentrações de ácido málico encontradas no vinho base e nos vinhos espumantes podem indicar que a colheita de uvas foi realizada antes da maturação tecnológica (CALIARI et al., 2015). Isso também indica que a fermentação maloláctica não foi concluída, o que é típico da vinificação de vinhos espumantes (GALLARDO-CHACÓN et al., 2010). As concentrações de ácidos orgânicos nos vinhos espumantes rosé foram influenciadas pela adição do agente enológico. Os teores de ácidos málico e succínico foram significativamente maiores nas amostras adicionadas de manoproteína ao longo do envelhecimento biológico, enquanto que, as concentrações de ácido tartárico nos vinhos espumantes diminuíram quando comparadas com as amostras controle, demonstrando a influência das manoproteínas na concentração desses ácidos orgânicos e na qualidade sensorial dos vinhos espumantes rosé. Independentemente do uso de manoproteínas, as alterações nos ácidos orgânicos são geralmente acompanhadas por pequenas alterações de pH que podem ser justificadas devido ao metabolismo fermentativo da levedura (PAN et al., 2011). Isso pode explicar o aumento do pH dos vinhos verificados após 12 meses de envelhecimento neste estudo, provavelmente devido à diminuição das concentrações de ácido tartárico durante o envelhecimento, como consequência da precipitação do bitartrato de potássio. Apesar de algumas variações, observou-se que o perfil e os teores de ácidos orgânicos foram preservados durante o envelhecimento biológico, uma vez que foram quantificados individualmente após 12

meses de envelhecimento. Isto demonstra que estes ácidos específicos, nomeadamente o málico, o tartárico, o láctico e o succínico, não foram metabolizados, podendo assim ser responsáveis pela qualidade final dos vinhos espumantes rosé.

Tabela 1. Parâmetros enológicos clássicos e ácidos orgânicos determinados no vinho base e nos vinhos espumantes adicionados de manoproteínas após 3 e 12 meses de envelhecimento biológico.

	Vinho base	Envelhecimento biológico			
		Vinhos espumantes, 3 meses		Vinhos espumantes, 12 meses	
		Controle	Manoproteína	Controle	Manoproteína
pH	3,37±0,01	3,47±0,01 ^a	3,46±0,01 ^a	3,83±0,01 ^b	3,84±0,01 ^b
Acidez titulável	4,28±0,26	4,38±0,18 ^b	4,68±0,58 ^b	3,20±0,12 ^a	3,15±0,19 ^a
Acidez volátil	0,21±0,03	0,21±0,01 ^a	0,17±0,01 ^{*b}	0,18±0,01 ^a	0,15±0,01 ^{*a}
SO ₂ livre	11,20±0,80	11,20±0,01 ^a	13,20±0,40 ^{*a}	12,70±0,56 ^b	14,60±0,25 ^{*b}
SO ₂ total	14,80±0,40	22,93±2,01 ^a	36,27±3,23 ^{*a}	42,01±1,90 ^b	46,03±2,60 ^{*b}
Teor alcoólico	11,00±0,01	12,40±0,01 ^a	12,63±0,06 ^{*a}	12,45±0,10 ^a	12,71±0,09 ^{*b}
Ácido tartárico	0,95±0,01	0,94±0,01 ^b	0,92±0,01 ^{*b}	0,90±0,02 ^a	0,85±0,01 ^{*a}
Ácido láctico	1,21±0,01	1,06±0,03 ^a	1,10±0,01 ^a	1,09±0,02 ^a	1,11±0,01 ^a
Ácido málico	3,74±0,01	3,35±0,01 ^a	3,43±0,01 ^{*a}	3,40±0,02 ^b	3,50±0,01 ^{*b}
Ácido succínico	nd	0,20±0,03 ^a	0,26±0,01 ^{*a}	0,21±0,01 ^b	0,29±0,02 ^{*b}
Ácido cítrico	nd	nd	nd	nd	nd
Total ácidos orgânicos	5,90	5,56	5,71	5,59	5,75

Valores médios ± desvio padrão (n = 3). *Indica diferença significativa entre os vinhos espumantes e seus respectivos controles (teste t de Student, p<0,05). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras controle durante o envelhecimento biológico (teste de Duncan, p<0,05). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os vinhos espumantes adicionados de manoproteínas durante o envelhecimento biológico (teste de Duncan, p<0,05). Acidez titulável (g L⁻¹ ácido tartárico); Acidez volátil (g L⁻¹ ácido acético); SO₂ livre e total (mg L⁻¹ dióxido de enxofre); Teor de álcool (% v/v.); Ácidos orgânicos (g L⁻¹). nd: não detectado.

3.2 EFEITO DE MANOPROTEÍNAS E EVOLUÇÃO DOS POLIFENÓIS DO VINHO DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO

O perfil fenólico e a evolução dos vinhos são apresentados na Tabela 2. Muitos polifenóis incluindo ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, flavonóis, flavanóis e antocianinas foram identificados nos vinhos espumantes rosé. O ácido cafeico, catequina, tirosol, ácido gálico e malvidina-3-*O*-glicosídeo foram os fenólicos predominantes. O *trans*-resveratrol e o tirosol foram encontrados em altas concentrações (7,70 e 98,07 mg L⁻¹, respectivamente), enquanto que, a antocianina cianidina-3-*O*-glicosídeo não foi detectada nos vinhos estudados. A

adição de manoproteínas influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) os parâmetros de cor, atividade antioxidante e as concentrações dos fenólicos individuais, com efeito variável ao longo do tempo de envelhecimento.

As concentrações dos ácidos cafeico e *p*-cumárico nos vinhos tratados com manoproteínas foram significativamente maiores ($p < 0,05$) em comparação com a amostra controle. Para o ácido *trans*-caftárico, este efeito só foi observado após 12 meses de envelhecimento, sendo que os vinhos espumantes adicionados de manoproteínas apresentaram níveis mais elevados deste ácido do que a amostra controle. Assim, a influência das manoproteínas foi positivamente observada no final do envelhecimento biológico, quando os vinhos espumantes apresentaram maior soma dos ácidos hidroxicinâmicos, respectivamente em 9 (30,9 mg L⁻¹) e 12 meses (27,8 mg L⁻¹) de envelhecimento (Figura 1). Contrariamente, as concentrações de ácidos cafeico e ferúlico nestas amostras diminuíram durante o envelhecimento biológico. Essas mudanças durante o envelhecimento podem estar relacionadas a reações de hidrólise das formas esterificadas dessas substâncias para formar ácidos hidroxicinâmicos livres ou devido à participação de suas formas livres em reações de polimerização com antocianinas, levando à formação de piranoantocianinas (GARRIDO; BORGES, 2013; MARQUEZ; SERRATOSA; MERIDA, 2013).

Tabela 2. Parâmetros de cor e caracterização fenólica das amostras de vinho e evolução dos fenólicos individuais (mg L⁻¹) dos vinhos espumantes rosé adicionados de manoproteínas durante o envelhecimento biológico (*sur lies*).

Substâncias	Vinho Base	Envelhecimento biológico			
		Vinhos espumantes, 3 meses		Vinhos espumantes, 6 meses	
		Controle	Manoproteína	Controle	Manoproteína
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>					
Gálico	10,74±0,05	12,45±0,07 ^b	12,32±0,01 ^{*a}	12,60±0,01 ^b	12,71±0,08 ^{ab}
Protocateico	7,27±0,03	4,09±0,04 ^b	4,16±0,01 ^{*a}	4,36±0,07 ^c	4,27±0,01 ^b
Vanílico	5,23±0,03	3,45±0,03 ^a	3,97±0,01 ^{*b}	3,86±0,07 ^b	3,92±0,02 ^a
Serínico	0,69±0,01	0,49±0,01 ^a	0,55±0,01 ^{*a}	0,61±0,02 ^b	0,64±0,01 ^b
Elágico	0,34±0,01	0,57±0,01 ^b	0,41±0,01 ^{*b}	0,17±0,01 ^a	0,23±0,01 ^{*a}
<i>Ácidos hidroxicinâmicos</i>					
Cafeico	26,76±0,01	28,48±0,50 ^d	29,72±0,01 ^{*d}	19,05±0,02 ^c	20,19±0,02 ^{*c}
<i>trans</i> -caftárico	6,41±0,04	5,95±0,07 ^c	4,21±0,02 ^{*a}	7,11±0,02 ^d	5,52±0,03 ^{*c}
<i>p</i> -cumárico	5,81±0,01	4,71±0,02 ^a	4,77±0,01 ^{*a}	4,74±0,04 ^a	4,85±0,01 ^{*b}
Ferúlico	1,14±0,01	1,25±0,06 ^c	1,57±0,01 ^{*d}	0,91±0,03 ^b	0,91±0,01 ^c
<i>Flavonóis</i>					
Campferol	0,63±0,01	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	0,58±0,01 ^{*a}
Quercetina	1,13±0,01	0,79±0,07 ^a	0,91±0,01 ^{*a}	0,97±0,01 ^b	0,98±0,01 ^{*b}
Miricetina	2,18±0,01	1,18±0,01 ^d	1,35±0,01 ^{*d}	0,53±0,01 ^a	0,71±0,01 ^{*a}
<i>Flavanóis</i>					
(+)-catequina	11,33±0,06	3,53±0,09 ^a	2,69±0,15 ^{*a}	3,70±0,09 ^b	2,43±0,10 ^{*a}
(-)-epicatequina	<0,07 ¹	<0,07 ¹	<0,07 ¹	<0,07 ¹	<0,07 ¹
<i>Antocianinas 3-O-monoglicosídeos</i>					
Delfinidina	0,42±0,01	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Cianidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Peonidina	1,60±0,02	1,04±0,01 ^c	0,86±0,03 ^{*c}	1,00±0,01 ^b	0,83±0,01 ^{*b}
Malvidina	25,01±0,17	19,34±0,14 ^c	20,70±1,01 ^c	19,29±0,13 ^c	21,99±0,01 ^{*d}
<i>Outros</i>					
<i>trans</i> -resveratrol	2,90±0,02	2,10±0,03 ^a	2,36±0,03 ^{*a}	2,32±0,01 ^b	2,64±0,01 ^{*a}
Tirosol	97,50±0,38	91,51±0,75 ^b	95,90±0,06 ^{*b}	93,96±0,06 ^c	94,00±0,41 ^{*a}
AMT	27,05±0,23	24,35±0,26 ^a	25,76±0,35 ^{*c}	24,21±0,35 ^a	25,72±0,31 ^{*c}
ABTS [#]	3,02±0,13	2,50±0,32 ^b	3,45±0,24 ^{*c}	2,70±0,01 ^b	2,80±0,04 ^{*b}
Intensidade de cor ^{##}	5,25±0,01	5,15±0,03 ^c	8,96±0,16 ^{*c}	1,48±0,10 ^a	1,47±0,09 ^a
Tonalidade de cor ^{##}	1,02±0,01	1,16±0,02 ^a	1,09±0,01 ^{*a}	1,15±0,02 ^a	1,14±0,01 ^b
Densidade de cor ^{##}	4,57±0,01	4,19±0,04 ^c	6,76±0,11 ^{*c}	1,35±0,08 ^a	1,35±0,06 ^a

Tabela 2. (Continuação)

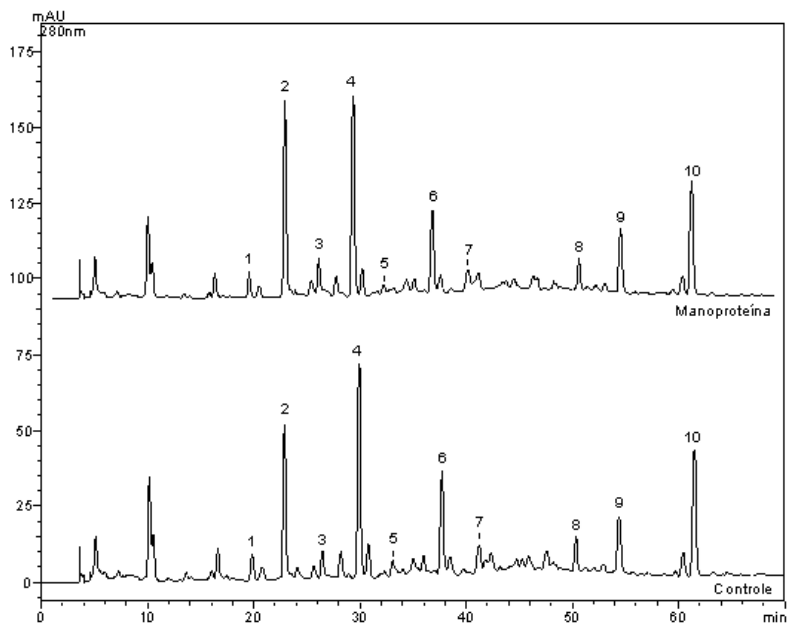
Substâncias	Envelhecimento biológico			
	Vinhos espumantes, 9 meses		Vinhos espumantes, 12 meses	
	Controle	Manoproteína	Controle	Manoproteína
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>				
Gálico	13,00±0,10 ^c	13,50±0,50 ^{*c}	11,86±0,06 ^a	13,15±0,05 ^{*bc}
Protocateico	5,48±0,05 ^d	5,76±0,02 ^{*c}	2,50±0,02 ^a	4,27±0,01 ^{*b}
Vanílico	3,95±0,02 ^b	4,08±0,03 ^{*c}	4,71±0,05 ^c	5,21±0,01 ^{*d}
Serínico	0,66±0,04 ^c	0,81±0,01 ^{*c}	0,98±0,01 ^d	0,99±0,02 ^d
Elágico	3,37±0,13 ^c	4,63±0,09 ^{*d}	3,97±0,04 ^d	4,17±0,11 ^{*c}
<i>Ácidos hidroxicinâmicos</i>				
Cafeico	16,83±0,01 ^b	18,98±0,01 ^{*b}	15,39±0,03 ^a	16,29±0,01 ^{*a}
<i>trans</i> -caftárico	5,73±0,03 ^b	5,40±0,02 ^{*b}	4,53±0,03 ^a	5,38±0,01 ^{*b}
<i>p</i> -cumárico	5,37±0,01 ^c	5,65±0,01 ^{*d}	5,09±0,01 ^b	5,42±0,03 ^{*c}
Ferúlico	0,84±0,01 ^a	0,89±0,01 ^{*b}	0,78±0,01 ^a	0,72±0,01 ^{*a}
<i>Flavonóis</i>				
Campferol	<0,04 ¹	0,70±0,01 ^{*b}	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Quercetina	1,50±0,01 ^c	1,83±0,01 ^{*c}	1,99±0,04 ^d	2,18±0,02 ^{*d}
Miricetina	0,84±0,02 ^b	1,04±0,01 ^{*b}	0,94±0,02 ^c	1,17±0,01 ^{*c}
<i>Flavanóis</i>				
(+)-catequina	20,97±0,06 ^d	17,22±0,10 ^{*b}	19,21±0,08 ^c	23,81±0,59 ^{*c}
(-)-epicatequina	6,45±0,08 ^a	3,92±0,08 ^{*a}	19,98±0,47 ^b	11,64±0,01 ^{*b}
<i>Antocianinas 3-O-monoglicosídeos</i>				
Delfinidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Cianidina	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹	<0,05 ¹
Peonidina	0,47±0,01 ^a	0,46±0,01 ^{*a}	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Malvidina	14,15±0,12 ^b	13,81±0,12 ^{*b}	3,07±0,02 ^a	3,02±0,01 ^{*a}
<i>Outros</i>				
<i>trans</i> -resveratrol	6,35±0,03 ^c	7,70±0,06 ^{*b}	6,91±0,01 ^d	7,52±0,32 ^{*b}
Tirosol	91,43±0,08 ^b	93,96±0,08 ^{*a}	86,64±0,11 ^a	98,07±0,40 ^{*c}
AMT	16,22±0,31 ^b	16,47±0,07 ^b	3,47±0,02 ^a	3,40±0,14 ^a
ABTS [#]	0,42±0,12 ^a	0,79±0,01 ^{*a}	3,24±0,06 ^c	2,87±0,08 ^{*b}
Intensidade de cor ^{##}	1,48±0,01 ^a	1,51±0,06 ^a	1,81±0,01 ^b	1,96±0,02 ^{*b}
Tonalidade de cor ^{##}	1,19±0,01 ^b	1,20±0,02 ^c	1,44±0,02 ^c	1,43±0,01 ^d
Densidade de cor ^{##}	1,36±0,01 ^a	1,39±0,04 ^a	1,61±0,01 ^b	1,71±0,02 ^{*b}

Valores médios ± desvio padrão (n = 3). *Indica diferença significativa entre os vinhos espumantes e seus respectivos controles (teste t de Student, p<0,05). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras de controle durante o envelhecimento biológico (teste de Duncan, p<0,05). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os vinhos espumantes adicionados de manoproteínas durante o envelhecimento biológico (teste de Duncan, p<0,05). AMT, antocianinas monoméricas totais (mg L⁻¹ malvidina-3-O-glicosídeo). [#]Atividade antioxidante de eliminação de radical expressa como equivalentes de Trolox (mmol TEAC L⁻¹). ^{##}expresso como índice. ¹Valor menor que o limite de detecção do método.

Um total de cinco ácidos hidroxibenzoicos foram detectados nas amostras, sendo o ácido gálico o mais abundante, presente em concentrações que variaram entre 10,74 e 13,50 mg L⁻¹ no vinho base e nos vinhos espumantes, respectivamente. Similarmente aos ácidos hidroxicinâmicos, os vinhos espumantes adicionados de manoproteínas apresentaram as maiores concentrações dos ácidos hidroxibenzoicos após 9 e 12 meses de envelhecimento. Nestes vinhos espumantes, as concentrações dos ácidos protocateico, gálico, vanílico e elágico foram significativamente maiores em relação à amostra controle. Isto mostra o efeito benéfico das manoproteínas no teor dos ácidos fenólicos, uma vez que estas substâncias estão associadas ao potencial antioxidante dos vinhos. Em geral, observou-se que as concentrações dos ácidos hidroxibenzoicos aumentou nas amostras de vinhos espumantes ao longo do envelhecimento biológico. Esses achados são consistentes com relatos prévios de mudanças nos teores de ácidos fenólicos em vinhos envelhecidos, o que é atribuído às reações de hidrólise durante a autólise de leveduras, como a formação de ácido gálico resultante da hidrólise de taninos (POZO-BAYÓN et al., 2009).

Mudanças substanciais também foram verificadas quando se compara o perfil fenólico dos vinhos espumantes e do vinho base, pois alguns fenólicos não foram detectados em todas as amostras de vinho, como o campferol e as antocianinas peonidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo. A epicatequina não foi detectada nos vinhos no início do experimento, entretanto, foi quantificada em concentrações crescentes nos últimos meses de envelhecimento biológico (após 9 e 12 meses). A adição de manoproteínas teve um efeito variável nos flavonóis e flavanóis. As concentrações de flavonóis foram significativamente maiores nos vinhos tratados em comparação com as amostras controle. Por outro lado, os níveis de (+)-catequina e (-)-epicatequina diminuíram consistentemente durante o envelhecimento em relação aos vinhos não tratados, com exceção da catequina após 12 meses de envelhecimento (Figura 1). Estas alterações são provavelmente devidas às reações de copigmentação, despolimerização ou polimerização destas substâncias com outros fenólicos que ocorrem durante o envelhecimento do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). A diminuição nas concentrações de alguns fenólicos observados nas amostras adicionadas de manoproteínas pode ser atribuída aos fenômenos de precipitação das manoproteínas ou à formação de colóides instáveis (GUADALUPE et al., 2007).

Figura 1. Cromatograma representativo dos polifenóis nos vinhos espumantes Merlot com e sem adição de manoproteínas após 12 meses de envelhecimento biológico. Picos de absorvância (280 nm): 1. ácido *trans*-caftárico, 2. tirosol, 3. (+)-catequina, 4. ácido cafeico, 5. (-)-epicatequina, 6. ácido *p*-cumárico, 7. ácido ferúlico 8. miricetina, 9. *trans*-resveratrol, 10. quercetina.



Quanto à cor dos vinhos espumantes rosé, as concentrações de antocianinas-3-*O*-monoglicosídeos e AMT mostraram uma diminuição gradual ao longo do envelhecimento biológico. Seus níveis nos vinhos controle e naqueles adicionados de manoproteínas apresentaram reduções de 85 % e 86 %, respectivamente, ao final de 12 meses de envelhecimento. Por outro lado, alterações na intensidade de cor, tonalidade de cor e densidade de cor foram significativas apenas nos vinhos após 3 e 12 meses de envelhecimento. A adição de manoproteínas não influenciou as concentrações de antocianinas nos vinhos espumantes rosé, como evidenciado em outros estudos com vinhos espumantes (PÉREZ-MAGARIÑO et al., 2015) e vinhos tintos (GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008). Em conjunto, estes resultados demonstram mudanças específicas envolvendo diferentes polifenóis que ocorrem durante o envelhecimento biológico que podem modificar a qualidade química dos vinhos espumantes, e muitos foram de fato atribuídos às

manoproteínas. Em geral, a adição de manoproteínas influenciou as concentrações de *trans*-resveratrol, quercetina, catequina, ácido *p*-cumárico e ácidos hidroxibenzoicos que apresentaram suas concentrações aumentadas ao longo do tempo. Seu efeito poderia ser justificado pela adsorção ou liberação de polifenóis e outras substâncias não-fenólicas pela parede celular da levedura (GALLARDO-CHACÓN et al., 2010), ou também pela hidrólise de substâncias fenólicas com outras pequenas substâncias liberadas no vinho, tais como as manoproteínas de levedura (GUADALUPE et al., 2007).

3.3 PERFIL MINERAL

A composição elementar do vinho base e dos vinhos espumantes após 12 meses de envelhecimento biológico é apresentada na Tabela 3. Os macrossubstâncias Ca, K e Mg e o microelemento Mn foram quantificados em todas as amostras. Cobre, Zn, Fe e Sr não foram detectados. O potássio foi o macrossubstância presente em maiores concentrações em todas as amostras, os vinhos espumantes apresentaram maiores teores quando comparados ao vinho base. Cálcio e Mg apresentaram concentrações semelhantes nos vinhos. Observou-se que K, Ca e Magnésio apresentaram pequenas alterações durante a fermentação e o envelhecimento biológico, uma vez que seus teores nos vinhos foram bastante semelhantes ao longo do experimento. Estes macrossubstâncias são extraídas do solo pela videira e estão presentes nos vinhos devido ao processo de maceração utilizado para a elaboração dos vinhos (JOS et al., 2004), são importantes para a multiplicação e metabolismo de leveduras de vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Entre os microelementos, apenas Mn foi detectado nas amostras, com concentrações variando de 1,4 a 1,7 mg L⁻¹ nos vinhos espumantes e no vinho base, respectivamente. De fato, os microelementos como Mn, Fe, Cu, Zn, Se e Co são encontrados em concentrações deficientes em uvas e seus derivados (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Além de sua ocorrência natural nas bagas de uvas, seus níveis nos vinhos podem ser provenientes de contaminação ambiental ou condições de processamento, como o uso de produtos fitossanitários, ferramentas metálicas ou recipientes e uso de produtos enológicos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; HOPFER et al., 2015). Nos vinhos estudados, os níveis de macro e microelementos foram consistentes durante o envelhecimento biológico, sem alterações significativas entre vinhos tratados (adicionados de manoproteínas) e vinhos não tratados. Estes resultados demonstram que a adição de manoproteínas não comprometeu a concentração total dos

elementos dos vinhos espumantes, sugerindo que não ocorreu a precipitação ou formação de substâncias insolúveis com os minerais estudados, que se mantiveram estáveis nas amostras de vinho. No entanto, a determinação dos elementos nos vinhos é de grande interesse devido suas implicações nutricionais e toxicológicas, bem como sua importância enológica em relação à origem geográfica e autenticidade dos vinhos (JOS et al., 2004; HOPFER et al., 2015).

Tabela 3. Composição elementar (mg L⁻¹) do vinho base e vinhos espumantes rosé tratados com manoproteínas após 12 meses de envelhecimento biológico.

