



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DA INOCULAÇÃO COMBINADA DE LEVEDURAS  
INDÍGENAS EM MOSTO CHENIN BLANC NA  
COMPOSIÇÃO DO AROMA E ACEITAÇÃO DO  
CONSUMIDOR**

ADRIANA PEREIRA COELHO SANTOS

SALVADOR – BA

2015

**ADRIANA PEREIRA COELHO SANTOS**

**EFEITO DA INOCULAÇÃO COMBINADA DE LEVEDURAS  
INDÍGENAS EM MOSTO CHENIN BLANC NA  
COMPOSIÇÃO DO AROMA E ACEITAÇÃO DO  
CONSUMIDOR**

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Eugênia de Oliveira Mamede

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Salvador – BA  
2015

**Sistema de Bibliotecas da UFBA**

S237 Santos, Adriana Pereira Coelho.

Efeito da inoculação combinada de leveduras indígenas em mosto Chenin Blanc na composição do aroma e aceitação do consumidor / Adriana Pereira Coelho Santos. - 2015.

76 f.: il.

Inclui apêndice

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia de Oliveira Mamede.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2015.

## TERMO DE APROVAÇÃO

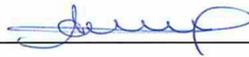
ADRIANA PEREIRA COELHO SANTOS

### **Efeito da Inoculação Combinada de Leveduras Indígenas em Mosto Chenin Blanc na Composição do Aroma e Aceitação do Consumidor**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 31 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia de Oliveira Mamede  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora



Dr<sup>a</sup>. Adriana Oliveira Medeiros  
Universidade Federal da Bahia



Dr<sup>a</sup>. Aline Telles Biasoto Marques  
EMBRAPA Semiárido

*Aos meus queridos pais, Fernando e Ednalva, toda a minha gratidão pelos ensinamentos e exemplos de vida digna.*

*Ao meu grande amor Leandro que além de partilhar os mesmos sonhos completa meu dia a dia com carinho, companheirismo e muito amor.*

*Às minhas irmãs, Suzana e Fernanda, pela amizade, apoio e torcida na conquista dos meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, onipresente em toda minha vida.

À minha querida orientadora Maria Eugênia de O. Mamede, por todos esses anos de convivência, confiança, amizade e indiscutível contribuição para a minha formação acadêmica.

À professora Alaíse Gil Guimarães pelo carinho, apoio, ensinamentos e disposição em contribuir para a minha pesquisa.

Às equipes dos laboratórios de Análises Bromatológicas, Análise Sensorial (UFBA); Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de leveduras do Instituto de Biologia (UFMG); Laboratório de Referência Enológica - LAREN (Caxias do Sul – RS) pela realização das análises e concretização do objetivo proposto.

À Vinibrasil S/A pela assistência e doação do mosto de uva Chenin Blanc e à FAPESB e CNPq para apoio financeiro e bolsas de estudo.

À equipe de professores e funcionários da pós-graduação, que direto ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos julgadores que gentilmente participaram dos testes sensoriais.

À Jaqueline Fronza, amiga inesquecível, por tornar a minha rotina de trabalho leve e prazerosa.

Aos amigos Mariana Assis, Palloma Souza e Danilo Moreira pela colaboração na pesquisa e amizade conquistada.

Ao meu grande amigo Valterney Deus pela grata surpresa de tê-lo novamente como meu colega, apoiando e me incentivando nessa jornada do mestrado.

À minha família, tios, primos e sobrinhos por acreditarem em minha capacidade.

Aos meus colegas do mestrado pela harmoniosa convivência e união nos momentos de alegrias e tristezas.

Por fim, a todas as pessoas que contribuíram e me motivaram no decorrer deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
INTRODUÇÃO GERAL .....	12
OBJETIVOS .....	15
Objetivo geral .....	15
Objetivos específicos .....	15
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA .....	16
1. VITIVICULTURA NO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO .....	16
2. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO DE UVA .....	18
3. PROCESSO FERMENTATIVO .....	21
4. USO DE CULTURA MISTAS DE LEVEDURAS NA FERMENTAÇÃO .....	26
5. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS .....	28
6. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA E SUA DETERMINAÇÃO .....	30
7. AVALIAÇÃO DO AROMA .....	36
REFERÊNCIAS .....	38
CAPÍTULO II – EFEITO DA COINOCULAÇÃO DE LEVEDURAS INDÍGENAS EM MOSTO CHENIN BLANC NA COMPOSIÇÃO DO AROMA E PREFERÊNCIA DO CONSUMIDOR .....	49
RESUMO .....	49
1. INTRODUÇÃO .....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	52
2.1. Leveduras .....	52
2.2. Mosto de uva e condições de fermentação .....	52
2.3. Análise da composição química do mosto .....	53
2.4. Compostos voláteis .....	53
2.4.1. Análises cromatográficas .....	53
2.4.2. Determinação de ésteres, acetatos, álcoois e ácidos voláteis .....	53
2.4.3. Determinação de álcoois superiores, acetaldeído, acetato de etila e metanol .....	54
2.4.4. Valor da atividade de odor .....	54

2.5. Análises sensoriais .....	54
2.6. Tratamento estatístico.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
3.1. Cinética do crescimento das leveduras.....	55
3.2. Análises físico-químicas do mosto Chenin Blanc fermentado .....	58
3.3. Análises dos compostos voláteis.....	59
3.4. Avaliação da aceitação e intenção de compra.....	65
4. CONCLUSÃO.....	68
Agradecimentos .....	68
5. REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICES .....	76

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Alcoóis superiores; intervalos de concentração no vinho; descritores sensoriais (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000) e limiar de detecção do aroma, referências mostradas em letras sobrescritas.....	32
<b>Tabela 2.</b> Ácidos voláteis, seus intervalos de concentração no vinho; descritores sensoriais (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000) e limiar de detecção do aroma, referências mostradas em letras sobrescritas.....	33
<b>Tabela 3.</b> Ésteres, suas concentrações nos vinhos; descritores sensoriais (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000) e limiar de detecção do aroma, referências mostradas em letras sobrescritas .....	34

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Composição geral do mosto Chenin Blanc .....	56
<b>Tabela 2.</b> Análises químicas do mosto Chenin Blanc fermentado a 15 °C.....	58
<b>Tabela 3.</b> Composição volátil do mosto Chenin Blanc fermentado a 15 °C.....	61
<b>Tabela 4.</b> Compostos voláteis identificados com seus respectivos limiares de odor e valores de atividade de odor (VAO).....	62
<b>Tabela 5.</b> Médias de aceitação do aroma de mosto Chenin Blanc fermentado a 15 °C.....	66

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Localização dos municípios da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco nos Estados de Pernambuco e Bahia .....17
- Figura 2.** Metabolismo da glicose em leveduras. ....24

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Concentração celular expressa em matéria seca (MS) ( $\text{mg.l}^{-1}$ ), nas fermentações conduzidas pela *saccharomyces cerevisiae*, *hanseniaspora opuntiae*, *hanseniaspora guilliermondii*, *issatchenkia terricola* e *cryptococcus flavescens* em mosto Chenin Blanc a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  .....57
- Figura 2.** Intenção de compra do mosto Chenin Blanc em 120 horas de fermentação .....67

## RESUMO

O Vale do Submédio São Francisco tem se destacando nos últimos anos como uma região promissora para a produção de vinhos de qualidade. As leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* participam na fermentação do mosto e a identificação da microbiota da uva é bastante relevante, pois espécies não-*Saccharomyces* podem ser empregadas em fermentações mistas para aumentar a complexidade do vinho. Muitas pesquisas têm sido realizadas no sentido de explorar o potencial dessas leveduras em sua contribuição na formação do aroma e sabor do vinho, podendo originar um produto diferenciado com características específicas regionais. Dentro desses aspectos, o objetivo deste estudo foi identificar a microbiota das uvas, investigar a produção de compostos voláteis de aroma, assim como avaliar físico-química e sensorialmente as características finais do mosto fermentado por leveduras que compõem o ecossistema natural de uvas obtidas da região do Vale do Submédio São Francisco/BA, visando à possibilidade da utilização destas em processos biotecnológicos e produção de vinho. As leveduras não-*Saccharomyces* foram identificadas por biologia molecular, através do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do rRNA, em *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia terricola* e *Cryptococcus flavescens*. A levedura *S. cerevisiae* var. *bayanus* (comercial) foi empregada como controle do processo fermentativo. Essas leveduras foram utilizadas para a realização da fermentação em escala laboratorial em mosto de uva Chenin Blanc para estudo da cinética de crescimento, parâmetros físico-químicos, composição volátil e avaliação sensorial. O estudo da cinética de crescimento das leveduras realizado por meio da determinação matéria seca celular resultou em uma maior concentração na fermentação conduzida pela *Saccharomyces cerevisiae* em todos os tempos analisados quando comparada ao crescimento das não-*Saccharomyces*. A *H. opuntiae* foi a levedura não-*Saccharomyces* que não declinou o valor de matéria seca celular no final das 168 horas de fermentação. Os parâmetros físico-químico como: teor alcoólico, açúcares residuais, densidade, acidez total e volátil foram avaliados e todas as amostras analisadas estavam de acordo com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira. A técnica de extração líquido-líquido e o uso do cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC) permitiu a detecção de 24 compostos de aroma nas amostras fermentadas, sendo que a conduzida pela coinoculação da *H. opuntiae/S. cerevisiae* apresentou níveis mais elevados de acetato de etila, octanoato e decanoato de etila, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-butanol que contribuem positivamente para a qualidade aromática geral do mosto e concentrações menores de ácidos isobutírico, butírico e octanóico que contribuem negativamente. Os testes sensoriais com o mosto fermentado pela *H. opuntiae* apresentou as maiores médias de aceitação em 72, 96 e 120 horas (6,74, 6,78 e 7,30, respectivamente), entretanto, não diferiu estatisticamente das médias obtidas nas fermentações conduzidas em combinação com a *S. cerevisiae* nos períodos de 96 horas (6,90) e 120 horas (7,22). Em relação à intenção de compra, o mosto fermentado pela *H. opuntiae* e a coinoculação da *H. opuntiae/S. cerevisiae* apresentaram os maiores percentuais, correspondendo à soma dos conceitos de "certamente compraria" e "provavelmente compraria", com valores de 76% e 70%, respectivamente, em 120 horas de fermentação. Leveduras não-*Saccharomyces* como as do gênero *Hanseniaspora* spp. demonstrou potencial de utilização para produção de vinhos de qualidade que possivelmente agradará ao mercado consumidor.

**Palavras-chave:** compostos voláteis, fermentação, *Hanseniaspora* spp., não-*Saccharomyces*, testes afetivos sensoriais.

## ABSTRACT

The São Francisco Submid Valley has excelled in recent years as a promising region for the production of quality wines. The non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts participate in fermentation of the grape must and the identification microbiota is quite relevant, because non-*Saccharomyces* species may be used in mixed fermentations to increase the complexity of the wine. Many researches has been conducted to explore the potential of these yeasts in their contribution in formation of aroma and flavor of wine, may give rise a distinguished product with regional specific characteristics. Within these aspects, the aim of this study was to identify the microbiota of the grapes, investigate the production of volatile compounds of aroma, as well as evaluate physical-chemical and sensory the final characteristics of must fermented by yeasts that compose the natural ecosystem of grapes from the São Francisco Submid Valley/BA, seeking the possibility of using these in biotechnological processes and wine production. The non-*Saccharomyces* yeasts were identified by molecular biology, by sequencing the D1/D2 region of 26S subunit of the *rRNA*, in *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia terricola* and *Cryptococcus flavescens*. The *Saccharomyces cerevisiae* var. bayanus (commercial) was used as control of the fermentative process. These yeasts were utilized for the realization of fermentation in laboratory scale in Chenin Blanc grape must to study the growth kinetics, physical-chemical parameters, volatile composition and sensory evaluation. The growth kinetics study of yeast conducted by the determination the dry matter cell resulted in a higher concentration in the fermentation conducted by *Saccharomyces cerevisiae* at all times analyzed compared to the growth of non-*Saccharomyces*. The *H. opuntiae* was non-*Saccharomyces* yeast whose value dry matter cell does not detract from the end of the 168 hours of fermentation. The physical-chemical parameters such as alcohol content, residual sugars, density, total and volatile acidity were evaluated and all samples were analyzed according to the identity and quality standards established by Brazilian legislation. The technique of liquid-liquid extraction and gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID) allowed the detection of 24 aroma compounds in the fermented samples, wherein the conducted by the co-inoculation *H. opuntiae*/*S. cerevisiae* showed higher levels of ethyl acetate, octanoate and decanoate ethyl, 2-methyl-1-propanol and 3-methyl-1-butanol that contribute positively to the general aromatic quality of the must, and lower concentrations of isobutyric, butyric and octanoic acid that contribute negatively. The sensory tests with fermented must by *H. opuntiae* presented higher acceptance means in 72, 96 and 120 hours (6.74, 6.78 and 7.30, respectively), however, was no statistical difference from the means obtained in fermentation conducted by combination with *S. cerevisiae* in periods of 96 hours (6.90) and 120 hours (7.22). In relation to purchasing intention, the must fermented by *H. opuntiae* and the co-inoculation of *H. opuntiae* / *S. cerevisiae* showed higher percentages, corresponding to the sum of the concept "definitely would buy" and "probably would buy", with values of 76% and 70%, respectively, at 120 hours of fermentation. Yeast non-*Saccharomyces* such as the genus *Hanseniaspora* spp. demonstrated potential of using for the production of quality wines that possibly will please the consumer market.

**Keywords:** volatile compounds, fermentation; *Hanseniaspora* spp., non-*Saccharomyces*, affective sensory tests.

## INTRODUÇÃO GERAL

O vinho é uma bebida alcoólica resultante da fermentação do mosto de uva por leveduras vínicas. A sua história tem mais de 8000 anos, considerando-se o seu processo de produção como um dos mais antigos processos biotecnológicos no mundo (PRETORIUS, 2000; THIS et al., 2006). Em 1866, Pasteur demonstrou que as leveduras vínicas eram responsáveis pela transformação dos açúcares do mosto em etanol e desde então muitos estudos foram desenvolvidos a respeito destas leveduras.

Dessa forma, foi possível descobrir que as fermentações alcoólicas realizadas espontaneamente não são devidas à ação de uma única levedura e sim que se trata do resultado da ação combinada de diversas espécies de leveduras que crescem em diferentes proporções ao longo de uma fermentação.

A fermentação alcoólica é referida como “natural”, “nativa” ou fermentação espontânea quando leveduras naturalmente presentes na casca das uvas ou sobre as superfícies dos maquinários iniciam a fermentação. Tipicamente, espécies não-*Saccharomyces* como *Candida*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, e *Hanseniaspora* se desenvolvem durante este estágio da fermentação alcoólica, porém sua viabilidade declina devido à falta de oxigênio e aumento dos níveis de etanol, sendo considerada de importância secundária para o processo (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2006).

Dentre as espécies de leveduras que podem ser encontradas em uma fermentação alcoólica, percebeu-se que a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais apta a consumir todos os açúcares fermentáveis e, portanto, assegurar o processo (ANTUNOVICS et al., 2005). Contudo, durante os últimos 25 anos, grandes avanços têm ocorrido para a melhor compreensão da ecologia, bioquímica, fisiologia e biologia molecular das leveduras envolvidas na produção de vinho, revelando o quanto estas leveduras afetam o vinho em relação as suas propriedades químicas, sensoriais e atrativas para o produto final (PRETORIUS, 2000; FLEET, 2003, 2008; SWIEGERS et al., 2005; KING et al., 2010).

Atualmente, as leveduras descobertas como responsáveis pela fermentação têm sido muito mais complexas do que o domínio assumido da inoculação das estirpes *S. cerevisiae*, e o impacto do metabolismo das leveduras nas características do vinho é muito mais diversificada do que uma simples fermentação de açúcares do suco de uvas (FLEET, 2008). Com este maior conhecimento, a fermentação alcoólica agora é vista como um processo chave em que os enólogos podem alterar criativamente o caráter do vinho melhorando estrategicamente a qualidade e as características dos vinhos sob medida para

as mudanças do mercado. Muitos estudos em várias regiões vinícolas do mundo já confirmaram a importante contribuição das espécies não-*Saccharomyces* na cinética de crescimento das leveduras durante a fermentação espontânea (JOLLY et al., 2003; MOREIRA et al., 2005; NISIOTOU et al., 2007; FLEET, 2008; ZOTT et al., 2008). Sendo assim, o impacto da levedura não-*Saccharomyces* nas fermentações não pode ser ignorado.

Em alguns casos, as cepas de *S. cerevisiae* inoculadas como culturas iniciadoras da fermentação não puderam competir com o mesmo sucesso das estirpes nativas e, portanto, não dominam a fermentação conforme o esperado (GUTIERREZ et al., 1999; GANGA; MARTINEZ, 2004; SANTAMARIA et al., 2005).

Apesar da existência de leveduras comerciais para a realização de fermentações, muitos produtores têm utilizado culturas puras de leveduras isoladas de seu próprio vinho como cultivos iniciadores, garantindo assim, a qualidade e reprodutibilidade das características dos vinhos. Estas culturas, na forma de leveduras secas ativas, são fornecidas aos produtores e inoculadas no mosto a fim de conduzir a fermentação e o vinho produzido terá, em sucessivas vindimas, as propriedades sensoriais típicas daquela região (GONZÁLEZ-PEREZ, et al., 1993). Além disso, estas leveduras específicas de uma área, totalmente adaptadas às condições climáticas da região e à matéria-prima, serão parcialmente responsáveis, pelas características únicas do vinho a ser obtido (KING et al., 2008). Dessa forma, a seleção da levedura adequada para cada tipo de fermentação é uma estratégia importante para garantir uma fermentação uniforme, além de poder evitar alterações químicas e microbiológicas durante a etapa fermentativa, assim melhora-se as características finais do vinho e tornando-o mais competitivo no mercado.

A região do Vale Submédio São Francisco - Brasil vem se destacando na produção de vinhos finos utilizando uvas *Vitis viníferas* L. de qualidade em qualquer época do ano (PEREIRA et al., 2011). Estratégias adotadas conjuntamente permitiram superar as condições climáticas adversas, favorecendo a produção de uvas e vinhos de qualidade.

Na fermentação vínica, os principais açúcares presentes no mosto, glicose e frutose, são fermentados levando à produção de etanol e gás carbônico, assim como outros metabólitos de menor importância (BERTHELIS, 2004). As análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos mostos de uvas e vinhos são fundamentais para controle de qualidade enológica, uma vez detectado algum problema é possível intervir no processo para efetuar as correções pertinentes. Os enólogos orientam-se por essas análises na vinificação, definindo assim as operações técnicas a serem realizadas na produção do vinho.

Da mesma forma, as modernas pesquisas científicas realizadas têm possibilitado uma maior compreensão da fisiologia e bioquímica das leveduras vínicas e assim possibilitando a seleção e desenvolvimento de cepas que definem influências específicas sobre o processo de eficiência e qualidade do vinho.

Dentro desses aspectos, esse trabalho objetiva investigar a produção de compostos voláteis de aroma, assim como avaliar físico-química e sensorialmente as características finais do mosto fermentado por leveduras que compõem o ecossistema natural de uvas obtidas da região do Vale do Submédio São Francisco/BA, visando à possibilidade da utilização destas em processos biotecnológicos e produção de vinho.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Investigar a produção de compostos voláteis de aroma, assim como avaliar físico-química e sensorialmente as características finais do mosto fermentado por leveduras que compõem o ecossistema natural de uvas obtidas da região do Vale do Submédio São Francisco/BA, visando à possibilidade da utilização destas em processos biotecnológicos e produção de vinho.

### **Objetivos específicos**

- Determinar valores de pH, grau alcoólico real, densidade relativa a 20°C/20°C, acidez total ou titulável, acidez volátil e açúcar residual do mosto Chenin Blanc em diferentes tipos de fermentação;

- Investigar os compostos voláteis de aroma produzidos pelas leveduras não-*Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica do mosto de uvas Chenin Blanc sob temperaturas de 15°C;

- Avaliar o potencial de formação de aroma do mosto fermentado por meio de testes sensoriais de aceitação e intenção de compra.

# CAPÍTULO I

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. VITIVINICULTURA NO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO

O Vale do Submédio São Francisco é considerado uma das novas regiões vitivinícolas brasileiras produtoras de vinhos finos. Localizada entre os paralelos 8 - 9º de latitude sul e altitude ao redor de 350 m, a área de produção é caracterizada como uma região de clima tropical semiárido, com média anual de 26 °C, altos índices de insolação e quantidade abundante de água para o processo de irrigação. O clima tropical característico da região é também conhecido como clima de variabilidade intra-anual e essa variabilidade climática possibilita a produção de uvas com qualidades específicas e diferenciadas, além de assegurar um desenvolvimento contínuo e produção ao longo do ano, sendo possível que uma planta de videira produza de duas a três safras por ano, dependendo do ciclo de cada cultivar (TONIETTO; TEIXEIRA, 2004; PEREIRA; BASSOI, 2008; IBRAVIN, 2010; PEREIRA et al., 2011).

