

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Alberto Rodrigo de Queirós Bastos Barbosa

**Estudo do comportamento de duas estirpes
de *Saccharomyces cerevisiae* na produção
de espumante pelo método clássico**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob orientação do
Professor Doutor José Maria Marques Oliveira
e da
Mestre Isabel Araújo

Nome Alberto Rodrigo de Queirós Bastos Barbosa

Título dissertação: Estudo do comportamento de duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de espumante pelo método clássico.

Orientadores: Professor Doutor José Maria Marques Oliveira e Mestre Isabel Araújo

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, Ramo Tecnologia Química e Alimentar.

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, 31/01/2017

Assinatura: _____

“A dúvida é o alimento do conhecimento.”

Raul Minh'alma

Agradecimentos

A realização deste projeto não seria possível sem o apoio e colaboração de algumas pessoas e entidades. Desde já fica aqui o meu sincero agradecimento a todos que tornaram esta realização possível.

Começo desde já os meus agradecimentos pelos intervenientes diretos, pois proporcionaram fazer um trabalho na área que gosto, ao Doutor José Maria Oliveira, por todo o apoio, orientação e paciência ao longo deste tempo, à Mestre Isabel Araújo, pela orientação e disponibilidade imediata demonstrada em todos os processos necessários para a realização desta dissertação, à Engenheira Eugénia Vieira e ao Mestre João Drumonde Neves pelo apoio prático em laboratório e incentivo, à empresa VINALIA – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura.

Quero agradecer aos meus amigos, Carlos Pereira, Joana Antunes, Nuno Braga, Joana Rodrigues, Telma Taveira, Élio Silva, Ricardo Sampaio, Norberto Freitas e Tiago Mendes que não só me incentivaram e ajudaram como também ao longo do curso me deram apoio para nunca desistir.

Aos meus tios António e Anabela que muito pediram por mim, à minha avó Laurinha que muito terá pedido por mim no céu e ao meu avô Acácio que tudo fez em vida para que o neto fosse um Homem.

Aos meus dois e queridos irmãos Vasco Barbosa e José Nelson Barbosa que sempre me deram uma palavra de incentivo e de força para finalizar este projeto.

Um especial agradecimento à pessoa que todos os dias me dá força para viver e ser feliz, Elizabete Oliveira, deste o que faltava para isto ser possível, muito obrigado meu amor.

E por fim, quem mais força fez para tudo isto, quem mais sofreu, a minha querida MÃE e o meu querido PAI, isto também é vosso.

Sumário

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o comportamento de duas estirpes de leveduras na produção de vinho espumante branco. Além disso foi também foco do trabalho avaliar se a imobilização da levedura não comercial permite eliminar a etapa *rémuage* necessária na produção de espumante pelo método clássico.

Na elaboração do vinho base foi preparado um inóculo com a levedura a estudar, e posteriormente foi elaborado o vinho base. As estirpes foram previamente selecionadas pelo seu excelente potencial enológico demonstrado anteriormente. Na produção do vinho base foi vinificado um mosto industrial dessulfitado (castas *Arinto*, *Avesso*, *Trajadura* e *Loureiro*).

Foi elaborado um vinho base em várias cubas de 20 L, numa estação capaz de reproduzir as condições gerais de fermentação utilizadas em adega. Foram preparadas 12 cubas com várias estirpes para selecionar a estirpe que melhor capacidade teria para produzir o vinho espumante numa segunda fermentação. O processo fermentativo foi acompanhado pela monitorização, através de FTIR, da densidade e temperatura do mosto.

Após a elaboração do vinho base foram preparadas várias amostras de espumante com as leveduras imobilizadas e em suspensão (método clássico). A levedura comercial (amostra padrão) e a estirpe em estudo foram encapsuladas num gel de alginato de cálcio. Durante todo o processo de espumantização a pressão de CO₂ foi monitorizada através de um manómetro criado. Posteriormente, e de seguida à abertura das garrafas para prova sensorial, foram avaliados os parâmetros físico-químicos por HPLC, para caracterizar os espumantes. Os espumantes foram avaliados sensorialmente por provadores não treinados.

O vinho base foi produzido normalmente com boa qualidade base para a realização do espumante e na produção dos espumantes houve produção de etanol e CO₂. As amostras com a levedura proposta para comparação com a comercial tiveram resultados considerados bons na produção de espumante.

Está-se perante uma levedura que a nível de limpidez e turvação obteve bons resultados, resultado esse que interessa para a eliminação da etapa *rémuage*.

Abstract

The objective of this work was to evaluate and compare the behavior of two yeast strains in the production of white sparkling wine. In addition, it was also the focus of the study to evaluate if the immobilization of non-commercial yeast allows to eliminate the necessary *rémuage* step in the production of sparkling wine by the classical method.

In the preparation of the base wine an inoculum was done with the yeast to be studied, and later the base wine was elaborated. The strains were previously selected for their excellent oenological potential previously showed. In the production of the base wine, a desulfited industrial must was vinified (*Arinto, Avesso, Trajadura* and *Loureiro* varieties).

A base wine was produced in several 20 L tanks at a station capable of reproducing the general fermentation conditions used in the cellar. Twelve vats with various strains were prepared to select the strain that would best be able to produce the sparkling wine in a second fermentation. The fermentation process was followed by FTIR monitoring of the must density and temperature.