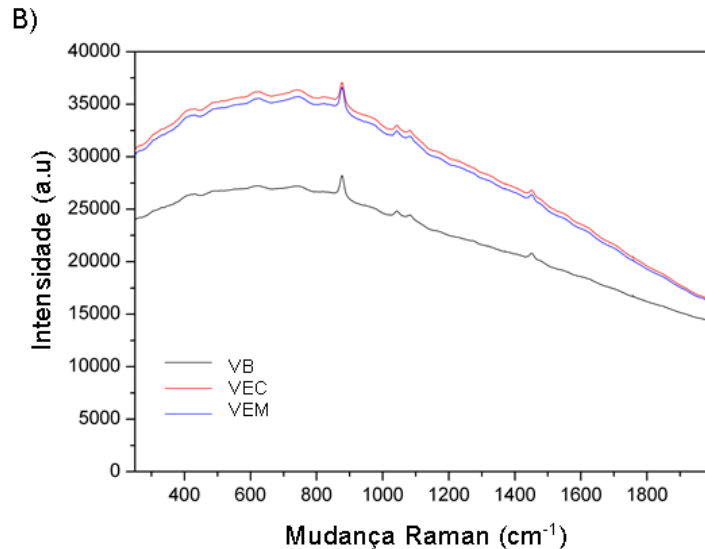
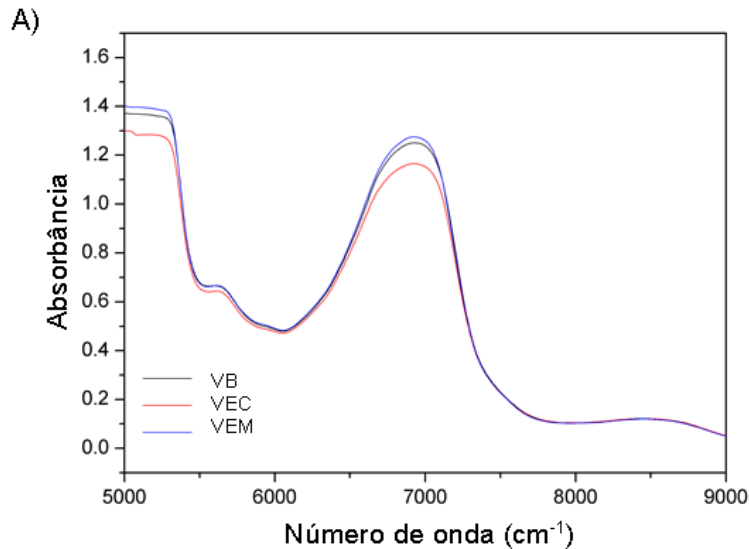
Elementos	Vinho base	Envelhecimento biológico	
		Vinhos espumantes, 12 meses	
		Controle	Manoproteína
<i>Macroelementos</i>			
Ca	61,7±1,6	63,4±2,2	69,3±10,6
K	1055,5±61,6	1152,2±56,6	1158,0±122,9
Mg	70,8±6,2	66,1±7,8	63,5±26,6
<i>Microelementos</i>			
Mn	1,7±0,2	1,4±0,2	1,4±0,5
Zn	<5,3 ¹	<5,3 ¹	<5,3 ¹
Fe	<1,1 ¹	<1,1 ¹	<1,1 ¹
Sr	<2,4 ¹	<2,4 ¹	<2,4 ¹
Cu	<1,0 ¹	<1,0 ¹	<1,0 ¹

Valores médios ± desvio padrão (n = 3). *Indica diferença significativa entre o vinho espumante adicionado de manoproteínas e amostra controle (teste t de Student, p<0,05). ¹Valor menor que o limite de detecção do método.

3.4 MEDIDAS DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E RAMAN DOS VINHOS ESPUMANTES

As medidas de espectrometria no infravermelho próximo e Raman foram realizadas no vinho base e nos vinhos espumantes tratados com manoproteínas para identificar possíveis modificações na composição química dos vinhos espumante rosé quando em contato com as borras das leveduras durante o envelhecimento. Com base na vibração de ligação das moléculas, essas técnicas fornecem informações úteis quanto a alteração de moléculas, neste caso, picos adicionais são observados nas amostras quando comparado com a amostra controle (LUNA et al., 2017; SANTOS et al., 2017). Assim, os espectros vibracionais das amostras de vinho foram monitorados no vinho base e após 12 meses de envelhecimento (Figura 2).

Figura 2. Espectros no infravermelho próximo (A) e Raman (B) do vinho base e dos vinhos espumantes após 12 meses de envelhecimento biológico. Vinho base: VB; Vinho espumante sem manoproteínas (controle): VEC; Vinho espumante adicionado de manoproteínas: VEM.



O espectro NIR das amostras (Figura 2A) demonstrou bandas de absorção com picos intensos acima de 6000 cm^{-1} , de aproximadamente 6250 cm^{-1} até 7620 cm^{-1} . A faixa de absorção intensa em torno de $6901,31\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à água (OH) (SANTOS et al., 2017). As regiões $9091\text{-}7692$ e $6023\text{-}5435\text{ cm}^{-1}$ forneceram os melhores modelos para a calibração da acidez, açúcares totais, pH e densidade dos vinhos (TEIXEIRA DOS SANTOS et al., 2018). Os sinais em torno de $7304\text{-}6301\text{ cm}^{-1}$ também podem ter origem na absorção dos grupos RN-H de proteínas (LUNA et al., 2017). Os sinais máximos observados na região de $5405\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídos à absorção de muitas ligações químicas e grupos químicos (C=O, C-H, CH₂ e CH₃) originados de ácidos fenólicos, água, ácidos orgânicos e outras substâncias fenólicas (BAUER et al., 2008; MARTELO-VIDAL; VÁZQUEZ, 2014). Bandas de absorção relacionadas aos sulfetos adicionados nos vinhos não foram características nos espectros NIR obtidos para amostras. Isso é explicado pela absorção das substâncias S-O e S=O que exibem bandas fortes na região do infravermelho médio, respectivamente de 1000 a 650 cm^{-1} e 1375 a 1050 cm^{-1} (BAUER et al., 2008).

A ausência de picos adicionais para os vinhos tratados com manoproteínas e a amostra controle indica que a composição dos vinhos não foi modificada quanto a degradação e formação de novas substâncias. As intensidades observadas podem ser atribuídas a diferenças na composição dos vinhos (vinho base e vinhos espumantes) e seus níveis variáveis de constituintes, principalmente as substâncias fenólicas e ácidos orgânicos, como mostrado pelos resultados da caracterização química. Em estudos anteriores, os dados espectrais de infravermelho coletados de derivados da uva, como vinhos tintos e sucos, mostraram picos intensos nas faixas de $700\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ e $2600\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, correspondente às substâncias fenólicas como a cianidina, malvidina, quercetina e catequina (MARTELO-VIDAL; VÁZQUEZ, 2014; SNYDER et al., 2014; SEN et al., 2016). De acordo com a literatura, isso pode ser consistente com nossas observações. De fato, juntamente com a malvidina-3-*O*-glicosídeo e alguns ácidos fenólicos, a catequina foi um dos fenólicos presentes em maiores concentrações nos vinhos estudados (Tabela 2).

No espectro Raman (Figura 2B), picos intensos foram observados em aproximadamente 840 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} e 1440 cm^{-1} . O pico de intensidade observado em torno de 880 cm^{-1} é provavelmente originado da ligação C-C do etanol. As bandas em torno de 1250 e 450 cm^{-1} podem estar relacionadas com as ligações H-C-C e O-C-C, respectivamente (SANTOS et al., 2017; TEIXEIRA DOS SANTOS et al.,

2018). Outros picos intensidade fraca podem ser observados no espectro de 1050 a 1450 cm^{-1} e são presumivelmente originados dos ácidos hidroxicinâmicos, como caféico, ferúlico, *p*-cumárico, entre outros presentes nos vinhos. De fato, como relatado anteriormente em vinhos brancos, essa família fenólica provavelmente contribui para o espalhamento Raman em torno de 1000 e 1600 cm^{-1} (MARTIN et al., 2015; SEN et al., 2016).

O espectro Raman das amostras de vinho confirmaram as observações do NIR de que não houve formação de novas espécies após o tratamento realizado nas amostras e após o envelhecimento biológico dos vinhos espumantes. Isto sugere que as pequenas mudanças observadas para as substâncias fenólicas e outros constituintes químicos encontrados nas amostras de vinho, justificadas por reações de polimerização, quelação ou copigmentação, podem ter ocorrido de forma semelhante em todos os vinhos, independentemente da adição de manoproteínas. Além disso, a amplitude das transformações químicas que podem ter ocorrido em nível molecular durante o envelhecimento dos espumantes não foi suficientemente para alterar seus espectros vibracionais.

A interpretação dos espectros vibracionais das amostras pode ser bastante complexa, uma vez que as variações podem não serem percebidas com clareza. Por exemplo, quando a região NIR é considerada, a sobreposição espectral e ressonâncias de Fermi podem comprometer a diferenciação de amostras (LUNA et al., 2017).

3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para explorar melhor as informações dos espectros e estudar quais constituintes químicos apresentaram maior influência no agrupamento das amostras. Os resultados da ACP considerando a composição dos vinhos espumantes são apresentados na Figura 3. Apenas amostras de vinho no final do envelhecimento biológico nos experimentos (12 meses) foram incluídas na análise, a fim de obter uma melhor representação das mudanças químicas e características finais dos vinhos espumantes envelhecidos.

Foi possível observar a partir do gráfico de escores (Figura 3A) da ACP que os vinhos espumantes foram divididos em dois componentes principais (PC1 x PC2), que representam 94,41 % da variabilidade total dos dados. O primeiro componente principal (PC1) representou a maior variabilidade dos dados (85,13 %), responsável por separar as amostras

em dois grupos, sendo um grupo correspondente aos vinhos controle e outro aos vinhos tratados com manoproteínas, segundo às variações nas concentrações de minerais, ácidos orgânicos e polifenóis. A Figura 3B representa os gráficos das correlações entre as variáveis analisadas. Como pode ser observado na ACP, o gráfico de dispersão demonstrou que as diferenças devido à adição do agente enológico nos vinhos obscurecem as diferenças entre constituintes químicos específicas da composição dos vinhos controle e tratados, particularmente no que diz respeito aos fenólicos individuais, tais como como tirosol, ácido gálico, ácido *trans*-caftárico, ácido cafeico, miricetina, ácido vanílico, ácido protocateico, quercetina, ácido *p*-cumárico, catequina, *trans*-resveratrol, ácido elágico e ácido siríngico, que foram fortemente associados com vinhos espumantes adicionados de manoproteínas. Destaca-se que a maioria dos minerais e ácidos orgânicos estudados, bem como a maioria dos polifenóis, estavam associados a esses vinhos. Esses resultados confirmam que as manoproteínas influenciaram positivamente a composição final dos vinhos espumantes envelhecidos.

Figura 3. ACP mostrando o gráfico de escore (A) para vinhos espumantes adicionados de manoproteínas e amostra controle após 12 meses de envelhecimento biológico, e (B) com as variáveis de polifenóis individuais, ácidos orgânicos e composição elementar dos vinhos espumantes. Atividade antioxidante (ABTS), intensidade de cor (IC), tonalidade de cor (TC), densidade de cor (DC) e antocianinas monoméricas totais (AMT).

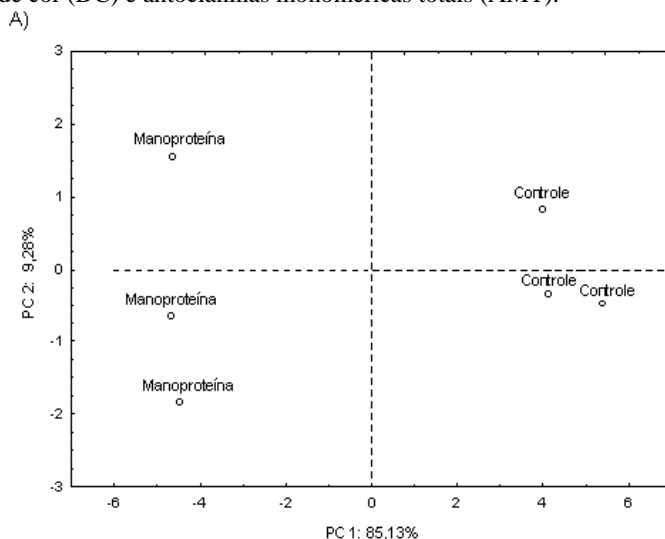
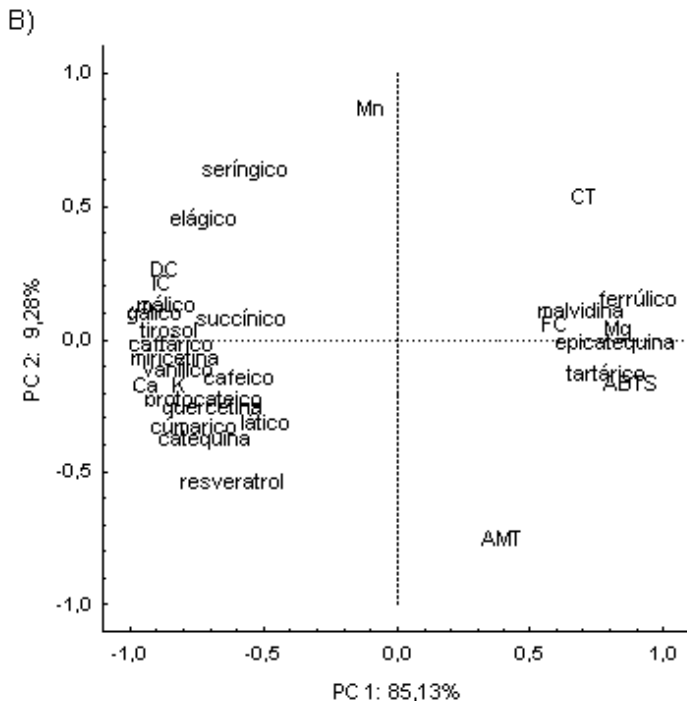


Figura 3. (Continuação)



4 CONCLUSÕES

Algumas alterações foram observadas nas concentrações dos constituintes fitoquímicos dos vinhos espumantes rosé elaborados pelo método *Champenoise*, com influência variável do tempo de envelhecimento biológico. Os níveis de macro e microelementos permaneceram estáveis em todas as amostras, mantendo as características nutricionais dos vinhos espumantes. A adição de manoproteínas influenciou positivamente as concentrações dos ácidos orgânicos e substâncias fenólicas nos vinhos ao longo do tempo e estes efeitos foram observados principalmente ao final do envelhecimento biológico, particularmente para o tirosol, *trans*-resveratrol, ácido gálico, catequina e os ácidos hidroxicinâmicos, que apresentaram um aumento de seus teores. As medições NIR e Raman revelaram que estas alterações não

modificaram os espectros de absorção dos vinhos. As mudanças observadas por meio desta abordagem multianalítica podem oferecer novos conhecimentos sobre as propriedades bioativas e nutricionais dos vinhos espumantes rosé.

CAPÍTULO 4

PERFIL FENÓLICO, TEOR DE GLUTATIONA E ESCURECIMENTO EM VINHOS ESPUMANTES DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO

Saionara Sartor¹, Vívian Maria Burin¹, Vinícius Caliarí², Marilde
T. Bordignon-Luiz¹

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga 1346, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

² Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de *Santa Catarina*, Rod. João Zardo 1660, 89560-000, Videira, Santa Catarina, Brasil.

RESUMO

Vinhos espumantes elaborados com variedades de uvas não-tradicionais (Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe) foram monitorados quanto as mudanças na composição fenólica, índice de escurecimento e teor de glutaciona durante 18 meses de envelhecimento biológico (*sur lies*), afim de verificar o potencial dessas variedades na elaboração de vinhos espumantes de qualidade. Importantes mudanças no perfil fenólico, escurecimento e teor de glutaciona foram observadas nos vinhos espumantes durante o tempo de envelhecimento sobre borra. O tirosol foi o composto fenólico individual presente em maiores concentrações nos vinhos espumantes, seguido dos ácidos cafeico, *trans*-caftárico e gálico, catequina e epicatequina. O tempo de envelhecimento sobre borra influenciou o aumento das concentração de alguns fenólicos individuais, principalmente os ácidos cafeico, gálico e elágico. Um aumento significativo do índice de escurecimento foi observado nos vinhos espumantes ao longo do envelhecimento. O ácido cafeico apresentou alta correlação positiva e significativa com o escurecimento e com o tempo de envelhecimento para todos os vinhos espumantes, assim sugere-se que o ácido cafeico seja utilizado como um indicador de qualidade para monitorar o perfil de envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes brancos. Esses resultados indicam que o tempo de envelhecimento sobre borra influenciou as mudanças no perfil fenólico dos vinhos espumantes, que apresentaram características particulares.

Palavras-chave: Vinho espumante. Polifenóis. Escurecimento. Glutaciona. Envelhecimento *sur lie*.

1 INTRODUÇÃO

Vinhos espumantes elaborados pelo método Tradicional (*Champenoise*) são obtidos por uma segunda fermentação do vinho base em garrafa. Após a segunda fermentação, a viabilidade celular diminui devido a autólise da levedura. Este processo é irreversível e ocorre geralmente no final da fase estacionária de crescimento (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). A autólise é um processo lento associado com a morte celular, e envolve a ação de enzimas hidrolíticas que liberam diferentes substâncias do citosol (como peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos) e da parede celular (como glucanas e manoproteínas) para o vinho. Após a autólise, as borras da levedura permanecem em contato com o vinho durante um processo denominado de envelhecimento biológico (*sur lie*) (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006). Durante esta etapa, as borras das leveduras podem adsorver e liberar diferentes substâncias fenólicas para o meio, que podem modificar o perfil bioativo e a capacidade antioxidante dos vinhos espumantes (STEFENON et al., 2014).

O perfil bioativo do vinho está diretamente relacionado com a estabilidade e evolução do produto tanto durante a fermentação como também durante o envelhecimento. Os polifenóis participam de inúmeras reações químicas, como oxidação, degradação e polimerização, influenciando a cor, sabor e grau de adstringência do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). O escurecimento de vinhos brancos é um dos maiores problemas para a indústria enológica. Os polifenóis, especialmente ácidos hidroxicinâmicos, são importantes substratos nas reações de oxidação (LI; GUO; WANG, 2008; FERREIRA-LIMA et al. 2016a). Durante o processo de vinificação, esses ácidos cinâmicos são liberados das células das uvas para o mosto, e rapidamente oxidados pela enzima polifenol oxidase (PPO) presente no meio (CHEYNIER et al., 1986). Inúmeras reações de oxidação são desencadeadas, formando *o*-quinonas polimerizadas (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009) o que contribui para o escurecimento dos vinhos principalmente durante o tempo de envelhecimento (IBERN-GÓMEZ et al., 2000).

A glutathione (GSH) é um tri-peptídeo naturalmente presente em uvas. Este composto participa diretamente do processo de oxidação tendo importante papel como agente antioxidante, pois reage com as *o*-quinonas dos ácidos hidroxicâmicos formando substâncias conhecidas como “aductos” de oxidação que limitam as reações de escurecimento. O 2-*S*-glutathionyl *trans*-caftaric acid (*Grape Reaction Product* - GRP ou Produto de Reação da Uva) foi o primeiro aduto de oxidação a ser

completamente elucidado (SINGLETON et al., 1985; CHEYNIER et al., 1986). Produtos adicionais resultantes da hidrólise do GRP, também já foram detectados (CEJUDO-BASTANTE et al., 2010; FERREIRA-LIMA et al., 2016b) e quantificados em vinhos brancos (FERREIRA-LIMA et al., 2017).

Considerando que a produção de vinho espumante está aumentando em escala global, existe um foco crescente em buscar variedades de uvas alternativas cultivadas em regiões emergentes que podem produzir vinhos espumantes de qualidade (KEMP et al., 2015). No Brasil, as variedades de uvas mais cultivadas são as espécies *Vitis labrusca* e híbridas, destinadas tanto para a elaboração de sucos como vinhos. Devido às suas características únicas que reflete na sua tipicidade, essas variedades vêm sendo utilizadas também para a elaboração de vinhos espumantes, podendo ser uma estratégia comercial. Cabe ressaltar que o uso destas variedades de uvas não-tradicionais para a elaboração de vinhos espumantes ainda é um desafio para a indústria vinícola. O estudo sobre as mudanças que ocorrem na composição fitoquímica destes vinhos espumantes elaborados com variedades uvas *V. labrusca* e/ou híbridas, durante o envelhecimento biológico, até o momento, ainda não foram relatados na literatura. Com o intuito de buscar novas alternativas para a elaboração de vinhos espumantes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo de envelhecimento sobre borra de vinhos espumantes brancos elaborados com variedades de uvas não-tradicionais (*V. labrusca* e híbridas) sobre as mudanças da composição fenólica, escurecimento e teor de glutatona.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Para a elaboração dos vinhos espumantes foram utilizadas variedades de uvas brancas *V. labrusca* L. e/ou híbridas, como Villenave, Niágara, Goethe e Manzoni Bianco, safra 2015, denominadas de variedade de uvas não-tradicionais.

Todas as uvas foram cultivadas na estação experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). O mosto foi obtido a partir do desengace, esmagamento e prensagem das uvas de uma única variedade. O mosto foi clarificado (7 ml L⁻¹ de solução de bentonite, AEB Spa, Bréscia, Itália) e adicionado de sulfito (30 mg L⁻¹ Vinoaromax, AEB Spa, Bréscia, Itália). Para produção do vinho base, o mosto de uva foi fermentado com leveduras

Saccharomyces cerevisiae PB2019 (Fermol Blanc, AEB Spa, Bréscia, Itália) em tanques de aço inoxidável, estabilizado a frio e sulfitado com dióxido de enxofre (30 mg L^{-1} , Vinoaromax, AEB Spa, Bréscia, Itália) antes do engarrafamento. Para produção dos vinhos espumantes pelo método Tradicional, foi adicionado ao vinho base 26 g L^{-1} de açúcar para obtenção de 6 atm de pressão, com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PB2002 (Fermol Reims Champagne, AEB Spa, Bréscia, Itália) e 15 g hL^{-1} de coadjuvante para *remuage* que age como clarificante (Compact gel, AEB, Bréscia, Itália). Os vinhos foram engarrafados e armazenados a 17°C até a segunda fermentação ser completada. O tempo de envelhecimento sobre borra (*sur lies*) dos vinhos espumantes foi de 3, 6, 9, 15 e 18 meses, para cada amostragem os vinhos espumantes foram estabilizados a frio, degolados, rolhados, engaiolados e analisados

2.1.2 Reagentes químicos

Os padrões de γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (GSH), 2,3-naphthalenedialdehyde (NDA), tris(2-carboxyethyl)phosphine) (TCEP), ácidos orgânicos, substâncias fenólicas, Folin-Ciocalteu, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). O reagente DMACA (*p*-dimetilaminocinamaldeído) foi adquirido da Fluka (Steinheim, Alemanha). Todos os solventes cromatográficos eram de grau HPLC adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água utilizada para as análises foi obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Massachusetts, USA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Parâmetros enológicos

Os sólidos solúveis totais ($^\circ\text{Brix}$), pH (pHmetro 220 MP Metler-Toledo), acidez total titulável, acidez volátil, teor alcoólico, anidrido sulfuroso livre e total foram determinados de acordo com os métodos da métodos da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2012).

2.2.2 Análises espectrofotométricas

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U 2900, CA, USA). Os polifenóis, estimados como capacidade redutora de Folin-Ciocalteu (FC), foram

determinados de acordo com o método de Singleton e Rossi (1965), os resultados foram expressos em mg L^{-1} de ácido gálico (GAE). O índice de escurecimento foi determinado de acordo com Glories (1984), com leituras em 420 nm, diretamente em cubeta de 1 cm. A determinação dos *orto*-difenóis foi realizada de acordo com Flanzly e Aubert (1969), utilizando o reativo de Arnou, os resultados foram expressos em mg L^{-1} de catequina. Os flavanóis totais (mg L^{-1} catequina) foram determinados pelo método colorimétrico DMACA (4-dimetilaminocinamaldeído) descrito por Arnous, Makris e Kefalas (2002). A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelo do método ABTS [ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico], e os resultados expressos em mMol TEAC por L^{-1} de vinho (atividade antioxidante equivalente a Trolox-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (RE et al., 1999).

2.2.3 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Shimadzu - Kyoto, Japão), composto por uma bomba de alta pressão modelo LC-10AT, desgaseificador a vácuo modelo DGU-14A5, detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e detector de Fluorescência (RF-10Ax1), forno (CTO-20A), injetor manual (Rheodyne) com loop de 20 μL , comunicador de sistema modelo CBM-20A, e software LC Solutions. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm de tamanho de partícula) (Shimadzu) para as análises por HPLC-DAD das substâncias fenólicas individuais e ácidos orgânicos. Utilizou-se uma coluna de fase inversa C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm) (Shimadzu) para as análises de HPLC-Fluorescência da glutatona total, reduzida e oxidada.