A Região do Vale do Submédio São Francisco é composta pelos municípios de Lagoa Grande, Santa Maria de Boa Vista, Santo Antônio, Petrolina, Casa Nova e Juazeiro, abrangendo os Estados de Pernambuco e Bahia (Figura 1). Nos municípios de Lagoa Grande, Santa Maria da Boa Vista e Casa Nova, a vitivinicultura detém 15% do mercado de vinhos finos brasileiros, perdendo apenas para o Estado do Rio Grande do Sul em quantidade de produção (ARRUDA, 2011).

No ano de 2009, a produção de vinhos na região do Vale do Submédio São Francisco foi estimada em sete milhões Litro/ano, em uma área de 700 hectares, sendo destes 60% espumantes, 35% tinto e 5% branco (PEREIRA; BASSOI, 2008). Estima-se que a cultura da videira nessa região seja responsável por mais de 72 mil empregos/ano, considerando a média de dois empregos diretos gerados por hectare no campo e quatro empregos indiretos decorrentes da dinâmica dos serviços dessa atividade (SILVA; COELHO, 2010). Dessa forma, a cultura da videira é de fundamental importância social e econômica para toda a região, uma vez que envolve um considerável volume anual de negócios voltados para o mercado interno e externo, apresentando também maior geração de empregos diretos e indiretos.



**Figura 1.** Localização dos municípios da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco nos Estados de Pernambuco e Bahia.  
Fonte: <http://www.sitedovinhobrasileiro.com.br>

A matéria-prima da indústria vinícola é a uva, a partir da qual se elabora o mosto para a produção de vinho. Existe grande variedade de espécies de videiras cultiváveis em todo o mundo, as que vêm se destacando na região do Vale Submédio São Francisco para fabricação de vinhos finos e de qualidade pertencem à casta *Vitis vinífera* L., que se adaptaram bem ao clima seco, baixa umidade relativa do ar e insolação, além de ser a variedade que produz os melhores vinhos.

As principais variedades utilizadas para a produção de vinhos tintos na região do Vale do Submédio São Francisco são Syrah, Tempranillo, Touriga nacional, Cabernet sauvignon, Alicante bouschet, Ruby cabernet e Petit verdot, sendo que Syrah representa cerca de 65% dos vinhos tintos. No caso dos brancos, as uvas utilizadas são Chenin Blanc, Sauvignon Blanc, Moscato canelli e Viognier, sendo que a primeira representa cerca de 60% dos vinhos brancos tranquilos (CAMARGO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011).

Segundo Tonietto e Pereira (2012), a vitivinicultura desenvolvida na região possui características típicas, que influenciam fortemente as características qualitativas dos vinhos denominados tropicais, distinguindo-os daqueles elaborados em regiões temperadas, tradicionais, em diversos países do mundo.

## 2. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO DE UVA

Diversas variáveis como matéria-prima, fatores ambientais e principalmente o processo fermentativo influenciam diretamente nas características físico-químicas finais dos vinhos. Em geral, as pesquisas que buscam avaliar a composição físico-química de vinhos e mostos brasileiros são baseadas nas análises exigidas pela legislação vigente e relacionadas ao Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da bebida estabelecidos pela Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1988). As análises físico-químicas representam um importante suporte para o acompanhamento da vinificação na elaboração de vinhos de qualidade.

A composição do mosto de uva, a exemplo do teor de dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), nitrogênio e teor de sólidos totais ( $^{\circ}\text{Brix}$ ), assim como a acidez, tipos de leveduras e pH influenciam a fermentação alcoólica (JACKSON, 2008). O  $\text{SO}_2$ , favorece a inibição de microrganismos deteriorantes e oxidação dos compostos fenólicos, além da redução do pH (RIBÉREUA-GAYON, 2006). Portanto, além de ser um constituinte normal do vinho como resultado da fermentação por leveduras, o  $\text{SO}_2$  é frequentemente adicionado como agente antimicrobiano e antioxidante para sua conservação. A faixa de  $\text{SO}_2$  adequada é de 50-100mg/L dependendo da sanidade da fruta e da temperatura de maceração (JACKSON, 2008).

O  $^{\circ}\text{Brix}$  (sólidos totais) é um indicador bastante preciso do teor de açúcar no mosto e representa a capacidade deste para sustentar a produção de álcool pelas leveduras (JACKSON, 2008). O  $^{\circ}\text{Brix}$  das uvas destinadas à elaboração de vinhos tintos, brancos e espumantes devem apresentar valores entre 18 a 22°, 18 a 20° e 17 a 18° respectivamente, podendo variar a depender do estilo do vinho (MANDELLI; ZANUS, 2009).

Os fatores relacionados à acidez do vinho têm participação importante nas características sensoriais e na estabilidade físico-química e biológica do vinho. A acidez do vinho é diretamente relacionada à composição do mosto, especialmente, sua acidez, concentração de potássio e cálcio e predominância do ácido tartárico em relação ao málico (GABAS et al., 1994). A medida da acidez total é definida como a concentração dos ácidos orgânicos como tartárico, málico, cítrico e acético e dos ácidos succínico, láctico e outros em menor concentração na uva ou vinho. Sendo o ácido tartárico o principal ácido no mosto e no vinho, a acidez total é normalmente expressa em g/L em ácido tartárico.

Segundo Ribéreu-Gayon et al., (2006) o limite ideal para valores de acidez total é de 55 a 130 meq/L. No mosto e no vinho, o conhecimento da acidez total permite prever as

possíveis correções (acidificação e desacidificação), favorecer ou impedir a fermentação malolática e detectar alterações microbianas.

Com relação ao pH, a maior estabilidade ocorre em vinhos com níveis entre 3,2–3,6, baixo teor de potássio e cálcio, presença de taninos complexos, combinados a nanoproteínas, e condições de baixa oxigenação em meio de leve redução (RIBÉREAU-GAYOU et al., 2003). Outra faixa de pH, entre 2,8 a 4,4, de acordo com Jackson (2008) é considerada adequada para produção de vinho por restringir e selecionar os microrganismos presentes nos mostos e estabilizar o produto final. O pH alto durante o processo fermentativo torna a capacidade do dióxido de enxofre menos inibitória para as leveduras indígenas. O pH pode ser reduzido a 3,25–3,35 pela adição de ácido tartárico (BAMFORTH, 2005).

Quanto ao nitrogênio, constitui um importante nutriente limitante do crescimento das leveduras e do desempenho da fermentação. Normalmente os mostos de uvas são considerados deficientes em nitrogênio sendo que o valor mínimo requerido para elaboração do vinho é de 140 a 150mg N/L (FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

A determinação da densidade relativa, através da qual é realizado o acompanhamento da fermentação, é uma das técnicas usuais de análise em um laboratório de enologia. Trata-se da relação expressa em quatro casas decimais, da massa volumétrica ( $\text{g/cm}^3$ ) do mosto a 20 °C com a massa volumétrica da água a mesma temperatura. A densidade varia em função do extrato seco, grau alcoólico e teor de açúcar. Sendo a glicose mais pesada que o etanol, o enólogo pode seguir o processo de uma fermentação pela medida da densidade do mosto. A densidade do mosto diminui progressivamente até entre 0,992 e 0,998, ou seja, a glicose está sendo consumida e conseqüentemente o álcool produzido (ÁVILA, 2002).

O fator temperatura tem grande importância na atividade de todas as leveduras, afetando o crescimento e conseqüentemente o curso da fermentação. Normalmente, a temperatura ótima para a vinificação resulta da relação entre uma temperatura suficiente para obter uma fermentação rápida e não excessivamente elevada para não inibir a multiplicação de leveduras. Para isso, consideram-se temperaturas entre 10 e 20°C como ideais para o melhor funcionamento das leveduras no caso de vinhos brancos, acarretando em uma maior esterificação e liberação de produtos aromáticos (ÁVILA, 2002).

A graduação alcoólica representa a porcentagem em volume de álcool no vinho. Segundo a legislação brasileira, vinho fino apresenta teor alcoólico de 8,6% a 14% em volume, elaborado mediante processos tecnológicos adequados que assegurem a

otimização de suas características sensoriais e exclusivamente de variedades *Vitis vinífera* L. do grupo Nobre, a serem definidas em regulamento (BRASIL, 2004).

Jolly, Augustyn e Pretorius (2003) avaliaram os parâmetros físico-químicos de mosto Chardonnay elaborados experimentalmente com levedura não-*Saccharomyces* (*Kloeckera apiculata*) individualmente e em combinação com a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e obtiveram os seguintes valores médios: 0,89 g/L e 0,18 g/L para acidez volátil; 5,4 %v/v e 12,5 %v/v referente ao teor alcoólico; 135,0 g/L e 1,9 g/L de açúcar residual, 23 mg/L e 27 mg/L do SO<sub>2</sub> total. Todos os resultados citados referem-se, respectivamente, ao mosto Chardonnay fermentado pela levedura *K. apiculata* isoladamente e em combinação com a *S. cerevisiae*.

Os teores de açúcares são provenientes dos açúcares da uva que não sofreram a fermentação do vinho (ZOECKLEIN et al., 1995). O valor elevado do açúcar residual observado no mosto fermentado apenas com a levedura *K. apiculata* indica que a mesma não conseguiu completar a fermentação no prazo estabelecido (14 dias), concordando com o resultado obtido na produção de etanol. Essa levedura geralmente produz altos valores de acidez volátil, podendo refletir negativamente sobre a composição química e, por conseguinte, a qualidade de vinho. A acidez volátil permite inferir sobre a sanidade dos vinhos; portanto, vinhos vinificados corretamente, nos quais foram acrescentados dióxido de enxofre, apresentam baixa acidez volátil (GIL et al., 1996).

García et al. (2010) analisaram o efeito do uso de cultivos mistos de levedura não-*Saccharomyces* (*Candida membranifaciens*) e *Saccharomyces cerevisiae* nas características físico-química e sensoriais do vinho Chardonnay. A *S. cerevisiae* foi utilizada como controle nesse estudo. O vinho produzido por cultivos mistos obtiveram menor acidez volátil (0,13 g/L) e menor produção de etanol (12,6 % v/v) comparado ao controle (0,17 g/L e 15,6 % v/v). Com relação à diminuição da concentração de etanol na cultura mista, pode ter ocorrido uma competição antagônica entre os microrganismos inoculados que fez a produção deste metabólito menos eficiente. Contudo, os resultados desse estudo referentes a composição dos compostos aromáticos (ésteres e propanol) em mosto fermentado com culturas mistas influenciaram positivamente nas qualidades sensoriais dos vinhos elaborados, segundo o julgamento de um painel de enólogos. Sendo assim, o uso de culturas mistas de leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* pode ser uma estratégia eficiente para a obtenção de vinhos típicos usando os microrganismos nativos de cada área de vinificação.

As análises físico-químicas dos mostos de uvas e vinhos é sem dúvida um dos aspectos mais importantes do moderno controle de qualidade enológica. Os enólogos orientam-se pelas análises químicas, microbiológicas e sensoriais na vinificação, definindo assim as operações técnicas a serem realizadas na produção do vinho.

### 3. PROCESSO FERMENTATIVO

A fermentação de mostos vínicos é um processo altamente complexo e dinâmico que engloba diversas fases e são caracterizadas por condições fisiológicas distintas que alteram a composição das comunidades microbianas fermentativas. As leveduras situam-se especificamente na superfície das uvas não danificadas e o sucesso da sua sobrevivência e aptidão para iniciar o processo fermentativo depende em grande parte da interação de todos os fatores bióticos e abióticos a que estão sujeitas (CAPPELLO et al., 2004).

O processo de fermentação pode ser conduzido por leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Entre as espécies de maior importância fermentativa destacam-se as leveduras do grupo *Saccharomyces*, mais especificamente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que é amplamente estudada devido ao seu grande poder fermentativo e maior tolerância ao etanol produzido durante a fermentação (ANTUNOVICS et al., 2005).

Quanto a localização, as leveduras do gênero *Saccharomyces* são encontradas mais abundantemente nas cubas de fermentação, fazendo parte da flora residual das adegas, entretanto, são mais raras na película das uvas onde predominam as leveduras não-*Saccharomyces*, apiculadas (LE JEUNE et al., 2006), como as do gênero *Hanseniaspora*, que pode constituir até 50% da microflora vínica, sendo a restante da população composta por leveduras pertencente aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metchnikowia*, *Pichia* e *Rhodotorula* (FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

O emprego de leveduras não-*Saccharomyces* de morfologia apiculadas, tornou objeto de interesse para muitos pesquisadores, particularmente porque são espécies frequentemente identificadas em uvas nas fases iniciais da fermentação (FLEET et al., 2003) e são metabolicamente ativas demonstrando contribuição efetiva para o aroma e impacto na qualidade do vinho (ROMANO et al. 2003; JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2006). Em estudo realizado por Rossouw, Naes e Bauer (2008) foi possível constatar que apesar de se ter observado aumento constante na concentração dos

compostos aromáticos durante fermentação em mosto sintético, o período em que ocorreu a maior acumulação dos compostos aromáticos foi no início da fermentação.

O crescimento da população de leveduras em mosto de uva fermentado segue padrão típico de cultivo em laboratório, sendo caracterizado pelas fases de adaptação (latência ou *lag*), exponencial (*log*), estacionária e de declínio celular. A fase de adaptação representa o período em que as células de leveduras inoculadas no mosto se ajustam a um novo ambiente. Pode-se observar no final da fase de latência um discreto aumento da população (DEL NOBILE et al., 2003).

Após a adaptação das leveduras às condições ambientais, tem início à fase de desenvolvimento celular, conhecida como fase exponencial ou logarítmica (fase *log*), nesta fase ocorre formação da população máxima de leveduras. Durante esse período, as leveduras têm necessidade de oxigênio para se multiplicar. Esta necessidade de oxigênio é de certa forma indireta, uma vez que as leveduras necessitam de oxigênio para sintetizar os esteróis e assimilar os ácidos graxos de cadeia longa, que são fundamentais para assegurar a permeabilidade das membranas. Estudos mostram que células de leveduras mais ricas em esteróis mantêm por mais tempo sua atividade fermentativa e ao fim da fermentação degrada uma maior quantidade de açúcares (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). Na fase exponencial ocorre a produção máxima de etanol e pode durar de 3 a 6 dias. Depois deste período cessa o crescimento das leveduras, devido à escassez de alguns nutrientes (HORSEY, 2007).

Com relação à fase estacionária que dura de 2 a 10 dias, a população de leveduras se mantém estável. Após este período inicia-se a fase de declínio celular e esta população decresce gradativamente devido à falta de nutrientes, efeito tóxico do etanol, bem como síntese de outras substâncias oriundas do processo fermentativo que são tóxicas para as leveduras (DEL NOBILE et al., 2003).

O papel das leveduras na fermentação consiste na degradação dos açúcares presentes nas uvas (hexoses) em etanol e dióxido de carbono como metabólitos principais e outros compostos organolépticos secundários que conferem aromas e sabores diferenciados aos vinhos. Já as bactérias irão desempenhar também funções metabólicas relevantes durante a fermentação designada como malolática (FLEET et al., 2003).

Na fermentação malolática, também conhecida como fermentação secundária participam geralmente espécies do gênero *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, mais conhecidas como bactérias de ácido láctico (LAB), e *Acetobacter*. Dentre estes gêneros, destaca-se a espécie *Oenococcus oeni* devido a sua maior tolerância a pH baixo e pela

síntese de metabólitos secundários que conferem paladares distintos aos vinhos (LIU, 2001).

A via catabólica principal de degradação as hexoses e comum a todas as leveduras é a glicólise ou Via Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 2) que pode ser definida como um conjunto de reações enzimáticas que conduzem à oxidação de uma molécula de glicose e sua conversão em duas moléculas de ácido pirúvico. Estas, por sua vez, podem ter três destinos metabólicos distintos: carboxilado, com produção de oxaloacetato que, por sua vez, entra no Ciclo de Krebs; transportado para a mitocôndria e ser oxidado a acetil-CoA que segue para o Ciclo de Krebs e descarboxilado pela piruvato-decarboxilase e convertido em acetaldeído.

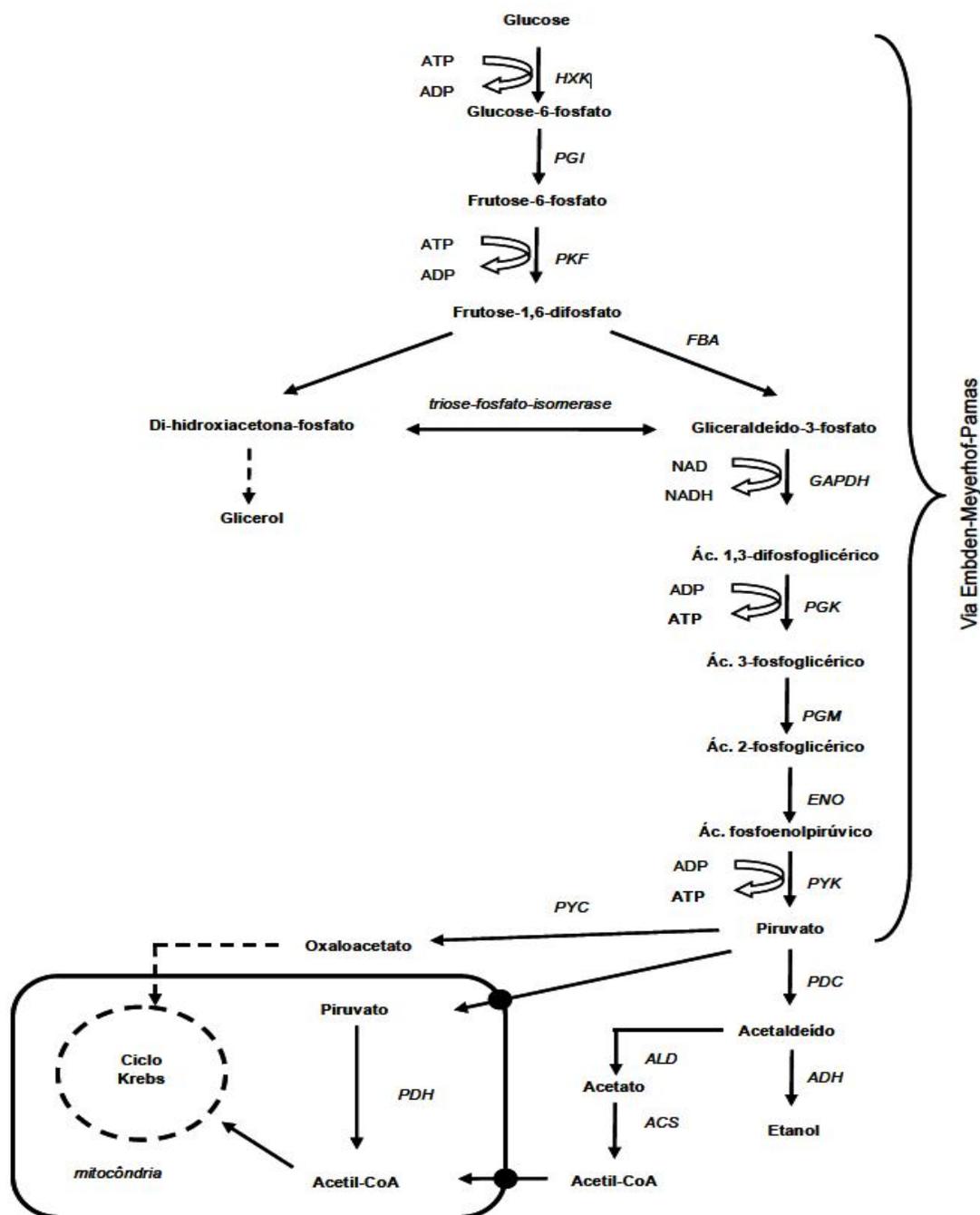
Quando formado, o acetaldeído poderá ser reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase ou oxidado ao acetato pela enzima aldeído-desidrogenase.

O glicerol é o terceiro composto produzido em maiores quantidades durante a fermentação alcoólica. Como o glicerol não é um composto volátil sua formação não reflete no aroma, no entanto, participa em vários atributos sensoriais importantes, como doçura, suavidade e “corpo” do vinho (PIZARRO et al., 2007).