Fenólicos individuais

As substâncias fenólicas (miricetina, quercetina, campferol, *trans*-resveratrol, catequina, epicatequina, ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e caftárico) e os ácidos hidroxibenzoicos (ácidos gálico, protocateico, siríngico, vanílico e elágico) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com o método de Burin et al. (2014), com modificações. Para a análise dos mostos, vinhos base e espumantes foram realizadas extrações líquido-líquido conforme descrito por Burin et al. (2014).

Para a análise dos ácidos hidroxibenzoicos, foi utilizada fase móvel constituída de água:ácido acético (98:2 v/v) como solvente A, e 20 % do solvente A com 80 % de acetonitrila como solvente B. As eluições são realizadas aplicando um gradiente linear de 0-35% de solvente B durante 37 min, 35-0% de B durante 3 min, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A área dos picos foi determinada em comprimento de onda de 280 nm, com exceção do ácido elágico detectado a 254 nm.

Para análise das demais substâncias fenólicas foi utilizada como fase móvel água ultra pura: ácido acético (98:2 v/v) (solvente A), e água ultra pura:acetonitrila:ácido acético (58:40:2 v/v/v) (solvente B). As condições de eluição de gradiente foram: 0-80% de solvente B durante 55 minutos, 80-100% de B durante 5 min, 100-0% B por 5 min, com fluxo de 0,9 mL min⁻¹. A quantificação do tirosol, catequina e epicatequina foi realizada em 280 nm, substâncias da classe dos ácidos hidroxicinâmicos (cafeico, *trans*-caftárico, *p*-cumárico e ferúlico) foram quantificados em 320 nm, os flavonóis (miricetina, quercetina e campferol) foram quantificados em 360 nm e o *trans*-resveratrol foi quantificado em 306 nm.

A identificação e quantificação das substâncias fenólicas individuais foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos respectivos padrões e por meio de curva de calibração construída por adição de padrão na matriz.

Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos (málico, tartárico, láctico, cítrico e succínico) foram determinados cromatografia líquida de alta eficiência conforme o método de Escobal et al. (1998), com modificações. As amostras de mostos e vinhos foram centrifugadas e diluídas em água Milli-Q, filtradas em membrana PTFE 0,45 µm e injetadas no sistema cromatográfico. A separação cromatográfica foi realizada utilizando eluição isocrática. A fase móvel consiste de água ultra pura (Milli-Q) acidificada com ácido fosfórico (1,2 % v/v) com pH de 2,4. O fluxo do eluente foi de 0,7 mL min⁻¹, e o tempo da corrida cromatográfica foi de 40 minutos. O controle de detecção foi de 212 nm para todos os ácidos. Os resultados foram expressos em g L⁻¹ por meio da construção de uma curva de calibração por adição de padrão na matriz.

Glutationa total, reduzida e oxidada

A análise de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência de acordo com Marchand e De Revel (2010), com modificações. A fase móvel A consiste de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH = 8,6) e metanol (fase móvel B). Os analitos foram eluídos em condição isocrática: 85% de solvente A e 15% de solvente B, durante 18 minutos, com fluxo do solvente de 1,0 mL min⁻¹. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 467 e 525 nm, respectivamente. Para a quantificação da glutatona 100 µL de amostra de vinho (ou solução padrão) foi misturada com 900 µL de tampão fosfato (0,01 mM, pH 7,4) e então foi realizado uma reação de derivatização com o naftaleno 2,3-dicarboxialdeído (NDA) (1 mg mL⁻¹) e tampão borato (pH 9,2), após 4 minutos de reação a amostra foi injetada no cromatógrafo com forno mantido a temperatura de 40 °C durante toda a análise. O teor de glutatona reduzida foi determinado pela construção de uma curva de calibração pelo método de adição padrão na amostra e o resultado expresso em mg L⁻¹.

Para quantificação da glutatona total, antes de se realizar a reação de derivatização com NDA, foi realizada uma reação de redução da glutatona oxidada (GSSG), utilizando-se o agente redutor tris (2-carboxietil) fosfana (TCEP) (0,35 mM), após 4 minutos de reação a amostra foi derivatizada com NDA conforme descrito anteriormente e injetada diretamente no cromatógrafo. A concentração de glutatona oxidada foi determinada utilizando o cálculo das concentrações de glutatona total menos o teor de glutatona reduzida dividido por dois.

2.2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo programa STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, USA) e avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), teste de Tukey (p<0,05) e matriz de correlação. Todas as análises foram realizadas em triplicata, expresso como média ± desvio padrão. Regressão linear foi usada para determinar as relações entre os compostos com o tempo para cada amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PARÂMETROS ENOLÓGICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

A Tabela 1 apresenta os parâmetros enológicos clássicos e teor de ácidos orgânicos determinados nas amostras de mosto e vinho base das variedades de uvas não-tradicionais utilizadas para a elaboração de vinhos espumantes. Os valores para pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, acidez volátil, teor alcoólico, SO₂ livre e total estão de acordo com os parâmetros enológicos e práticas internacionais (OIV, 2012), indicando a qualidade das uvas e que boas práticas de vinificação foram empregadas.

Conhecer o perfil de ácidos orgânicos da uva e vinho é um importante parâmetro de qualidade pois estes contribuem para o pH, acidez total e volátil, além de auxiliarem na manutenção da cor, sabor e intensidade aromática dos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Observou-se neste estudo que os ácidos orgânicos málico e tartárico foram predominantes nas amostras de mosto e vinho base (Tabela 1). A variedade Villenave apresentou as maiores concentrações dos ácidos málico e tartárico no mosto (6,97 e 4,19 mg L⁻¹, respectivamente) e no vinho base (5,98 e 3,65 mg L⁻¹, respectivamente). Também, foi possível observar que as concentrações dos ácidos orgânicos das amostras de mosto e vinho base foram variavelmente modificadas pelo processo fermentativo. Os teores dos ácidos málico e tartárico do mosto foram relativamente maiores em relação ao vinho base para todas as variedades. Enquanto que as concentrações dos ácidos lático e succínico aumentaram consistentemente nas amostras de vinho base, demonstrando a influência da primeira fermentação alcoólica. Segundo Pan et al. (2011), alterações nos ácidos orgânicos são geralmente acompanhadas por pequenas mudanças de pH e são esperadas devido ao metabolismo fermentativo da levedura, corroborando com os resultados deste estudo, onde observou-se algumas variações nos valores de pH das amostras, que podem ser atribuídas a redução das concentrações do ácido tartárico durante o processo de vinificação como consequência da sua precipitação na forma de cristais de bitartrato de potássio. O equilíbrio da acidez e pH é essencial para a qualidade dos vinhos, pois uma acidez elevada realça a percepção de sabor ácido e adstringência, enquanto que a baixa acidez reduz a harmonia do vinho.

Tabela 1. Composição química do mosto e vinho base das variedades de uvas não-tradicionais utilizadas na elaboração dos vinhos espumantes.

Parâmetros	Mosto				Vinho base			
	Villenave	Niágara	Manzoni	Goethe	Villenave	Niágara	Manzoni	Goethe
SST	12,8±0,1 ^a	14,6±0,2 ^c	20,0±0,1 ^d	13,4±0,1 ^b	-	-	-	-
pH	3,10±0,01 ^b	2,86±0,01 ^a	3,60±0,02 ^d	3,27±0,01 ^c	2,69±0,01 ^a	3,11±0,01 ^c	3,07±0,01 ^b	3,32±0,01 ^d
Acidez titulável	8,62±0,01 ^d	5,35±0,01 ^a	6,11±0,01 ^b	7,41±0,08 ^c	9,13±0,23 ^d	5,24±0,09 ^a	7,59±0,09 ^c	6,03±0,08 ^b
Acidez volátil	-	-	-	-	0,18±0,01 ^b	0,19±0,01 ^b	0,09±0,02 ^a	0,17±0,02 ^b
SO ₂ livre	-	-	-	-	7,12±0,08 ^a	9,60±0,01 ^b	14,32±0,08 ^d	12,00±0,01 ^c
SO ₂ total	-	-	-	-	24,72±0,08 ^b	11,28±0,08 ^a	91,92±0,08 ^d	48,08±0,08 ^c
Teor de alcoólico	-	-	-	-	10,03±0,05 ^a	10,07±0,02 ^a	12,07±0,06 ^c	10,47±0,04 ^b
Ácido málico	6,97±0,02 ^d	3,18±0,01 ^a	5,02±0,01 ^b	5,92±0,01 ^c	5,98±0,01 ^d	1,07±0,01 ^b	4,42±0,01 ^c	1,00±0,02 ^a
Ácido tartárico	4,19±0,01 ^d	3,09±0,01 ^b	2,77±0,01 ^a	3,50±0,01 ^c	3,65±0,02 ^d	2,26±0,02 ^b	2,45±0,02 ^c	1,54±0,03 ^a
Ácido láctico	nd	nd	nd	nd	0,23±0,01 ^a	0,28±0,01 ^b	0,23±0,01 ^a	0,41±0,01 ^c
Ácido succínico	0,14±0,01 ^b	0,02±0,01 ^a	0,39±0,01 ^c	0,41±0,01 ^d	0,59±0,01 ^b	0,22±0,01 ^a	0,86±0,01 ^c	1,01±0,01 ^d
Ácido cítrico	0,06±0,01 ^b	0,03±0,01 ^a	0,16±0,01 ^c	0,12±0,02 ^d	nd	nd	nd	nd

Valores médios de três determinações independentes ± desvio padrão (n=3). A análise de variância (ANOVA) foi realizada separadamente para as amostras de mosto e vinho base. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (teste de Tukey, p<0,05). SST, Sólidos solúveis totais (°Brix); Acidez titulável (g L⁻¹ ácido tartárico); Acidez volátil (g L⁻¹ ácido acético); SO₂ livre e total (mg L⁻¹ dióxido de enxofre); Teor alcoólico (% v/v); Ácidos orgânicos (g L⁻¹). nd, não detectado.

3.2 PERFIL FENÓLICO E ÍNDICE DE ESCURECIMENTO DURANTE O ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO DE VINHOS ESPUMANTES

A evolução da composição fenólica individual durante o envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes elaborados com as variedades de uvas não-tradicionais está apresentado na Tabela 2. De maneira geral, observou-se que dentre os fenólicos individuais analisados neste estudo, o tirosol foi o composto encontrado em maiores concentrações nas amostras, variando de 32,18 a 73,72 mg L⁻¹ para os vinhos espumantes Niágara (9 meses) e Goethe (6 meses), respectivamente. Pode-se destacar a presença de outros fenólicos individuais nos vinhos espumantes como os ácidos *trans*-caftárico, cafeico e gálico, catequina e epicatequina.

Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, observou-se que o ácido *trans*-caftárico foi o composto fenólico predominante em todas as variedades analisadas (Tabela 2). Os vinhos espumantes Niágara apresentaram as maiores concentrações deste composto ao longo do envelhecimento, o que pode ser um indicativo da ocorrência de menor reação de oxidação neste vinho, uma vez que o ácido *trans*-caftárico é o principal substrato para as enzimas oxidativas. Estudo de Ibern-Gómez et al. (2000) demonstrou que vinhos espumantes das variedades Macabeo e Parellada também apresentaram maior concentração de ácido *trans*-caftárico e conseqüentemente menor formação de adutos de oxidação, provavelmente devido à proporção de glutatona e ácido *trans*-caftárico na uva, que determina a quantidade de 2-*S*-glutathionylcaftaric acid formado. No presente estudo, observou-se uma diminuição da concentração do ácido *trans*-caftárico no final do envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes em relação aos valores obtidos no tempo inicial (3 meses) para todas as variedades avaliadas. As mudanças nas concentrações do ácido *trans*-caftárico podem ser atribuídas a sua participação nas reações de oxidação que ocorrem durante o armazenamento do vinho. Diferentemente do ácido *trans*-caftárico, os ácidos cinâmicos, cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, aumentaram suas concentrações durante o envelhecimento sobre borra nos vinhos espumantes elaborados com as variedades Niágara e Manzoni. Este aumento da concentração dos ácidos fenólicos livres pode ser devido à hidrólise dos ésteres hidroxicinâmicos durante o processo de fermentação, bem como sua participação na reação com a glutatona (FERREIRA-LIMA et al., 2016a). Observou-se também que os vinhos espumantes Niágara e Manzoni apresentaram um aumento das

concentrações de *orto*-difenóis no final do envelhecimento em relação ao tempo inicial (3 meses) (Tabela 2), indicando que a glutatona disponível no meio reagiu com as *orto*-quinonas e impediu as reações de polimerização que causam o escurecimento do vinho.

Os flavanóis, como catequina e epicatequina, foram quantificados em todos os vinhos espumantes elaborados com variedades de uvas não-tradicionais, com diferenças significativas para os níveis de catequina que apresentou maiores concentrações, principalmente nos vinhos espumantes Niágara (até 24,67 mg L⁻¹) (Tabela 2). Em geral, observou-se variações não lineares nas concentrações de catequina e epicatequina, com aumento e diminuições dos teores ao longo do envelhecimento sobre borra para todos os vinhos espumantes. Essas alterações nas concentrações dos flavanóis podem ser devido à reatividade destas substâncias, principalmente pela participação nas reações de polimerização e/ou hidrólise durante envelhecimento do vinho (LOPEZ-TOLEDANO et al., 2006).

A evolução dos polifenóis, estimados como capacidade de redução de Folin-Ciocalteu (FC), demonstrou uma diminuição de suas concentrações ao longo do envelhecimento sobre borra para todos os vinhos espumantes (Tabela 2), o que pode estar relacionado à adsorção dessas moléculas pelas borras de leveduras (MAZAURIC; SALMON, 2005). A capacidade antioxidante determinada pelo radical ABTS apresentou uma evolução inversa a capacidade de redução de FC (Tabela 2), o aumento dos valores de ABTS nos vinhos espumantes foram observados até 15 meses de envelhecimento sobre borra. Dentre os vinhos espumantes avaliados, aquele elaborado com a variedade Manzoni apresentou maiores valores de capacidade antioxidante pelo método ABTS e de capacidade de redução de FC.

Tabela 2. Caracterização fenólica e índice de escurecimento das amostras de vinho elaboradas com variedades de uvas não-tradicionais e evolução dos vinhos espumantes durante o envelhecimento biológico.

Substâncias	Villenave					
	Vinho base	Envelhecimento <i>sur lies</i> vinhos espumantes				
		3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>						
Gálico	0,57±0,01	0,93±0,01 ^a	0,94±0,01 ^a	0,91±0,01 ^a	0,99±0,01 ^b	1,07±0,02 ^c
Protocateico	0,37±0,02	0,13±0,01 ^b	0,22±0,01 ^a	0,23±0,02 ^a	0,29±0,01 ^d	0,25±0,01 ^c
Vanílico	0,35±0,01	0,28±0,01 ^a	0,24±0,01 ^c	0,29±0,01 ^a	0,18±0,01 ^b	0,25±0,01 ^d
Siringico	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	0,10±0,01 ^a
Elágico	0,49±0,01	0,36±0,01 ^b	0,20±0,02 ^a	<0,02 ¹	<0,02 ¹	2,22±0,03 ^c
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>						
Cafeico	0,49±0,01	0,53±0,01 ^a	0,60±0,02 ^b	0,72±0,01 ^c	0,76±0,01 ^d	0,97±0,01 ^e
<i>trans</i> -caftárico	22,25±0,01	22,58±0,08 ^e	21,24±0,01 ^b	21,96±0,01 ^d	21,78±0,01 ^c	19,84±0,01 ^a
<i>p</i> -cumárico	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹
Ferúlico	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹
<i>Flavonóis</i>						
Campferol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Quercetina	0,17±0,01	<0,02 ¹	<0,02 ¹	<0,02 ¹	<0,02 ¹	<0,02 ¹
Miricetina	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
<i>Flavanóis</i>						
(+)-catequina	7,02±0,01	7,30±0,01 ^b	7,10±0,01 ^a	7,04±0,06 ^a	7,69±0,05 ^c	7,06±0,01 ^a
(-)-epicatequina	<0,07 ¹	1,20±0,01 ^a	1,54±0,02 ^c	1,45±0,02 ^b	1,18±0,01 ^a	1,21±0,02 ^a
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>						
<i>trans</i> -resveratrol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Tirosol	61,45±0,12	65,18±0,32 ^{ac}	65,94±0,02 ^{ab}	64,49±0,15 ^c	66,20±1,00 ^{ab}	66,85±0,13 ^b
FC	352,46±4,10	305,70±9,84 ^c	212, 84±5,46 ^b	212,02±2,88 ^b	174,86±6,26 ^a	177,87±0,82 ^a
FLA	8,65±0,39	13,24±0,38 ^c	13,20±0,45 ^c	12,25±0,22 ^b	12,65±0,06 ^{bc}	11,29±0,13 ^a
OD	25,85±2,87	38,65±0,47 ^b	43,82±0,47 ^c	38,10±0,94 ^b	35,56±1,25 ^a	32,11±1,70 ^a
ABTS*	0,01±0,01	0,30±0,01 ^a	0,31±0,01 ^{ab}	0,34±0,01 ^b	0,55±0,02 ^d	0,40±0,03 ^c
A420	0,11±0,01	0,07±0,01 ^a	0,08±0,01 ^b	0,08±0,01 ^b	0,09±0,01 ^c	0,09±0,01 ^c

Tabela 2. (Continuação)

Substâncias	Niágara					
	Vinho base	Envelhecimento <i>sur lies</i> vinhos espumantes				
		3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>						
Gálico	0,26±0,01	0,55±0,01 ^a	0,59±0,01 ^b	0,60±0,01 ^b	0,62±0,01 ^c	0,70±0,01 ^d
Protocateico	0,34±0,01	0,30±0,01 ^a	0,41±0,04 ^b	0,47±0,01 ^c	0,43±0,02 ^{bc}	0,63±0,01 ^d
Vanílico	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Siríngico	4,51±0,01	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Elágico	0,74±0,02	0,59±0,01 ^b	0,35±0,02 ^a	<0,02 ¹	1,07±0,02 ^c	2,32±0,04 ^d
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>						
Cafeico	5,51±0,05	1,24±0,01 ^a	1,38±0,01 ^b	1,43±0,01 ^c	1,58±0,01 ^d	1,81±0,01 ^e
<i>trans</i> -caftárico	23,92±0,01	31,41±0,09 ^d	30,25±0,08 ^b	31,09±0,04 ^c	33,30±0,03 ^e	29,33±0,02 ^a
<i>p</i> -cumárico	0,63±0,01	0,14±0,01 ^a	0,17±0,01 ^b	0,18±0,01 ^c	0,20±0,01 ^d	0,26±0,01 ^e
Ferúlico	0,31±0,01	0,25±0,01 ^b	0,23±0,01 ^a	0,25±0,01 ^b	0,26±0,01 ^c	0,29±0,01 ^d
<i>Flavonóis</i>						
Campferol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Quercetina	0,16±0,01	<0,02 ¹	0,18±0,01 ^a	0,19±0,01 ^b	0,18±0,01 ^a	0,20±0,01 ^c
Miricetina	0,18±0,01	0,40±0,01 ^a	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
<i>Flavanóis</i>						
(+)-catequina	18,28±0,02	22,86±0,04 ^a	24,57±0,30 ^c	23,34±0,01 ^b	24,67±0,04 ^c	23,53±0,02 ^b
(-)-epicatequina	1,02±0,01	1,82±0,01 ^d	1,35±0,01 ^b	1,34±0,01 ^b	1,39±0,01 ^c	1,22±0,01 ^a
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>						
<i>trans</i> -resveratrol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Tirosol	31,86±0,15	32,56±0,16 ^a	33,77±0,27 ^b	32,18±0,05 ^a	34,27±0,04 ^c	34,05±0,06 ^{bc}
FC	345,93±6,26	302,98±15,20 ^c	225,14±4,73 ^b	211,48±3,57 ^b	184,43±3,57 ^a	185,79±3,31 ^a
FLA	11,79±0,23	13,46±0,29 ^b	12,21±0,36 ^a	13,06±0,42 ^{ab}	13,86±0,67 ^b	13,24±0,22 ^{ab}
OD	32,39±1,89	34,84±1,25 ^a	47,90±0,47 ^b	43,82±1,25 ^b	44,91±1,63 ^b	35,38±3,09 ^a
ABTS*	0,15±0,01	0,35±0,01 ^a	0,34±0,02 ^a	0,38±0,01 ^b	0,65±0,01 ^d	0,45±0,01 ^c
A420	0,28±0,01	0,11±0,01 ^a	0,13±0,01 ^c	0,12±0,01 ^b	0,13±0,01 ^c	0,14±0,01 ^d

Tabela 2. (Continuação)

Substâncias	Manzoni					
	Vinho base	Envelhecimento <i>sur lies</i> vinhos espumantes				
		3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>						
Gálico	0,46±0,01	0,86±0,01 ^c	0,81±0,01 ^b	0,75±0,01 ^a	0,89±0,01 ^d	0,97±0,02 ^e
Protocateico	0,26±0,01	0,36±0,01 ^c	0,31±0,01 ^b	0,44±0,01 ^d	0,49±0,01 ^e	0,14±0,02 ^a
Vanílico	0,12±0,01	0,24±0,01 ^b	0,27±0,01 ^c	0,28±0,01 ^d	0,25±0,01 ^{bc}	0,17±0,01 ^a
Siringico	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	0,17±0,01 ^b	0,13±0,01 ^a	0,54±0,02 ^c
Elágico	0,62±0,03	0,41±0,01 ^a	0,55±0,03 ^c	0,13±0,01 ^b	0,41±0,01 ^a	2,45±0,02 ^d
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>						
Cafeico	3,71±0,01	4,30±0,01 ^a	4,34±0,01 ^b	5,27±0,01 ^c	5,50±0,01 ^d	5,85±0,01 ^e
<i>trans</i> -caftárico	24,50±0,02	24,03±0,01 ^e	19,18±0,02 ^c	20,58±0,03 ^d	17,23±0,02 ^b	15,41±0,04 ^a
<i>p</i> -cumárico	0,32±0,01	0,32±0,01 ^a	0,39±0,01 ^b	0,45±0,01 ^c	0,48±0,01 ^d	0,53±0,01 ^e
Ferúlico	0,24±0,01	0,24±0,01 ^a	0,25±0,01 ^b	0,28±0,01 ^c	0,28±0,01 ^c	0,31±0,01 ^d
<i>Flavonóis</i>						
Campferol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Quercetina	0,36±0,01	0,42±0,01 ^b	0,41±0,01 ^a	0,53±0,01 ^c	0,54±0,01 ^d	0,61±0,01 ^e
Miricetina	<0,04 ¹	0,43±0,01 ^a	0,44±0,03 ^{ac}	0,48±0,01 ^b	0,47±0,01 ^{bc}	0,47±0,01 ^{bc}
<i>Flavanóis</i>						
(+)-catequina	3,65±0,01	3,67±0,03 ^e	2,95±0,01 ^d	2,17±0,02 ^b	1,86±0,03 ^a	2,26±0,02 ^c
(-)-epicatequina	1,15±0,01	1,80±0,03 ^c	1,80±0,01 ^c	1,89±0,02 ^d	1,36±0,01 ^b	1,20±0,04 ^a
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>						
<i>trans</i> -resveratrol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Tirosol	65,29±0,11	73,35±0,02 ^e	72,87±0,23 ^d	70,75±0,05 ^c	68,15±0,05 ^a	69,08±0,31 ^b
FC	413,93±4,10	373,94±4,73 ^d	273,22±8,29 ^{bc}	281,97±5,37 ^c	259,29±8,21 ^{ab}	251,37±3,10 ^a
FLA	8,75±0,09	19,69±0,61 ^b	15,56±0,38 ^a	15,23±0,19 ^a	15,53±0,57 ^a	14,83±0,23 ^a
OD	35,11±1,63	31,43±0,41 ^b	42,46±2,83 ^c	22,59±3,09 ^a	31,84±0,82 ^b	41,64±1,41 ^c
ABTS*	0,34±0,17	0,46±0,01 ^a	0,50±0,01 ^b	0,52±0,01 ^b	0,76±0,01 ^d	0,60±0,01 ^c
A420	0,23±0,01	0,12±0,01 ^a	0,13±0,01 ^b	0,14±0,01 ^c	0,16±0,01 ^d	0,18±0,01 ^e

Tabela 2. (Continuação)

Substâncias	Goethe					
	Vinho base	Envelhecimento <i>sur lies</i> vinhos espumantes				
		3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
<i>Ácidos hidroxibenzoicos (mg L⁻¹)</i>						
Gálico	0,61±0,01	1,03±0,01 ^c	0,82±0,01 ^a	0,82±0,01 ^a	0,85±0,01 ^b	1,01±0,01 ^c
Protocateico	0,34±0,01	0,33±0,01 ^a	0,34±0,01 ^a	0,36±0,01 ^{ab}	0,40±0,01 ^b	0,71±0,04 ^c
Vanílico	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Siríngico	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Elágico	0,30±0,01	0,24±0,01 ^a	0,28±0,01 ^c	0,24±0,01 ^a	0,15±0,01 ^b	2,24±0,03 ^d
<i>Ácidos hidroxicinâmicos (mg L⁻¹)</i>						
Cafeico	0,41±0,01	0,48±0,01 ^a	0,58±0,01 ^b	0,76±0,05 ^c	0,91±0,01 ^d	1,36±0,01 ^e
<i>trans</i> -caftárico	23,48±0,01	25,68±0,03 ^d	21,44±0,02 ^b	21,70±0,27 ^b	22,65±0,07 ^c	20,63±0,10 ^a
<i>p</i> -cumárico	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹	<0,14 ¹
Ferúlico	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹	<0,10 ¹
<i>Flavonóis</i>						
Campferol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Quercetina	0,15±0,01	0,17±0,01 ^a	0,16±0,01 ^a	0,18±0,01 ^a	0,22±0,01 ^b	0,23±0,01 ^b
Miricetina	<0,04 ¹	0,42±0,01 ^{ab}	0,42±0,01 ^{ab}	0,43±0,02 ^b	0,39±0,01 ^a	0,48±0,01 ^c
<i>Flavanóis</i>						
(+)-catequina	6,63±0,03	6,73±0,04 ^{cb}	6,90±0,07 ^d	6,76±0,05 ^c	6,26±0,01 ^a	6,62±0,06 ^b
(-)-epicatequina	<0,07 ¹	1,33±0,01 ^c	1,30±0,01 ^c	1,18±0,01 ^b	0,96±0,01 ^a	<0,07 ¹
<i>Outros (mg L⁻¹)</i>						
<i>trans</i> -resveratrol	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹	<0,04 ¹
Tirosol	70,20±0,03	73,11±0,04 ^{cd}	73,72±0,52 ^d	68,71±0,51 ^b	64,86±0,21 ^a	72,53±0,55 ^c
FC	358,61±2,05	297,52±2,17 ^c	211,48±4,26 ^b	213,93±5,74 ^b	188,52±4,99 ^a	197,27±1,71 ^a
FLA	8,65±0,15	15,01±0,48 ^a	18,48±0,63 ^c	16,23±0,11 ^b	20,03±0,45 ^d	20,06±0,32 ^d
OD	25,85±3,30	36,33±0,41 ^b	36,20±0,94 ^b	33,20±2,87 ^b	26,94±0,82 ^a	35,38±1,70 ^b
ABTS*	0,04±0,01	0,29±0,01 ^a	0,36±0,01 ^b	0,38±0,01 ^b	0,59±0,01 ^d	0,45±0,01 ^c
A420	0,22±0,01	0,05±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,06±0,01 ^b	0,08±0,01 ^c	0,09±0,01 ^d

Valores médios de três determinações independentes ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05). Teste de Tukey realizado separadamente para cada variedade ao longo do tempo de envelhecimento *sur lies*. FC, capacidade de redução do Folin-Ciocalteu (mg L⁻¹ ácido gálico); FLA, flavanóis totais (mg L⁻¹ catequina); OD, *orto*-difenóis (mg L⁻¹ catequina); A420: índice de escurecimento, absorção no comprimento de onda de 420 nm, expresso em mAU. *Atividade antioxidante expressa como equivalentes de Trolox (mmol TEAC L⁻¹). ¹Valor menor que o limite de detecção do método.

Em conjunto, os resultados deste estudo apontaram alterações específicas envolvendo diferentes fenólicos que ocorrem durante o envelhecimento sobre borra e que podem alterar a perfil bioativo dos vinhos espumantes, e muitos foram, de fato, atribuídos às diferentes variedades de uvas. Em geral, o tempo de envelhecimento sobre borra influenciou positivamente as concentrações dos polifenóis, principalmente os ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico, serínico e elágico que apresentaram aumento de suas concentrações ao longo do tempo. As mudanças observadas nas concentrações dos fenólicos podem estar relacionadas as diferentes reações químicas que ocorrem durante o processo de vinificação e envelhecimento dos vinhos, como a oxidação, polimerização, cicloadição e copigmentação (LI; GUO; WANG, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009), particularmente durante o envelhecimento biológico (*sur lies*), devido a adsorção ou hidrólise de fenólicos com outras substâncias liberadas pela parede celular da levedura (MAZAURIC; SALMON, 2005; GALLARDO-CHACÓN et al., 2010).

A intensidade da cor amarela do vinho branco medida pela absorvância a 420 nm fornece uma indicação do índice de escurecimento durante o envelhecimento, que é associado, principalmente, à oxidação dos polifenóis. Neste estudo observou-se um aumento do índice de escurecimento dos vinhos espumantes durante o envelhecimento sobre borra (Tabela 2). Os vinhos espumantes Niágara apresentaram menor percentual de aumento (22 %) do índice de escurecimento no final de 18 meses de envelhecimento sobre borra, seguidos dos vinhos espumantes Villenave (32 %), Manzoni (33 %) e Goethe (64 %). Observou-se que o índice de escurecimento dos vinhos espumantes apresentou uma evolução inversa à concentração do ácido *trans*-caftárico para todas as amostras, provavelmente devido a sua participação nas reações de oxidação. Correlação negativa foi observada entre ácido *trans*-caftárico e o escurecimento de todos os vinhos espumantes (Villenave, $R = -0,70$; Niágara, $R = -0,33$; Manzoni, $R = -0,94$; Goethe, $R = -0,63$) (Figura 1). Ibern-Gómez et al. (2000) e Serra-Cayuela et al. (2013) observaram que o tempo de envelhecimento sobre borra é o fator com o maior impacto para o aumento do escurecimento, sugerindo que as borras das leveduras não inibem o escurecimento dos vinhos espumantes. No entanto, outros estudos demonstram que as borras das leveduras, devido a suas propriedades de absorção, podem impedir a formação de substâncias responsáveis pelo escurecimento dos vinhos espumantes (LOPEZ-TOLEDANO et al., 2006; BOSCH-FUSTÉ et al., 2009). Estas pesquisas demonstram que as borras podem promover a liberação e/ou adsorção de substâncias responsáveis pelo escurecimento pela parede celular da

levedura (MAZAUIC; SALMÃO, 2005). Outras substâncias além dos fenóis também podem estar envolvidas no escurecimento dos vinhos, como proteínas, aminoácidos e açúcares redutores, assim como as potenciais interações entre essas substâncias (LI; GUO; WANG, 2008). Ressalta-se que escurecimento dos vinhos também pode estar relacionado com produtos da reação de Maillard, como o 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF); no entanto, no caso dos vinhos espumantes, é provavelmente formado a partir da desidratação múltipla de hexoses e cetopentoses. Esse composto já foi utilizado como marcador de qualidade durante o envelhecimento de vinhos espumantes, sendo um indicador de escurecimento (BOSCH-FUSTÉ et al., 2009; SERRA-CAYUELA et al., 2013).

Neste estudo, em razão do aumento significativo do índice de escurecimento dos vinhos espumantes ao longo do envelhecimento sobre borra, juntamente com o comportamento de evolução semelhante dos ácidos hidroxicinâmicos, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico, foi realizada uma análise de correlação de Pearson para avaliar o grau de correlação linear entre estas variáveis. A análise de correlação entre estas substâncias demonstrou que as formas livres dos ácidos cinâmicos (ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico), quando detectadas nas amostras, foram correlacionadas significativamente ($p < 0,05$) como o escurecimento dos vinhos espumantes, com destaque para o ácido cafeico que apresentou maior correlação ($R > 0,90$).

Considerando que os ácidos cafeico e *trans*-caftárico são importantes fenólicos que participam das reações de oxidação, e que também foram detectados em todos os vinhos espumantes (todos os tempos), foi realizada a análise de correlação entre estas substâncias e o índice de escurecimento dos vinhos espumantes ao longo do tempo de envelhecimento sobre borra (Figura 1). Observou-se que o ácido cafeico apresentou alta correlação positiva com o escurecimento ($R > 0,90$) e com o tempo ($R > 0,95$) em todos os vinhos espumantes estudados. Enquanto que, o ácido *trans*-caftárico apresentou uma correlação negativa com o escurecimento, com o tempo, e com o ácido cafeico em todas as amostras. Ainda, este composto não apresentou correlação significativa para o vinho espumante da variedade Niágara, o que está de acordo com o baixo coeficiente de determinação ($R^2 \leq -0,33$) observado para esta amostra (Figura 1). Os resultados sobre a evolução do ácido *trans*-caftárico podem estar relacionados, provavelmente, com a diminuição de sua concentração durante o envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes (Tabela 2). Essas alterações podem ser atribuídas a hidrólise da ligação éster do ácido

trans-caftárico durante o envelhecimento, e liberação do ácido cafeico livre (WEBBER et al., 2017).

Os resultados deste estudo demonstram um efeito significativo da evolução do ácido cafeico com o escurecimento dos vinhos espumantes ($R^2 > 0,78$) (Figura 1). No entanto, o tempo de envelhecimento sobre borra apresentou maior influência na evolução do ácido cafeico dos vinhos espumantes, sendo que foi possível observar um coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,90. Com base na Figura 1, sugere-se que a concentração de ácido cafeico pode ser um indicador no monitoramento do perfil de envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes brancos elaborados com variedade de uvas não-tradicionais, uma vez que foi correlacionado positivamente com o escurecimento, que é utilizado como um parâmetro de controle de qualidade pelas vinícolas.

Figura 1. Correlação de Pearson e coeficientes de determinação entre os ácidos cafeico e *trans*-caftárico, escurecimento e tempo dos vinhos espumantes Villenave (a), Niágara (b), Manzoni (c) e Goethe (d). Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). R^2 , coeficiente de determinação.

a) Villenave

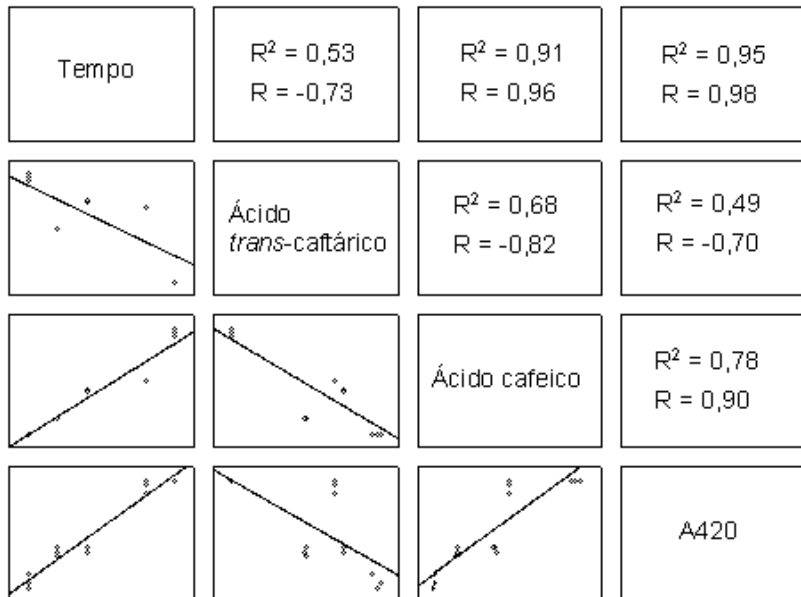
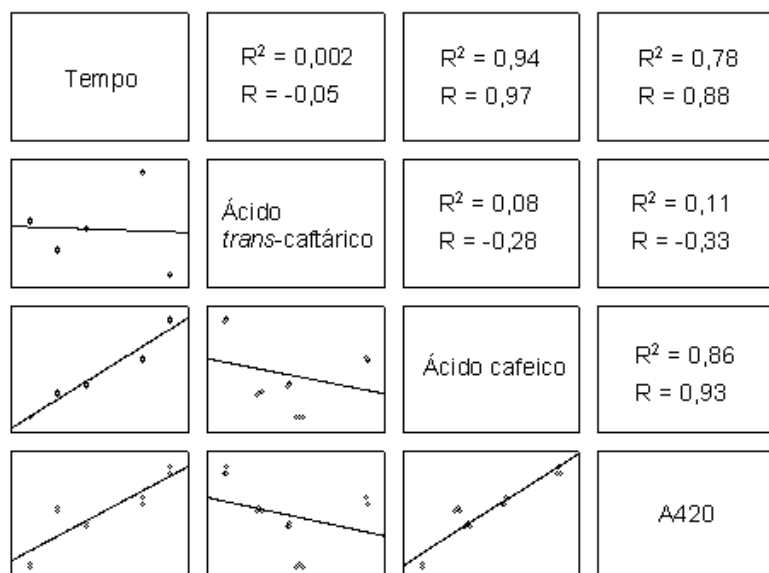


Figura 1. (Continuação)

b) Niágara



c) Manzoni

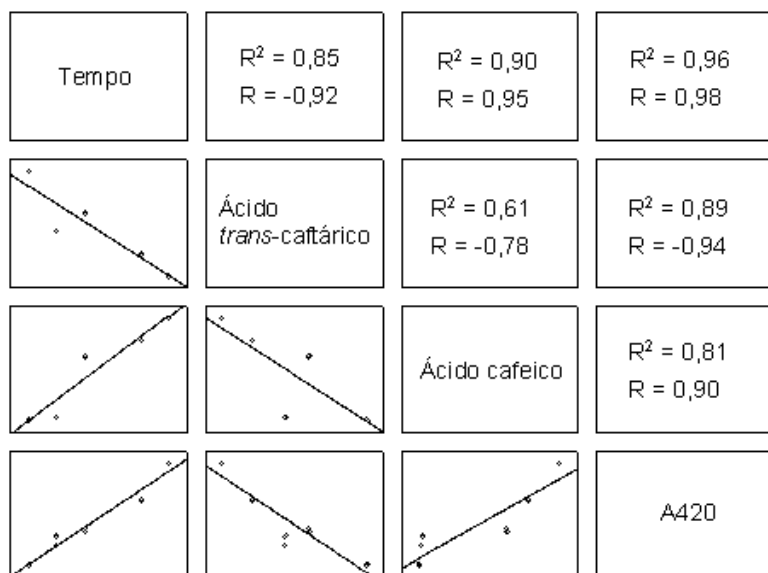
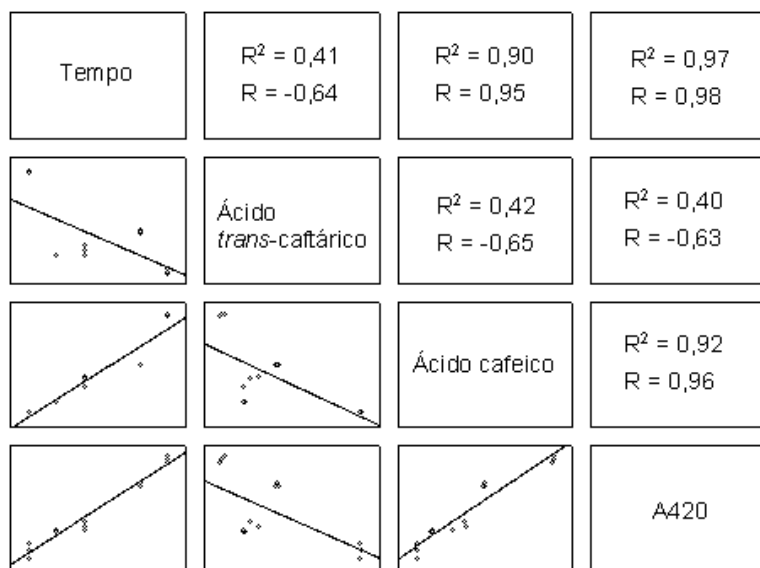


Figura 1. (Continuação)

d) Goethe



3.3 GLUTATIONA

O teor de glutatona total, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) para as amostras de mostos, vinho base e espumantes ao longo de 18 meses de envelhecimento sobre borra estão apresentadas na Tabela 3. Observou-se que a concentração de GSH variou de acordo com a variedade de uva, e que o teor de GSH no mosto em sua forma reduzida foi maior que a forma oxidada (GSSG). A maior concentração de GSH reduzida no mosto é desejável, pois a glutatona previne a ocorrência de reações de escurecimento, uma vez que este composto pode reagir rapidamente com as *o*-quinonas do ácido *trans*-caftárico formando o produto de reação da uva (GRP, *2-S-glutathionylcaftaric acid*), que não é escuro nem facilmente oxidado (SINGLETON et al., 1985; CHEYNIER et al., 1986).

Tabela 3. Concentração de glutatona total, reduzida e oxidada (mg L^{-1}) dos mostos obtidos das variedades de uvas não-tradicionais e dos respectivos vinhos base e vinhos espumantes durante o envelhecimento biológico.

Glutaciona	Variedades não-tradicionais			
	Villenave	Niágara	Manzoni	Goethe
GSH reduzida				
Mosto	0,24±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,25±0,01 ^a	0,24±0,01 ^a
Vinho base	0,41±0,01 ^f	1,03±0,01 ^f	2,12±0,01 ^c	0,71±0,01 ^d
3 meses	0,43±0,01 ^g	1,19±0,01 ^g	2,35±0,01 ^c	0,27±0,01 ^c
6 meses	0,36±0,01 ^e	0,77±0,01 ^e	1,16±0,86 ^b	0,26±0,01 ^b
9 meses	0,32±0,01 ^d	0,52±0,01 ^c	0,63±0,01 ^{ab}	0,25±0,01 ^{ab}
15 meses	0,30±0,01 ^c	0,61±0,02 ^d	0,44±0,02 ^{ab}	nd
18 meses	0,25±0,01 ^b	0,41±0,01 ^b	0,26±0,01 ^{ab}	nd
GSSG (oxidada)				
Mosto	0,01±0,00 ^a	0,07±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a
Vinho base	1,40±0,01 ^g	2,45±0,01 ^d	0,13±0,01 ^b	0,74±0,01 ^d
3 meses	1,09±0,01 ^e	2,83±0,04 ^f	0,68±0,01 ^e	1,29±0,01 ^e
6 meses	0,66±0,01 ^b	2,78±0,01 ^e	0,67±0,01 ^e	0,48±0,01 ^c
9 meses	0,76±0,01 ^c	2,43±0,01 ^d	0,36±0,01 ^d	0,32±0,01 ^b
15 meses	1,32±0,02 ^f	2,16±0,02 ^c	0,24±0,02 ^c	nd
18 meses	0,99±0,01 ^d	2,10±0,01 ^b	0,13±0,01 ^b	nd
GSH total				
Mosto	0,25±0,01 ^a	0,33±0,01 ^a	0,30±0,01 ^a	0,28±0,01 ^a
Vinho base	1,82±0,01 ^g	3,49±0,03 ^e	2,26±0,01 ^e	1,46±0,01 ^f
3 meses	1,52±0,01 ^e	4,01±0,04 ^g	3,05±0,01 ^g	1,57±0,02 ^g
6 meses	1,02±0,01 ^b	3,57±0,01 ^f	2,34±0,01 ^f	0,74±0,01 ^e
9 meses	1,10±0,01 ^c	2,96±0,01 ^d	1,00±0,01 ^d	0,58±0,01 ^d
15 meses	1,62±0,02 ^f	2,79±0,03 ^c	0,67±0,02 ^c	0,50±0,02 ^c
18 meses	1,24±0,01 ^d	2,52±0,02 ^b	0,38±0,01 ^b	0,36±0,01 ^b

Valores médios de três determinações independentes \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Teste de Tukey realizado separadamente para cada variedade ao longo do tempo de envelhecimento *sur lies*. nd, não detectado.

A concentração de glutatona total dos vinhos espumantes diminuiu durante o envelhecimento sobre borra, considerando o tempo inicial (3 meses) e final (18 meses), e uma correlação significativa entre a glutatona total e o ácido *trans*-caftárico ($R = 0,90$) foi observada no final do envelhecimento sobre borra para todas as variedades, indicando que a diminuição da concentração de glutatona total pode estar relacionada com as reações de oxidação que ocorrem durante o envelhecimento dos vinhos. Dentre os espumantes avaliados, aquele elaborado com a variedade Niágara apresentou maior concentração de glutatona total o que pode ser correlacionado com o menor percentual de

aumento do índice de escurecimento (22 %) ao longo do tempo em relação as demais amostras, e a maior concentração de catequina durante o envelhecimento (Tabela 2). Esta relação entre glutatona e catequina indica que a glutatona pode ter impedido também a formação de polímeros de catequina, que podem contribuir para o escurecimento dos vinhos espumantes (WEBBER et al., 2017). Com relação as formas de GSH reduzida e oxidada (Tabela 3), observou-se que as amostras apresentaram redução da concentração de GSH reduzida durante o envelhecimento sobre borra, considerando o tempo inicial (3 meses) e final (18 meses), e consequente aumento da concentração de glutatona oxidada (GSSG), com exceção do vinho espumante elaborado com a variedade Manzoni.

Durante o envelhecimento, parte da glutatona presente nos vinhos é oxidada e parte é consumida na reação com ácidos hidroxycinâmicos e catequina. Isso porque, o grupamento sulfidril da glutatona é um centro nucleofílico capaz de realizar uma substituição no anel eletrofílico das *o*-quinonas formadas e levar à regeneração do anel di-hidroxi, e o produto dessa reação não é substrato para oxidação (SINGLETON et al., 1985). Como consequência, ocorre uma diminuição na concentração de glutatona total, como observado neste estudo, dando origem à forma GSSG (oxidada), e a formação de adutos de oxidação nas amostras. Além da formação de GRP e seus produtos derivados como o 2-*S*-glutathionylcaffeic acid (CHEYNIER et al., 1986), produtos adicionais resultantes da hidrólise, esterificação e isomerização *trans/cis* do GRP também podem ser encontrados nos vinhos (CEJUDO-BASTANTE et al., 2010; FERREIRA-LIMA et al., 2016b; FERREIRA-LIMA et al., 2017). As mudanças das concentrações de glutatona dos vinhos espumantes também podem estar relacionadas ao metabolismo da levedura durante o processo de fermentação (KRITZINGER et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

Significativas mudanças foram observadas na composição fitoquímica, índice de escurecimento e teor de glutatona dos vinhos espumantes durante os 18 meses de envelhecimento sobre borra. A concentração de glutatona total dos vinhos espumantes diminuiu ao longo do envelhecimento sobre borra, o que pode ser atribuído a participação nas reações de oxidação. O tempo de envelhecimento modificou positivamente a concentração dos fenólicos individuais, particularmente os ácidos cafeico, gálico e elágico que apresentaram aumento de suas concentrações ao longo do tempo. Observou-se um

aumento do índice de escurecimento durante o envelhecimento dos vinhos espumantes. O ácido cafeico apresentou alta correlação positiva e significativa com o escurecimento e com o tempo de envelhecimento para todos os vinhos espumantes, enquanto que o ácido *trans*-caftárico apresentou correlação negativa. Sugere-se que o teor de ácido cafeico pode ser utilizado como um indicador de qualidade para monitorar o perfil de envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes.

CAPÍTULO 5

EFEITO DO TEMPO DE ENVELHECIMENTO SOBRE BORRA NA COMPOSIÇÃO NITROGENADA E SENSORIAL DE VINHOS ESPUMANTES

RESUMO

A influência do tempo de envelhecimento sobre borra de vinhos espumantes brasileiros elaborados com a variedade de uva Chardonnay, clássica na elaboração de vinhos espumantes, e com as variedades não-tradicionais como Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe foram investigadas quanto as alterações na concentração de aminoácidos, íon amônio e perfil sensorial, a fim de avaliar as características próprias dos vinhos espumantes brasileiros. Os vinhos espumantes foram avaliados durante 18 meses de envelhecimento sobre borra quanto as análises de substâncias nitrogenadas, e caracterizadas quanto ao perfil sensorial no final do envelhecimento. Os resultados demonstraram a prolina foi o aminoácido presente em maiores concentrações nos vinhos espumantes, seguido dos aminoácidos alanina, ácido glutâmico, GABA, fenilalanina e lisina. A concentração dos aminoácidos livres variou nos vinhos espumantes ao longo do envelhecimento sobre borra, e um aumento significativo das concentrações dos aminoácidos lisina, citrulina e fenilalanina foi observado em todas as amostras, indicando que pode ter ocorrido a liberação de aminoácidos da parede celular da levedura. O íon amônio apresentou uma diminuição significativa de suas concentrações ao longo do envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes, indicando sua utilização como fonte de nitrogênio inorgânico pelas leveduras. A análise de componentes principais separou claramente os vinhos espumantes com 3, 6 e 9 meses de envelhecimento daqueles com 15 e 18 meses de envelhecimento considerando a composição nitrogenada, esse comportamento permaneceu em todas as variedades. Os aminoácidos lisina, citrulina e fenilalanina foram fortemente associados com os vinhos espumantes com 15 e 18 meses de envelhecimento sobre borra para todas as amostras, sugerindo estes aminoácidos como indicadores do envelhecimento sobre borra. O perfil sensorial dos vinhos espumantes envelhecidos foi caracterizado por descritores de frutos brancos e cítricos, floral e/ou flor de laranjeira, casca de pão e/ou pão torrado, mel, manteiga e vegetal, e cor amarelo palha. Esses resultados demonstram que o tempo de envelhecimento biológico influenciou a composição nitrogenada e sensorial dos vinhos espumantes, os quais apresentaram características típicas da viticultura local.