As leveduras podem ser classificadas como obrigatoriamente aeróbias, quando são incapazes de utilizar glicose na ausência de oxigênio ou anaeróbias facultativas, que são aquelas capazes de metabolizar glicose em condições de anaerobiose ou baixo teor de oxigênio. A maioria das leveduras fermentativas são anaeróbias facultativas, a *S. cerevisiae* é um exemplo clássico deste tipo de levedura e a sua capacidade em fermentar açúcares é absolutamente vital para o seu crescimento em condições anaeróbias (SNOEK; STEENSMA, 2007).

Outro fator que contribui para que fermentação se realize em condições de anaerobiose é o efeito de Pasteur, que corresponde à inibição da fermentação da glicose na presença de oxigênio. Como a fermentação não consegue competir eficientemente com a respiração em termos de rendimento energético, ocorre uma conseqüente diminuição da taxa de fermentação sob condições aeróbias (WEUSTHUIS, 1994).

Resumidamente o metabolismo dos açúcares em leveduras distingue-se pelo destino do piruvato. Na via fermentativa o piruvato é convertido, essencialmente, em etanol e CO<sub>2</sub>, a chamada fermentação alcoólica. Na via respiratória o piruvato é metabolizado através do Ciclo de Krebs e há uma oxidação completa da glicose em CO<sub>2</sub> e água.



**Figura 2.** Metabolismo da glicose em leveduras. Enzimas abreviadas: *HXK*, Hexocinase; *PGI*, Fosfoglicose isomerase; *PKF*, Fosfofrutocinase; *FBA*, Frutose-fosfo-aldolase; *GAPDH*, Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase; *PGK*, 3-fosfoglicerato-cinase; *PGM*, fosfoglicerato-mutase; *ENO*, enolase; *PYK*, piruvatocinase; *PDC*, Piruvato-descarboxilase; *ADH*, Álcool-desidrogenase; *PDH*, piruvatodesidrogenase; *ACS*, acetil-coenzima A-sintetase; *ALD*, acetaldeído-desidrogenase; *PYC*, pirivatocarboxilase (STRYER, 2000).

A fermentação do vinho é um processo ecológico e bioquímico complexo que envolve uma multiplicidade de fatores de estresses que, de uma forma sinérgica, promovem o desenvolvimento sequencial de diferentes espécies de leveduras (BAUER; PRETORIUS, 2000).

O mosto constitui a primeira situação de estresse tanto pela elevada concentração de açúcares presentes (elevada pressão osmótica), quanto pela presença de compostos antimicrobianos (SO<sub>2</sub> e resíduos de pesticidas) e microrganismos competidores (presença de fatores *killer* e de moléculas *quorum-sensing* e influência da densidade espacial) (YAP et al., 2000; FLEET, 2003; NISSEN et al., 2003; HOGAN, 2006; PEREZ-NEVADO et al., 2006). No decorrer da fermentação a concentração de oxigênio dissolvido, o acúmulo de etanol e a temperatura também afetam diretamente a cinética de crescimento da levedura durante a fermentação do vinho (BISSON, 1999; FLEET, 2003; ZOTT et al., 2008), porém mais pesquisas são necessárias para melhor compreender a diversidade e mecanismos de tais reações.

Com relação aos tipos de fermentação existem duas opções para a produção de vinhos, de forma espontânea ou fermentação natural; e através da inoculação de leveduras comerciais (*dry yeasts*), a fim de iniciar o processo fermentativo.

As fermentações espontâneas são aquelas produzidas de maneira natural, ou seja, realizadas pelas leveduras provenientes das cascas das uvas, sem nenhum tipo de inoculação externa. Isto faz com que as fermentações espontâneas não sejam produto da ação de uma única espécie de levedura, e sim uma sucessão de espécies diferentes ao longo da fermentação (TORIJA, 2001). Algumas das principais espécies envolvidas incluem os gêneros *Dekkera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2006).

A principal vantagem desse tipo de fermentação é a possibilidade de originar vinhos de alta qualidade com um caráter regional único, fornecendo diferenciação e acrescentando importante valor comercial em um mercado altamente competitivo. Contudo, traz como consequência negativa uma menor previsibilidade do processo, lentidão nos processos fermentativos e inconsistências na qualidade do vinho (FLEET, 2008). Assim, a inoculação de cepas pré-selecionadas de levedura, em geral de *S. cerevisiae*, é um meio amplamente utilizado para controlar a fermentação primária.

No passado, a maioria das fermentações ocorriam espontaneamente. Atualmente, o uso de culturas de levedura comerciais é considerada por alguns enólogos uma rentável

escolha, reduzindo consideravelmente as chances de desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e de aromas indesejados (STYGER et al., 2011).

No mercado há cerca de 200 culturas de levedura comerciais disponíveis e essas cepas diferem quanto a cinética de fermentação, bem como na sua capacidade de produzir perfis de aroma (SABLAYROLLES et al., 2009).

O uso de culturas puras de leveduras de origem comercial, em contraste à fermentação espontânea, oferecem as vantagens de um processo mais previsível e rápido, dando vinhos com maior consistência na qualidade (MARO et al., 2007). Eles são bem adequados para produção em massa para o mercado de vinhos, e sua aceitação pelo indústria tem sido reforçada pela disponibilidade comercial de concentrados secos de cepas de leveduras selecionadas, que pode ser convenientemente tratadas para inoculação em mosto de uva (MANZANO et al., 2006).

Iniciativas como essas, têm agora uma maior chance de um resultado bem sucedido devido à compreensão mais clara da ecologia da levedura de fermentação de vinho, e como estas características podem ser geridas de acordo com as condições práticas de cada vinícola.

#### **4. USO DE CULTURAS MISTAS DE LEVEDURAS NA FERMENTAÇÃO**

A fermentação a partir de culturas mistas consiste na inoculação simultânea de uma mistura de culturas microbianas distintas para realizar a fermentação do vinho. Pode envolver a utilização de múltiplas leveduras, múltiplas bactérias ou leveduras e bactérias em conjunto. Para o propósito desta revisão, a fermentação a partir de culturas mistas refere-se à utilização de múltiplas cepas de leveduras que podem conduzir a fermentação em vinhos.

Do ponto de vista econômico, o uso de culturas mistas em fermentações é bastante acessível, uma vez que podem ser utilizadas culturas de leveduras nativas, pré-selecionadas, oriundas de cada região. Além disso, são comercialmente atraentes já que não há impedimentos de desenvolvimento e validação. Sendo assim, inoculações desse tipo podem ser usadas de forma a manipular a composição volátil e perfis sensoriais dos vinhos deixando-os mais agradáveis e consequentemente atendendo as preferências dos consumidores (KING et al., 2008).

Alguns importantes estudos investigaram o uso de culturas mistas de leveduras não-*Saccharomyces* com *S. cerevisiae*, em comparações com inoculações isoladas

(monoculturas) das respectivas leveduras (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2003; MOREIRA et al., 2005, 2008; FLEET, 2008; CIANI et al., 2010; ZOTT et al., 2011; MATURANO et al., 2012). Esta técnica tem como principal vantagem controlar a fermentação primária com a *S. cerevisiae*, enquanto o aroma do vinho pode ser modificado utilizando leveduras não-*Saccharomyces*. Anfang et al. (2009) demonstraram que o uso de leveduras não-*Saccharomyces* em conjunto com a *S. cerevisiae* na fermentação resultou em maiores níveis de compostos tióis voláteis em vinhos Sauvignon Blanc.

Estudos realizados por Moreira et al. (2005) empregando cultivos puros e mistos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum* na fermentação em meio de cultura simples, determinaram que a cinética do crescimento das leveduras apiculadas foi positiva, com isso esses autores sugerem a utilização de culturas mistas de leveduras na fermentação do mosto de uva combinado com a tecnologia para produção de vinho com características aromáticas diferenciadas.

Algumas dessas espécies não-*Saccharomyces* são limitadas na sua capacidade de fermentar totalmente os açúcares do mosto de uva e em sua capacidade de produzir concentrações suficientes de etanol, além disso, algumas podem crescer muito lentamente em comparação com outras leveduras indígenas, e não estabelecer-se (FLEET, 2008). No entanto, elas têm outras propriedades de relevância enológica que vale a pena explorar, como por exemplo, algumas espécies dos gêneros *Hanseniaspora*/*Kloeckera* que podem produzir misturas mais atraentes de compostos voláteis e valores mais elevados de glicosidases e proteases do que as espécies *Saccharomyces* (CAPECE et al., 2005; . MENDOZA et al., 2007 ; MOREIRA et al., 2008).

Com relação ao uso conjunto de diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* em processos fermentativos, ainda há poucos estudos realizados. Favale et al. (2007) estudaram o uso de culturas mistas de leveduras *S. cerevisiae* var. *bayanus* e *S. cerevisiae* var. *uvarum* em meio sintético e determinaram que não houve diferença na composição volátil quando comparada com inoculações isoladas dessas espécies. No entanto, em estudos realizados por Grossmann et al. (1996), Howell et al. (2006) e Nikolaou et al. (2006) com a inoculação de duas diferentes variedades de *S. cerevisiae* resultaram em compostos de aroma modificados e ainda evidenciaram que havia indícios de diferenças nos perfis sensoriais.

As interações entre as cepas de leveduras em fermentações com culturas mistas pode ser a causa desses perfis químicos distintos, provocada pelo compartilhamento de metabolitos intermediários (GROSSMANN et al., 1996; HOWELL et al., 2006;

NIKOLAOU et al., 2006). A evidência para esta hipótese foi fornecida pelo trabalho de Cheraiti et al. (2005) que verificaram que o estado redox de inoculações múltiplas difere das inoculações com um único tipo de cepa, indicando que as interações entre cepas de leveduras compatíveis envolveram a difusão de metabólitos durante as fermentações mistas.

Devido às influências sobre o perfil da composição do aroma dos vinhos, as fermentações com culturas mistas de leveduras revelam um grande potencial para contribuir com a indústria enológica através do fornecimento de novos produtos, aumentando a diversidade de estilo de vinhos. Apesar da existência de alguns estudos, os mecanismos fundamentais das interações metabólicas entre as leveduras ainda permanecem desconhecidos, o que demonstra a necessidade de novas pesquisas referentes aos processos de formação desses compostos aromáticos, assim como análises que buscam determinar as propriedades sensoriais dos vinhos.

## **5. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS**

As leveduras são microrganismos integrantes do reino *Fungi* que possuem características típicas dos fungos como núcleo organizado com membrana celular, presença de parede celular rígida, aclorofilados, nutrição heterotrófica por meio de absorção de nutrientes e ausência de motilidade. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo predominantemente unicelular, realizarem reprodução assexuada por brotamento ou fissão e não formarem corpos de frutificação (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Numerosos gêneros e espécies de leveduras são encontrados durante a produção de vinho. As diferentes espécies de leveduras vnicas afetam características aromáticas e sensoriais de vinho e têm um impacto único sobre as propriedades enológicas. Segundo Fleet et al. (2002), essas leveduras que influenciam a composição do vinho e/ou da adega, podem ter sido disseminadas por insetos voadores (mosca da fruta, abelhas e vespas) ou podem provir de inoculações efetuadas a partir de preparações comerciais de levedura.

Na vinificação, é de extrema importância prática a identificação correta e a diferenciação ou tipificação dos microrganismos envolvidos nas diferentes etapas de processamento, desde a matéria-prima até o produto final, incluindo os responsáveis por processos fermentativos, os contaminantes ou os microrganismos de deterioração (INÊS, 2008). Existem vários métodos de identificação de leveduras de interesse enológico cujo

maior desafio recai na necessidade de diferenciar gêneros e espécies que taxonomicamente estão muito próximos, mas que têm propriedades muito diferentes no que se refere às suas características fermentativas e sensoriais.

Os métodos convencionais de identificação e caracterização de leveduras, são baseados em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. As características morfológicas relacionam-se com a reprodução sexuada e vegetativa, o crescimento microscópico e macroscópico. Quanto às fisiológicas incluem a fermentação de açúcares, a assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, necessidades vitamínicas, temperatura máxima de crescimento, resistência à ciclohexamida, entre outras (KURTZMAN; FELL, 1998). Contudo os métodos convencionais para a identificação das leveduras requerem uma avaliação de aproximadamente 80-100 testes, resultando num processo complexo e muito laborioso (KURTZMAN; FELL, 1998; MANZANARES; VALLÉS; VIANA, 2011).

A morosidade da metodologia clássica de identificação e até mesmo as errôneas classificações em nível de espécies, conduziu a busca por parte da indústria do vinho por técnicas moleculares para a determinação taxonômica de leveduras vínicas. Estas técnicas incluem a análise de restrição do DNA genômico e mitocondrial, cariótipo molecular com eletroforese de campo pulsado e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As metodologias que têm por base o PCR permitem diferenciar leveduras e bactérias, em diferentes níveis, que variam desde gênero a subespécie e consiste fundamentalmente na amplificação de determinados segmentos de DNA. A grande vantagem da utilização da técnica de PCR baseia-se na necessidade de uma pequena quantidade de DNA para efetuar a análise, o qual não necessita estar muito purificado. A amplificação pode ser efetuada a partir de células lisadas sem posterior extração ou purificação do DNA (CASAL; SCHULLER; PAIS, 2004).

A determinação precisa da sequência de nucleotídeos de determinadas regiões do genoma é o método mais direto de análise do DNA, a partir da qual se poderá caracterizar e identificar os organismos. Uma dessas regiões mais frequentemente estudadas é o RNA ribossômico (*rRNA*) / DNA ribossômico (*rDNA*) e a importância desta região deve-se ao fato dos ribossomos estarem presentes em todas as células, e terem uma origem evolutiva comum (RENOUF; CLAISSE; LONVAUD-FUNEL, 2007).

Os genes mais utilizados em pesquisas são os que codificam o 16S *rDNA* e 23S *rDNA* em bactérias e 18S *rDNA* e 26S *rDNA* em leveduras, pelas inúmeras cópias que

tem no genoma, tornando-os mais fáceis de isolar e próprios para a rotina laboratorial (KOLBERT; PERSING, 1999).

Dos genes citados destaca-se a sequência do gene da subunidade 26S do *r*RNA, mais especificamente os domínios D1 e D2 que engloba uma porção de cerca de 600 nucleotídeos, tem se revelado como uma poderosa ferramenta na identificação das leveduras. As inúmeras investigações realizadas nas últimas décadas evidenciaram que estas regiões exibem diferenças suficientes nas leveduras para que se possa avaliar relações intra e inter-específicas (KURTZMAN; FELL, 1998; FELL et al., 2000; FERNÁNDEZ-ESPINAR et al., 2006).

Estudos utilizando os domínios D1 e D2 do *r*RNA foram eficientes para a diferenciação e identificação de espécies de leveduras (ROSA et al., 2003, 2009; FRANCESCA et al., 2010; LI et al., 2011).

Outros métodos são utilizados para diferenciar cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, os mais modernos e comuns são as técnicas de hibridização, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) dos cromossomos e análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (FERNANDEZ-ESPINAR et al., 2011). Estas metodologias têm como vantagem a independência das técnicas de cultivo de microrganismos necessárias nos métodos clássicos. Contudo, a identificação dos microrganismos requer culturas puras, o que é dificultado pela incapacidade da maior parte das espécies não crescer nos meios de cultivo existentes (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2005).

Segundo Urso et al. (2008), a combinação de métodos tradicionais e moleculares na identificação de leveduras resulta em uma imagem completa da ecologia da levedura investigada, permitindo de forma eficaz e rápida uma melhor compreensão das relações entre as espécies de leveduras envolvidas durante o processo fermentativo.

Todas essas pesquisas realizadas têm possibilitado uma maior e melhor compreensão da fisiologia e bioquímica das leveduras vínicas e assim possibilitando a seleção e desenvolvimento de cepas que definem influências específicas sobre o processo de eficiência e qualidade do vinho.

## **6. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA E SUA DETERMINAÇÃO**

O aroma e o sabor são uma das principais características que definem as diferenças entre os estilos de vinho em todo o mundo. Inúmeros estudos tem focado na compreensão

do processo de desenvolvimento de aroma durante a maturação das uvas e vinificação (ROSSOUW, NAES, BAUER, 2008; KING et al., 2008; UGLIANO et al., 2010; MOREIRA et al., 2011; ROBINSON et al., 2014). No entanto, a compreensão plena desses processos complexos e a capacidade de controlar a produção de aroma ainda permanece bastante limitada.

Microrganismos, especificamente leveduras, desempenham um papel vital no processo de vinificação. As cepas de leveduras são reconhecidas por sua principal função de converter o açúcar em etanol e dióxido de carbono, contudo, o processo inclui um grande número de outras vias bioquímicas que resultam em centenas de metabólitos secundários que ao se converterem formam um vinho altamente aromático (PRETORIUS, 2000; SWIEGERS et al., 2005; CIANI et al., 2010). Sabe-se que os metabólitos formados durante a fermentação alcoólica pelas leveduras podem melhorar o aroma de vinhos varietais (interação sinérgica) ou mascarar (interação antagônica) aromas favoráveis (STYGER et al., 2011).

O vinho contém compostos aromáticos e cromáticos, a exemplo dos taninos, antocianinas e flavonóides que contribuem expressivamente para cor e sabor (HORSEY, 2007). Os compostos voláteis são os mais importantes na formação do sabor e aroma (FIA; GIOVANI; ROSI, 2005; HORSEY, 2007), contribuindo para a complexidade, originalidade e caráter varietal do vinho. Designa-se por aroma varietal de um vinho os compostos voláteis característicos da variedade de uva, podendo estes não ser diretamente identificados na uva (precursores de aroma), mas apenas se revelarem no decorrer da fermentação e do envelhecimento do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Os níveis de nutrientes no solo, a disponibilidade de água, as condições climáticas, a exposição ao sol e o crescimento vegetativo dos frutos são fatores que influenciam a produção dos compostos voláteis durante o desenvolvimento e maturação do bago (REYNOLDS; VANDEN HEUVEL, 2009), já os fatores aliados à fermentação que têm impacto sobre o aroma do vinho incluem, o tipo de cuba de fermentação, tipo e quantidade de levedura, temperatura de fermentação, adição de nutrientes e técnicas de remontagem (mistura) (SWIEGERS et al., 2005; KING et al., 2010).

Durante a fermentação alcoólica, além de etanol, dióxido de carbono e glicerol, são formados paralelamente compostos de sabor e aroma de diferentes classes de substâncias, tais como: ésteres, alcoóis, ácidos, aldeídos, cetonas, lactonas, terpenos, fenóis voláteis, acetais, entre outras. Nos vinhos brancos os principais constituintes voláteis tratam-se de alcoóis superiores, ácidos carboxílicos e ésteres (FLANZY, 2000).

Os alcoóis superiores contêm mais de dois átomos de carbono, peso molecular e ponto de ebulição mais alto que o etanol e são agradavelmente aromáticos. O teor total de compostos aromáticos no vinho varia de 0,8-1,2 g/L, os álcoois superiores contribuem para cerca de 50% deste intervalo, tornando quantitativamente o maior grupo de compostos (VILANOVA et al., 2010). Alguns alcoóis superiores importantes estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Alcoóis superiores, seus intervalos de concentração no vinho; descritores sensoriais (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000) e limiar de detecção do aroma, referências mostradas em letras sobrescritas.

<b>Composto aromático</b>	<b>Concentração no vinho (mg/L)</b>	<b>Limiar de detecção (mg/L)</b>	<b>Descritores</b>
<b>Butanol</b>	0,5 - 8,5	150 <sup>b</sup>	Alcoólico, frutado
<b>2-metil-propanol</b>	-	40 <sup>a</sup>	Alcoólico, frutado
<b>Hexanol</b>	0,3-12	8,0 <sup>a</sup>	Herbáceo
<b>2-metil-1-butanol</b>	15-150	75 <sup>c</sup>	Esmalte
<b>3-metil-1-butanol</b>	45-490	30 <sup>a</sup>	Esmalte
<b>Hexanol</b>	0,3-12	8,0 <sup>a</sup>	Herbáceo
<b>2-fenil-etanol</b>	10 - 180	10,0 <sup>a</sup>	Floral, rosa

<sup>a</sup>Guth (1997) em 10% p/p solução água/etanol

<sup>b</sup>Etievant (1991) em vinho branco

<sup>c</sup>Salo (1970) em 9,5% p/p solução água/etanol

A maior parte dos alcoóis superiores é liberada como produto secundário do metabolismo das leveduras, tanto pela via anabólica através da glicose como pela via catabólica a partir de aminoácidos (TAO et al., 2008).

O butanol e 2-metil-propanol são os alcoóis que se encontram em grande quantidade nos vinhos e têm descritores que contribuem para as características frutadas dos vinhos. Outro álcool majoritário é o hexanol associado ao descritor de aromas herbáceos (VILANOVA et al., 2010). Com relação aos alcoóis aromáticos presentes nos vinhos destacam-se os alcoóis benzílico e feniletílico e são responsáveis por um aroma floral e adocicado. Elevadas concentrações de álcoois superiores resultam em vinhos com aromas e sabores fortes (KING et al., 2010).

Os ácidos encontrados nos vinhos podem estar presentes nas uvas ou formados durante o processo de fermentação. O ácido acético é o mais volátil e caracteriza-se pelo

aroma de vinagre, além de estar relacionado com a acidez volátil dos vinhos. O tamanho da cadeia carbonada é o principal fator que irá conferir aromas agradáveis ou desagradáveis ao vinho. Na Tabela 2 é possível observar alguns ácidos importantes.

**Tabela 2.** Ácidos voláteis, seus intervalos de concentração no vinho; descritores sensoriais (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000) e limiar de detecção do aroma, referências mostradas em letras sobrescritas.

<b>Composto aromático</b>	<b>Concentração no vinho (mg/L)</b>	<b>Limiar de detecção (mg/L)</b>	<b>Descritores</b>
<b>Ácido propiônico</b>	Traços	20 <sup>c</sup>	Vinagre
<b>Ácido acético</b>	150 - 900	720 <sup>d</sup>	Vinagre, pungente
<b>Ácido butírico</b>	Traços	3,0 <sup>a</sup>	Pungente
<b>Ácido isobutírico</b>	Traços	2,3 <sup>b</sup>	Pungente
<b>Ácido hexanóico</b>	Traços - 37	0,42 <sup>b</sup>	Queijo, suor, rançoso
<b>Ácido isovalérico</b>	< 3	0,033 <sup>b</sup>	Queijo, rançoso
<b>Ácido Octanóico</b>	Traços - 41	0,50 <sup>b</sup>	Rançoso, pungente
<b>Ácido decanóico</b>	Traços - 54	1,0 <sup>b</sup>	Rançoso

<sup>a</sup>Guth (1997) em 10% p/p solução água/etanol

<sup>b</sup>Ferreira, Lopez e Cacho (2000) em 11% p/p vinho sintético

<sup>c</sup>Salo (1970) em 9,5% p/p solução água/etanol

<sup>d</sup>Ribéreau-Gayon et al., (2006) em vinho branco

Ácidos com pequenas cadeias carbonadas (C2 a C5) conferem aromas desagradáveis aos vinhos, como o ácido acético, aroma de vinagre e o ácido butanóico, associado a notas de ranço e a manteiga. Os ácidos graxos de cadeia média como o hexanóico, octanóico e decanóico também contribuem para o aroma do vinho (FRANCIS; NEWTON, 2005), e suas concentrações são dependentes das condições anaeróbias de crescimento, composição do mosto, levedura, temperatura de fermentação, variedade da uva e das práticas de viticultura (BARDI; COCITO; MARZONA, 1999). A principal função dos ácidos nos vinhos é manter o pH baixo, estabilizando as antocianinas e diminuindo a atividade microbiana (JACKSON, 2008).

Os ésteres são produzidos durante a fermentação, contribuindo para o aroma frutado dos vinhos (SWIEGERS et al., 2005; KING et al., 2010), são um grupo de compostos que são especialmente importantes para os vinhos brancos. Podem ser divididos em dois grupos: ésteres de acetato e ésteres etílicos, os primeiros estão normalmente presentes em maior concentração quando comparados aos etílicos e estão associados com

aromas frutados. Já os ésteres etílicos tendem a contribuir mais para aromas de maçã (SAERENS et al. 2008).

A formação dos ésteres pode ocorrer por reações químicas ou enzimáticas durante a fermentação. Estes ésteres são sintetizados pelas leveduras na presença de álcool acetil-transferase (AATases), tendo como substratos os álcoois superiores e a acetil Co-A (SWIEGERS et al., 2005; KING et al., 2010). O éster conhecido mais abundante em vinhos é o acetato de etila, com concentrações de 85 mg/L de vinho (Tabela 3).

**Tabela 3.** Ésteres, suas concentrações no vinho; descritores sensoriais (LAMBRECHTS; PRETORIUS 2000) e limiar de detecção do aroma, referências mostradas em letras sobrescritas.

<b>Composto aromático</b>	<b>Concentração no vinho (mg/L)</b>	<b>Limiar de detecção (mg/L)</b>	<b>Descritores</b>
<b>Acetato de etila</b>	85	7,5 <sup>a</sup>	Frutado
<b>Acetato de isoamila</b>	2,37	-	Frutado (banana, pêra)
<b>Acetato de 2-feniletila</b>	0,21	0,25 <sup>a</sup>	Mel, floral, frutado
<b>Acetato de isobutila</b>	0,07	1,6 <sup>b</sup>	Frutado (banana)
<b>Acetato de hexila</b>	1,06	2,4 <sup>b</sup>	Frutado, doce
<b>Octanoato de etila</b>	2,11	-	Frutado (abacaxi)
<b>Decanoato de etila</b>	0,56	-	Floral

<sup>a</sup>Guth (1997) em 10% p/p solução água/etanol

<sup>b</sup>Ribéreau-Gayon et al., (2006) em vinho branco

Os ésteres etílicos (butanoato de etila, hexanoato de etila e octanoato de etila) são muito aromáticos, estando associados a descritores de aroma doce e frutado. Os acetatos de álcoois superiores como o acetato de isoamila, acetato de isobutila e acetato de hexila têm descritores de aroma frutado, como banana e pêra (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

Em 1973 foi relatado por Daudt e Ough que cepas de leveduras têm um impacto importante sobre a formação de ésteres. Já no ano de 2003, Plata et al. testaram várias espécies de leveduras de vinho para observar a sua capacidade em produzir acetato de etila e acetato de isoamila que são dois ésteres aromáticos importantes, eles descobriram que ambos os compostos eram dependentes da cepa de levedura utilizada.

Mamede e Pastore (2004) avaliaram o comportamento do crescimento e a produção de compostos voláteis de aroma em mostos de uvas após a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* e *Kloeckera apiculata*. Compostos como acetato de etila, acetato de isoamila, isobutanol foram identificados e quantificados e o mosto fermentado

pela *Kloeckera apiculata* apresentou concentrações desses compostos dentro de limites aceitáveis para vinho.

A extração, identificação e quantificação dos compostos responsáveis pelos atributos sensoriais experimentados pelos consumidores de vinho são essenciais para uma melhor compreensão das várias influências que exercem sobre o aroma e sabor do vinho. Os compostos voláteis normalmente possuem polaridade variável, solubilidade, volatilidade, pH e concentração que são bastante instáveis. Além disso, são facilmente oxidados por contato com o ar ou degradados pelo calor (MAMEDE; PASTORE, 2006). Portanto, os procedimentos de extração dos compostos voláteis requerem muitos cuidados.

O método de extração líquido-líquido é um dos métodos utilizados, que tem como vantagem a possibilidade de determinação de componentes de alta, média e baixa volatilidade, permitindo a identificação da maioria dos ésteres, álcoois, ácidos e aldeídos conhecidos. Contudo, a principal desvantagem desse método é a utilização de um solvente orgânico tóxico, que, em alguns casos, resulta na perda ou na degradação de alguns compostos e/ou formação de outros não presentes no vinho original (MAMEDE; PASTORE, 2006). Atualmente as metodologias tradicionais de extração de compostos voláteis estão sendo substituídas por outras que sejam menos agressivas aos analitos e capazes de detectar concentrações mínimas nas amostras estudadas.

A microextração em fase sólida (MEPS), por exemplo, é uma técnica de sorção (absorção e/ou adsorção, em função do revestimento da fibra), usada para a extração e concentração de compostos quer por imersão numa fase líquida ou exposição a uma fase gasosa e após a exposição da fibra à amostra, os analitos podem ser termicamente desorvidos em um cromatógrafo convencional. As principais vantagens desta técnica são a simplicidade de manuseamento, não requer uso de solvente de extração, elevada sensibilidade e seletividade (SETKOVA et al., 2007).

Várias técnicas têm sido utilizadas para caracterizar a composição do mosto de uva e do vinho, como por exemplo a espectrofotometria de absorção atômica em chama (FAAS - Flame Atomic Absorption Spectrometry) e a espectrofotometria de emissão atômica em chama (FAES - Flame Atomic Emission Spectrometry) (FRÍAS et al., 2003), espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (BAXTER et al., 1997), cromatografia líquida (CL) (BELLOMARINO et al., 2009), cromatografia gasosa (CG) (MARENGO et al., 2002), Ultravioleta-visível (UV/Vis), espectroscopia no infravermelho próximo (near infrared - NIR) e infravermelho médio (mid infrared - NIR) (LIU et al., 2006, COZZOLINO et al., 2010), espectroscopia de ressonância magnética

nuclear (RMN) (BRESCIA et al., 2002) e “nariz eletrônico” (e-nose), um dispositivo que identifica os componentes específicos de um aroma e analisa sua composição química para identificá-lo (CYNKAR et al., 2010).

Dentre as técnicas citadas, o CG tem sido a metodologia mais aplicada nas pesquisas de compostos voláteis que contribuem para o aroma devido a sua capacidade de separar os compostos voláteis numa mistura complexa, fornecendo informação quantitativa, assim como a capacidade de identificar os compostos com base em seus tempos de retenção, que reflete o ponto de ebulição e polaridade dos analitos (ROBINSON et al., 2014).

O CG por espectrometria de massa (CG/EM), detecta moléculas ionizadas com base na relação de sua massa e carga e possui vantagens significativas para a identificação de compostos voláteis em relação a outros detectores devido à disponibilidade do extenso espectro de massa e índice de retenção das bases de dados (BABUSHOK et al., 2007), além do fato de que os custos de bancada são mais acessíveis para a maioria de usuários.

O interesse na determinação de compostos voláteis de aromas produzidos no processo fermentativo surgiu a partir da necessidade de verificação do limite legal de aceitação desses compostos, da influência nas características sensoriais, do importante efeito no crescimento das leveduras, além do monitoramento de sua formação para controlar a fermentação. Dessa forma, a dosagem desses compostos é descrita na literatura como sendo de grande importância nas áreas de alimentos e bebidas e, portanto, a determinação dos mesmos é fundamental para o controle de qualidade na indústria de bebidas.

## **7. AVALIAÇÃO DO AROMA**

A ciência sensorial tem contribuído significativamente para o conhecimento das variáveis que influenciam e colaboram na percepção sensorial de alimentos e bebidas. A percepção do aroma e sabor do vinho pelo consumidor é o resultado da interpretação pelo sistema olfativo, sendo que a análise sensorial permite identificar e mensurar as características que agradam ao consumidor (STONE; SIDEL, 2004). Embora vários parâmetros sensoriais possam desempenhar papel na aceitação e prazer no consumo do vinho, é possível que o aroma, sabor e a qualidade sensorial intrínseca do vinho sejam atributos importantes e que influenciam na decisão de compra pelo consumidor (SWIEGERS et al., 2005).

Inicialmente as análises sensoriais eram usadas, tal como as químicas, como controle de qualidade, certificando-se da ausência de odores ou sabores indesejados. Com o sequenciamento do genoma humano e novos avanços no campo da neurobiologia do comportamento, emergem informações cruciais sobre a definição de qualidade e preferência. Sabe-se hoje que aproximadamente 2% do genoma humano codificam receptores olfativos e que existe uma íntima ligação entre percepção de um odor e emoções, agradáveis ou não. Usando ferramentas estatísticas de análises variadas bem como redes artificiais neurológicas é possível, atualmente, traçar o perfil sensorial de cada vinho (BISSON et al., 2002).

As análises química e sensorial permitem caracterizar o vinho, demonstrando a sua qualidade e tipicidade. A capacidade de reconhecer um aroma no vinho pode ser influenciada por diversos fatores, sendo os mais importantes o estado emocional, o treinamento e a fisiologia do provador. A cultura do indivíduo também interfere no reconhecimento dos aromas, pois remete ao contato com flores, frutos ou outros aromas em períodos como a infância, a adolescência ou o próprio dia-a-dia. Portanto, não existem duas pessoas que percebam da mesma maneira e na mesma intensidade os aromas e, devido a isso, cada pessoa possui sua carta de identidade olfativa (ZANUS; PEREIRA, 2006).

O aroma e sabor não dependem somente da concentração dos diferentes compostos existentes no vinho, mas a sua percepção pelos sentidos individuais é determinante no impacto sensorial, ou seja, a avaliação do aroma exige um envolvimento pluridisciplinar (VILANOVA et al., 2008). Por um lado a análise química com recurso às técnicas separativas, que permite a identificação e quantificação dos compostos voláteis; e por outro lado, a análise sensorial, com recurso a diferentes metodologias, procura determinar quais as características sensoriais dos compostos individuais e quais as características sensoriais de cada produto.

A análise sensorial tem sido utilizada para corroborar a influência das características ambientais, a inoculação com cepas de leveduras, o tempo de armazenamento, diferentes tratamentos enológicos ou o fator envelhecimento sobre o perfil aromático de vinhos (FALQUÉ et al., 2004; VILANOVA et al., 2008). O futuro encaminha-se, portanto, para a individualização dos consumidores, com base nas suas diferenças genéticas e nos seus perfis olfativos, que determinarão consequentemente as decisões de produção e de marketing dos vinhos.

## REFERÊNCIAS

ANFANG, N.; BRAJKOVICH, M.; GODDARD, M. R. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2009.

ANTONOVICS Z.; IRINYI L.; SIPICZKI M. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 971-979, 2005.

ARRUDA, C. A. Brasil - Vale do São Francisco. **Academia do Vinho**, 2011. Disponível em: <[http://www.academiadovinho.com.br/\\_regiao\\_mostra.php?reg\\_num=BR04](http://www.academiadovinho.com.br/_regiao_mostra.php?reg_num=BR04)>. Acesso em: 09 de fev. 2015.

ÁVILA, L. D. **Metodologias Analíticas Físico-químicas - Laboratório de Enologia**. Bento Gonçalves: CEFET, 2002. 68 p.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; REED, J. J.; ZENKEVICH, I. G.; BROWN, R. L., MALLARD, W. G.; STEIN, S. E. Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 414-421, 2007.

BAMFORTH, C. W. **Food Fermentation and Micro-organisms**. 1 ed. Australia: Blackwell Science Ltd, 2005. 12 p.

BARDI, L.; COCITO, C.; MARZONA, M. *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 133-140, 1999.

BAUER, F.F.; PRETORIUS, I.S. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making wine. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 21, p. 27-51, 2000.

BAXTER, M. J.; CREWS, H. M.; DENNIS, M. J.; GOODALL, I.; ANDERSON, D. The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. **Food Chemistry**, v. 60, p. 443-450, 1997.

BELLOMARINO, S. A.; CONLAN, X. A.; PARKER, R. M.; BARNETT, N. W.; ADAMS, M. J. Geographical classification of some Australian wines by discriminant analysis using HPLC with UV and chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 80, p. 833-838, 2009.

BERTHEL, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F. F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Sacharomyces cerevisiae* wine yeast strain. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 683-689, 2004.

BISSON, L.F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 1, p.107-119.1999.

BISSON, L. F.; WATERHOUSE, A. L.; EBELER, S. E.; M. WALKER, A.; LAPSLEY, J. T. The present and future of the international wine industry. **Nature Publishing Group**, v. 418, n. 6898, p. 696-699, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº299 de 25 de outubro de 1988. **Aprovar as normas referentes à “complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho”**. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso: 21 jan. 2015.

BRASIL. Lei nº 10970 de 16 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei n. 7678 de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados de uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004.

BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; DE GIGLIO A.; BENEDETTI D.; FANIZZI F.P.; SACCO A. Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 177-186, 2002.

CAMARGO, U. A.; PEREIRA, G. E.; GUERRA, C. C. Wine grape cultivars adaptation and selection for tropical wines”. **Acta Horticulturae**, n. 919, p. 121-129, 2011.

CAPECE, A.; FIORE, C.; MARAZ, A.; ROMANO, P. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 136–144, 2005.

CAPELLO, M. S.; BLEVE G.; GRIECO F.; DELLAGLIO F.; ZACHEO G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1274-1280, 2004.

CASAL, M.; SCHULLER D.; PAIS, C. Métodos moleculares de identificação de leveduras do vinho, **RCAAP**, 2004. Disponível em:<<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/2237>>. Acesso em: 11 jan. 2015.

CHERAITI, N.; GUEZENEC, S.; SALMON, J. M. Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 255–260, 2005.

CIANI, M.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; DOMIZIO, P. Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of *non-Saccharomyces* yeasts in winemaking. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 2, p. 123-133, 2010.

COZZOLINO, D.; CYNKAR, W. U.; SHAH, N.; SMITH, P. A. Can spectroscopy geographically classify Sauvignon Blanc wines from Australia and New Zealand? **Food Chemistry**, v. 126, p. 673-678, 2010.

CYNKAR, W.; DAMBERGS, R.; SMITH, P.; COZZOLINO D. Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: Combination of mass spectrometry

based electronic nose and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 660, p. 227-231, 2010.

DAUDT, C. E.; OUGH, C. S. Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation. Effects of fermentation temperature, SO<sub>2</sub>, yeast strain, and grape variety. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, p. 130-135, 1973.

DEL NOBILE, M.A.; D'AMATO, D.; ALTIERI, C.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M. Modeling the yeast Growth-Cycle in a model wine system. **Journal of Food Science**, v. 68, n.6, p. 2080–2085, 2003.

ETIEVANT, P. X. Wine. In: MAARSE, H. **Volatile compounds of food and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 483-546.

FALQUÉ, E.; FERREIRA, A. C.; HOGG, T.; GUEDES-PINHO, P. Determination of aromatic descriptors of Touriga Nacional wines by sensory descriptive analysis. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 298-302, 2004.

FAVALE, S.; PIETROMARCHI, P.; CIOLFI, G. Metabolic activity and interactions between two strains. *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* (SBC2) and *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum* (S6u) in pure and mixed culture fermentations. **Vitis**, v. 46, n.1, p. 39-43, 2007.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1351-1371, 2000.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; LLOPIS, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts. In: CARRASCOSA, A. V.; MUNÓZ, R.; GONZÁLEZ, R. N. **Molecular Wine Microbiology**. Elsevier, 2011. p. 111-129.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; MARTORELL, P.; DE LLANOS, R.; QUEROL, A. Molecular methods to identify and characterize yeast in foods and beverages. In: QUEROL, A.; FLEET, F.T. **The Yeast Handbook – Yeast in Food and Beverages**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, p. 55-82.

FERREIRA, A. C. S.; LOPEZ, R.; CACHO, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1659-1667, 2000.

FIA, G.; GIOVANI, G.; ROSI, I. Study of b-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. The Society for Applied Microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 509–517, 2005.

FLANZY, C. **Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa, 2000.

FLEET, G.; PRAKITCHAIWATTANA, C.; BEH, A. L.; HEARD, G. The yeast ecology of wine grapes. In: CIANE, M. **Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts**. Kerala, India: Research Signpost, 2002, p.1-17.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. (1-2), p. 11–22, 2003.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast research**, v. 8, n. 7, p.979–995, 2008.

FRANCESCA, N.; CHIURAZZI, M.; ROMANO, R.; APONTE, M.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Indigenous yeast communities in the environment of ‘‘Rovello bianco’’ grape variety and their use in commercial white wine fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 337-351, 2010.

FRANCIS, I. L.; NEWTON, J. L. Determining wine aroma from compositional data. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 114-126, 2005.

FRÍAS, S.; CONDE, J. E.; RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J.; GARCÍA-MONTELONGO, F.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. **Talanta**, v. 59, p. 335-344, 2003.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **WINE MICROBIOLOGY: Practical Applications and Procedures**. 2 ed. New York: Springer, 2007. 380 p.

GABAS, N.; RATSIMBA, B.; GERBAUD, V. Les sels tartriques dans les vins: solubilité et sursaturation. In: LALLEMAND, D. **La microbiologie des vins mousseux: la stabilisation des vins – mécanismes et évaluation**. Toulouse: Danona, 1994. p. 95-98.

GANGA, M.A.; MARTINEZ C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 76-83, 2004.

GARCÍA, V.; VÁSQUEZ, H.; FONSECA, F.; MANZANARES, P.; VIANA, F.; MARTÍNEZ C.; GANGA, M. A. Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, p. 226-229, 2010.

GIL, J. V.; MATEO, J. J.; JIMENEZ, M.; PASTOR, A.; HUERTA, T. Aroma compounds in wines as influenced by apiculate yeasts. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 1247-1250, 1996.

GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A.; GONZÁLEZ, R.; QUEROL, A.; SENDRA, J.; RAMÓN, D. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing b-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2801-2806, 1993.