Palavras-chave: Vinhos espumantes. Aminoácidos. Perfil sensorial. Envelhecimento biológico.

1 INTRODUÇÃO

A diversificação da indústria enológica baseada na busca por produtos diferenciados, como os vinhos espumantes, vêm sendo uma nova estratégia no mercado do vinho. Este crescente interesse está vinculado a recentes segmentos para vinhos espumantes, resultando em mudanças no comércio global para este produto (CALIARI et al., 2014; RUIZ-MORENO et al., 2017).

A elaboração de vinho espumante pelo método Tradicional ou *Champenoise*, envolve uma segunda fermentação em garrafa do vinho base seguido do envelhecimento biológico em contato com as borras das leveduras. Esta vinificação especial permite obter um produto final com características distintas. Durante o envelhecimento sobre borra ocorre a autólise da levedura, e enzimas intracelulares lentamente hidrolisam a parede celular da levedura para liberar aminoácidos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos, ácidos graxos e nucleotídeos, que, juntamente com as mudanças químicas e bioquímicas, podem alterar tanto as características sensoriais quanto a qualidade final dos vinhos espumantes (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006). Dentre as substâncias liberadas destacam-se as nitrogenadas como as principais liberadas no vinho durante a autólise (MORENO-ARRIBAS et al., 1998; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002).

As substâncias nitrogenadas estão presentes na uva e no mosto tanto na forma inorgânica (amônio) como na forma orgânica (peptídeos, proteína e, principalmente, aminoácidos), que são as duas principais fontes de nitrogênio assimilável pela levedura durante a fermentação. A presença de nitrogênio influencia não apenas o desenvolvimento da fermentação, mas também o crescimento e a viabilidade da levedura e a síntese de substâncias voláteis do vinho (BELL; HENSCHKE, 2005).

Novas variedades de uvas estão sendo utilizadas como uma alternativa para a elaboração de vinhos espumantes com características diferenciadas (CALIARI et al., 2014; RUIZ-MORENO et al., 2017). Neste contexto, a caracterização de vinhos espumantes brasileiros elaborados com variedades inovadoras (Manzoni, Villenave, Niágara, Goethe e Moscato Embrapa), tem sido objeto de estudos recentes (CALIARI et al., 2014). No entanto, até o momento, para nosso conhecimento, as mudanças que ocorrem na composição nitrogenada destes vinhos espumantes ao longo do envelhecimento sobre borra ainda não são encontrados na literatura. Com o intuito de conhecer as características dos vinhos espumantes brasileiros, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de envelhecimento sobre borra de vinhos

espumantes brancos elaborados com variedades de uvas não-tradicionais (*V. labrusca* e/ou híbridas) e clássica (*V. vinifera*), quanto ao teor de nitrogênio (aminoácidos e amônio) durante 18 meses de envelhecimento sobre borra, e caracterizar o perfil sensorial final dos vinhos espumantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Para a elaboração dos vinhos espumantes foram utilizadas uvas das variedades *V. vinifera* (Chardonnay), *V. labrusca* e híbridas (Manzoni Bianco, Villenave, Niágara e Goethe). A Chardonnay é uma variedade clássica na elaboração de vinhos espumantes, enquanto que as uvas Manzoni Bianco, Villenave, Niágara e Goethe não são conhecidas tradicionalmente na vinificação de vinhos espumantes brancos. Essas variedades não-tradicionais são amplamente cultivadas nas condições climáticas do Sul do Brasil, destinadas principalmente a elaboração de suco de uva e vinhos de mesa.

Todas as uvas foram cultivadas na estação experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), safra 2015. O mosto foi obtido a partir do desengace, esmagamento e prensagem das uvas. O mosto foi clarificado (7 ml L⁻¹ de solução de bentonite, AEB Spa, Bréscia, Itália) e sulfitado (30 mg L⁻¹ Vinoaromax, AEB Spa, Bréscia, Itália). Para produção do vinho base, o mosto de uva foi fermentado com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PB2019 (Fermol Blanc, AEB Spa, Bréscia, Itália) em tanques de aço inoxidável, estabilizado a frio e sulfitado com dióxido de enxofre (30 mg L⁻¹, Vinoaromax, AEB Spa, Bréscia, Itália) antes do engarrafamento. Para a elaboração dos vinhos espumantes pelo método Tradicional, foi adicionado ao vinho base 26 g L⁻¹ de açúcar para obtenção de 6 atm de pressão, com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PB2002 (Fermol Reims Champagne, AEB Spa, Bréscia, Itália) e 15 g hL⁻¹ de coadjuvante para *remuage* que age como clarificante (Compact gel, AEB, Bréscia, Itália). Os vinhos foram engarrafados e armazenados a 17 °C até a segunda fermentação ser completada. O tempo de envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes foi de 3, 6, 9, 15 e 18 meses, para cada tempo citado os vinhos espumantes foram estabilizados a frio, degolados, rolhados, engaiolados e analisados.

Todos os vinhos espumantes apresentaram os parâmetros de acidez titulável, acidez volátil, pH, teor alcoólico, SO₂ livre e total de

acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2012).

2.1.2 Reagentes químicos

Os padrões de aminoácidos e dietil etoximetilenomalonato (DEEMM) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) ou Fluka (Buchs, Switzerland). Todos os solventes cromatográficos eram de grau HPLC adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os reagentes acetato de sódio e ácido bórico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Todas as soluções foram filtradas utilizando membranas com 0,45 µm de diâmetro (Millipore). Todos os reagentes tinham pureza superior a 95%. A água utilizada para as análises foi obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Massachusetts, USA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Análises das substâncias nitrogenadas

A análise de 22 aminoácidos e íon amônio (NH_4^+) das amostras foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com o método descrito por Burin et al. (2015), utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) (HPLC-DAD). As separações foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm, 5µm de tamanho de partícula - CLC-ODS). As amostras foram derivatizados pela reação com dietiletoximetilenomalonato (DEEMM), identificados conforme o tempo de retenção e características do espectro UV-Vis e quantificados utilizando padrão interno (ácido 2-aminoadípico, 1 g L⁻¹) e curva de calibração feita a partir de adição de padrão na matriz, expresso em mg L⁻¹.

2.2.2 Análise sensorial descritiva

As amostras de vinhos espumantes foram submetidas à Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) após aprovação do Comitê de Ética Nacional (CAAE: 60396316.7.0000.0121) (APÊNDICE A). Os vinhos espumantes foram avaliados por um painel de degustadores no Laboratório de Análise Sensorial da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI Videira, Santa Catarina. O painel foi constituído por uma equipe de 9 julgadores treinados com experiência na análise sensorial de vinhos, composta por seis homens e

três mulheres. A análise foi realizada em cabines de testes individuais sob luz branca.

Os julgadores geraram termos sensoriais individualmente para descrever os atributos sensoriais de cor, aroma e sensações gustativas dos vinhos espumantes, e os descritores foram selecionados por consenso. A partir dos atributos sensoriais gerados, os julgadores foram treinados com soluções padrões de diferentes concentrações, conforme descrito na Tabela 1. O treinamento foi realizado em várias sessões em dias diferentes. Para a realização da análise sensorial descritiva, as amostras de espumante foram servidas aleatoriamente a uma temperatura de 18 ± 1 °C em taças de cristal (ISO 3591:1977) e identificadas com códigos aleatórios de três dígitos. A avaliação olfativa dos vinhos foi realizada por percepção orthonasal direta. A intensidade de cada atributo foi avaliada utilizando-se uma escala linear não estruturada de 9 cm, identificada como "pouco intensa" à esquerda e "muito intensa" à direita (APÊNDICE B). Os atributos sensoriais de cada vinho foram classificados comparando-se a intensidade relativa (expresso em porcentagem). A avaliação sensorial foi realizada com duas repetições para cada amostra com o mesmo painel degustador.

2.2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), Teste de Tukey ($p < 0,05$), matriz de correlação e análise de componentes principais (ACP). Todos os dados foram apresentados como a média \pm desvio padrão.

Tabela 1. Atributos sensoriais gerados pelos julgadores e seus respectivos descritores e padrões de referência utilizados para a avaliação sensorial dos vinhos espumantes.

Atributos	Descrição	Padrões
<i>Cor</i>		
Amarelo palha	Cor característica de vinho branco jovem	<i>Pouco intenso:</i> vinho com absorvância 420nm = 0,030 <i>Muito intenso:</i> vinho com absorvância 420nm = 0,144
Amarelo dourado	Cor característica de vinho branco envelhecido	<i>Pouco intenso:</i> vinho com absorvância 420nm = 0,233 <i>Muito intenso:</i> vinho com absorvância 420nm = 0,717
<i>Aromas</i>		
Casca de pão/pão torrado	Odor característico de casca de pão torrado	<i>Pouco intenso:</i> 1g de pão torrado em forno a 150°C por 25 min <i>Muito intenso:</i> 7 g de pão torrado em forno a 150 °C por 25 min
Floral, flor de laranjeira	Odor associado com rosa, gerânio, violeta, margarida, jasmim	<i>Pouco intenso:</i> 0,5g de mix comercial de flores <i>Muito intenso:</i> 3,0g de mix comercial de flores
Frutas brancas	Odor associado com pera, maçã	<i>Pouco intenso:</i> Mix com 2 g de maçã verde fresca, 2 g de pera fresca, 1 g de pêssego fresco <i>Muito intenso:</i> Mix com 5 g de maçã verde fresca, 5 g de pera fresca, 4 g de pêssego fresco
Frutas cítricas	Odor associado com limão, toranja, laranja, abacaxi	<i>Pouco intenso:</i> 1,5 g de mix comercial de frutas cítricas: maçã, laranja, limão e bergamota (Chileno®) <i>Muito intenso:</i> 0,5 g de mix comercial de frutas cítricas: maçã, laranja, limão e bergamota (Chileno®)
Vegetal	Odor associado a pimentão verde e grama cortada	<i>Pouco intenso:</i> Solução hidroalcoólica de IBMP à 1ng/L. <i>Muito intenso:</i> Solução hidroalcoólica de IBMP à 8ng/L.
Manteiga	Odor associado com gordura, manteiga	<i>Pouco intenso:</i> 1,3 g manteiga derretida (Frimesa®) <i>Muito intenso:</i> 5 g de manteiga derretida (Frimesa®)
Mel	Odor doce associado ao mel de abelha	<i>Pouco intenso:</i> 2 g de mel de abelha em 100 mL de água <i>Muito intenso:</i> 8 g de mel de abelha em 100mL de água

Tabela 1. (Continuação)

<i>Sensações gustativas</i>		
Adstringente	Perda de lubrificação da mucosa da boca com estreitamento e secura	<i>Pouco intenso:</i> Solução aquosa de ácido tânico (0,3g/L) <i>Muito intenso:</i> Solução aquosa de ácido tânico (1,5g/L)
Ácido	Uns dos gostos básicos, causado pela solução de ácido em água percebidos pela língua (salivação)	<i>Pouco intenso:</i> Solução aquosa de ácido cítrico (0,2g/L) <i>Muito intenso:</i> Solução aquosa de ácido cítrico (1,0g/L)
Untuoso	Características percebidas pelos olhos e paladar, devido à pouca fluidez do líquido	Mix com 6 ml de glicerol em 1 L de vinho tinto de mesa
Amargo	Sabores básicos de substâncias amargas percebidos pela língua	<i>Pouco intenso:</i> Solução aquosa de cafeína (0,3g/L) <i>Muito intenso:</i> Solução aquosa de ácido cafeína (1,5g/L)
Doce	Um dos gostos básicos, causado pela solução de sacarose em água percebido pela língua	<i>Pouco intenso:</i> Solução aquosa de sacarose (1g/L) <i>Muito intenso:</i> Solução aquosa de sacarose (7g/L)
Alcoólico	Sensação de calor/odor característico percebido pela mucosa da boca	<i>Pouco intenso:</i> Solução hidroalcoólica 5% <i>Muito intenso:</i> Solução hidroalcoólica 30%

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 COMPOSIÇÃO NITROGENADA DOS MOSTOS E VINHOS BASE

As substâncias nitrogenadas foram identificadas e quantificadas nas amostras de mostos e vinhos base (Tabela 2) elaborados com as variedades de uvas Chardonnay, Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe, sendo um total de 22 aminoácidos e o íon amônio (NH_4^+). Observou-se que os aminoácidos mais abundantes nas amostras de mosto e vinho base foram a arginina, prolina, alanina, glutamina e ácido γ -aminobutírico (GABA). A arginina foi o aminoácido predominante nos mostos, presente em elevadas concentrações (máximo de $273,66 \text{ mg L}^{-1}$ para a variedade Manzoni), enquanto que, a prolina foi predominante nas amostras de vinhos base para todas as variedades estudadas, com concentração máxima de $1938,13 \text{ mg L}^{-1}$ no vinho base Chardonnay. Os aminoácidos alanina, glutamina e GABA apresentaram maiores concentrações nos mostos do que nas amostras de vinho base. As elevadas concentrações destes aminoácidos, especialmente da arginina e prolina, também foram relatados em outros estudos (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002; BURIN et al., 2015; BURIN et al., 2016). A arginina é uma importante fonte de nitrogênio e auxilia no desenvolvimento da fermentação alcoólica, sendo rapidamente consumida pelas leveduras no início da fermentação, e durante a autólise é excretada. Enquanto que a prolina, que não é assimilada pelas leveduras durante a fermentação, é acumulada nos vacúolos e posteriormente liberada no meio (BELL; HENSCHKE, 2005).

O íon amônio foi detectado em elevadas concentrações nas amostras de mostos das diferentes variedades de uvas analisadas (Tabela 2), variando de $175,25$ a $81,79 \text{ mg L}^{-1}$ para as variedades Niágara e Goethe, respectivamente. Observou-se uma diminuição do teor de íon amônio nas amostras de vinho base em relação ao mosto. A diminuição da concentração de íon amônio pode ser justificada devido a sua utilização como fonte de nitrogênio pelas leveduras durante o processo de fermentação (BELL; HENSCHKE, 2005; BURIN et al., 2016).

Tabela 2. Composição nitrogenada (mg L⁻¹) do mosto e vinho base das variedades de uva Chardonnay, Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe.

Aminoácidos	Chardonnay		Villenave		Niágara	
	Mosto	Vinho base	Mosto	Vinho base	Mosto	Vinho base
Ácido aspártico	10,40±0,09	16,47±0,15	42,18±2,89	1,68±0,05	39,62±0,49	7,38±0,01
Ácido glutâmico	<0,4 ¹	17,75±0,29	29,34±1,01	5,38±0,04	15,28±1,33	6,49±2,82
Asparagina	3,47±0,02	34,80±5,52	3,14±0,46	<0,2 ¹	7,23±0,14	16,95±4,92
Serina	67,59±1,42	14,81±1,05	14,08±1,11	14,23±0,50	32,01±10,86	6,54±0,06
Glutamina	87,36±0,64	9,16±0,52	67,20±0,86	13,08±0,18	180,37±10,90	12,89±0,25
Histidina	<0,3 ¹	6,60±0,25	<0,3 ¹	3,08±0,24	<0,3 ¹	3,43±0,39
Glicina	3,13±0,16	11,57±0,17	0,27±0,01	3,01±0,02	4,97±0,15	10,30±0,03
Citrulina	<0,3 ¹	1,59±0,01	0,89±0,01	0,91±0,03	<0,3 ¹	1,77±0,02
Treonina	64,19±0,06	7,12±0,13	8,53±0,36	1,79±0,05	34,23±0,42	<0,8 ¹
Alanina	202,35±14,44	11,86±0,08	55,80±1,97	8,37±0,10	327,08±2,46	23,97±0,01
Arginina	204,16±0,89	48,98±1,79	92,35±1,81	6,37±0,20	132,41±4,45	11,42±0,42
Prolina	71,93±5,80	1938,13±43,39	<0,8 ¹	21,00±2,45	14,44±2,01	28,42±1,97
Tirosina	10,43±0,38	8,66±0,39	0,81±0,05	2,36±0,17	10,08±0,13	4,53±0,39
Valina	24,39±0,47	9,43±0,01	2,81±0,07	1,73±0,04	14,35±0,05	2,88±0,10
Metionina	3,39±0,19	4,38±0,09	1,05±0,01	1,08±0,06	3,49±0,10	1,50±0,10
Cisteína	<0,1 ¹	2,17±0,07	0,46±0,10	<0,1 ¹	0,47±0,01	2,45±0,30
Isoleucina	1,39±0,02	<0,3 ¹	0,42±0,01	<0,3 ¹	1,57±0,02	<0,3 ¹
Triptofano	45,20±0,86	6,80±0,01	4,17±0,01	0,89±0,02	18,71±0,26	1,62±0,04
Fenilalanina	32,78±2,08	44,62±0,57	7,28±0,51	11,28±0,29	58,79±0,23	12,07±0,01
Ornitina	0,33±0,01	16,66±0,03	0,52±0,02	2,83±0,03	0,53±0,01	5,55±0,08
Lisina	2,01±0,06	37,24±0,17	1,54±0,02	9,64±0,05	4,20±0,09	12,46±0,02
GABA	121,64±11,68	7,54±0,07	15,82±2,63	11,43±0,13	47,15±1,92	5,96±0,08
<i>Soma</i>	956,14	2256,34	348,66	119,43	946,98	178,58
NH ₄ ⁺	115,02±0,85	39,67±0,13	86,94±0,36	71,78±0,49	175,25±0,67	19,19±0,69

Tabela 2. (Continuação)

Aminoácidos	Manzoni		Goethe	
	Mosto	Vinho base	Mosto	Vinho base
Ácido aspártico	10,54±0,09	16,71±0,12	25,33±0,02	10,73±0,07
Ácido glutâmico	<0,4 ¹	22,01±0,23	2,82±0,09	8,42±0,15
Asparagina	1,51±0,02	1,52±0,08	2,96±0,18	21,66±1,28
Serina	24,13±0,07	14,77±0,12	14,38±0,08	8,27±0,12
Glutamina	25,73±0,50	40,28±0,95	65,64±0,08	18,94±0,29
Histidina	53,93±0,17	6,26±0,13	20,99±1,67	3,20±0,01
Glicina	0,93±0,02	8,73±0,02	0,97±0,01	5,76±0,04
Citrulina	<0,3 ¹	1,03±0,01	1,39±0,05	1,65±0,01
Treonina	68,63±0,77	6,93±0,18	26,27±0,04	5,82±0,03
Alanina	55,99±0,25	20,13±0,34	92,07±0,81	11,83±0,01
Arginina	273,66±0,72	20,09±0,23	229,40±2,10	2,12±0,05
Prolina	122,77±5,01	930,23±22,98	7,33±0,17	90,15±7,24
Tirosina	<0,3 ¹	10,57±0,20	2,91±0,01	4,56±0,02
Valina	19,47±0,04	9,39±0,17	3,67±0,12	5,36±0,03
Metionina	<0,2 ¹	4,48±0,06	<0,2 ¹	2,31±0,01
Cisteína	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹
Isoleucina	0,82±0,01	19,66±0,18	0,79±0,01	<0,3 ¹
Triptofano	41,29±0,26	38,52±0,14	8,09±0,11	4,11±0,04
Fenilalanina	35,80±0,13	0,71±0,07	16,42±0,01	26,78±0,03
Ornitina	0,15±0,01	<0,4 ¹	1,41±0,01	8,31±0,03
Lisina	3,63±0,01	31,75±0,40	2,55±0,02	17,41±0,02
GABA	112,34±0,86	11,54±0,26	30,95±0,52	7,56±0,01
<i>Soma</i>	851,32	1215,31	531,01	263,23
NH ₄ ⁺	112,86±0,35	15,02±0,07	81,79±0,11	16,82±0,19

Resultados são expressos como valores médios ± desvio padrão (n=3). NH₄⁺, íon amônio. GABA, ácido gama-aminobutírico. ¹Valor menor que o limite de detecção do método.

3.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO NA COMPOSIÇÃO NITROGENADA DOS VINHOS

A Tabela 3 apresenta a evolução das substâncias nitrogenadas dos vinhos espumantes durante 18 meses de envelhecimento sobre borra. Em geral, observou-se que a prolina foi o aminoácido presente em maiores concentrações nas amostras, com destaque para os vinhos espumantes Chardonnay (teor máximo de 1936,20 mg L⁻¹) e Manzoni (teor máximo de 917,57 mg L⁻¹), seguido dos aminoácidos alanina, ácido glutâmico, GABA, fenilalanina e lisina, que apresentaram variações nas suas concentrações de acordo com a variedade de uva e tempo de envelhecimento sobre borra. Dos 22 aminoácidos determinados, apenas isoleucina e cisteína foram encontrados abaixo do limite de detecção do método em alguns dos vinhos espumantes estudados. Os aminoácidos fenilalanina, lisina e citrulina apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) de suas concentrações ao longo do tempo de envelhecimento sobre borra para todas as variedades de vinhos espumante estudados. O percentual de aumento das concentrações dos aminoácidos fenilalanina, lisina e citrulina no final de 18 meses de envelhecimento foi de 31, 32 e 156 % para os vinhos espumantes Chardonnay, 41, 45 e 119 % para os vinhos espumantes Villenave, 8, 22 e 92 % para os vinhos espumantes Niágara, 32, 53 e 123 % para os vinhos espumantes Manzoni e 53, 77 e 91 % para os vinhos espumantes Goethe, respectivamente. Também, foi possível observar que os aminoácidos glicina, ácido aspártico, arginina, tirosina, valina e metionina apresentaram aumento de suas concentração apenas no final do envelhecimento (18 meses) em relação ao tempo inicial (3 meses), não sendo significativo ao longo de todos os tempos avaliados. Enquanto que, outros aminoácidos como a prolina, alanina, ácido glutâmico e GABA apresentaram variações nas suas concentrações ao longo do tempo de envelhecimento (Tabela 3). Todos esses resultados estão relacionados com o processo de autólise das leveduras após o declínio de células viáveis (GALLARDO-CHACÓN, et al., 2010), e a liberação de diferentes substâncias de baixa massa molar da parede celular das leveduras (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006), e também podem ser devido as reações de desaminação ou descarboxilação, e ou à formação de outras substâncias (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002), como os voláteis (BELL; HENSCHKE, 2005).

Tabela 3. Evolução da composição nitrogenada (mg L⁻¹) de vinhos espumantes elaborados com diferentes variedades de uvas durante o envelhecimento biológico.