GROSSMANN, M.; LINSENMEYER, H.; MUNO, H.; RAPP, A. Use of oligo-strain yeast cultures to increase complexity of wine aroma. **Viticulture and Enological**

**Science**, v. 51, p. 175-179, 1996.

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

GUTIERREZ A. R.; SANTAMARIA P.; EPIFANIO S.; GARIJO P.; LOPEZ R. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 411-415, 1999.

HOGAN, D. A. Quorum sensing: alcohols in a social situation. **Current Biology**, v. 16, p. 457-458, 2006.

HORSEY, I. **The Chemistry and Biology of Winemaking**. RCS Publishing, 2007. 436 p.

HOWELL, K. S.; COZZOLINO, D.; BARTOWSKY, E. J.; FLEET, G. H.; HENSCHKE, P. A. Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 91-101, 2006.

IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. **Regiões produtoras de vinho**. Bento Gonçalves, 2010. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>> Acesso em: 11 fev. 2014.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: As Bactérias do Ácido Láctico do Vinho – Parte I. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 24, n. 1, p. 1-23, 2008.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles, Practice, Perception**. San Diego: Academic Press. 3 ed. 2008. 702 p.

JOLLY N. P.; AUGUSTYN O. P. H.; PRETORIUS I. S. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 24, n. 2, p. 55-62, 2003.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN O. P. H.; PRETORIUS I. S. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production., **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.27, n. 1, p.15-39, 2006.

KING, E. S.; SWIEGERS, J. H.; TRAVIS B.; FRANCIS, I. L.; BASTIAN, S. E.; PRETORIUS, I. S. Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. sauvignon Blanc wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10829-10837, 2008.

KING, E. S.; KIEVIT, R. L.; CURTIN, C.; SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, L. S.; BASTIAN, S. E. P.; FRANCIS, I. L. The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference. **Food Chemistry**, v. 122, p. 618-626, 2010.

KOLBERT, C. P; PERSING, D. H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 99-305, 1999.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeast: A Taxonomic Study**. Amsterdam. Elsevier, 1998. 1016p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, J. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. San Diego: Elsevier, 2011. 3p.

LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma: A Review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97-129, 2000.

LE JEUNE C.; ERNY C. D.; LOLLIER M. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in spontaneous fermentation. **Food Microbiology**, v. 23, p. 709-716, 2006.

LI, E.; LIU, A.; XUE, B.; LIU, Y. Yeast species associated with spontaneous wine fermentation of Cabernet Sauvignon from Ningxia, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2475–2482, 2011.

LIU, S. Q. A Review: Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 589–601, 2001.

LIU, L.; COZZOLINO, D.; CYNKAR, W. U.; GISHEN, M.; COLBY, C. B. Geographic classification of Spanish and Australian Tempranillo red wines by visible and near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6754-6759, 2006.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Evaluation of the major compounds formed during grape must fermentation by yeast isolated from “serra gaúcha” (RS) region. **Food Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 453-458, 2004.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 586-590, 2006.

MANDELLI, F.; ZANUS, M. C. O clima e a safra vinícola. In: GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TORNIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Embrapa, 2009. p. 31-34.

MANZANARES, P.; VALLÉS, S.; VIANA, F. Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. In: CARRASCOSA, A. V.; MUNOZ, R.; GONZÁLEZ, R. **Molecular Wine Microbiology**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 85-105.

MANZANO, M.; MEDRALA, D.; GIUSTO, C.; BARTOLMEOLI, I.; URSO, R.; COMI, G. Classical and molecular analyses to characterize commercial dry yeasts used in wine fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 599–607, 2006.

MARENGO, E.; ACETO, M.; MAURINO, V. Classification of Nebbiolo-based wines from Piedmont (Italy) by means of solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 943, p. 123-137, 2002.

- MARO, E.D.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalenesca grape. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 201-210, 2007.
- MATURANO Y. P.; RODRÍGUEZ, L. A.; TORO, M. E.; NALLY, M. C.; VALLEJO, M.; CASTELLANOS, L. I. F.; COMBINA, M.; VAZQUEZ F. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 43–50, 2012.
- MENDOZA, L. M.; NADRA, M. C. M.; FARIAS, M. F. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1057–1063, 2007.
- MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 285-294, 2005.
- MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 231-238, 2008.
- MOREIRA, N., PINA, C., MENDES, F., COUTO, J.A., HOGG, T., VASCONCELOS, I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 662-667, 2011.
- NIKOLAOU, E.; SOUFLEROS, E.H.; BOULOUMPASI, E.; TZANETAKIS, N. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. **Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 205-211, 2006.
- NISIOTOU A. A.; SPIROPOULOS A. E.; NYCHAS G. J. E. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytisaffected grape must fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 73, p. 6705–6713, 2007.
- NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. **Yeast**, v. 20, p. 331 – 341, 2003.
- PEREIRA, G. E.; ARAÚJO, A. J. B.; SANTOS, J.; VANDERLINDE, R.; LIMA, L. L. A. Chemical and aromatic characteristics of Brazilian tropical wines. **Acta Horticulturae**, n. 910, p. 135-140, 2011.
- PEREIRA, G. E.; BASSOI, L. H. Production of Syrah wines in tropical conditions of northeast Brazil. In: INTERNATIONAL SYRAH SYMPOSIUM, 2008, Lyon, France. **Annals...Lyon: Oenoplurimedia**, 2008. p. 45-49.
- PEREZ-NEVADO, F.; ALBERGARIA, H.; HOGG, T.; GIRIO, F. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine related yeasts during mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*". **International Journal of Food Microbiology**. v. 108, p. 336 – 345, 2006.

- PIZARRO, F.; VARGAS, F. A.; AGOSIN, E. A systems biology perspective of wine fermentations. **Yeast**, v. 24, p. 977-991, 2007.
- PLATA, C.; MILLÁN, C.; MAURICIO, J. C.; ORTEGA, J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeast. **Food Microbiology**, v. 20, p. 217-224, 2003.
- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 6 ed, New York: MC Graw-Hill, 2005.
- PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.
- RENOUF, V.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 149-164, 2007.
- REYNOLDS, A.G.; VANDEN HEUVEL, J. E. Influence of grapevine training systems on vine growth and fruit composition: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 60, p. 251-268, 2009.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A.; GLORIES, Y.; MAUGEAN, A. **Tratado de enología**. 1 ed. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2003. 84 p.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications**. v. 1. 2 ed. England: John Wiley e Sons Ltd, 2006. 481 p.
- ROBINSON, A. L.; BOSS, P. K.; SOLOMON, P. S.; TRENGOVE, R. D.; HEYMANN, H.; EBELER S. E. Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 65, n.1, 2014.
- ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n. (1-2), p. 169–180, 2003.
- ROSA, C. A.; JINDAMORAKOT, S.; LIMTONG, S.; NAKASE, T.; LACHANCE, M.; FIDALGO-JIMÉNEZ, A.; DANIEL, H.; PAGNOCCA, F. C.; INÁCIO, J.; MORAIS, P. B. Synonymy of the yeast genera *Moniliella* and *Trichosporonoides* and proposal of *Moniliella fonsecae* sp. nov. and five new species combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 425–429, 2009.
- ROSA, C. A.; LACHANCE, M.; SILVA, J. O. C.; TEIXEIRA, A. C. P.; MARINI, M. M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 271-275, 2003.
- ROSSOUW, D.; NÆS, T.; BAUER, F.F. Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the

- production of volatile aroma compounds in yeast. **BMC Genomics**, v. 9, n. 530 p. 530-548, 2008.
- SABLAYROLLES, J.M. Control of alcoholic fermentation in winemaking: current situation and prospect. **Food Research**, v. 42, p. 418-424, 2009.
- SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F. R.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 454-461, 2008.
- SALO, P. Determining the odor thresholds for some compounds in alcoholic beverages. **Journal of Food Science**, v. 35, p. 95-99, 1970.
- SANTAMARIA P.; GARIJO P.; LOPEZ R.; TENORIO C.; GUTIERREZ A. R. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 49-56, 2005.
- SETKOVA, L.; RISTICEVIC, S.; PAWLISZYN, J. Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction. I. Method development and optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1147, n. 2, p. 213-223, 2007.
- SILVA, P. C. G. S.; COELHO, R. C. Cultivo da Videira. **Embrapa Semiárido**, Ago. 2010. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira\\_2ed/Caracterizaca\\_social\\_da\\_%20videira.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/Caracterizaca_social_da_%20videira.html)>. Acesso em: 10 fev. 2015.
- SNOEK, I. S. I.; STEENSMA, H. Y. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 24, p. 1-10, 2007.
- STONE, H.; SIDEL, J. L. Descriptive Analysis. In: STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**, Academic Press, 2004. p. 215-235.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman Company 2000.
- STYGER, G.; PRIOR, B.; BAUER, F.F. Wine flavour and aroma. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1145-1159, 2011.
- SWIEGERS J.H.; BARTOWSKY E. J.; HENSCHKE P. A.; PRETORIUS I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, p. 139-173, 2005.
- TAO, Y.; LI, H.; WANG, H.; ZHANG, L. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 689-694, 2008.
- THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**, v. 22, p. 511-519, 2006.

TONIETTO, J.; TEIXEIRA, A. H. C. Zonage climatique dès périodes viticoles de production dans l'année en zonage tropicale: application de la méthodologie du Système CCM Géoviticole. In: JOINT INTERNATIONAL CONFERENCE ON VITICULTURAL ZONING, 2004, Cape Town, South África. **Annals...**[S.I.:s.n.], 2004. p.193-201.

TONIETTO, J.; PEREIRA, G. E. A concept for the viticulture of "tropical wines". In: IXTH INTERNATIONAL TERROIR CONGRESS, 2012, Dijon, France. **Annals...**[S.I.:s.n.], 2012. p. 34-37.

TORIJA, M.J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years", **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 345-352, 2001.

UGLIANO, M.; TRAVIS, I. B.; FRANCIS, L.; HENSCHKE, P. Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines as Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12417–12425, 2010.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; ROLLE, L.; COMI, G.; COCOLIN, L. Yeast biodiversity and dynamics during weat wine production as determined by molecular methods. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n.7, p.1053–1062, 2008.

VILANOVA, M.; ZAMUZ, S.; TARDÁGUILA, J.; MASA, A. Descriptive analysis of wines from *Vitis vinifera* cv. Albarino. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 819-823, 2008.

WEUSTHUIS, R. A. **Disaccharide fermentation by yeasts**. 1994. PhD Thesis, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands, 1994.

YAP, N. A.; BARROS, L. M.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation, **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 381–389, 2000.

ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E. Degustação de vinhos e espumantes. **Informe Agropecuário**, Vinhos finos: rumo à qualidade, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 126-132, 2006.

ZOECKLEIN, B. C.; FUGELSANG, K. C.; GUMP, B. H.; NURY, F. S. **Wine analysis and production**. New York: Chapman e Hall, 1995.

ZOTT, K.; MIOT-SERTIER, C.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; MASNEUF-POMAREDE, I. Dynamics and diversity of non- *Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**. n.125, p. 197–203, 2008.

ZOTT, K.; THIBON, C.; BELY, M.; LONVAUD-FUNEL, A.; DUBOURDIEU D.; MASNEUF-POMAREDE, I. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community:

Impact on volatile thiol release. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 210-215, 2011.

## CAPÍTULO II

### EFEITO DA INOCULAÇÃO COMBINADA DE LEVEDURAS INDÍGENAS EM MOSTO CHENIN BLANC NA COMPOSIÇÃO DO AROMA E ACEITAÇÃO DO CONSUMIDOR.

**Adriana Pereira Coelho Santos<sup>1</sup>; Danilo Moreira Vilas Boas<sup>1</sup>; Regina Vanderlinde<sup>2</sup>;  
Maria Eugênia de Oliveira Mamede<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, 40171-970,  
Salvador, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Referência Enológica - LAREN, Instituto Brasileiro do Vinho –  
IBRAVIN, Avenida da Vindima, 1855, Exposição, 95054-470 Caxias do Sul, Brasil;  
Universidade de Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul,  
RS, Brasil.

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a composição volátil e avaliar físico-química e sensorialmente o mosto Chenin Blanc fermentado por leveduras encontradas na microbiota natural das uvas. Os parâmetros físico-químico avaliados em todas as amostras estavam de acordo com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira. A técnica de extração líquido-líquido e o uso do cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC) permitiu a detecção de 24 compostos de aroma nas amostras fermentadas, sendo que a conduzida pelas *H. opuntiae/S. cerevisiae* apresentou concentrações mais elevadas de compostos como o acetato de etila, octanoato e decanoato de etila, 2-metil-1-propanol e concentrações menores de ácidos isobutírico, butírico e octanóico importantes na caracterização aromática do mosto. O cálculo do VAO permitiu a determinação dos compostos voláteis que apresentaram maior contribuição para o aroma do mosto e os compostos acetato de etila, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol apresentaram maiores VAO. Dentre as fermentações combinadas, a maior porcentagem de intenção de compra e média de aceitação foi obtida no mosto fermentado pelas *H. opuntiae/S. cerevisiae*.

**Palavras-chave:** compostos voláteis; fermentação; *Hanseniaspora opuntiae*; teste de aceitação; vinho branco.

## 1. Introdução

Nos últimos anos, as leveduras indígenas não-*Saccharomyces* e sua potencial aplicação na elaboração de vinhos têm sido exploradas por enólogos de diferentes regiões do mundo. Alguns importantes estudos desenvolvidos sugerem que diferentes cepas de leveduras (e as diferenças genéticas correspondentes) podem influenciar a composição volátil e, conseqüentemente, o aroma dos vinhos e sua tipicidade (TORRENS et al., 2008; BISSON; KARPEL, 2010; CALLEJON et al., 2010; KING et al., 2011; ROBINSON et al., 2011, RICHTER et al., 2013).

Espécies dos gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* e *Zygosaccharomyces* geralmente crescem durante as primeiras fases da fermentação, enquanto a presença da *Saccharomyces cerevisiae* aumenta proporcionalmente à concentração de etanol (GONZÁLEZ et al., 2006; LOPANDIC et al., 2008). Essas leveduras têm geralmente capacidade fermentativa moderada, mas são importantes na produção de compostos voláteis aromáticos (MAMEDE; PASTORE, 2005; VIANA et al., 2011; COMITINI et al., 2011).

A fermentação a partir de culturas denominadas mistas, coinoculadas, ou “multistarter”, é definida como a inoculação simultânea de uma mistura de culturas microbianas para realizar a fermentação do vinho. As inoculações deste tipo pode ser utilizada para manipular a composição volátil e perfis sensoriais dos vinhos, tornando-os mais agradáveis e, conseqüentemente, servindo as preferências dos consumidores (KING et al., 2008). Determinados estudos de seleção e testes com culturas mistas chegaram a algumas das melhores espécies de leveduras apiculadas capazes de interagir positivamente com *S. cerevisiae*, resistir a fatores de estresse do meio e gerar propriedades sensoriais desejáveis ao vinho, são elas: *Hanseniaspora guilliermondii* (MOREIRA et al., 2005, 2008), *Hanseniaspora osmophila* (VIANA et al., 2009) e *Kloeckera apiculata* (anamorfa *Hanseniaspora opuntiae*) (MENDOZA et al., 2009).

O aroma e sabor dos vinhos são obtidos a partir de centenas de compostos voláteis e não voláteis resultantes da baga da uva, da vinificação e dos processos de envelhecimento (KING et al., 2010).

A determinação de voláteis por injeção direta é uma técnica simples e rápida, que requer apenas pequenos volumes de amostra e sem pré-concentração, além de não requerer a derivatização dos compostos antes da injeção no Cromatógrafo Gasoso (CG) (ABU-KHALAF; HASELMANN, 2012). É um método que possui uma sensibilidade aceitável

(ZWANK et al., 2002) e os compostos são quantificados independentemente dos seus pontos de ebulição, que é uma limitação em alguns métodos analíticos (RAZOTE et al., 2004). Essa técnica foi utilizada na quantificação dos principais compostos voláteis e polióis em amostras de vinhos (PEINADO et al., 2004) e na determinação de compostos de aroma secundário da fermentação de vinho espumante (WEBBER et al., 2014).

Os compostos voláteis influenciam o aroma final do vinho a depender de sua concentração e do limiar de percepção específico de cada composto. Cada fração volátil tem sua contribuição na composição aromática do vinho. A contribuição de um composto específico está relacionada com o seu limiar de percepção de aroma, o qual é definido como a concentração mais baixa que pode ser detectado através do olfato (GUTH, 1997).

A contribuição sensorial de compostos aromáticos do vinho pode ser determinada pelo valor da atividade de odor (VAO) (CAPONE; TUFARIELLO; SICILIANO, 2013; FERREIRA; LOPEZ; CACHO, 2000; GUTH, 1997; JIANG; ZHANG, 2010; JUAN et al., 2012; WELKE et al., 2014). O VAO é obtido a partir da razão entre a concentração de um composto e o seu respectivo limiar de percepção. A contribuição aromática ocorre quando concentração deste composto no vinho é acima do seu limiar de percepção, por conseguinte, valores de atividade de odor maior que 1 podem ser percebidos (GUTH, 1997). Capone et al. (2013) identificaram 51 compostos voláteis em vinhos tinto Negroamaro, e dentre eles, apenas 18 compostos foram percebidos como odores ativos ( $OAV > 1$ ). Os compostos relacionados com aroma eram principalmente álcoois, ácidos graxos e ésteres etílicos e os descritores sensoriais citados foram frutado, floral, gordo, pungente, de nozes e notas caramelizadas.

O estudo combinado dos compostos voláteis e análise sensorial tem sido empregado na resolução dos efeitos das interações de compostos de aroma com a matriz não-volátil (ROBINSON et al., 2009; SÁENZ-NAVAJAS et al., 2010) e volátil em vinhos (PINEAU et al., 2009). Segundo Robinson et al. (2014) essas interações podem resultar em variações no caráter sensorial do vinho devido ao realce ou supressão de efeitos na percepção, bem como para efeitos físico-químicos sobre a volatilidade e liberação dos compostos de aroma.

A região do submédio do Vale do São Francisco (Bahia/Brasil) tem se destacado nos últimos anos na produção de vinhos de qualidade em condições de clima tropical semiárido. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar a produção de compostos voláteis, bem como avaliar as características físico-químicas e sensoriais de mosto de uva Chenin Blanc fermentado a partir da inoculação de leveduras isoladas de

uvas que compõem o ecossistema natural da região do "Vale do Submédio São Francisco", visando a possibilidade de utilização destas em processos biotecnológicos e produção de vinho.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Leveduras

As leveduras *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia terricola* e *Cryptococcus flavescens* foram obtidas a partir de uvas cultivadas no município de Lagoa Grande (PE-Brasil) à 361 metros, latitude sul 8°59'47" e longitude 40°16'18", e isoladas seguindo o método de Assis et al. (2012). Após o estudo bioquímico, essas leveduras não-*Saccharomyces* foram identificadas por sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossômico (KURTZMAN et al., 2011).

As colônias puras de leveduras não-*Saccharomyces* foram mantidas em meio "Agar Yeast Malt" (YMA) (1% de glicose, 2,5% de ágar, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de malte e 0,3% de extrato de levedura) inclinado com a adição de glicerol estéril (Vetec) e mantidos sob refrigeração (4 °C) por 30 dias, e reativadas 48 horas antes das realizações das análises.

### 2.2. Mosto de uva e condições de fermentação

O mosto de uva Chenin Blanc doado pela empresa Vinibrasil S/A, localizada no estado de Pernambuco (Brasil), foi utilizado para a fermentação. As leveduras não-*Saccharomyces* foram inoculadas individualmente e em combinação com a *Saccharomyces cerevisiae* var. *Bayanus*, segundo método descrito por Assis et al. (2014). A levedura comercial *S. cerevisiae* var. *bayanus* (Maurivin) foi empregada como controle do processo fermentativo. Os inóculos de *S. cerevisiae* var. *bayanus*, *H. opuntiae*, *H. guilliermondii*, *I. terricola* e *C. flavescens* foram previamente ativados em meio YMA e incubadas em estufa BOD (Alfakit) por 48 horas a 28 °C. Após este período de incubação, os inóculos foram padronizados em  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de leveduras de acordo com leitura em espectrofotômetro (Femto 800 XI), com faixa de densidade óptica de 0,08-0,1 e comprimento de onda de 625 nm. Uma alíquota de 1 mL dessa suspensão padronizada foi retirada e inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 83,3 mL do mosto de

uva Chenin Blanc filtrado. As amostras foram incubadas em Shaker de agitação orbital, modelo Tecnal (TE-424) a 100 rpm por 168 horas (7 dias) em triplicatas sob temperatura de 15°C. Após 168 h de fermentação os mostos foram filtrados através de membrana Millipore (0,22 µm de poro) para realização das análises físico-químicas e determinação dos parâmetros cinéticos. A concentração celular, expressa como matéria seca (MS) em mg.L<sup>-1</sup> foi obtida após secagem das membranas a 100°C por 24 horas e divisão do peso pelo volume filtrado correspondente.

### *2.3. Análise da composição química do mosto*

O pH foi determinado em pHmetro digital (Phtek/P100). A acidez total foi determinada por titulação de acordo com Ough e Amerine (1988) e os sólidos solúveis totais, expresso em °Brix, utilizando um refratômetro manual (Atago/2313). As concentrações de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e nitrogênio presentes no mosto de uva foram cedidas pela vinícola para a realização deste estudo. O teor alcoólico, teor de açúcar residual, acidez volátil e total dos mostos fermentados foram determinados através do método descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) (BRASIL, 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### *2.4. Compostos voláteis*

#### *2.4.1. Análises cromatográficas*

As determinações dos álcoois superiores, ésteres e ácidos carboxílicos foram realizadas de acordo com Webber et al. (2014), no Laboratório de Referência Enológica - LAREN, na cidade de Caxias do Sul-RS, Brasil. O cromatógrafo gasoso utilizado foi da marca HP 6890 Agilent Technologies (Palo Alto, EUA), com detector de ionização de chama (CG-DIC). Os compostos voláteis foram identificados a partir de comparações da injeção de padrões autênticos da marca Sigma-Aldrich nas mesmas condições cromatográficas.

#### *2.4.2. Determinação de ésteres, álcoois e ácidos voláteis*

A extração desses compostos foi do tipo líquido-líquido utilizando como solvente uma mistura de éter etílico/hexano (1:1, v/v). Foram utilizados como padrão interno o 3-octanol a 40 mg.L<sup>-1</sup> em solução hidroalcoólica (40% vol.) e o ácido heptanóico a 50mg.L<sup>-1</sup>

em solução hidroalcoólica (40% vol.). Para o preparo adicionou-se a 50 mL de mosto de uva Chenin Blanc fermentado, 2 mL de cada padrão interno, o meio foi acidificado por 0,3 mL de ácido fosfórico (1:3), sendo então efetuadas 3 extrações utilizando sucessivamente 4 mL, 2 mL e 2 mL de uma solução de éter dietílico/n-hexano (1:1, v/v). Após decantação em funil de separação, as fases orgânicas foram reunidas constituindo o extrato.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica CP Inowax (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e a forma de injeção foi *splitless*, injetando-se 2  $\mu\text{L}$  de amostra em fluxo de 5,0 a 2,0 mL.min<sup>-1</sup> de hidrogênio (gás de arraste). A programação de temperatura para foi de 40 °C durante 5 minutos; 40 – 230 °C a 3 °C.min<sup>-1</sup>; 230 °C durante 20 minutos. A combustão foi mantida com ar sintético a 350 mL.min<sup>-1</sup> e o nitrogênio a 35 mL.min<sup>-1</sup> e a temperatura do detector foi de 230 °C.

#### 2.4.3. Determinação de álcoois superiores, acetaldeído, acetato de etila e metanol

Foi adicionado 70  $\mu\text{L}$  de 4-metil-2-pentanol (5 g.L<sup>-1</sup>, padrão interno) em 5 mL de amostra destilada. A coluna cromatográfica empregada foi uma CPWax 57CB (60 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ). A injeção direta das amostras foi realizada no modo *split* com razão 1:50, injetando-se 1  $\mu\text{L}$  de amostra em fluxo de 5,0 a 2,0 mL.min<sup>-1</sup> de hidrogênio (gás de arraste). A programação de temperatura para o forno foi de 40 °C durante 5 minutos; 40 – 90 °C a 3°C.min<sup>-1</sup>; 90 – 200 °C a 10 °C. min<sup>-1</sup>; 200 °C por 5 minutos. A combustão foi mantida com ar sintético a 350 mL.min<sup>-1</sup> e o nitrogênio a 35 mL.min<sup>-1</sup> e a temperatura do detector foi de 230 °C.

#### 2.4.4. Valor da atividade de odor

O Valor da Atividade de Odor (VAO) foi calculado dividindo a concentração média (n=3) de um composto volátil pelo seu respectivo valor de limiar de odor publicado na literatura científica (Peinado et al., 2004; Guth, 1997; Li et al., 2008; Escudero et al., 2007; King et al., 2008).

### 2.5. Análises sensoriais

O aroma do mosto de uva Chenin Blanc fermentado pelas leveduras foi avaliado em 120 horas de fermentação por meio de teste de aceitação e intenção de compra. Um total de 50 julgadores foram recrutados com base em sua frequência de consumo de vinho (mínimo de uma vez por semana). As avaliações foram realizadas em cabines individuais,

sob luz artificial, temperatura entre 22 e 24°C e com circulação de ar. As amostras foram avaliadas de forma monádica. Cada consumidor avaliou 9 amostras de bebidas (A, B, C, D, E, F, G, H, I) em três sessões, de acordo com um delineamento experimental de blocos completos balanceados e randomizados. As amostras (50 ml) foram servidos em taças de vidro codificadas com números aleatórios de 3 dígitos.

Uma escala hedônica estruturada de 9 pontos foi utilizada no teste de aceitação com extremos de "(1) desgostei muitíssimo" e "(9) gostei muitíssimo" (STONE; SIDEL, 2004). Os julgadores também registraram sua intenção de compra para cada amostra no mesmo formulário de avaliação, utilizando uma escala de cinco pontos, com extremos de "(1) certamente não compraria" e "(5) certamente compraria" (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2007).

O plano de estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia-UFBA, resolução número 01, de 13/06/1988-CNS, que apresenta um parecer favorável para o desenvolvimento do estudo (número 094/2009 e registro CEP 102/2009).

## *2.6 Tratamento estatístico*

Os resultados obtidos nos testes sensoriais afetivos foram avaliados por Análise Univariada de Variância (ANOVA) e teste de média de *Tukey* (ao nível de 5% de significância) utilizando o programa estatístico STATISTICA (versão 8.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Os resultados para a intenção de compra são apresentados em histogramas de frequência.

## **3. Resultados e discussão**

### *3.1. Cinética do crescimento das leveduras*

A composição química do mosto de uva Chenin Blanc está demonstrada na Tabela 1. A concentração de SO<sub>2</sub> presente no mosto foi de 60,0 mg.L<sup>-1</sup>, que, por sua vez, encontra-se dentro do limite ideal (50,0 a 100,0 mg.L<sup>-1</sup>) para a fermentação descrito por Jackson (2008), a depender da sanidade do fruto e da temperatura de maceração.

A concentração de nitrogênio e o valor de pH obtidos no mosto de uva Chenin Blanc foram 150 mg.L<sup>-1</sup> e 3,1, respectivamente. Normalmente, os mostos de uva são

considerados deficientes em nitrogênio e o valor necessário para a produção de vinho é entre a faixa de 140 a 150 mg N.L<sup>-1</sup> (FUGELSANG; EDWARDS, 2007). Para o pH, os valores entre 2,8 e 4,4, são considerados apropriados para a produção de vinho (JACKSON, 2008), neste intervalo é possível restringir e selecionar os microrganismos presentes no mosto a fim de estabilizar o produto final.

Fatores relacionados com a acidez do vinho tem um papel importante nas características sensoriais, assim como na estabilidade físico-química e biológica do vinho. De acordo Ribéreau-Gayon et al. (2006) o limite ideal de acidez total é entre 55 e 130 mEq.L<sup>-1</sup>, assim, o valor encontrado (71,64 mEq.L<sup>-1</sup>) está adequado. O teor de sólidos solúveis totais, expresso em °Brix, é um indicador bastante utilizado para a determinação do teor de açúcares no mosto e representa a capacidade de sustentar a produção de álcool pelas leveduras (JACKSON, 2008). Segundo Mandelli e Zanus (2009), o °Brix das uvas para a produção de vinhos tintos, brancos e espumantes devem apresentar valores entre 17 e 22 °Brix, podendo variar a depender do tipo de vinho. Neste estudo, o mosto de uva Chenin Blanc atingiu o valor ideal (19,8) para °Brix, garantindo a fermentação durante o processo de produção do vinho. Assim, os parâmetros indicam que o mosto estava em condições adequadas para iniciar a fermentação.

**Tabela 1.** Composição geral do mosto Chenin Blanc.

Parâmetros	Mosto Chenin Blanc
pH*	3,1
°Brix*	19,8
SO <sub>2</sub> **	60,0 mg.L <sup>-1</sup>
Acidez total*	71,64 mEq.L <sup>-1</sup>
Nitrogênio**	150 mg.L <sup>-1</sup>

\*Dados obtidos no Laboratório de Pesquisa e Análise de Alimentos e Contaminantes (UFBA).

\*\* Dados fornecidos pela vinícola.

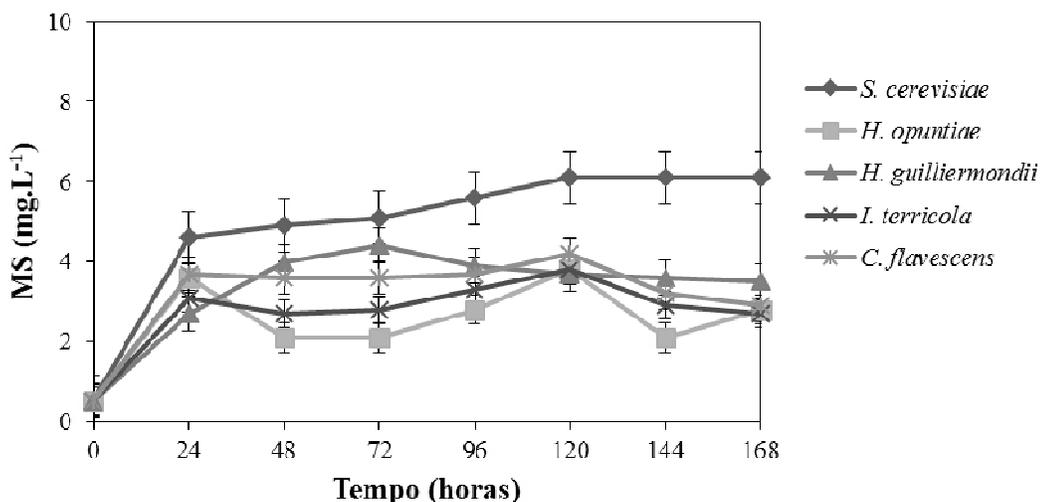
A cinética do crescimento das levedura durante as fermentações em culturas puras de *S. cerevisiae*, *H. opuntiae*, *H. guilliermondii*, *I. terricola* e *C. flavescens* em mosto de uva Chenin Blanc está representada na Figura 1.

A fase exponencial (fase log) das estirpes ocorreu durante as primeiras 24 horas de fermentação, tal como evidenciado pelo aumento da concentração da matéria seca (MS) celular. Para o mosto fermentado pela *H. opuntiae*, o valor máximo de MS foi obtido depois de 120 horas (3,8 mg.L<sup>-1</sup>), após este período verificou-se uma redução na produção de MS (2,1 mg.L<sup>-1</sup>). No entanto, houve uma nova evolução depois de 168 horas de

fermentação, resultando em 2,8 mg.L<sup>-1</sup>. O mosto fermentado por *H. guilliermondii* atingiu um valor máximo de MS em 72 horas (4,4 mg.L<sup>-1</sup>), e as fermentações realizadas pelas *I. terricola*, *C. flavescens* e *S. cerevisiae* produziram o maior valor de MS em 120 horas de fermentação (3,8; 4,2 e 6,1 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente). A fermentação conduzida pela *S. cerevisiae* apresentou comportamento de crescimento diferente quando comparado as outras fermentações, o valor da massa seca celular (MS) foi maior em todos os tempos de fermentação do que as observadas nas conduzidas pelas não-*Saccharomyces*.

Alguns estudos verificaram parâmetros cinéticos de crescimento de linhagens de levedura em mostos de uva de forma similar ao encontrado nesse estudo foi observado em pesquisas realizadas por Moreira et al. (2008) e Jolly, Augustyn e Pretorius (2003).

Mamede e Pastore (2007) realizaram um estudo utilizando a levedura *Pichia membranaefaciens*, a uma temperatura de 15 °C, e observaram que o crescimento celular foi mais rápido e vigoroso nas primeiras 72 horas de fermentação, com valores máximos de matéria seca celular produzida de 10,6 mg.L<sup>-1</sup> e 10,3 mg.L<sup>-1</sup> nos mostos de uva Chardonnay e Pinot Noir, respectivamente.



**Figura 1.** Concentração celular expressa em matéria seca (MS) (mg.L<sup>-1</sup>), nas fermentações conduzidas pela *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia terricola* e *Cryptococcus flavescens* em mosto Chenin Blanc a 15 °C.

Os resultados de MS, demonstram que somente *S. cerevisiae* permanece com valores elevados após 120h de fermentação. Esse comportamento pode ser explicado devido ao seu maior poder fermentativo e maior tolerância ao etanol produzido durante a fermentação (ANTUNOVICS et al., 2005). Assim, o comportamento das outras leveduras,

com a diminuição da matéria seca produzida após este período (120 h), pode estar associado à sua menor tolerância ao etanol produzido no processo fermentativo ou ainda à produção de outros compostos tóxicos além do etanol (FLEET, 2003; MOREIRA et al., 2008).

### 3.2 Análises físico-química do mosto Chenin Blanc fermentado

O teor de etanol no mosto fermentado alcançou a média de 11,53% para a *S. cerevisiae*, 10,56% para a combinação de leveduras *H. opuntiae/S. cerevisiae*, 7,30% para *H. guilliermondii/S. cerevisiae*, 8,53% para *I. terricola/S. cerevisiae* e 8,04% para *C. flavecens/S. cerevisiae*. Nos mostos de uva fermentado por culturas de leveduras não-*Saccharomyces*, não houveram níveis de produção de etanol (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análises químicas do mosto Chenin Blanc fermentado a 15 °C.

Leveduras	Caracterização química			
	Etanol (%, v/v)	Açúcar residual (g.L <sup>-1</sup> )	Acidez Total (mEq.L <sup>-1</sup> )	Acidez volátil (mEq.L <sup>-1</sup> )
<i>S. cerevisiae</i>	11,53±0,01	1,88±0,02	79,82±0,02	3,55±0,01
<i>H. opuntiae</i>	-	160,02±0,02	47,72±0,01	2,32±0,03
<i>H. guilliermondii</i>	-	136,51±0,01	41,04±0,01	2,05±0,02
<i>I. terricola</i>	-	135,50±0,00	65,21±0,00	4,36±0,00
<i>C. flavecens</i>	-	154,02±0,00	79,60±0,00	4,42±0,00
<i>H. opuntiae/S. cerevisiae</i>	10,56±0,01	1,91±0,01	97,18±0,00	3,84±0,01
<i>H. guilliermondii/S. cerevisiae</i>	7,30±0,00	2,45±0,00	75,26±0,01	2,75±0,00
<i>I. terricola/S. cerevisiae</i>	8,53±0,01	3,13±0,02	74,13±0,01	2,03±0,02
<i>C. flavecens/S. cerevisiae</i>	8,04±0,00	1,72±0,01	83,86±0,01	5,02±0,00

Todos os parâmetros são apresentados com o seu desvio padrão (n = 3).

Os resultados obtidos dos teores de etanol também demonstram que o mosto fermentado por culturas mistas de leveduras obtiveram menores níveis de produção desse composto quando comparado à fermentação controle realizada apenas pela *S. cerevisiae*. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por Jolly, Augustyn e Pretorius (2003), Moreira et al. (2008) e García et al. (2010), que avaliaram os efeitos do uso de culturas mistas de leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* sobre as características físico-químicas durante a produção de vinho. A *S. cerevisiae* foi utilizada como controle nesses estudos e o vinho produzido por culturas mistas obteve uma produção de etanol menor em comparação com o controle. De acordo com os autores citados, em termos de diminuição da concentração de etanol na cultura mista, pode ter

ocorrido uma competição antagônica entre os microrganismos inoculados que fez com que a produção deste metabólito fosse menos eficiente, isto é, pode ser devido à supressão das leveduras não-*Saccharomyces* pelas *Saccharomyces* durante a fermentação.

As concentrações de açúcares são derivadas de açúcares presentes nas uvas que não tenham sofrido metabolização durante a fermentação do vinho. Como esperado, o açúcar não foi completamente consumido em culturas puras de leveduras não-*Saccharomyces*, refletindo em um valor elevado de açúcar residual, 160,02 g.L<sup>-1</sup> para a fermentação conduzida pela *H. opuntiae*, 136,51 g.L<sup>-1</sup> para a *H. guilliermondii*, 135,50 g.L<sup>-1</sup> para a *I. terricola* e 154,02 g.L<sup>-1</sup> para a *C. flavescens* (Tabela 2). Isso demonstra uma maior eficiência na utilização do açúcar presente no mosto quando se realiza a fermentação mista de culturas de leveduras. Comportamento semelhante foi observado no estudo realizado por Jolly, Augustyn e Pretorius (2003), onde a levedura *K. apiculata* (anamorfa *H. opuntiae*) não conseguiu completar a fermentação do mosto de uva Chardonnay no prazo determinado, resultando em valores de 135,0 g.L<sup>-1</sup> e 1,9 g.L<sup>-1</sup> de açúcares residuais na fermentação com a *K. apiculata* pura e em combinação com a de *S. cerevisiae*, respectivamente.

Com relação à acidez total apenas os valores encontrados nos mostos de uva fermentados pela *H. opuntiae* e *H. guilliermondii* isoladamente estão abaixo do valor mínimo estabelecido (55 mEq.L<sup>-1</sup>) por Ribéreau-Gayon et al. (2006). O valor da acidez volátil permite inferir sobre a sanidade do vinho e quando produzido com a adição do SO<sub>2</sub> tem baixa acidez volátil (GIL et al., 1996). Neste estudo os níveis de acidez volátil estão entre 2,03 mEq.L<sup>-1</sup> e 5,02 mEq.L<sup>-1</sup>, e em conformidade com a legislação brasileira (BRASIL, 2004) que permite um máximo de 20 mEq.L<sup>-1</sup> de acidez volátil corrigida ou 1,2 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético.

### 3.3 Análises dos compostos voláteis

A tabela 3 mostra os resultados dos compostos voláteis, expresso em mg.L<sup>-1</sup>, presentes no mosto de uva Chenin Blanc fermentado por diferentes leveduras não-*Sacharomyces* inoculadas isoladamente e em combinação com a *S. cerevisiae*.

O valor de atividade do odor (VAO) pode ser usado para estabelecer os compostos que contribuem para o aroma pois o seu cálculo depende da concentração obtida e do limiar de odor específico de cada composto volátil numa determinada matriz. Para ser percebido pelo nariz humano, o composto deve apresentar um valor de atividade do odor

>1 (WELKE et al., 2014). Os valores de obtidos nesse estudo são apresentados na Tabela 4.

O acetato de etila foi o éster detectado em maior concentração variando entre 2,76 mg.L<sup>-1</sup> e 15,17 mg.L<sup>-1</sup> (fermentado pela *S. cerevisiae* e pela coinoculação da *H. opuntiae/S. cerevisiae*, respectivamente). O acetato de etila também apresentou o maior VAO, mais especificamente na fermentação conduzida pelas *H. opuntiae/S. cerevisiae* (1.264,16). Este composto em níveis baixos (<50 mg.L<sup>-1</sup>) pode ser adequado e adicionar complexidade ao aroma, ao passo, em altas concentrações se torna susceptível a produzir um aroma desagradável no vinho (TESEVIC et al., 2009). Os resultados obtidos coincidem com os encontrados por Zohre e Erten (2002), utilizando mosto estéril inoculado com diferentes leveduras. Os autores revelaram que a concentração de acetato etila produzida em culturas mistas de leveduras (*Kloeckera apiculata*, *Candida pulcherrima* e *S. cerevisiae*) foram maiores do que aqueles produzidos apenas pela *S. cerevisiae*. Em estudo realizado por Plata et al. (2003) a levedura não-*Saccharomyces Kloeckera apiculata* (anamorfa *H. opuntiae*), apresentou maior capacidade de produção do acetato de etila e acetato de isoamila ao final da fermentação no mosto de uva em relação à levedura *S. cerevisiae*.