Aminoácidos	Chardonnay				
	3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
Ácido aspártico	15,44±0,37 ^b	17,02±0,03 ^c	12,94±0,23 ^a	29,35±1,17 ^d	33,08±0,23 ^c
Ácido glutâmico	15,94±0,35 ^b	22,98±0,11 ^a	24,07±0,09 ^d	22,26±0,59 ^a	19,15±0,04 ^c
Asparagina	7,56±0,20 ^d	6,90±0,02 ^c	6,63±0,16 ^c	4,19±0,01 ^b	3,37±0,04 ^a
Serina	18,03±0,30 ^a	18,89±0,01 ^b	18,59±0,19 ^{ab}	19,86±0,38 ^c	20,62±0,03 ^d
Glutamina	15,59±0,68 ^b	23,69±0,21 ^c	7,44±0,20 ^a	6,51±0,40 ^a	6,62±0,06 ^a
Histidina	7,73±0,05 ^a	8,22±0,04 ^b	9,23±0,06 ^c	10,10±0,35 ^d	10,16±0,08 ^d
Glicina	14,40±0,58 ^a	14,95±0,26 ^a	16,14±0,34 ^b	18,99±0,27 ^c	18,87±0,18 ^c
Citrulina	1,55±0,01 ^a	1,63±0,01 ^a	1,98±0,01 ^b	3,28±0,18 ^c	3,98±0,06 ^d
Treonina	9,07±0,16 ^a	9,69±0,31 ^b	9,10±0,33 ^{ab}	11,05±0,15 ^c	12,44±0,02 ^d
Alanina	23,10±0,05 ^a	23,93±0,41 ^b	24,02±0,11 ^b	25,93±0,14 ^c	24,45±0,06 ^b
Arginina	4,61±0,21 ^a	5,36±0,45 ^a	6,61±0,75 ^a	13,75±0,67 ^b	12,74±1,35 ^b
Prolina	1862,74±14,91 ^c	1784,87±7,09 ^b	1619,22±14,53 ^a	1936,20±1,75 ^d	1881,41±8,06 ^c
Tirosina	11,06±0,43 ^{ab}	10,80±0,22 ^a	11,48±0,15 ^b	14,78±0,08 ^c	14,76±0,02 ^c
Valina	12,34±0,18 ^a	12,61±0,21 ^a	13,31±0,31 ^b	15,87±0,23 ^c	16,34±0,06 ^c
Metionina	4,80±0,05 ^a	4,85±0,63 ^a	5,29±0,01 ^{ab}	5,00±0,69 ^{ab}	6,12±0,05 ^b
Cisteína	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹
Isoleucina	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹
Triptofano	8,43±0,04 ^b	8,26±0,06 ^{ab}	7,82±0,15 ^a	10,63±0,37 ^c	11,08±0,24 ^c
Fenilalanina	50,59±0,21 ^a	55,05±0,68 ^b	56,07±0,45 ^b	66,67±0,16 ^c	66,29±0,19 ^c
Ornitina	18,33±0,07 ^{ab}	9,75±7,74 ^a	17,13±0,08 ^{ab}	18,59±0,07 ^{ab}	22,18±4,02 ^b
Lisina	41,59±0,03 ^a	44,73±0,15 ^b	46,74±0,04 ^c	54,76±0,30 ^d	54,77±0,53 ^d
GABA	9,27±0,01 ^b	7,97±0,20 ^a	8,14±0,03 ^a	10,59±0,12 ^d	9,87±0,07 ^c
<i>Soma</i>	2152,17	2092,15	1921,95	2298,27	2248,66
NH ₄ ⁺	19,86±0,05 ^b	19,48±0,10 ^b	7,74±0,01 ^a	6,60±0,02 ^a	5,08±2,62 ^a

Tabela 3. (Continuação)

Aminoácidos	Villenave				
	3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
Ácido aspártico	5,92±0,19 ^b	5,81±0,04 ^b	5,01±0,01 ^a	10,53±0,04 ^c	10,82±0,04 ^c
Ácido glutâmico	10,95±0,01 ^d	10,08±0,02 ^c	10,16±0,01 ^c	8,74±0,14 ^b	8,05±0,21 ^a
Asparagina	10,15±0,12 ^b	15,96±0,98 ^c	4,24±0,01 ^a	3,74±0,07 ^a	4,43±0,46 ^a
Serina	16,66±0,55 ^b	7,60±0,44 ^a	18,72±1,87 ^b	6,79±0,06 ^a	7,63±0,47 ^a
Glutamina	20,30±0,33 ^b	20,53±1,60 ^b	14,79±9,43 ^{ab}	3,86±0,11 ^a	5,99±0,45 ^a
Histidina	5,17±0,12 ^b	2,04±0,49 ^a	2,47±0,05 ^a	2,31±0,08 ^a	2,28±0,10 ^a
Glicina	6,41±0,01 ^a	6,97±0,15 ^c	6,71±0,12 ^b	7,37±0,05 ^d	7,21±0,07 ^{cd}
Citrulina	1,28±0,11 ^a	1,58±0,01 ^b	1,62±0,01 ^b	2,41±0,08 ^c	2,81±0,02 ^d
Treonina	3,55±0,06 ^a	3,76±0,01 ^b	3,64±0,13 ^{ab}	3,97±0,02 ^d	3,87±0,03 ^{cd}
Alanina	16,27±0,42 ^a	17,60±0,66 ^c	16,55±0,05 ^{ab}	18,34±0,12 ^c	17,22±0,41 ^{ab}
Arginina	4,52±0,09 ^a	6,37±0,20 ^b	5,89±0,14 ^b	8,12±0,22 ^c	7,48±0,58 ^c
Prolina	22,64±0,20 ^b	21,00±0,94 ^a	19,93±0,13 ^a	25,46±0,21 ^c	24,62±0,47 ^c
Tirosina	4,42±0,05 ^a	4,64±0,08 ^a	4,79±0,16 ^a	5,99±0,04 ^c	5,43±0,32 ^b
Valina	4,31±0,03 ^a	4,57±0,22 ^a	4,89±0,07 ^b	5,43±0,01 ^c	5,42±0,01 ^c
Metionina	1,19±0,02 ^a	1,64±0,02 ^b	1,54±0,03 ^b	1,84±0,09 ^c	1,64±0,09 ^b
Cisteína	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹
Isoleucina	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹
Triptofano	2,38±0,09 ^{ab}	2,27±0,03 ^a	2,51±0,06 ^b	2,96±0,01 ^d	2,76±0,06 ^c
Fenilalanina	14,36±0,55 ^a	16,88±0,08 ^b	17,83±0,01 ^{bc}	18,66±0,63 ^c	20,27±0,24 ^d
Ornitina	7,48±0,03 ^b	7,65±0,19 ^b	7,03±0,05 ^a	7,71±0,01 ^b	7,68±0,03 ^b
Lisina	11,21±0,10 ^a	12,80±0,11 ^b	13,31±0,28 ^c	16,32±0,01 ^d	16,23±0,07 ^d
GABA	16,02±0,40 ^b	16,01±0,08 ^b	14,55±0,19 ^a	16,21±0,08 ^b	14,39±0,14 ^a
<i>Soma</i>	185,19	185,74	176,19	178,38	174,62
NH ₄ ⁺	16,96±0,07 ^c	12,87±0,07 ^b	7,05±0,01 ^a	6,59±0,09 ^a	5,13±1,54 ^a

Tabela 3. (Continuação)

Aminoácidos	Niágara				
	3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
Ácido aspártico	7,55±0,19 ^b	7,59±0,01 ^b	16,58±0,23 ^d	9,99±0,35 ^a	11,08±0,04 ^c
Ácido glutâmico	8,48±0,04 ^a	15,56±0,49 ^c	17,30±0,13 ^d	9,18±0,01 ^b	9,37±0,08 ^b
Asparagina	4,28±0,04 ^d	4,09±0,02 ^c	3,95±0,03 ^c	3,63±0,10 ^b	3,24±0,09 ^a
Serina	7,38±0,06 ^c	7,24±0,12 ^c	6,82±0,04 ^b	6,75±0,08 ^b	6,41±0,01 ^a
Glutamina	11,27±0,22 ^d	4,28±0,28 ^c	1,06±0,03 ^a	2,01±0,01 ^b	1,13±0,02 ^a
Histidina	1,26±0,06 ^b	1,24±0,06 ^{ab}	1,22±0,05 ^{ab}	1,20±0,04 ^{ab}	1,10±0,05 ^a
Glicina	13,26±0,11 ^a	13,18±0,43 ^a	13,05±0,24 ^a	13,52±0,09 ^a	13,63±0,01 ^a
Citrulina	1,67±0,02 ^a	1,96±0,08 ^b	1,89±0,02 ^b	2,44±0,02 ^c	3,20±0,03 ^d
Treonina	4,52±0,07 ^c	4,44±0,18 ^b	4,56±0,03 ^c	3,92±0,08 ^a	4,18±0,14 ^{ab}
Alanina	30,09±0,07 ^{ab}	30,34±0,55 ^b	29,81±0,01 ^{ab}	29,11±0,57 ^a	30,01±0,43 ^{ab}
Arginina	0,89±0,03 ^a	1,01±0,02 ^{ab}	1,36±0,02 ^c	1,12±0,01 ^b	1,52±0,12 ^d
Prolina	31,62±0,26 ^c	27,01±1,11 ^a	27,49±0,14 ^a	30,14±0,10 ^b	30,96±0,04 ^{bc}
Tirosina	6,13±0,08 ^b	5,96±0,11 ^b	5,69±0,01 ^a	6,49±0,10 ^c	6,39±0,03 ^c
Valina	5,08±0,25 ^{ab}	4,90±0,33 ^a	5,52±0,01 ^{bc}	5,49±0,03 ^{bc}	5,77±0,10 ^c
Metionina	1,87±0,02 ^a	1,79±0,01 ^a	1,85±0,01 ^a	2,12±0,01 ^b	2,23±0,03 ^b
Cisteína	2,45±0,23 ^c	1,80±0,08 ^b	1,34±0,01 ^a	1,21±0,05 ^a	1,08±0,05 ^a
Isoleucina	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹
Triptofano	3,01±0,11 ^b	2,72±0,07 ^{ab}	2,76±0,02 ^{ab}	2,68±0,05 ^a	2,77±0,20 ^{ab}
Fenilalanina	15,02±0,16 ^a	14,74±0,23 ^a	15,79±0,02 ^b	15,57±0,19 ^b	16,24±0,15 ^c
Ornitina	7,69±0,04 ^e	4,44±0,01 ^d	3,96±0,02 ^c	3,29±0,08 ^b	2,15±0,05 ^a
Lisina	12,92±0,01 ^a	13,46±0,29 ^b	13,99±0,08 ^c	14,64±0,09 ^d	15,81±0,22 ^e
GABA	7,77±0,06 ^c	7,67±0,04 ^c	7,33±0,09 ^{ab}	7,23±0,04 ^a	7,47±0,06 ^b
<i>Soma</i>	184,24	175,42	183,29	171,74	175,74
NH ₄ ⁺	14,78±0,02 ^b	14,61±0,02 ^b	6,55±0,01 ^a	6,56±0,04 ^a	5,19±2,39 ^a

Tabela 3. (Continuação)

Aminoácidos	Manzoni				
	3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
Ácido aspártico	21,89±0,69 ^b	13,83±0,04 ^a	20,74±1,20 ^b	27,92±0,21 ^c	33,45±0,07 ^d
Ácido glutâmico	25,37±0,23 ^b	27,62±0,58 ^c	27,41±0,05 ^c	21,57±0,62 ^a	26,70±0,36 ^c
Asparagina	4,72±0,01 ^a	7,32±0,07 ^c	7,16±0,05 ^c	8,38±0,02 ^d	6,20±0,14 ^b
Serina	16,06±0,04 ^a	17,91±0,01 ^b	18,90±0,27 ^c	19,06±0,03 ^c	19,52±0,05 ^d
Glutamina	14,04±0,26 ^c	25,58±0,42 ^e	21,93±0,61 ^d	8,60±0,38 ^b	6,41±0,15 ^a
Histidina	8,29±0,13 ^b	0,77±0,01 ^a	0,72±0,01 ^a	11,68±0,04 ^c	11,92±0,01 ^d
Glicina	12,10±0,21 ^a	14,56±0,43 ^b	14,58±0,41 ^b	14,17±0,31 ^b	16,49±0,25 ^c
Citrulina	1,45±0,08 ^a	1,30±0,18 ^a	1,84±0,06 ^b	2,37±0,06 ^c	3,23±0,08 ^d
Treonina	9,35±0,03 ^b	9,13±0,04 ^a	9,81±0,01 ^c	11,34±0,10 ^d	11,69±0,09 ^e
Alanina	29,05±0,34 ^a	30,81±0,58 ^b	30,70±0,56 ^b	32,60±0,03 ^c	33,09±0,21 ^c
Arginina	1,49±0,01 ^a	1,85±0,04 ^b	2,05±0,06 ^c	5,86±0,07 ^d	10,17±0,07 ^e
Prolina	835,96±1,61 ^c	834,64±4,69 ^c	735,81±1,05 ^b	696,02±1,32 ^a	917,57±8,06 ^d
Tirosina	10,94±0,22 ^a	11,59±0,04 ^b	11,78±0,05 ^b	14,02±0,08 ^c	17,27±0,41 ^d
Valina	13,23±0,14 ^a	13,59±0,38 ^a	14,33±0,06 ^b	16,19±0,19 ^c	18,02±0,04 ^d
Metionina	5,09±0,12 ^a	6,10±0,17 ^b	6,09±0,05 ^b	7,07±0,08 ^c	6,87±0,09 ^c
Cisteína	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹
Isoleucina	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹
Triptofano	8,60±0,40 ^a	7,95±0,07 ^a	8,40±0,05 ^a	10,69±0,17 ^b	12,00±0,48 ^c
Fenilalanina	63,46±0,27 ^a	66,31±0,62 ^b	70,23±0,38 ^c	76,59±0,34 ^d	83,74±0,52 ^e
Ornitina	16,83±0,04 ^a	17,30±0,10 ^b	19,78±0,03 ^d	19,45±0,02 ^c	19,41±0,01 ^c
Lisina	37,08±0,03 ^a	42,07±0,08 ^b	45,45±0,17 ^c	53,39±0,08 ^d	56,60±0,22 ^e
GABA	12,03±0,09 ^b	12,59±0,09 ^c	11,68±0,17 ^a	11,80±0,02 ^{ab}	13,15±0,07 ^d
<i>Soma</i>	1147,02	1162,84	1079,40	1068,77	1323,49
NH ₄ ⁺	13,16±0,62 ^b	15,02±0,07 ^b	7,29±0,06 ^a	6,57±0,09 ^a	5,26±2,28 ^a

Tabela 3. (Continuação)

Aminoácidos	Goethe				
	3 meses	6 meses	9 meses	15 meses	18 meses
Ácido aspártico	8,78±0,03 ^b	8,13±0,02 ^a	11,26±0,01 ^d	9,05±0,04 ^c	11,46±0,15 ^e
Ácido glutâmico	14,78±0,05 ^a	18,52±0,11 ^c	16,42±0,56 ^b	14,50±0,04 ^a	14,69±0,49 ^a
Asparagina	3,99±0,21 ^b	4,15±0,05 ^b	3,43±0,24 ^a	4,93±0,07 ^c	5,06±0,11 ^c
Serina	6,30±0,48 ^a	7,92±0,02 ^c	6,89±0,66 ^{ab}	7,79±0,01 ^{bc}	9,42±0,02 ^d
Glutamina	20,47±1,14 ^d	12,86±0,08 ^c	8,09±0,92 ^{ab}	9,91±0,03 ^b	6,14±1,06 ^a
Histidina	2,08±0,02 ^a	2,54±0,10 ^b	2,76±0,27 ^b	3,86±0,02 ^c	4,01±0,18 ^c
Glicina	10,70±0,04 ^a	11,11±0,10 ^b	11,19±0,07 ^b	11,87±0,01 ^c	11,75±0,17 ^c
Citrulina	1,60±0,01 ^a	1,44±0,03 ^a	1,89±0,02 ^b	2,44±0,06 ^c	3,05±0,14 ^d
Treonina	3,87±0,10 ^a	4,69±0,15 ^c	4,31±0,08 ^b	4,49±0,07 ^{bc}	5,48±0,21 ^d
Alanina	15,86±0,11 ^a	17,17±0,13 ^c	16,29±0,01 ^{ab}	16,02±0,18 ^{ab}	16,68±0,53 ^{bc}
Arginina	2,12±0,05 ^c	1,86±0,05 ^b	1,31±0,04 ^a	4,61±0,11 ^e	3,67±0,14 ^d
Prolina	92,47±1,11 ^d	90,32±1,37 ^{cd}	88,11±0,28 ^c	76,59±0,19 ^b	70,47±1,09 ^a
Tirosina	4,60±0,24 ^a	5,48±0,23 ^b	5,61±0,02 ^{bc}	5,90±0,05 ^c	5,32±0,02 ^b
Valina	5,75±0,07 ^a	6,17±0,07 ^b	6,62±0,05 ^c	7,21±0,03 ^d	7,51±0,15 ^e
Metionina	1,69±0,03 ^{ab}	2,13±0,03 ^{ab}	1,60±0,12 ^a	2,43±0,02 ^b	2,18±0,67 ^{ab}
Cisteína	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹	<0,1 ¹
Isoleucina	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹	<0,3 ¹
Triptofano	2,37±0,03 ^c	2,27±0,03 ^c	1,53±0,20 ^a	1,93±0,03 ^b	2,91±0,16 ^d
Fenilalanina	14,37±0,15 ^a	17,53±0,03 ^b	18,47±1,48 ^{bc}	20,28±0,05 ^{cd}	22,02±1,03 ^d
Ornitina	8,41±0,01 ^a	10,77±0,01 ^c	9,13±0,04 ^b	8,93±0,06 ^b	10,63±0,24 ^c
Lisina	11,94±0,02 ^a	15,32±0,16 ^b	15,06±0,01 ^b	17,09±0,07 ^c	21,16±0,34 ^d
GABA	14,09±0,14 ^b	14,56±0,03 ^c	14,22±0,06 ^b	14,72±0,05 ^c	13,19±0,21 ^a
<i>Soma</i>	246,25	254,93	244,21	244,54	246,81
NH ₄ ⁺	13,67±0,01 ^b	13,75±0,02 ^b	7,29±0,01 ^a	6,57±0,01 ^a	5,56±1,74 ^a

Resultados são expressos como valores médios ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste de Tukey, p<0,05) entre as amostras para cada variedade ao longo do envelhecimento biológico.

NH₄⁺, íon amônio. GABA, ácido gama-aminobutírico. ¹Valor menor que o limite de detecção do método.

A soma dos aminoácidos apresentou algumas variações ao longo do envelhecimento sobre borra para todos os vinhos espumantes, onde pode-se observar que, entre o nono e décimo quinto mês, a soma de alguns aminoácidos diminuiu (Tabela 3), indicando que durante esta fase de envelhecimento pode estar ocorrendo a liberação de proteínas e peptídeos (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002). As mudanças que ocorrem durante a autólise das leveduras e envelhecimento sobre borra indicam que peptídeos e/ou proteínas podem ser liberados, podendo posteriormente ser hidrolisados em aminoácidos (MORENO-ARRIBAS et al., 1998). Desta forma, observou-se um aumento da soma dos aminoácidos no final do envelhecimento sobre borra (18 meses) em relação ao tempo inicial para os vinhos espumantes Manzoni (15 %) e Chardonnay (4 %), indicando a liberação de aminoácidos.

Com relação as diferentes variedades de uvas utilizadas para a elaboração dos vinhos espumantes, observou-se que a soma dos aminoácidos (Tabela 3) apresentou maiores concentrações nas amostras de vinhos espumantes Chardonnay (variedade clássica para elaboração de vinhos espumantes), seguida dos vinhos espumantes Manzoni, Goethe, Niágara e Villenave (variedades não-tradicionais para elaboração de vinhos espumantes). O maior teor de aminoácidos da variedade Chardonnay em relação as outras variedades de uva pode ser atribuído a sua característica genética (MORENO-ARRIBAS et al., 1998). Esses resultados indicam que a variedade de uva pode apresentar influência sobre o teor de aminoácidos.

Observou-se na Tabela 3 que os teores de NH_4^+ dos vinhos espumantes foram menores em relação as amostras de mosto e vinho base (Tabela 2). Essa diminuição do íon amônio é devida a sua utilização como fonte de nitrogênio inorgânico pelas leveduras durante a segunda fermentação em garrafa.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada separadamente para cada variedade de vinho espumante a fim de avaliar a separação das amostras em relação a evolução da composição nitrogenada ao longo de 18 meses de envelhecimento sobre borra. Foram consideradas para a análise de ACP todas as variáveis, com exceção dos aminoácidos não detectados (cisteína e isoleucina) nos vinhos espumantes, sendo considerado como critério de separação os diferentes tempos de envelhecimento sobre borra.

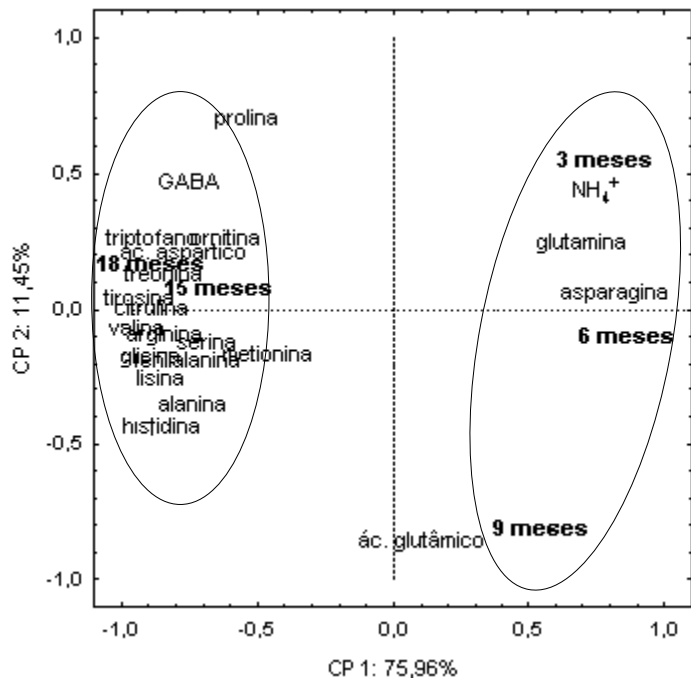
Foi possível observar na Figura 1 uma boa separação dos vinhos espumantes de acordo com o tempo de envelhecimento sobre borra. Em geral, os dois componentes principais (CP 1 x CP 2) representaram mais de 75 % da variância total dos resultados para todas as variedades. O Fator

1 explicou a maior variabilidade dos dados, sendo responsável pela separação dos vinhos espumantes de acordo com o tempo de envelhecimento sobre borra (Figura 1 A, B, C, D e E). Os vinhos espumantes com 3, 6 e 9 meses de envelhecimento sobre borra foram claramente separados no plano dos vinhos espumantes com 15 e 18 meses de envelhecimento para todas as variedades. Observou-se que todos os vinhos espumantes com 3, 6 e 9 meses de envelhecimento foram principalmente associados com o NH_4^+ e com os aminoácidos glutamina e ácido glutâmico. Enquanto que, no final do envelhecimento sobre borra (15 e 18 meses) foi possível observar que todos os vinhos espumantes foram fortemente associados com os aminoácidos lisina, fenilalanina, citrulina, glicina, arginina, ácido aspártico, valina, metionina e tirosina (Figura 1 A, B, C, D e E). Estes aminoácidos podem ter sido metabolizados pelas leveduras durante a fermentação e liberados pela parede celular da levedura no final do envelhecimento biológico. Dados estes que estão de acordo com a Tabela 3, que demonstra um aumento das concentrações destas substâncias nos vinhos espumantes nas etapas finais de envelhecimento (15 e 18 meses) em relação ao tempo inicial (3 meses). Cabe ressaltar, que ao longo do tempo de envelhecimento sobre borra, os aminoácidos lisina, citrulina e fenilalanina apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) de suas concentrações, sugerindo estes aminoácidos como indicadores do envelhecimento sobre borra.

Em geral, a ACP proporcionou um padrão de separação semelhante para todos os vinhos espumantes elaborados com as diferentes variedades de uvas de acordo com o tempo de envelhecimento, que foi responsável pelo perfil nitrogenado das amostras. Os vinhos espumantes com 15 e 18 meses de envelhecimento foram associados com a maioria dos aminoácidos analisados, demonstrando a influência significativa do tempo de envelhecimento biológico no aumento da concentração dos aminoácidos.

Figura 1. Análise de componentes principais (ACP) com os resultados dos aminoácidos e íon amônio (NH_4^+) durante o envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes. Os dados utilizados foram a média de 3 repetições.