Os ésteres conferem aromas característicos aos vinhos e mesmo quando presentes em baixas concentrações possuem papel fundamental nas notas frutais do aroma (FERREIRA, 2010; TAO; ZHANG, 2010). O acetato de etila é o éster predominante nos vinhos, é produzido em pequenas quantidades por leveduras durante a fermentação alcoólica e durante o período de envelhecimento, podendo também ser produzido em grandes quantidades pela ação de bactérias acéticas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O acetato de isoamila (aroma de banana e frutas (PEINADO et al., 2004), o hexanoato de etila (aroma de maçã e similares (PEINADO et al., 2004) e o acetato de hexila (maça, pêra, floral (PEINADO et al., 2004) são bastantes influentes na composição aromática da maioria dos vinhos. Entretanto apenas a fermentação conduzida pelas *H. opuntiae/S. cerevisiae* (VAO=5, tabela 4) resultou em VAO > 1.

No caso do conteúdo de acetato de hexila não houve diferença estatística significativa entre todos os mostos fermentados e as concentrações variaram de 0,053 mg.L<sup>-1</sup> a 0,064 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3). Os ésteres etílicos de ácidos graxos como o octanoato de etila e o decanoato de etila foram encontrados em todas as amostras analisadas, contudo as concentrações obtidas estão abaixo do limiar de percepção. O acetato de 2-feniletila, foi identificado nas fermentações com as diferentes combinações de leveduras, com exceção do mosto fermentado isoladamente pela *S. cerevisiae*. A presença deste composto pode ser

**Tabela 3.** Composição volátil do mosto Chenin Blanc fermentado a 15 °C.

Compostos voláteis (mg.L <sup>-1</sup> )	Leveduras								
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>I. terricola</i>	<i>C. flavescens</i>	<i>H. opuntiae/S. cerevisiae</i>	<i>H. guilliermondii/S. cerevisiae</i>	<i>I. terricola/S. cerevisiae</i>	<i>C. flavescens/S. cerevisiae</i>
<b>Ésteres</b>									
Acetato de etila	2,760 <sup>d</sup>	3,430 <sup>d</sup>	2,850 <sup>d</sup>	3,030 <sup>d</sup>	nd	15,170 <sup>a</sup>	6,900 <sup>b</sup>	5,670 <sup>c</sup>	7,550 <sup>b</sup>
Acetato de isoamila	nd	0,013 <sup>c</sup>	0,014 <sup>c</sup>	nd	nd	0,071 <sup>a</sup>	0,041 <sup>b</sup>	0,014 <sup>c</sup>	nd
Hexanoato de etila	nd	nd	nd	nd	nd	0,040 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
Acetato de hexila	0,064 <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	0,062 <sup>a</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,057 <sup>a</sup>	0,061 <sup>a</sup>	0,061 <sup>a</sup>	0,062 <sup>a</sup>	0,053 <sup>a</sup>
Octanoato de etila	0,088 <sup>fe</sup>	0,094 <sup>de</sup>	0,100 <sup>dc</sup>	0,084 <sup>f</sup>	0,091 <sup>fe</sup>	0,163 <sup>a</sup>	0,103 <sup>c</sup>	0,114 <sup>b</sup>	0,094 <sup>de</sup>
Decanoato de etila	0,070 <sup>b</sup>	0,071 <sup>b</sup>	0,082 <sup>a</sup>	0,077 <sup>ba</sup>	0,074 <sup>ba</sup>	0,077 <sup>ba</sup>	0,071 <sup>b</sup>	0,068 <sup>b</sup>	0,074 <sup>ba</sup>
Acetato de 2-feniletila	nd	0,027 <sup>d</sup>	0,121 <sup>a</sup>	0,001 <sup>e</sup>	0,006 <sup>ed</sup>	0,005 <sup>ed</sup>	0,091 <sup>b</sup>	0,029 <sup>d</sup>	0,001 <sup>e</sup>
<b>Soma dos ésteres (C6-C10)</b>	<b>0,158</b>	<b>0,165</b>	<b>0,182</b>	<b>0,161</b>	<b>0,165</b>	<b>0,280</b>	<b>0,174</b>	<b>0,182</b>	<b>0,168</b>
<b>Ácidos graxos</b>									
Ácido isobutírico	7,269 <sup>d</sup>	0,131 <sup>g</sup>	2,964 <sup>e</sup>	7,272 <sup>d</sup>	11,465 <sup>b</sup>	0,063 <sup>g</sup>	1,417 <sup>f</sup>	9,513 <sup>c</sup>	14,46 <sup>a</sup>
Ácido butírico	0,188 <sup>e</sup>	1,917 <sup>c</sup>	0,836 <sup>d</sup>	1,932 <sup>c</sup>	2,931 <sup>b</sup>	0,157 <sup>e</sup>	0,443 <sup>ed</sup>	3,436 <sup>a</sup>	2,140 <sup>c</sup>
Ácido isovalérico	0,067 <sup>g</sup>	2,580 <sup>d</sup>	1,390 <sup>e</sup>	3,476 <sup>c</sup>	5,427 <sup>a</sup>	0,066 <sup>g</sup>	0,681 <sup>f</sup>	5,647 <sup>a</sup>	4,414 <sup>b</sup>
<b>Soma dos ácidos (C4-C5)</b>	<b>7,524</b>	<b>4,628</b>	<b>5,190</b>	<b>12,680</b>	<b>19,823</b>	<b>0,286</b>	<b>2,541</b>	<b>18,596</b>	<b>21,014</b>
Ácido hexanóico	1,319 <sup>b</sup>	0,342 <sup>g</sup>	0,480 <sup>f</sup>	0,776 <sup>e</sup>	1,122 <sup>c</sup>	0,337 <sup>g</sup>	0,496 <sup>f</sup>	0,963 <sup>d</sup>	1,743 <sup>a</sup>
Ácido octanóico	0,201 <sup>e</sup>	0,232 <sup>d</sup>	0,110 <sup>g</sup>	0,289 <sup>c</sup>	0,713 <sup>a</sup>	0,028 <sup>h</sup>	0,190 <sup>e</sup>	0,136 <sup>f</sup>	0,683 <sup>b</sup>
Ácido decanóico	0,006 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	0,012 <sup>b</sup>	nd	0,046 <sup>b</sup>	nd	0,295 <sup>a</sup>
Ácido dodecanóico	0,119 <sup>a</sup>	0,116 <sup>ba</sup>	0,111 <sup>bc</sup>	0,109 <sup>dc</sup>	0,109 <sup>dc</sup>	0,106 <sup>dc</sup>	0,106 <sup>dc</sup>	0,106 <sup>dc</sup>	0,104 <sup>d</sup>
<b>Soma dos ácidos (C6-C12)</b>	<b>1,645</b>	<b>0,690</b>	<b>0,701</b>	<b>1,174</b>	<b>1,956</b>	<b>0,471</b>	<b>0,838</b>	<b>1,205</b>	<b>2,825</b>
<b>Alcoóis</b>									
Metanol	27,720 <sup>c</sup>	15,680 <sup>d</sup>	34,560 <sup>a</sup>	25,360 <sup>c</sup>	28,470 <sup>bc</sup>	17,470 <sup>d</sup>	34,440 <sup>a</sup>	23,340 <sup>c</sup>	33,370 <sup>ba</sup>
Hexanol	0,055 <sup>e</sup>	0,130 <sup>d</sup>	0,187 <sup>c</sup>	0,038 <sup>e</sup>	0,061 <sup>e</sup>	0,250 <sup>b</sup>	0,313 <sup>a</sup>	0,066 <sup>e</sup>	0,038 <sup>e</sup>
Cis-3-Hexen-1-ol	0,001 <sup>ed</sup>	0,022 <sup>c</sup>	0,042 <sup>b</sup>	nd	0,001 <sup>ed</sup>	0,042 <sup>b</sup>	0,086 <sup>a</sup>	0,007 <sup>d</sup>	nd
Trans-3-Hexen-1-ol	0,056 <sup>bac</sup>	0,056 <sup>bac</sup>	0,059 <sup>ba</sup>	0,017 <sup>dc</sup>	0,028 <sup>bdc</sup>	0,053 <sup>bac</sup>	0,080 <sup>a</sup>	0,005 <sup>d</sup>	nd
1-propanol	3,070 <sup>f</sup>	14,600 <sup>d</sup>	7,440 <sup>e</sup>	5,280 <sup>fe</sup>	2,780 <sup>f</sup>	37,310 <sup>b</sup>	23,910 <sup>c</sup>	23,040 <sup>c</sup>	52,930 <sup>a</sup>
2-metil-1-propanol	4,060 <sup>dc</sup>	24,900 <sup>b</sup>	26,160 <sup>b</sup>	3,710 <sup>d</sup>	7,330 <sup>dc</sup>	51,530 <sup>a</sup>	46,810 <sup>a</sup>	47,930 <sup>a</sup>	10,250 <sup>c</sup>
2-metil-1-butanol	4,510 <sup>f</sup>	14,760 <sup>d</sup>	8,070 <sup>e</sup>	19,010 <sup>c</sup>	28,940 <sup>ba</sup>	4,430 <sup>f</sup>	5,920 <sup>fe</sup>	27,540 <sup>b</sup>	32,010 <sup>a</sup>
3-metil-1-butanol	6,330 <sup>h</sup>	70,030 <sup>d</sup>	24,130 <sup>f</sup>	12,950 <sup>g</sup>	6,300 <sup>h</sup>	115,100 <sup>b</sup>	131,440 <sup>a</sup>	106,430 <sup>c</sup>	51,480 <sup>e</sup>
2-feniletanol	0,247 <sup>e</sup>	0,967 <sup>ba</sup>	0,742 <sup>c</sup>	0,415 <sup>d</sup>	0,374 <sup>ed</sup>	1,126 <sup>a</sup>	0,924 <sup>b</sup>	0,611 <sup>c</sup>	0,333 <sup>ed</sup>
<b>Soma dos álcoois superiores</b>	<b>17,97</b>	<b>124,29</b>	<b>65,80</b>	<b>40,95</b>	<b>45,35</b>	<b>208,37</b>	<b>208,08</b>	<b>204,94</b>	<b>146,67</b>
<b>Aldeídos</b>									
Acetaldeído	60,56 <sup>a</sup>	12,62 <sup>d</sup>	8,95 <sup>e</sup>	45,74 <sup>b</sup>	46,79 <sup>b</sup>	12,60 <sup>d</sup>	21,67 <sup>c</sup>	8,59 <sup>e</sup>	9,56 <sup>ed</sup>

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Soma de ésteres (C6-C10) = (soma do hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila); soma de ácidos (C4-C5) = (soma dos ácidos isobutírico, butírico e isovalérico); soma dos ácidos (C6-C12) = (soma dos ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e dodecanóico); soma dos álcoois superiores = (soma do 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-butanol, 3-metil-1-butanol). nd= não determinado.

**Tabela 4.** Compostos voláteis identificados com seus respectivos limiares de odor e valores de atividade de odor (VAO).

Compostos voláteis	Limiar de odor <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	VAO*								
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>I. terricola</i>	<i>C. flavescens</i>	<i>H. opuntiae/S. cerevisiae</i>	<i>H. guilliermondii/S. cerevisiae</i>	<i>I. terricola/S. cerevisiae</i>	<i>C. flavescens/S. cerevisiae</i>
<b>Ésteres</b>										
Acetato de etila	0,012 <sup>a</sup>	230,0	285,83	237,50	252,50	nd	1.264,16	575,0	472,50	629,16
Acetato de isoamila	0,160 <sup>a</sup>	nd	<1	<1	nd	nd	<1	<1	<1	nd
Hexanoato de etila	0,008 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	5	nd	nd	nd
Acetato de hexila	0,670 <sup>a</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Octanoato de etila	0,580 <sup>a</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Decanoato de etila	0,500 <sup>a</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Acetato de 2-feniletila	0,250 <sup>b</sup>	nd	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Ácidos graxos</b>										
Ácido isobutírico	0,200 <sup>b</sup>	36,345	<1	14,82	36,36	57,325	0,315	7,085	47,565	72,30
Ácido butírico	3,0 <sup>b</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ácido isovalérico	3,0 <sup>b</sup>	<1	<1	<1	1,16	1,81	<1	<1	1,88	1,47
Ácido hexanóico	3,0 <sup>a</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ácido octanóico	0,010 <sup>a</sup>	20,1	23,20	11,0	28,90	71,30	2,80	19,0	13,60	68,30
Ácido decanóico	0,006 <sup>a</sup>	1	nd	nd	nd	2	nd	7,66	nd	49,17
Ácido dodecanóico	1,0 <sup>c</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Alcoóis</b>										
Metanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hexanol	1,1 <sup>a</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Cis-3-Hexen-1-ol	0,400 <sup>d</sup>	<1	<1	<1	nd	<1	<1	<1	<1	nd
Trans-3-Hexen-1-ol	0,400 <sup>b</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	nd
1-propanol	0,306 <sup>a</sup>	10,03	47,71	24,31	17,25	9,08	121,93	78,14	75,29	172,97
2-metil-1-propanol	0,075 <sup>a</sup>	54,13	332,0	348,80	49,47	97,73	687,06	624,13	639,06	136,66
2-metil-1-butanol	75,0 <sup>e</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
3-metil-1-butanol	0,060 <sup>a</sup>	105,5	1.167,16	402,16	215,83	105,0	1.918,33	2.190,66	1.773,83	858,0
2-feniletanol	0,200 <sup>a</sup>	1,23	4,83	3,71	2,07	1,87	5,63	4,62	3,055	1,665
<b>Aldeídos</b>										
Acetaldeído	0,500 <sup>b</sup>	121,12	25,24	17,9	91,48	93,58	25,20	43,34	17,18	19,12

\*VAO=Valor da atividade de odor; <sup>+</sup>Limiar de odor determinado em 9,5-12% (v/v) de etanol obtido a partir da literatura: <sup>a</sup>PEINADO et al., 2004; <sup>b</sup>GUTH, 1997; <sup>c</sup>LI et al., 2008; <sup>d</sup>ESCUADERO et al., 2007; <sup>e</sup>KING et al., 2008. nd= não determinado.

relacionada com descritores aromáticos de nuances de “rosas” e “flores” para os vinhos (SWIEGERS; PRETORIUS, 2005).

A maior concentração de acetato de 2-feniletila foi obtida na fermentação conduzida pelas *H. guilliermondii* isoladamente (0,121 mg.L<sup>-1</sup>), diferindo estatisticamente de todas as outras amostras analisadas (Tabela 3). Rojas et al. (2003) verificaram também, em estudo realizado, que a *H. guilliermondii* quando inoculada isoladamente na fermentação tem uma elevada produção de acetato de 2-feniletila. Em um outro estudo, espécies de leveduras não-*Saccharomyces* foram avaliadas com base na formação de éster, selecionando como melhores os gêneros *Pichia* e *Hanseniaspora*, devido ao potencial de formação de acetato de 2-feniletila e alta taxa de fermentação de açúcares do mosto (VIANA et al., 2008).

Os ácidos graxos voláteis que obtiveram os maiores VAO foram o isobutírico na fermentação conduzida pela combinação de leveduras *C. flavescens/S. cerevisiae* (72,30) e o octanóico na fermentação com a *C. flavescens* isoladamente (71,30) (Tabela 4). Altos níveis de ácidos voláteis, tais como o ácido isobutírico e butírico, podem diminuir a aceitação do vinho uma vez que estes compostos têm um efeito negativo sobre as características sensoriais dos o vinho (NIKOLAOU et al., 2006). Segundo Shinohara (1985) podem afetar negativamente o aroma do vinho em concentrações superiores a 20 mg.L<sup>-1</sup>. Apenas as fermentações com a *C. flavescens* isoladamente (21,779 mg.L<sup>-1</sup>) e em combinação com a *S. cerevisiae* (23,839 mg.L<sup>-1</sup>) resultaram em concentrações de ácidos voláteis totais que podem afetar negativamente o aroma do vinho (Tabela 3).

A maioria dos álcoois superiores presentes no vinho são produtos secundários da fermentação alcoólica. Eles são formados a partir da fermentação dos açúcares ou através da reação de Ehrlich ou ainda a partir de aminoácidos das uvas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; HAZELWOOD et al., 2008; CHEYNIER et al., 2010). Álcoois superiores como o 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol pertencem ao grupo de compostos químicos ativos do aroma, os quais formam a base aromática dos vinhos (FERREIRA et al., 2010).

Com relação ao metanol a legislação brasileira estabelece um limite máximo para a concentração (350 mg.L<sup>-1</sup>) devido à toxicidade que ele apresenta (BRASIL, 1998). Entretanto, neste trabalho os mostos fermentados apresentaram teores muito inferiores a este limite, variando entre 17,47 mg.L<sup>-1</sup> e 34,56 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3).

O hexanol apresenta uma característica acentuada, responsável pela nota herbácea dos vinhos brancos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). Os teores de hexanol neste estudo foi consideravelmente baixo variando entre 0,038 mg.L<sup>-1</sup> e 0,313 mg.L<sup>-1</sup> nos mostos fermentados pela *I. terrícola* isoladamente e pela coinoculação da *H. guilliermondii/S. cerevisiae*, respectivamente. Embora considerado como um álcool superior, o hexanol é oriundo da degradação de ácidos graxos linoléico e linolênico encontrados nas uvas, portanto, não é produzido durante a fermentação alcoólica (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Também foram identificados os álcoois cis-3-hexen-1-ol e o trans-3-hexen-1-ol, entretanto não foi detectado a presença desses compostos na fermentação conduzida pela coinoculação da *C. flavescens/S.cerevisiae* (Tabela 3). Assim como o hexanol, esses compostos são caracterizados como descritor de aroma do tipo “verde”, “herbáceo” (ESCUADERO et al., 2007), entretanto neste estudo, quando presente, resultaram em VAO < 1 (Tabela 4) e em concentrações que variam de 0,001mg.L<sup>-1</sup> a 0,086 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3), assim pode-se dizer que o seu impacto sensorial foi limitado.

A concentração do composto 1-propanol (aroma alcoólico e de fruta madura (PEINADO et al., 2004) deve variar entre 10 a 50 mg.L<sup>-1</sup> em vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), as fermentações que obtiveram concentrações neste intervalo foram aquelas inoculadas pela combinação de leveduras *H. opuntiae/S. cerevisiae* (37,31 mg.L<sup>-1</sup>), *H. guilliermondii/ S. cerevisiae* (23,91 mg.L<sup>-1</sup>) e *I. Terrícola* (23,04 mg.L<sup>-1</sup>), não havendo diferença estatística significativa entre estas duas últimas fermentações. Também se obteve a concentração nesse intervalo no mosto fermentado pela *H. opuntiae* (14,60 mg.L<sup>-1</sup>) isoladamente, diferindo estatisticamente de todas as outras fermentações (tabela 3). Com relação ao VAO todas as fermentações foram > 1, sendo que os maiores valores foram nas conduzidas pela combinação da *C. flavescens* e da *H. opuntiae* com a *S. cerevisiae* (172,97 e 121,93, respectivamente).

Com relação ao 2-metil-1-propanol, aroma alcoólico (PEINADO et al., 2004), o maior valor de atividade de odor obtido foi no mosto fermentado pelas *H. opuntiae/S.cerevisiae* (687,06, Tabela 4), podendo apresentar considerável contribuição nas características aromáticas. No entanto, com relação ao 2-metil-1-butanol as concentrações variaram de 4,43 mg.L<sup>-1</sup> a 32,01 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3), abaixo do limiar de odor 75,0 mg.L<sup>-1</sup>) segundo King et al. (2008) e VAO < 1 (Tabela 4) em todas as fermentações realizadas. O composto 3-metil-1-butanol apresentou o maior VAO (2.190,66, Tabela 4) e

maior concentração (131,440 mg.L<sup>-1</sup>, Tabela 3) na fermentação conduzida pelas *H. guilliermondii/S. cerevisiae*, diferindo estatisticamente de todas as outras amostras.

O álcool feniletílico desempenha um importante papel no aroma dos vinhos brancos, isto quando presente em concentrações acima do limiar de 0,200 mg.L<sup>-1</sup> (PEINADO et al., 2004). Os valores encontrados do composto 2-feniletanol foram maiores que o limiar, assim como os valores de atividade de odor foram > 1 (Tabela 4) em todas as fermentações e por isso pode contribuir efetivamente na composição aromática do mosto analisado.

Na combinação de *H. opuntiae/S. cerevisiae* ocorreu a maior soma para alcoóis superiores, 208,37 (Tabela 3). Este resultado é coerente com os trabalhos de Gil et al. (1996), no qual os autores verificaram *Hanseniaspora uvarum* e *Kloeckera apiculata* (anamorfa *H. opuntiae*) foram as mais produtoras de álcoois superiores em mosto de uva. Em 2003, Romano et al. relataram que as leveduras apiculadas, como as *Hanseniasporas*, produzem baixas quantidades de álcoois superiores no processo fermentativo em relação à *S. cerevisiae*.

Em concentrações totais menores que 300 mg.L<sup>-1</sup>, os álcoois superiores podem participar do aroma global do vinho ou podem contribuir individualmente para o aroma do vinho. Entretanto, em altas concentrações, podem mascarar outros aromas responsáveis pelas propriedades sensoriais do vinho (FERREIRA et al., 2002).

O acetaldeído foi o único aldeído identificado e quantificado. A fermentação realizada pela *S. cerevisiae* obteve a maior concentração desse composto (60,56 mg.L<sup>-1</sup>, Tabela 3), diferindo estatisticamente de todas as outras fermentações. O VAO do acetaldeído nesta amostra foi de 121,12 (Tabela 4). Quando presente em alta concentração resulta em um aroma “pungente” (GURBUZ; ROUSEFF; ROUSEFF, 2006), afetando negativamente o aroma do vinho. Resultado semelhante foi observado em estudo realizado por Garde-Cerdán e Ancín-Azpilicueta (2006) em que as leveduras do gênero *Saccharomyces* foram boas produtoras deste aldeído, especialmente quando não competiam com outras leveduras nas fermentações oriundas de coinoculações.

### 3.4 Avaliação da aceitação e intenção de compra

A análise sensorial dos mostos foi realizada no período de 120 horas de fermentação. A escolha desse período foi em decorrência da observação do pico máximo

de desenvolvimento celular em 120 h (Figura 1). Os resultados do teste de aceitação estão demonstrados na tabela 5. O mosto de uva Chenin Blanc fermentado pela *H. opuntiae* apresentou a maior média de aceitação (7,30), entretanto, não diferiu estatisticamente do valor obtido na fermentação conduzida em combinação com a *S. cerevisiae* (7,22). Uma vez que estas amostras apresentaram as maiores médias de aceitação, as porcentagens de intenção de compra também foram as maiores.

A intenção de compra está representada na forma de histograma de frequência (%) na Figura 2. Os mostos fermentados pela *H. opuntiae* e pela combinação da *H. opuntiae/S. cerevisiae* apresentaram os maiores percentuais de intenção de compra, correspondendo à soma dos conceitos de "certamente compraria" e "provavelmente compraria", com valores de 76% e 70%, respectivamente. Em contrapartida, a fermentação conduzida pela levedura *C. flavecens* apresentou a menor média de aceitação (2,74), não diferindo estatisticamente da média obtida na fermentação combinada da *C. flavecens/S. cerevisiae* (3,34) (Tabela 5).

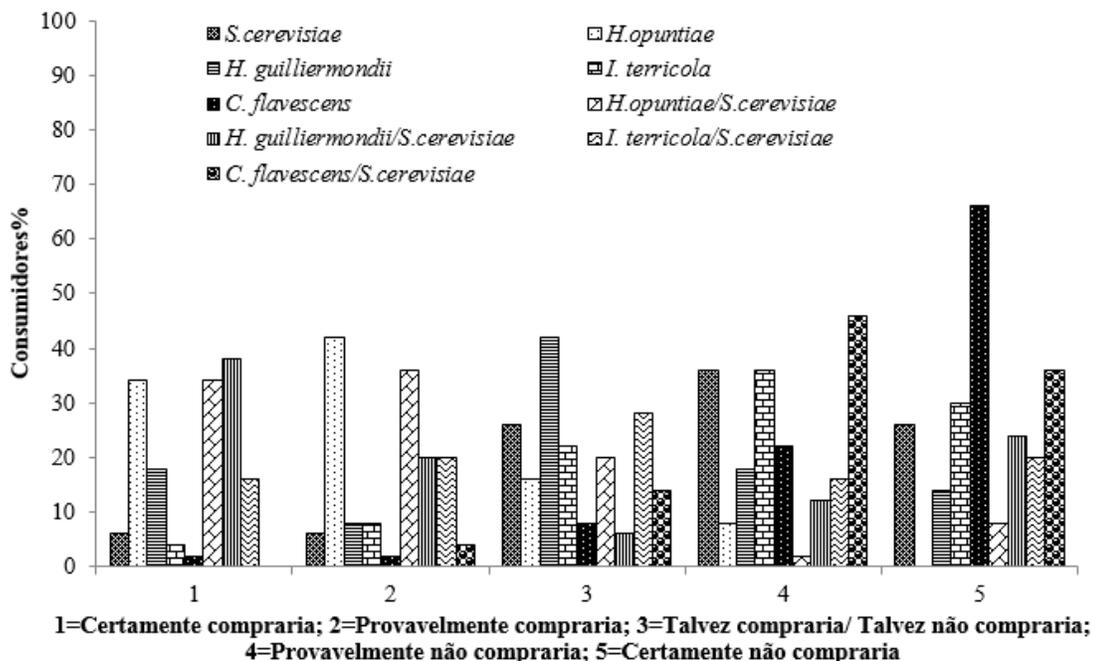
**Tabela 5.** Médias de aceitação do aroma de mosto Chenin Blanc fermentado a 15 °C.

Período da análise sensorial	Amostras	Médias de aceitação
120 horas de fermentação	<i>S. cerevisiae</i>	4,30 <sup>ced</sup>
	<i>H. opuntiae</i>	7,30 <sup>a</sup>
	<i>H. guilliermondii</i>	5,38 <sup>cb</sup>
	<i>I. terricola</i>	4,02 <sup>ed</sup>
	<i>C. flavecens</i>	2,74 <sup>f</sup>
	<i>H. opuntiae/S. cerevisiae</i>	7,22 <sup>a</sup>
	<i>H. guilliermondii/S. cerevisiae</i>	5,86 <sup>b</sup>
	<i>I. terricola/S. cerevisiae</i>	5,16 <sup>cbd</sup>
	<i>C. flavecens/S. cerevisiae</i>	3,34 <sup>fe</sup>

Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A fermentação realizada pela *S. cerevisiae* isoladamente apresentou a menor porcentagem para a soma dos conceitos "certamente compraria" e "provavelmente compraria" no teste de intenção de compra (12%, em 120 horas) (Figura 2). Resultado semelhante foi encontrado em estudo desenvolvido por Mamede, Cardello e Pastore (2005) que avaliaram a aceitação e intenção de compra do aroma dos mostos Pinot noir e Chardonnay fermentados a 15 °C pelas leveduras *Pichia membranefaciens*, *Kloeckera*

*apiculata*, *Candida valida* e *S. cerevisiae* e observaram que o mosto Chardonnay fermentado apenas pela *S. cerevisiae* obteve a menor intenção de compra (20%).



**Figura 2.** Intenção de compra do mosto Chenin Blanc em 120 horas de fermentação.

A avaliação sensorial obtida neste estudo pode ser associada com a composição volátil encontrada nos mostos fermentados. Os mostos com maiores médias de aceitação e porcentagens de intenção de compra apresentaram importantes concentrações de álcoois superiores, como o 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-butanol e ésteres etílicos, tais como, acetato de etila, acetato de hexila, octanoato e decanoato de etila, e acetato de 2-feniletila (Tabela 3). É possível observar também que o mosto fermentado pelas *H. opuntiae/S. cerevisiae* apresentou os maiores VAO para compostos como 2-metil-1-propanol e acetato de etila, que em concentrações adequadas contribuem positivamente para a qualidade aromática geral do mosto.

Do mesmo modo, a baixa média de aceitação encontrada na fermentação conduzida pela combinação da *C. flavecens/S. cerevisiae* pode estar associado à presença de ácidos

voláteis em altas concentrações, tais como o isobutírico e butírico, que podem influenciar negativamente ao aroma do vinho.

#### **4. Conclusão**

O uso da metodologia CG-DIC para análise dos mostos fermentados, juntamente com o VAO, análises físico-químicas e sensoriais permitiu uma correlação entre a concentração e o impacto do odor para cada composto volátil nos diferentes tipos de fermentações, resultando na constatação da melhor combinação de leveduras para a formação de compostos importantes para o aroma do mosto Chenin Blanc.

A utilização da levedura *H. opuntiae* em culturas mistas com a *S. cerevisiae* apresentou um grande potencial no processo de vinificação. O uso combinado dessas leveduras pode levar ao incremento na produção de compostos voláteis desejáveis como ésteres e álcoois superiores em concentrações adequadas. Além disso, os maiores VAO nas fermentações conduzidas pelas combinações de leveduras também demonstram a relevância deste tipo de inoculação para a formação de compostos voláteis que influenciam diretamente na qualidade aromática dos vinhos.

A coinoculação ou fermentação mista demonstrou ser uma ferramenta promissora para a indústria vinícola, permitindo que os produtores de vinhos possam alterar o aroma dos mesmos de acordo com as especificações e exigências do mercado consumidor.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Vinibrasil S/A pela assistência e doação do mosto de uva Chenin Blanc, ao Laboratório de Bromatologia (UFBA- Brazil), ao Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de leveduras do Instituto de Biologia (UFMG-Brazil), ao Laboratório de Referência Enológica – LAREN e aos órgãos de fomento FAPESB e CNPq para apoio financeiro e bolsas de estudo.

## 5. Referências

ABU-KHALAF, N.; HASELMANN, K. F. Characterization of Odorants in an Air Wet Scrubber Using Direct Aqueous Injection-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (DAI-GC-MS) and Solid Phase Extraction (SPE-GC). **American Journal of Environmental Engineering**, v. 2, n. 3, p. 58-68, 2012.

ANTONOVICS, Z.; IRINYI, L.; SIPICZKI, M. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 971-979, 2005.

ASSIS, M. O.; MAMEDE, M. E. O.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, L. S.; ROSA, C. A. *Vitis vinifera* L. grapes yeasts of Equatorial Region. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, p. 718-22, 2012.

ASSIS, M. O.; SANTOS, A. P. C.; ROSA, C. A.; MAMEDE, M. E. O. Impact of a Non-*Saccharomyces* Yeast Isolated in the Equatorial Region in the Acceptance of Wine Aroma. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 759-769, 2014.

BISSON, L. F.; KARPEL J. E. Genetics of yeast impacting wine quality. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 139-162, 2010.

BRASIL. Instrução Normativa N° 24, de 8 de setembro de 2005 (2005). Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13576>>. Acesso em: 15 de março de 2015.

BRASIL. Lei N° 10970 de 12 de novembro de 2004 (2004). Altera dispositivos da Lei n° 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Disponível em: <<http://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/97231/lei-10970-04>>. Acesso em: 15 de março de 2015.

BRASIL. Portaria N°. 283, de 18 de junho de 1998 (1998). Aprova normas e procedimentos para o registro de estabelecimento, bebidas e vinagres, inclusive vinhos e derivados da uva e do vinho e expedição dos respectivos certificados. Disponível em: <<http://www.ivegetal.com.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Referenciada/Portaria%20N%C2%BA%20283%20de%2018%20de%20junho%20de%201998.htm>>. Acesso em: 14 de março de 2015.

CALLEJON, R. M.; CLAVIJO, A.; ORTIGUEIRA, P.; TRONCOSO, A. M.; PANEQUE, P.; MORALES, M. L. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Analytica Chimica Acta**, v. 660, p. 68-75, 2010.

CAPONE, S.; TUFARIELLO, M.; SICILIANO, P. Analytical characterisation of Negroamaro red wines by “Aroma Wheels”. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2906–2915, 2013.

CHEYNIER, V.; SCHNEIDER, R.; SALMON, J. M.; FULCRAND, H. Chemistry of wine. Comprehensive natural products II. **Chemistry and Biology**, v. 3, p. 1119-1172, 2010.

COMITINI F.; GOBBI, M.; DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 28, p. 873-882, 2011.

ESCUDERO, A.; CAMPO, E.; FARINA, L.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 4501-4510, 2007.

FERREIRA, V.; LOPEZ, R.; CACHO, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1659–1667, 2000.

FERREIRA, V.; ORTIN, N.; ESCUDERO, A.; LOPEZ, R.; CACHO, J. Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis quantitative determination, and sensory reconstitution studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4048–4054, 2002.

FERREIRA, V. Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. In: Reynolds, A. **Managing wine quality: Viticulture and wine quality**, Canada: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2010. p. 187.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. (1-2), p. 11–22, 2003.

FUGELANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures**. 2 ed. New York: Springer, 2007. 380 p.

GARCÍA, V.; VÁSQUEZ, H.; FONSECA, F.; MANZANARES, P.; VIANA, F.; MARTÍNEZ C.; GANGA, M. A. Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, p. 226-229, 2010.

GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 15-25, 2006.

GIL, J. V.; MATEO, J. J.; JIMENEZ, M.; PASTOR, A.; HUERTA, T. Aroma compounds in wines as influenced by apiculate yeasts. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 1247-1250, 1996.

GONZÁLEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1018–1025, 2006.

GURBUZ, O.; ROUSEFF, J. M.; ROUSEFF, R. L. Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography olfactometry and gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 3990–3996, 2006.

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

HAZELWOOD, L. A.; DARAN, J. M.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; DICKINSON, J. R. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2259–2266, 2008.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles, Practice, Perception**. San Diego: Academic Press. 3 ed. 2008. 702 p.

JIANG, B.; ZHANG, Z. Volatile compounds of young wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay varieties grown in the Loess Plateau Region of China. **Molecules**, v. 15, p. 9184–9196, 2010.

JOLLY N. P.; AUGUSTYN O. P. H.; PRETORIUS I. S. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 24, n. 2, p. 55–62, 2003.

JUAN, S. F.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; ESCUDERO, A. Aroma chemical composition of red wines from different price categories and its relationship to quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5045–5056, 2012.

KING, E. S.; SWIEGERS, J. H.; TRAVIS B.; FRANCIS, I. L.; BASTIAN, S. E.; PRETORIUS, I. S. Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10829–10837, 2008.

KING, E. S.; KIEVIT, R. L.; CURTIN, C.; SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, L. S.; BASTIAN, S. E. P.; FRANCIS, I. L. The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference. **Food Chemistry**, v. 122, p. 618–626, 2010.

KING, E. S.; FRANCIS, I. L.; SWIEGERS, J. H.; CURTIN, C. Yeast strain-derived sensory differences retained in Sauvignon Blanc wines after extended bottle storage. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 62, p. 366–370, 2011.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, J. **The Yeasts, A Taxonomic Study**. San Diego: Elsevier, 2011.

- LI, H.; TAO, Y. S.; WANG, H.; ZHANG, L. Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 287–292, 2008.
- LOPANDIC, K.; TIEFENBRUNNER, W.; GANGL, H.; MANDL, K.; BERGER, S.; LEITNER, G.; ABD-ELLAH, G. A.; QUEROL, A.; GARDNER, R. C.; STERFLINGER, K.; PRILLINGER, H. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1063–1075, 2008.
- MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Evaluation of fermented grape must. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 281-284, 2007.
- MAMEDE, M. E.O; CARDELLO, H.M.A.B; PASTORE, G. M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p.63-68, 2005.
- MANDELLI, F.; ZANUS, M. C. O clima e a safra vinícola. In: GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TORNIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Embrapa, 2009. p. 31-34.
- MEILGAARD, M. C.; CARR, B. T.; CIVILLE, G. V. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed. Boca Raton: CRC, 2007. p. 4-27, 275-276.
- MENDOZA, L. M.; DE NADRA, M. C; BRU, E; FARÍAS, M. E. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts in mixed culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 229-237, 2009.
- MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 285-294, 2005.
- MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 231-238, 2008.
- NIKOLAOU, E.; SOUFLEROS E. H.; BOULOUMPASI, E.; TZANETAKIS, N. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. **Food Microbiology**, v. 23, p. 205-211, 2006.
- OUGH, C. S.; AMERINE, M. A. **Methods Analysis of Musts and Wines**. New York: John Wiley e Sons, 1988.
- PEINADO, R. A.; MORENO, J.; BUENO, J. E.; MORENO, J. A.; MAURICIO, J. C. Comparative study of aromatic compounds in two young white wine subjected to pre-fermentative cryomaceration. **Food Chemistry**, v. 84, p. 585–590, 2004.

- PINEAU, B.; BARBE, J.C.; VAN LEEUWEN, C.; DUBOURDIEU, D. Examples of perceptive interactions involved in specific “red-“ and “black-berry” aromas in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3702- 3708, 2009.
- PLATA C.; MILLAN C.; MAURICIO J. C.; ORTEGA J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 20, p. 217–224, 2003.
- RAZOTE, E. B.; MAGHIRANG, R. G.; SEITZ, L. M.; JEON, I. J. Characterization of volatile organic compounds on airborne dust in a swine finishing barn. Trans. **American Society of Agricultural Engineers**, v. 47, n. 4, p. 1231-1238, 2004.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B; LONVAUD, D. A. **Tratado de Enología**. 1. Microbiología del vino - Vinificaciones. 2. Química del vino – Estabilización y tratamientos. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2003. 655 p.
- RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; BUBOURDIEU, D. **Handbook of enology. The chemistry of wine and stabilization and treatments**. Chichester: J. Wiley, 2006. 441 p.
- RICHTER, C. L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; PUGH, T. Comparative metabolic footprinting of a large number of commercial wine yeast strains in Chardonnay fermentations. **FEMS Yeast Research**. v. 13, p. 394-410, 2013.
- ROBINSON, A. L.; S.E. EBELER, S. E.; HEYMANN, H.; BOSS, P. K.; SOLOMON, P. S.; TRENGOVE, R. D. Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 10313-10322, 2009.
- ROBINSON, A. L.; BOSS, P. K.; HEYMANN, H.; SOLOMON, P. S.; TRENGOVE, R. D. Influence of yeast strain, canopy management, and site on the volatile composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines from western Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3273-3284, 2011.
- ROBINSON, A. L.; BOSS, P. K.; SOLOMON, P. S.; TRENGOVE, R. D.; HEYMANN, H.; EBELER S. E. Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 65, n.1, 2014.
- ROJAS, V.; GIL, J., PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 181–188, 2003.
- ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n. (1-2), p. 169–180, 2003.
- ROSSOUW, D.; OLIVARES-HERNANDES, R.; NIELSEN, J.; BAUER, F. F. Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology

and metabolism during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 6600-6612, 2009.

SÁENZ-NAVAJAS, M.P.; CAMPO, E.; CULLERÉ, L.; FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; VALENTIN, D.; FERREIRA, V. Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 5574-5585, 2010.

SHINOHARA, T. Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 49, p. 2211-2212, 1985.

STONE, H.; SIDEL, J. L. Descriptive Analysis. In: STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**, Academic Press, 2004. p. 215-235.

SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S. Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology*, v. 57, p. 131-175, 2005.

TAO, Y.; ZHANG, L. Intensity prediction of typical aroma characters of Cabernet Sauvignon wine in Changli County (China). *Food Science and Technology*, v. 43, p. 1550-1556, 2010.

TESEVIC, V., NIKICEVIC, N., MILOSAVLJEVIC, S., BAJIC, D., VAJS, V., VUCKOVIC, I.; VUJISIC, L.; DORDEVIC, I.; STANKOVIC, M.; VELICKOVIC, M. Characterization of volatile compounds of "Drenja", an alcoholic beverage obtained from the fruits of cornelian cherry. *Journal of the Serbian Chemical Society*, V. 74, p. 117-128, 2009.

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

VIANA F.; GIL, J. V.; GENOVES, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, v. 25, p. 778-785, 2008.

VIANA, F.; GIL, J. V.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, p. 68-74, 2009.

VIANA, F.; BELLOCH, C.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 235-240, 2011.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 3, p. 319-324, 2002.

ZWANK, L.; SCHMIDT, T. C.; HADERLEIN, S. B.; BERG, M. Simultaneous determination of fuel oxygenates and BTEX using direct aqueous injection gas chromatography mass spectrometry (DAI-GC/MS). **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 9, p. 2054-2059, 2002.

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

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

## APÊNDICES

**Apêndice A.** Ficha para avaliação da aceitação e intenção de compra (utilizando escala hedônica de nove pontos) e intenção de compra (utilizando uma escala de atitude de cinco pontos) das amostras fermentadas pelas não-*Saccharomyces* isoladamente e em combinação com a *S. cerevisiae*.

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
Sexo: M ( ) F ( ) Data: \_\_\_\_\_

Por favor, avalie as amostras codificadas de mosto de uva da esquerda para a direita e utilize a escala abaixo para registrar o quanto você gostou ou desgostou das amostras.

- 9-gostei muitíssimo
- 8-gostei muito
- 7-gostei moderadamente
- 6-gostei ligeiramente
- 5-nem gostei/nem desgostei
- 4-desgostei ligeiramente
- 3-desgostei moderadamente
- 2-desgostei muito
- 1-desgostei muitíssimo

Amostra (código)	Nota

Por favor, com relação à intenção de compra, você:

- 1 – Certamente compraria
- 2 – Provavelmente compraria
- 3 – Talvez compraria / Talvez não compraria
- 4 – Provavelmente não compraria
- 5 – Certamente não compraria

Amostra (código)	Nota

Justificativa (opcional):

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_