A) Chardonnay



B) Villenave

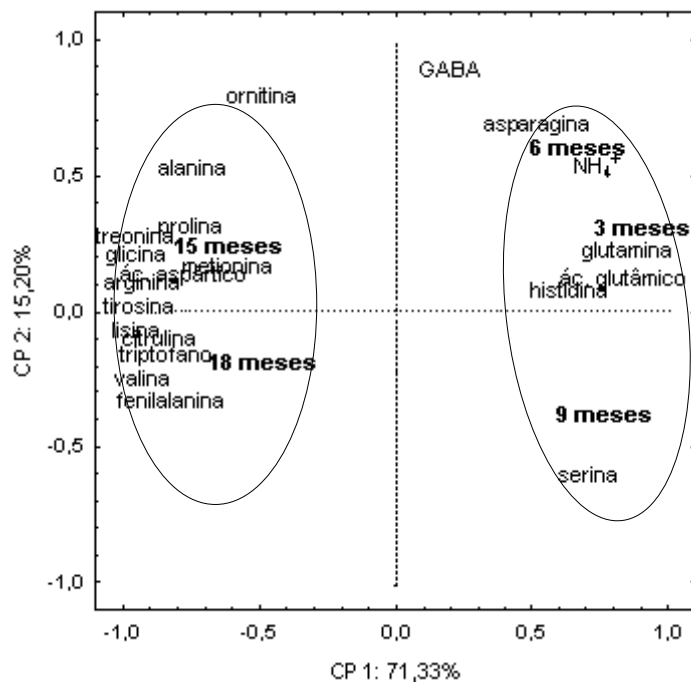
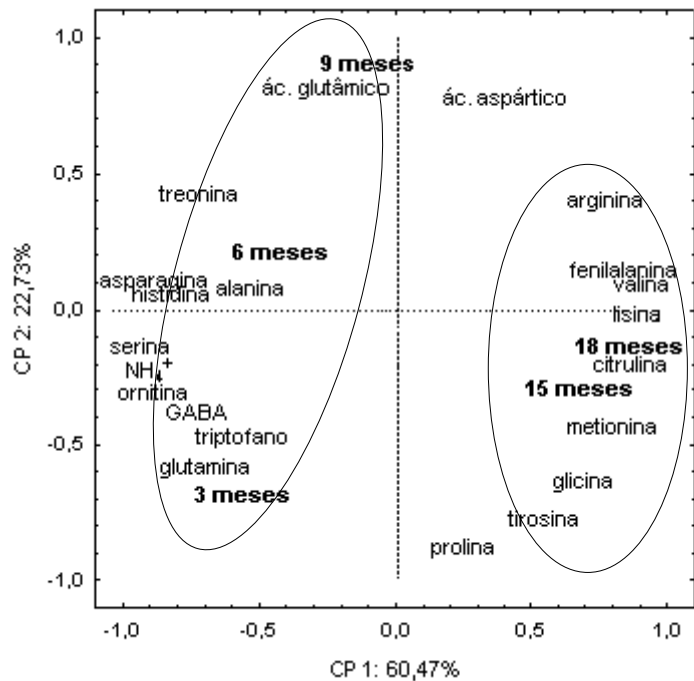


Figura 1. (Continuação)

C) Niágara



D) Manzoni

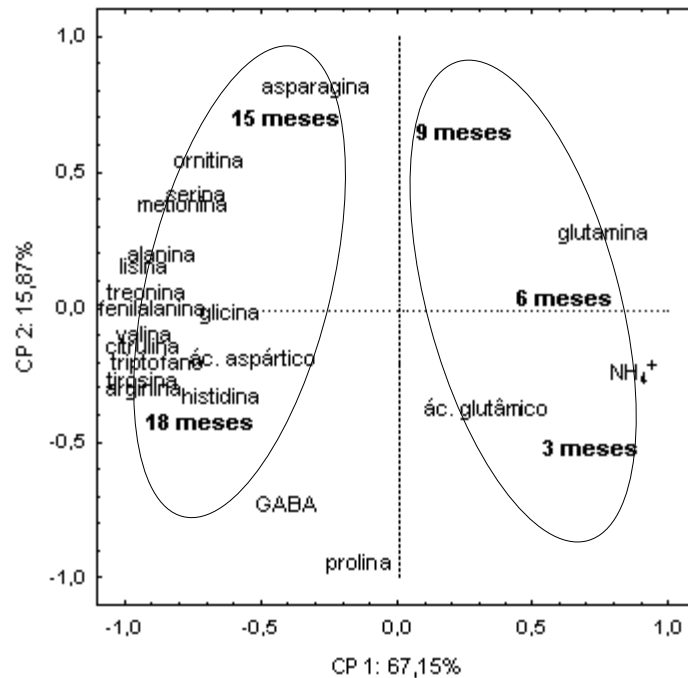
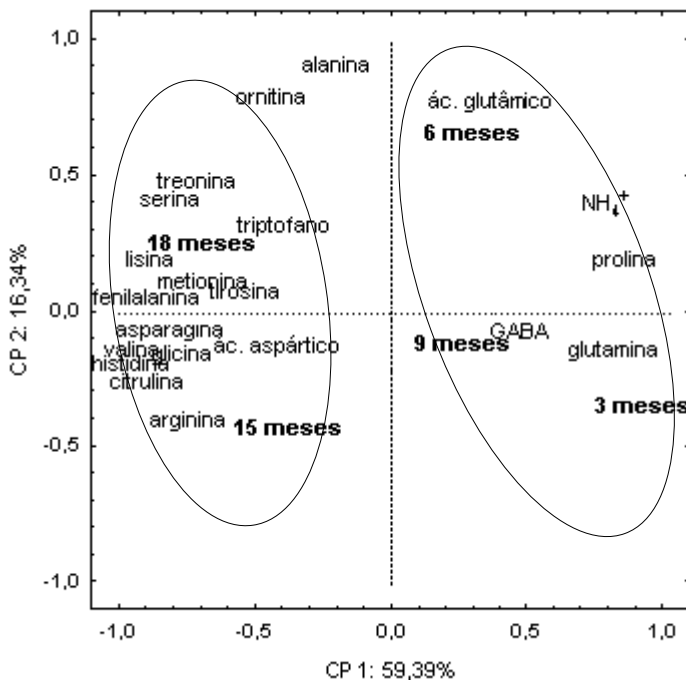


Figura 1. (Continuação)

E) Goethe



3.3 ANÁLISE SENSORIAL

Para conhecer melhor as características sensoriais dos vinhos espumantes elaborados com as variedades de uvas Chardonnay, Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe, foi realizada uma Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) após 18 meses de envelhecimento sobre borra. A Tabela 4 mostra os valores médios para a intensidade relativa (%) dos atributos sensoriais gerados pelos julgadores. Os resultados demonstraram que os vinhos foram caracterizados por descritores de frutos brancos e cítricos, floral e/ou flor de laranjeira, casca de pão e/ou pão torrado, mel, manteiga e vegetal, enquanto que, a aparência variou entre as cores amarelo palha e dourado. Em geral, algumas diferenças nos atributos sensoriais dos vinhos espumantes foram observadas pelos julgadores e estas podem ser atribuídas principalmente às diferentes

variedades de uva utilizadas para a elaboração, como também devido ao processo de envelhecimento sobre borra.

Entre as cores amarelo palha e dourado avaliadas, observou-se que para todos os vinhos espumantes a cor amarela palha foi predominante, indicando que apesar do tempo de envelhecimento, todos os vinhos espumantes apresentaram características de cor de vinhos brancos mais jovens. O vinho espumante Villenave apresentou maior intensidade cor amarela palha (68,58 %) em relação as demais amostras. A avaliação gustativa (paladar) das amostras demonstrou que os vinhos espumantes Villenave e Goethe apresentaram maior acidez, enquanto que, os vinhos espumantes Manzoni, Niágara e Chardonnay apresentaram maior intensidade para o sabor doce. O vinho espumante Goethe também apresentou maior intensidade para o sabor alcoólico.

Com relação aos atributos de aromas avaliados (Tabela 4), em geral, observou-se que os vinhos espumantes das variedades Manzoni, Niágara e Chardonnay apresentaram maiores intensidades relativas para os atributos floral e/ou flor de laranjeira, frutas brancas e mel. Enquanto que, os vinhos espumantes Chardonnay e Goethe apresentaram as maiores intensidades relativas para o atributo de frutas cítricas. O aroma vegetal apresentou maior intensidade nos vinhos espumantes Chardonnay, e o aroma de manteiga para o vinho espumante Goethe. Os vinhos espumantes Goethe e Villenave foram descritos com maior intensidade para o aroma de casca de pão e/ou pão torrado, o qual pode ser atribuído ao processo fermentativo e envelhecimento sobre borra.

Estudos de Torrens et al. (2010) demonstram a evolução das notas de frutas cítricas, arbóreas, tropicais e maduras no perfil sensorial do vinho base, para um perfil quimicamente mais complexo nos vinhos espumantes envelhecidos, com notas de torrado, lácteo, doce e leveduras. Enquanto que Ganss et al. (2011) na avaliação sensorial descritiva de vinhos espumantes Chardonnay e Riesling demonstraram um aumento das notas aromáticas frutadas que lembram pêssego e melão. Esses resultados são similares ao perfil sensorial dos vinhos espumantes deste estudo.

Tabela 4. Perfil sensorial dos valores da intensidade média (%) para os descritores de aparência, aroma e sensação bucal dos vinhos espumantes elaborados com as variedades Chardonnay, Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe com 18 meses de envelhecimento biológico.

Atributos	Chardonnay	Villenave	Niágara	Manzoni	Goethe
Amarelo palha	61,91±0,84 ^b	68,58±0,53 ^d	66,73±0,49 ^c	66,17±0,62 ^c	42,90±0,85 ^a
Amarelo dourado	31,54±0,70 ^d	16,85±0,28 ^b	31,30±0,52 ^c	32,35±0,88 ^e	8,95±0,05 ^a
Casca de pão/pão torrado	22,22±0,55 ^a	27,41±0,29 ^{cd}	25,43±1,01 ^{bc}	24,83±0,33 ^b	28,51±1,67 ^d
Floral/flor de laranjeira	34,38±0,58 ^c	29,57±0,31 ^b	37,90±0,79 ^d	37,41±0,50 ^{cd}	24,10±2,53 ^a
Frutas brancas	35,43±0,58 ^c	30,99±0,38 ^b	38,64±0,45 ^e	36,23±0,46 ^d	25,86±0,27 ^a
Frutas cítricas	28,40±0,32 ^e	25,31±0,32 ^b	23,89±0,18 ^a	26,30±0,52 ^c	26,92±0,22 ^d
Vegetal	26,42±0,49 ^e	16,85±0,32 ^a	25,25±0,75 ^d	22,90±0,59 ^b	24,73±0,27 ^c
Manteiga	14,14±0,21 ^a	15,31±0,21 ^b	17,72±0,27 ^c	18,02±0,32 ^c	25,63±0,32 ^d
Mel	23,64±0,61 ^c	22,10±0,33 ^b	27,35±0,74 ^d	27,78±0,51 ^d	13,79±0,40 ^a
Adstringente	26,48±0,52 ^a	31,60±0,52 ^d	28,52±0,41 ^b	32,28±0,60 ^e	28,95±0,05 ^c
Untuoso	32,78±0,55 ^c	31,36±0,42 ^b	27,84±0,30 ^a	35,12±0,28 ^d	31,30±0,42 ^b
Ácido	31,60±0,31 ^a	53,09±0,96 ^d	34,01±0,56 ^b	35,38±0,32 ^c	52,52±0,49 ^d
Doce	23,27±0,40 ^b	9,14±0,21 ^a	20,31±0,33 ^b	28,70±0,33 ^b	8,93±0,05 ^a
Amargo	26,05±0,76 ^d	23,27±0,34 ^a	25,56±0,29 ^c	25,43±0,47 ^e	24,49±0,06 ^b
Alcoólico	39,15±0,35 ^c	35,56±0,29 ^a	35,93±0,62 ^a	38,09±0,32 ^b	40,40±0,60 ^d

Resultados são expressos como valores médios ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$) entre as variedades.

4 CONCLUSÃO

Alterações significativas foram observadas nas concentrações dos aminoácidos e íon amônio dos vinhos espumantes durante o tempo de envelhecimento biológico. Os teores dos aminoácidos livres dos vinhos espumantes apresentaram variações nas suas concentrações ao longo do envelhecimento sobre borra, indicando que pode ter ocorrido a liberação de aminoácidos ou de peptídeos e proteínas da parede celular da levedura. A análise de componentes principais mostrou que a composição nitrogenada dos vinhos espumantes foi modificada de acordo com tempo de envelhecimento, os vinhos espumantes com 3, 6 e 9 meses foram claramente separados dos vinhos com 15 e 18 meses de envelhecimento, e o mesmo comportamento foi observado para todas as variedades de vinhos espumantes. Os vinhos espumantes com 15 e 18 meses de envelhecimento foram associados com a maioria dos aminoácidos analisados, especialmente com a lisina, citrulina e fenilalanina, sugerindo estes aminoácidos como possíveis indicadores do envelhecimento sobre borra. O perfil sensorial dos vinhos espumantes envelhecidos foi caracterizado por descritores de frutos brancos e cítricos, floral e/ou flor de laranjeira, casca de pão e/ou pão torrado, mel, manteiga e vegetal, e cor amarelo palha. Esses resultados demonstram que o tempo de envelhecimento biológico influenciou a composição nitrogenada e o perfil sensorial dos vinhos espumantes, os quais apresentaram características de qualidade típicas da viticultura local.

Mais investigações são necessárias, principalmente quanto a evolução do perfil volátil, a fim de verificar como o processo de envelhecimento biológico impacta na qualidade aromática destes vinhos espumantes brasileiros.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Taninos enológicos, goma arábica e manoproteínas são descritos na literatura como agentes enológicos, porém, pouco explorados em vinhos espumantes rosé. Este trabalho demonstrou pela primeira vez o efeito destes agentes enológicos na vinificação de espumantes rosé. As alterações na composição química durante o envelhecimento sobre borra de vinhos espumantes brancos elaborados com variedades de uvas não-tradicionais Villenave, Niágara, Manzoni e Goethe, e clássica (Chardonnay), cultivadas na região Sul do Brasil, foram investigadas com o intuito de buscar novas alternativas para a elaboração de vinhos espumantes com potencial de envelhecimento.

A adição de goma arábica e tanino enológico em duas diferentes etapas da vinificação dos vinhos espumantes rosé exerceram influências significativas na composição dos polifenóis e capacidade antioxidante. A adição dos agentes enológicos no vinho base, antes da segunda fermentação em garrafa, aumentou as concentrações dos polifenóis dos vinhos espumantes, particularmente o *trans*-resveratrol, ácidos gálico e elágico, catequina, quercetina e miricetina. A adição dos agentes enológicos após a etapa de degola apresentou menor influência sobre a composição fenólica dos vinhos espumantes.

O estudo referente a adição de manoproteínas em vinhos espumantes rosé mostrou alterações na composição dos polifenóis, ácidos orgânicos e elementar durante o envelhecimento biológico. A adição de manoproteínas influenciou significativamente as concentrações de ácidos orgânicos e fenólicos individuais, particularmente o *trans*-resveratrol, quercetina, catequina, ácido *p*-cumárico e ácidos hidroxibenzoicos, que apresentaram um aumento de suas concentrações ao longo do tempo. A composição mineral não alterou no final de 12 meses de envelhecimento biológico. Os espectros NIR e Raman demonstraram que estas alterações dos constituintes químicos dos vinhos espumantes não foram suficientes para modificar o espectro de absorção, independentemente da adição de manoproteínas.

O tempo de envelhecimento sobre borra influenciou positivamente o aumento das concentrações de alguns fenólicos individuais, com destaque para o ácido cafeico. O índice de escurecimento também aumentou ao longo do envelhecimento dos vinhos espumantes, tendo uma evolução inversa à concentração do ácido *trans*-caftárico e de glutathione total, provavelmente devido a participação destas substâncias nas reações de oxidação. O ácido cafeico foi correlacionado positivamente com o escurecimento e com o tempo, sugerindo ser um indicador no

monitoramento do perfil de envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes brancos elaborados com variedade de uvas não-tradicionais.

A composição nitrogenada dos vinhos espumantes Villenave, Niágara, Manzoni, Goethe e Chardonnay foi influenciada significativamente pelo tempo de envelhecimento sobre borra. A concentrações dos aminoácidos lisina, citrulina e fenilalanina aumentaram significativamente durante o envelhecimento sobre borra dos vinhos espumantes. A análise de componentes principais separou claramente os vinhos espumantes com 3, 6 e 9 meses de envelhecimento daqueles com 15 e 18 meses de envelhecimento considerando a composição nitrogenada, esse comportamento permaneceu para todas as variedades. Os aminoácidos lisina, citrulina e fenilalanina foram fortemente associados com os vinhos espumantes no final do envelhecimento (15 e 18 meses) para todas as variedades, sugerindo estes aminoácidos como indicadores do envelhecimento sobre borra. O perfil sensorial dos vinhos espumantes envelhecidos foi caracterizado por descritores de frutos brancos e cítricos, floral e/ou flor de laranjeira, casca de pão e/ou pão torrado, mel, manteiga e vegetal, e cor amarelo palha.

Este estudo proporcionou amplo conhecimento do efeito de agentes enológicos na melhoria e/ou manutenção dos constituintes químicos determinantes de qualidade dos vinhos espumantes rosé; bem como proporcionou melhor compreensão quanto ao uso de variedades de uvas não-tradicionais para elaboração de vinhos espumantes com potencial de envelhecimento biológico e com características típicas da vitivinicultura local. Esses resultados são de grande importância para o setor vitivinícola brasileiro.

REFERENCIAS

ALCAIDE-HIDALGO, J. M.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; POLO, M. C. Influence of malolactic fermentation, post fermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. **Food Chemistry**, v.103, p.572-581, 2007.

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.

ARCARI, S. G.; CHAVES, E. S.; VANDERLINDE, R.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Brazilian fortified wines: Chemical composition, chromatic properties and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 53, p. 164–173, 2013.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content wine antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 655-665, 2002.

BAI, B.; HE, F.; YANG, L.; CHEN, F.; REEVES, M. J.; LI J. Comparative study of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3984-3992, 2013.

BAIANO, A.; TERRACONE, C.; GAMBACORTA, G.; LA NOTTE, E. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Primitivo Wine: Comparison among Winemaking Technologies. **Journal of Food Science**, v. 74, p. C258-C267, 2009.

BATISTA, L.; MONTEIRO, S.; LOUREIRO, V. B.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1067-1075, 2010.

BAUER, R.; NIEUWOUDT, H.; BAUER, F. F.; KOSSMANN, J.; KOCH, K. R.; ESBENSEN, K. H. FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 1371-1379, 2008.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. I.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 546-552, 2007.

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

BOSCH-FUSTÉ, J.; SARTINI, E.; FLORES-RUBIO, C.; CAIXACH, J.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, E. Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, “cavas”. **Food Chemistry**, v. 114, p. 782-720, 2009.

BOULTON, R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 67-87, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Decreto nº 8.198 de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21/02/2014 - Edição Extra 1.

BURIN, V. M.; CALIARI, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine : Influence of clarification process before alcoholic fermentation. **Food Chemistry**, v. 202, p. 417-425, 2016.

BURIN, V. M.; Da SILVA, A. L.; MALINOVSKI, L. I.; ROSIER, J. P.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Characterization and multivariate classification of grapes and wines of two Cabernet Sauvignon clones. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, p. 474-481, 2011.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of

different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155-163, 2014.

BURIN, V. M.; GOMES, T. M.; CALIARI, V.; PIERRE, J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. **Microchemical Journal**, v. 122, p. 20–28, 2015.

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.; PANCERI, C. P.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of the Traditional, Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 393-400, 2015.

CALIARI, V.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. VINHOS ESPUMANTES: MÉTODOS DE ELABORAÇÃO – Review. **Evidencia**, v.13, p.65-77, 2013.

CAMARGO, U. A. **Porta-enxertos e cultivares de videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2008.

CARRASCOSA, A. V.; BARTOLOME, B.; ROBREDO, S.; LEON, A.; CEBOLLERO, E.; JUEGA, M.; NUNEZ, Y. P.; MARTINEZ, M. C.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. Influence of locally-selected yeast on the chemical and sensorial properties of Albariño white wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 319–325, 2012.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. de L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CASTIÑEIRA, M. M. G.; BRANDT, R.; JAKUBOWSKI, N.; ANDERSSON, J. T. Changes of the metal composition in German white wines through the winemaking process. A study of 63 elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2953–2961, 2004.

CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; BRUNO DE SOUSA, R. Revision: Contaminant elements in wines. **Science and Viticulture Technique**, v. 23, p. 3–19, 2008.

CEJUDO-BASTANTE, M. J.; PÉREZ-COELLO, M. S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Identification of New Derivatives of 2-*S*-Glutathionylcaftaric Acid in Aged White Wines by HPLC-DAD-ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11483-11492, 2010.

CHEYNIER, V. F.; TROUSDALE, E. K.; SINGLETON, V. L.; SALGUES, M. J.; WYLDE, R. Characterization of 2-*S*-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grapes wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 217-221, 1986.

DEL BARRIO-GALÁN, R.; CÁCERES-MELLA, A.; MEDELMARABOLÍ, M.; PEÑA-NEIRA, Á. Effect of selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and different aging techniques on the polysaccharide and polyphenolic composition and sensorial characteristics of Cabernet Sauvignon red wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 2132-2144, 2015.

DEL BARRIO-GALÁN, R.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; ORTEGA-HERAS, M.; GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B. Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 215-223, 2012.

DU TOIT, W. J.; LISJAK, K.; STANDER, M.; PREVOO, D. Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2765–2769, 2007.

ESCOBAL, A.; IRIONDO, C.; LABORRA, C.; ELEJALDE, E.; GONZALEZ, I. Determination of acids and volatile compounds in red Txakoli wine by highperformance liquid chromatography and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 349-354, 1998.

ESCOT, S.; FEUILLAT, M.; DULAU, L.; CHARPENTIERC. Release

of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v. 7, p. 153-159, 2001.

FALCÃO, L. D.; DE REVEL, G.; PERELLO, M. C.; MOUTSIU, A.; ZANUS, M. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. A Survey of Seasonal Temperatures and Vineyard Altitude Influences on 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine, C13-Norisoprenoids, and the Sensory Profile of Brazilian Cabernet Sauvignon Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.55, p.3605-3612, 2007.

FANG, F.; LI, J-M.; PAN, Q-H.; HUANG, W-D. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. **Food Chemistry**, v. 101, p. 428-433, 2007.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v. 13, p. 797-813, 2012.

FERREIRA-LIMA, N. E.; BURIN, V. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Characterization of Goethe white wines: influence of different storage conditions on the wine evolution during bottle aging. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 509-520, 2013.

FERREIRA-LIMA, N. E.; BURIN, V. M.; CALIARI, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Impact of Pressing Conditions on the Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and Glutathione Content of Brazilian *Vitis vinifera* White Wines and Evolution During Bottle Ageing. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1-14, 2016a.

FERREIRA-LIMA, N.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; MEUDEC, E.; MAZAURIC, J-P.; SOMMERER, N.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; CHEYNIER, V.; LE GUERNEVÉ, C. Synthesis, Identification, and Structure Elucidation of Adducts Formed by Reactions of Hydroxycinnamic Acids with Glutathione or Cysteinylglycine. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 2211–2222, 2016b.

FLANZY, M.; AUBERT, S. Évaluation des Composés Phénoliques des Vins Blancs. **Annals Technologie Agricole**, v. 18, p. 27-44, 1969.

GALGANO, F.; FAVATI, F.; CARUSO, M.; SCARPA, T.; PALMA, A. Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to provenance. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 1808–1815, 2008.

GALLARDO-CHACÓN, J. J.; VICHI, S.; URPI, P.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine *sur lie* aging. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 48-53, 2010.

GAMBINI, J.; LÓPEZ-GRUESO, R.; OLASO-GONZÁLEZ, G.; INGLÉS, M.; ABDELAZID, K.; ALAMINE, M. E.; BONET-COSTA, V.; BORRÁS, C.; VINÁ, J. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. **Revista Española de Geriátría y Gerontología**, v. 48, p. 79-88, 2013.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; ERBAGGIO, A.; LECCE, L.; MOIO L. Effect of Winemaking Practices on Color Indexes and Selected Bioactive Phenolics of Aglianico Wine. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 623-628, 2007.

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

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. **Food Research International**, v. 54, p. 1844-1858, 2013.

GHANEM, C.; TAILLANDIER, P.; RIZK, M.; RIZK, Z.; NEHME, N.; SOUCHARD J. P.; EL RAYESS Y. Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and mannoproteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 83, p. 101-109, 2017.

GIOVANNINI, E. **Manual de viticultura**. Porto Alegre: Bookman, 2014. 253p.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In R.E. Wrolstad

(Eds.), **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc., 2001.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. **Connaissance Vigne Vin**, v. 18, p. 253-271, 1984.

GONÇALVES, F. J.; ROCHA, S. M.; COIMBRA, M. A. Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material. **Food Chemistry**, v. 134, p. 957-963, 2012.

GONZÁLEZ-MANZANO, S.; DUEÑAS, M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. **Food Chemistry**, v. 114, p. 649–656, 2009.

GONZÁLEZ-MANZANO, S.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 283-289, 2004.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p. 83-90, 2018.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. **LWT – Food Science and Technologic**, v. 43, p. 1542-1549, 2010.

GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Stilbenes and Tyrosol as Target Compounds in the Assessment of Antioxidant and Hypolipidemic Activity of *Vitis vinifera* Red Wines from Southern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7954-7961, 2011a.

GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, p. 31-40, 2013.

GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; PEDROSA, R. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. **Food Chemistry**, v. 126, p. 213-220, 2011b.

GUADALUPE, Z., MARTÍNEZ, L., AYESTARÁN, B. Yeast mannoproteins in red winemaking: Effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 26, p. 191-200, 2010.

GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B. Effect of Commercial Mannoprotein Addition on Polysaccharide, Polyphenolic, and Color Composition in Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9022-9029, 2008.

GUADALUPE, Z.; PALACIOS, A.; AYESTARÁN, B. Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4854-4862, 2007.

GUAN, Y.; ZHONG, Q. The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum arabic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 706-712, 2015.

HARBERTSON, J. F.; PARPINELLO, G. P.; HEYMANN, H.; DOWNEY, M. O. Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. **Food Chemistry**, v. 131, p. 999-1008, 2012.

HE, F.; MU, L.; YAN, G. L.; LIANG, N. N.; PAN, Q. H.; WANG, J.; REEVES, M. J.; DUAN, C. Q. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. **Molecules**, v. 15, p. 9057-9091, 2010.

HOPFER, H.; NELSON, J.; COLLINS, T. S.; HEYMANN, H.; EBELER, S. E. The combined impact of vineyard origin and processing

winery on the elemental profile of red wines. **Food Chemistry**, v. 172, p. 486–496, 2015.

IBERN-GOMEZ, M.; ANDRES-LACUEVA, C.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; BUXADERAS, S.; SINGLETON, V. L.; DE LA TORRE-BORONAT, M. C. Browning of Cava (Sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, p. 29-36, 2000.

IMESON, A. **Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents**. United Kingdom. Ed. by Alan Imeson. John Wiley & Sons Ltd, 2010. 343p.

IVANOVA-PETROPULOS, V.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; BOROS, B.; STEFOVA, M.; STAFILOV, T.; VOJNOSKI, B.; DORNYEI, A.; KILÁR, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 1-14, 2015.

JACKSON, D. I.; LOMBARD, P. B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 4, p. 409-430, 1993.

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

JACKSON, R.S. **Wine Tasting – A professional handbook**. Food Science and Technology International Series. Elsevier Academic Press, 2002.

JANEŠ, L.; LISJAK, K.; VANZO, A. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 239–242, 2010.

JOS, A.; MORENO, I.; GONZÁLEZ, A.G.; REPETTO, G.; CAMEÁN, A. M. Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content. **Talanta**, v. 63, p. 377–382, 2004.

JUEGA, M.; GONZALEZ-RAMOS, D.; BARTOLOME, B.;

CARRASCOSA, A. V.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. Chemical evaluation of white wines elaborated with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins. **Food Chemistry**, v. 147, p. 84–91, 2014.

KEMP, B.; ALEXANDRE, H.; ROBILLARD, B.; MARCHAL, R. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 19–38, 2015.

KRITZINGER, E. C.; BAUER, F. F.; DU TOIT, W. J. Role of glutathione in winemaking: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 269–277, 2013.

LARCHER, R.; TONIDANDEL, L.; VILLEGAS, T. R.; NARDIN, T.; FEDRIZZI, B.; NICOLINI, G. Pre-fermentation addition of grape tannin increases the varietal thiols content in wine. **Food Chemistry**, v. 166, p. 56–61, 2015.

LI, H.; GUO, A.; WANG, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1–13, 2008.

LOPEZ-TOLEDANO, A.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Yeasts used to delay browning in white wines. **Food Chemistry**, v. 97, p. 498-504, 2006.

LUCCI, P.; SAURINA J.; NÚÑEZ, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 88, p. 1-24, 2017.

LUNA, A. S.; SILVA, A. P.; ALVES, E. A.; ROCHA, R. B.; LIMA, I. C. A.; DE GOIS, J. S. Evaluation of chemometric methodologies for the classification of *Coffea canephora* cultivars via FTNIR spectroscopy and direct sample analysis. **Analytical Methods**, v. 9, p. 4255-4260, 2017.

MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 396–404, 2006.

MARCHAND, S.; DE REVEL, G. A. HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 660, p. 158-163, 2010.

MARQUEZ, A.; SERRATOSA, M. P.; MERIDA, J. Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation During Winemaking. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–35, 2013.

MARTELO-VIDAL, M. J.; VÁZQUEZ, M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. **Food Chemistry**, v. 158, p. 28-34, 2014.

MARTIN, C.; BRUNEEL, J. L.; GUYON, F.; MÉDINA, B.; JOURDES, M.; TEISSEDE, P. L.; GUILLAUME, F. Raman spectroscopy of white wines. **Food Chemistry**, v. 181, p. 235–240, 2015.

MARTÍNEZ-LAPUENTE, L.; APOLINAR-VALIENTE, R.; GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; WILLIAMS, P.; DOCO, T. Polysaccharides, oligosaccharides and nitrogenous compounds change during the ageing of Tempranillo and Verdejo sparkling wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 291-303, 2018.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A J.; CARRASCOSA, A V; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, M. C. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 314–322, 2002.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.; POLO, M. C. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1081–1085, 2000.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, v. 38, p. 1175-1188, 2005.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using

capillary zone electrophoresis with direct UV detection. **Food Chemistry**, v. 102, p. 104-112, 2007.

MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOVSEK, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7692-7702, 2006.

MAZAURIC, J-P.; SALMON, J-M. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5647-5653, 2005.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1993. 362 p.

MORATA, A.; GONZÁLEZ, C.; SUÁREZ-LEPE, J. A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 144-152, 2007.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Springer Science, New York, USA, 2009. 715p.

MORENO-ARRIBAS, V.; PUEYO, E.; NIETO, F. J.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; POLO, M. C. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. **Food Chemistry**, v. 70, p. 309-317, 2000.

MORENO-ARRIBAS, V.; PUEYO, E.; POLO, M. C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J. Changes in the Amino Acid Composition of the Different Nitrogenous Fractions during the Aging of Wine with Yeasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4042-4051, 1998.

MULERO, J.; ZAFRILLA, P.; CAYUELA, J. M.; MARTÍNEZ-CACHÁ, A.; PARDO, F. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Organic Red Wine Using Different Winemaking Techniques. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C436-C440, 2011.

NICOLINI, G.; VERSINI, G.; MOSER, S.; CARLIN, S.; MASSOLINI, U. Aroma characteristics of wines from the cultivar ‘Manzoni bianco’ (‘White Riesling’ x ‘Pinot blanc’). **Mitteilungen Klosterneuburg**, v. 53, p. 251-257, 2003.

NÚÑEZ, Y. P.; CARRASCOSA, A. V.; GONZÁLEZ, R.; POLO, M. C.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7898–7903, 2006.

OIV. Office International de la Vigne et du Vin. **Codex Œnologique International**. Ed. 2012, Paris, v. 1-2, 2018.

OIV. Office International de la Vigne et du Vin. **Compendium of international methods of wine and must analysis**. (Edition 2012). Rue d’Aguesseau-75008 Paris: France, Vol. 1-2, 2012.

OLIVEIRA, J.; AZEVEDO, J.; SILVA, A. M. S.; TEIXEIRA, N.; CRUZ, L.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Pyranoanthocyanin dimers: A new family of turquoise blue anthocyanin-derived pigments found in port wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5154–5159, 2010.

PADILHA, C. V. da S.; MISKINIS, G. A.; de SOUZA, M. E. A. O.; PEREIRA, G. E.; de OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. dos S. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106-115, 2017.

PAN, W.; JUSSIER, D.; TERRADE, N.; YADA, R. Y.; ORDUÑA, R. M. Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values. **Food Research International**, v. 44, p. 660–666, 2011.

PANCERI, C.P.; DE GOES, J.S.; BORGES, D.L.G.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Effect of grape dehydration under controlled conditions on chemical composition and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 228-235, 2015.

PANCERI, C.P.; GOMES, T.M.; DE GOES, J.S.; BORGES, D.L.G.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. **Food Research International**, v. 54, p. 1343-1350, 2013.

PARKER, M.; SMITH, P.A.; BIRSE, M.; FRANCIS, I. L.; KWIATKOWSKI, M. J. LATTEY, K. A.; LIEBICH, B.; HERDERICH, M. J. The effect of pre- and post-ferment additions of grape derived tannin on Shiraz wine sensory properties and phenolic composition. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 13, p. 30-37, 2007.

PÉREZ-MAGARIÑO, S.; MARTÍNEZ-LAPUENTE, L.; BUENO-HERRERA, M.; ORTEGA-HERAS, M.; GUADALUPE, Z. AYESTARÁN, B. Use of Commercial Dry Yeast Products Rich in Mannoproteins for White and Rosé Sparkling Wine Elaboration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, P. 5670-5681, 2015.

PÉREZ-SERRADILLA, J. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Role of lees in wine production: A review. **Food Chemistry**, v. 111, p. 447–456, 2008.

PINA, F.; OLIVEIRA, J.; FREITAS, V. DE. Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations. **Tetrahedron**, v. 71, p. 3107–3114, 2015.

POZO-BAYÓN, M. Á.; HERNÁNDEZ, M. T.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; POLO, M. C. 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**, v. 51, p. 2089–2095, 2003.

POZO-BAYÓN, M. Á.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.; PUEYO, E.; MORENO-ARRIBAS, M. V. 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-BAYÓN, M. Á.; MONAGAS, M.; POLO, M. C.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Occurrence of pyranoanthocyanins in sparkling wines manufactured with red grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1300–1306, 2004.

PRAKASH, S.; ITURMENDI, N.; GRELARD, A.; MOINE, V.; DUFOURC, E. Quantitative analysis of Bordeaux red wine precipitates by solid-state NMR: Role of tartrates and polyphenols. **Food Chemistry**, v. 199, p. 229-237, 2016.

PROTAS, J. F. Da S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010**. IBRAVIN; Embrapa Uva e Vinho, Brasília, DF, 2011. 110p.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGEMNTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**, v. 26, p. 1234-1237, 1999.

REVILLA, I.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; BELTRÁN, S. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 83-90, 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology – vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications**. Wiley & Sons, West Sussex, UK, 2006a. 498p.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Handbook of enology. **The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments**, Vol. 2, West Sussex, UK: Wiley & Sons, 2006.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology – vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments**. Wiley & Sons, West Sussex, UK, 2006b. 429p.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, p. 933-956, 1996.

RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ, P.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Contribution of anthocyanin fraction of the antioxidant properties of wine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2815-2822, 2008.

RODRIGUES, A.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LUCAS, C.; LAUREANO, O. Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability. **Food Chemistry**, v. 131, p. 907–914, 2012.

ROMERO, E. G.; MUÑOZ, G. S. Determination of organic acids in grape must, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 655, p. 111-117, 1993.

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

RUIZ-MORENO, M. J.; MUÑOZ-REDONDO, J. M.; CUEVAS, F. J.; MARRUFO-CURTIDO, A.; LEÓN, J. M.; RAMÍREZ, P.; MORENO-ROJAS, J. M. The influence of pre-fermentative maceration and ageing factors on ester profile and marker determination of Pedro Ximenez sparkling wines. **Food Chemistry**, v. 230, p. 697-704, 2017.

SALMON, J. M.; FORNAIRON-BONNEFOND, C.; MAZAURIC, J. P. Interactions Between Wine Lees and Polyphenols : Influence on Oxygen Consumption Capacity During Simulation of Wine Aging. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 5–10, 2002.

Santos, C. A. T.; Páscoa, R. N. M. J.; Sarraguça, M. C.; Porto, P. A. L. S.; Cerdeira, A. L.; González-Sáiz, J. M.; Pizarro, C.; Lopes, J. A. Merging vibrational spectroscopic data for wine classification according

to the geographic origin. **Food Research International**, v. 102, p. 504-510, 2017.

SARTOR, S.; CALIARI, V.; MALINOVSKI, L. I.; TOALDO, I. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive profiling of polyphenolics and oenological properties of red wines from Italian grapes (*Vitis vinifera* L.) cultivated in a selected subtropical region. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 1-10, 2017a.

SARTOR, S.; MALINOVSKI, L. I.; CALIARI, V.; Da SILVA, A. L.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Particularities of Syrah wines from different growing regions of Southern Brazil: grapevine phenology and bioactive compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p.1414-1424, 2017b.

SCHUCK, E.; ROSIER, J. P.; DOAZAN, J. P.; DUCROQUET, J. P. H. J. Variedade de videira Epagri 401-Villenave. **Revista Agropecuária Catarinense**, v.12, p.17-19, 1999.

SEN, I.; OZTURK, B.; TOKATLI, F.; OZEN, B. Combination of visible and mid infrared spectra for the prediction of chemical parameters of wines. **Talanta**, v. 161, p. 130-137, 2016.

SERRA-CAYUELA, A.; AGUILERA-CURIEL, M. A.; RIU-AUMATELL, M.; BUXADERAS, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E. Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker. **Food Research International**, v. 53, p. 226–231, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colourimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SINGLETON, V. L.; SALGUES, M.; ZAYA, J.; TROUSDALE, E. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 50-56, 1985.

SNYDER, A. B.; SWEENEY, C. F.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; GIUSTI, M. M. Rapid authentication of concord juice concentration in a

grape juice blend using Fourier-Transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, v. 147, p. 295-301, 2014.

SOKOLOWSKY, M.; ROSENBERGER, A.; FISCHER, U. Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time-intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis. **Food Quality and Preference**, v. 39, p. 285-297, 2015.

STEFENON, C. A.; BONESI, C. D. M.; MARZAROTTO, V.; BARNABÉ, D.; SPINELLI, F. R.; WEBBER, V.; VANDERLINDE, R. Phenolic composition and antioxidant activity in sparkling wines: Modulation by the ageing on lees. **Food Chemistry**, v. 145, p. 292-299, 2014.

STEFENON, C. A.; COLOMBO, M.; BONESI, C. DE M.; MARZAROTTO, V.; VANDERLINDE, R.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods. **Food Chemistry**, v. 119, p. 12-18, 2010.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**, v. 101, p. 449-457, 2007.

STOCKHAM, K.; SHEARD, A.; PAIMIN, R.; BUDDHADASA, S.; DUONG, S.; ORBELL, J. D.; MURDOCH, T. Comparative studies on the antioxidant properties and polyphenolic content of wine from different growing regions and vintages, a pilot study to investigate chemical markers for climate change. **Food Chemistry**, v. 140, p. 500-506, 2013.

TEIXEIRA DOS SANTOS, C. A.; PÁSCOA, R. N. M. J.; PORTO, P. A. L. S.; CERDEIRA, A. L.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; PIZARRO, C.; LOPES, J. A. Raman spectroscopy for wine analyses: A comparison with near and mid infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 186, p. 306-314, 2018.

TOALDO, I. M.; CAMP, J. V.; GONZALES, G. B.; KAMILOGLU, S.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. SMAGGHE, G.; RAES, K.; CAPANOGLU, E.; GROOTAERT, C. Resveratrol improves TNF- α -induced endothelial dysfunction in a coculture model of a Caco-2 with

an endothelial cell line. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 36, p. 21-30, 2016a.

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; ALVES, T. L.; DE GOIS, J. S.; BORGES, D. L.G.; CUNHA, H. P.; DA SILVA, E. L.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, v. 173, p. 527-535, 2015.

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; DA SILVA, E. L.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Acute consumption of organic and conventional tropical grape juices (*Vitis labrusca* L.) increases antioxidants in plasma and erythrocytes, but not glucose and uric acid levels, in healthy individuals. **Nutrition Research**, v. 36, p. 808-817, 2016b.

TOALDO, I. M.; FOGOLARI, O.; PIMENTEL, G. C.; de GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; CALIARI, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 1-8, 2013.

TORRENS, J.; RIU-AUMATELL, M.; VICHI, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Assessment of Volatile and Sensory Profiles between Base and Sparkling Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.2455-2461, 2010.

TORRENS, J.; RIU-AUMATELL, M.; VICHI, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Assessment of Volatile and Sensory Profiles between Base and Sparkling Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.2455-2461, 2010.

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

VAZALLO-VALLEUMBROCIO, G.; MEDEL-MARABOLÍ, M.; PEÑA-NEIRA, À.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; OBREQUE-SLIER, E. Commercial enological tannins: Characterization and their relative impact on the phenolic and sensory composition of Carménère wine

during bottle aging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 83, p. 172-183, 2017.

WEBBER, V.; DUTRA, S. V.; SPINELLI, F. R.; CARNIELI, G. J.; CARDOZO, A.; VANDERLINDE, R. Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. **Food Chemistry**, v. 216, p. 254–259, 2017.

WEBBER, V.; DUTRA, S. V.; SPINELLI, F. R.; MARCON, Â. R.; CARNIELI, G. J.; VANDERLINDE, R. Effect of glutathione addition in sparkling wine. **Food Chemistry**, v. 159, p. 391–398, 2014.

WELKE, J. E.; ZANUS, M.; LAZZAROTTO, M.; PULGATI, F. H.; ZINI, C. A. Main differences between volatiles of sparkling and base wines accessed through comprehensive two dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection and chemometric tools. **Food Chemistry**, v. 164, p. 427–437, 2014.

WU, J.; GUAN, Y.; ZHONG, Q. Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0. **Food Chemistry**, v. 172, p. 121–128, 2015.

ZOECKLEIN, B. W. **A review of méthode Champenoise production.** Virginia Cooperative Extension. 2002. 29p.

APÊNDICE A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Espumantes brasileiros: Influência do tempo de armazenamento sobre borras na composição fenólica, nitrogenada, perfil volátil e sensorial de espumantes brancos; e efeito da adição de agentes enológicos nas características químicas e sensoriais de espumantes rose

Pesquisador: Marilde Terezinha Bordignon Luiz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60396316.7.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.841.441

Apresentação do Projeto:

Trata o presente projeto de uma pesquisa de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, que será desenvolvido por Saionara Sartor sob orientação de Marilde T. Bordignon Luiz, que assina a folha de rosto como pesquisador responsável juntamente com Ana Carolina Arisi, chefe do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

Durante o período de envelhecimento sobre borras, diversas reações conduzem a transformações importantes na composição química e sensorial dos espumantes, estas mudanças tem relação direta com a qualidade e aceitabilidade pelo consumidor; na enologia, a adição de agentes enológicos visa melhorar ainda mais a qualidade química e gustativa dos espumantes, podendo obter produtos diferenciados, sendo possível elencar a preferência do consumidor com base neste produtos.

Participantes: 15

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.841.441

Quanto ao teor alcoólico das amostras, este não apresenta um risco, já que a equipe passa por treinamento e é orientada a não ingerir as amostras no momento da análise, sendo elas descartadas após a avaliação.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o que foi literalmente citado no Projeto Básico apresentado:

"Caracterizar espumantes brancos elaborados com variedades de uvas clássicas e inovadoras, e avaliar a evolução da composição química e sensorial durante o armazenamento sobre borras. Caracterizar espumantes rose e avaliar o feito da adição de diferentes agentes enológicos na composição química e perfil sensorial."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o que foi literalmente citado no Projeto Básico apresentado:

"Riscos: Os riscos envolvidos na execução desta pesquisa estão relacionados com equipamentos e reagentes para análises químicas, seleção de julgadores e teor alcoólico das amostras. Porém, estes riscos são passíveis de serem controlados, e alternativas estão previstas para que a realização do projeto ocorra conforme cronograma. Com relação à análise sensorial, a equipe de julgadores é selecionada através de questionários, e após a seleção é feito esclarecimento e aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Quanto ao teor alcoólico das amostras, este não apresenta um risco, já que a equipe passa por treinamento e é orientada a não ingerir as amostras no momento da análise, sendo elas descartadas após a avaliação.

Benefícios:

Os benefícios desta pesquisa proporcionam subsídio aos vitivinicultores, fortalecendo o mercado de espumantes brasileiros que é promissor, ampliando também a ciência no meio acadêmico. O conhecimento do melhor tempo de envelhecimento sobre borras, bem como, o efeito da utilização de gentes enológicos durante a vinificação, auxiliará o setor vitícola e enológico para obtenção de produtos de excelente qualidade, elencando a preferência do consumidor. No que se refere ao meio acadêmico, as mudanças químicas e sensoriais que ocorrem durante o envelhecimento sobre borras, sim como as mudanças pela adição de produtos enológicos terão impacto científico de grande relevância para a ciência dos alimentos.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.841.441

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As considerações descritas e os pareceres anteriores apontam a relevância da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- (1) Folha de rosto
- (2) Formulário Projeto da Pesquisa - PB
- (3) Projeto de Pesquisa estruturado na íntegra
- (4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- (5) Declaração de concordância expedida pela(s) instituição(ões) envolvida(s)
- (6) Apresenta carta resposta as pendencias

Recomendações:

sem recomendações adicionais diante da Crata resposta apresentada e dos documentos anexados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este comitê recomenda a aprovação da execução do projeto de pesquisa ora apresentado, destacando que se houverem alterações estas devem ser remetidas para novo parecer, assim como recomenda-se que os pesquisadores mantenham-se atentos aos preceitos éticos em todo o percurso de pesquisa, encaminhando os relatórios recomendados na Res 466/12 a este Comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_799716.pdf	03/11/2016 16:45:38		Aceito
Outros	FichaADQ.pdf	03/11/2016 16:43:37	Marilde Terezinha Bordignon Luiz	Aceito
Outros	Fichaelecardescritores.pdf	03/11/2016 16:42:12	Marilde Terezinha Bordignon Luiz	Aceito
Outros	RESPOSTASPENDENCIAS.docx	03/11/2016 16:41:18	Marilde Terezinha Bordignon Luiz	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	03/11/2016 16:38:40	Marilde Terezinha Bordignon Luiz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinstituicaoassinada.pdf	03/11/2016 16:36:37	Marilde Terezinha Bordignon Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.pdf	26/09/2016 11:35:14	Marilde Terezinha Bordignon Luiz	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.841.441

Ausência	TCLE.pdf	26/09/2016 11:35:14	Mariide Terezinha Bordignon Luiz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	26/09/2016 11:33:47	Mariide Terezinha Bordignon Luiz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 28 de Novembro de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

APÊNDICE B – Ficha da análise descritiva quantitativa utilizada para a análise sensorial dos vinhos espumantes brancos.

ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA ESPUMANTES BRANCOS

Prove cuidadosamente a amostra e avalie a intensidade de cada atributo de acordo com a escala a baixo:

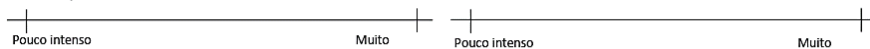
Nome: _____

Amostra: _____

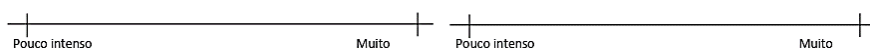
Amostra: _____

Aparência

Amarelo palha

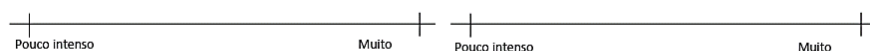


Amarelo dourado

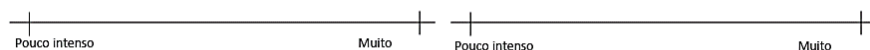


Aromas

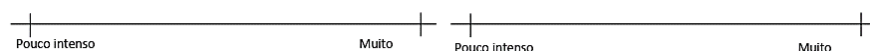
Aroma de casca de pão e pão torrado



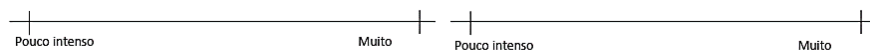
Aroma floral/flor de laranjeira



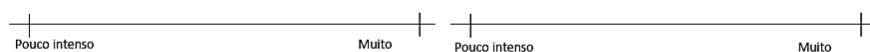
Aroma de frutas brancas



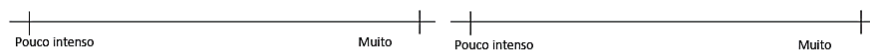
Aroma de frutas cítricas



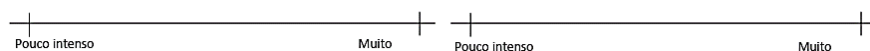
Aroma herbáceo



Aroma de manteiga

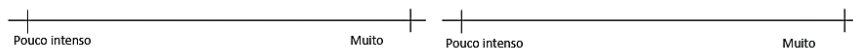


Aroma de mel

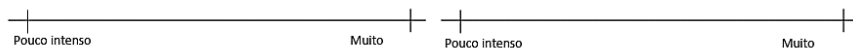


Sensações gustativas

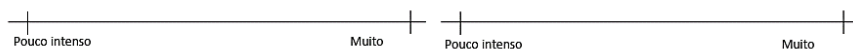
Adstringente



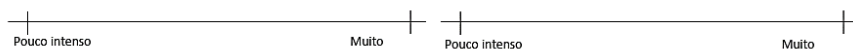
Untuoso



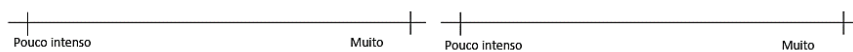
Ácido



Doce



Amargo



Alcoólico