After preparation of the base wine several samples of sparkling wine were prepared with immobilized and suspended yeasts (classical method). Commercial yeast (standard sample) and the strain under study were encapsulated in a calcium alginate gel. Throughout the foaming process the CO₂ pressure was monitored through a manometer created. Subsequently, and after the aperture for sensorial testing, the physical-chemical parameters were evaluated by HPLC, to characterize the sparkling wines. The sparkling wines were submitted to sensory evaluation by untrained tasters.

The base wine was normally produced with good quality base for the realization of the sparkling wine and in the production of the sparkling wines there was production of ethanol and CO₂. The samples with the yeast proposed for comparison with the commercial one had results considered good in the production sparkling wine.

We are faced with a yeast that, in terms of clarity and turbidity, obtained good results, a result that is of interest for the elimination of the *rémuage* stage.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Sumário	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Motivação e objetivos do trabalho.....	1
1.2. A VINALIA – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura	2
1.3. Estrutura da dissertação	2
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Vinho espumante	5
2.2. Métodos de espumantização.....	8
2.3. Uso de leveduras imobilizadas.....	11
2.4. Utilização de HPLC e de FTIR no controlo de qualidade nos vinhos	14
2.4.1. HPLC	14
2.4.2. FTIR.....	15
2.5. Análise Sensorial de vinhos espumantes.....	16
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1. Preparação do inóculo	20
3.2. Produção do vinho base	20
3.3. Elaboração do vinho espumante	22

3.3.1. Encapsulação das leveduras	24
3.3.2. Monitorização do CO ₂	24
3.4. Controlo de qualidade nos vinhos	25
3.4.1. Monitorização da fermentação alcoólica dos vinhos base	25
3.4.2. Caracterização dos vinhos espumantes	26
3.4.2.1. Parâmetros físico-químicos.....	26
3.4.2.2. Prova organolética.....	27
4. Resultados e Discussão	29
4.1. Vinhos base	29
4.2. Vinhos espumantes	35
4.2.1. Caracterização físico-química	35
4.2.2. Monitorização da pressão do CO ₂	39
4.2.3. Análise sensorial	40
5. Conclusões e considerações finais.....	45
Referências bibliográficas	47
Anexos	51
Anexo A. Monitorização da pressão do CO ₂	51
Anexo B. Curvas calibração das análises por HPLC.	52

Índice de Figuras

Figura 1 – Ilustração representativa de levedura imobilizada em alginato.	12
Figura 2 – Ilustração representativa da gelificação	13
Figura 3 – Etapas do trabalho elaborado.	19
Figura 4 – Organograma preparação do vinho base.	21
Figura 5 – Estação piloto usada na elaboração do vinho base.	21
Figura 6 – Organograma da preparação do vinho espumante.	23
Figura 7 – Manómetro para avaliação da produção de CO ₂ nas amostras de espumante.	25
Figura 8 – Esquema ilustrativo de uma análise FTIR no Oenofoss TM	26
Figura 9 – Sala de provas organoléticas.	28
Figura 10 – Ficha de provas utilizada na avaliação dos espumantes.	28
Figura 11 – Variação da densidade (<i>d</i>) ao longo do tempo de fermentação (<i>t</i>) do vinho base pela estirpe E.	31
Figura 12 – Gráfico da variação da concentração dos açúcares – glucose + frutose, G+F – (C) e formação de etanol (TAV).	32
Figura 13 – Valor do pH para as várias cubas com a estirpe E ao longo do tempo (<i>t</i>) de fermentação.	33
Figura 14 – Comparação dos valores de TAV do vinho base e das amostras de espumante.	37
Figura 15 – Gráfico relativo à monitorização da pressão (<i>p</i>) conferida pela produção de CO ₂ ao longo do tempo (<i>t</i>) da segunda fermentação alcoólica.	40

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Inóculo adicionado e respectivas cubas	20
Tabela 2 – Identificação das amostras	24
Tabela 3 – Valores da densidade dos mostos durante a fermentação	30
Tabela 4 – Concentração (C) dos açúcares, glucose e frutose, após segunda fermentação, determinada por HPLC, com respectivos erros calculados para 95 % de confiança	36
Tabela 5 – Concentração de glicerol (C) dos espumantes, com respectivos erros calculados para 95 % de confiança.....	38
Tabela 6 – Concentração (C) dos ácidos orgânicos dos espumantes, com respectivos erros calculados para 95 % de confiança	38
Tabela 7 – Valor do pH após segunda fermentação obtidos por FTIR.	39
Tabela 8 – Mediana dos valores obtidos no exame visual dos espumantes.....	41
Tabela 9 – Mediana dos valores obtidos no exame olfativo dos espumantes.....	42
Tabela 10 – Mediana dos valores obtidos no exame gustativo dos espumantes	43
Tabela 11 – Mediana dos valores obtidos na apreciação global dos espumantes	44

Lista de siglas, variáveis e abreviaturas

Siglas

- CVRVV – Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
DO – Denominação de Origem
FA – Fermentação alcoólica
FML – Fermentação malolática
FTIR – *Fourier Transform InfraRed Spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)
GC – *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência)
IGP – Indicação geográfica protegida
IVV – Instituto da Vinha e do Vinho, I.P.
MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)
OIV – *International Organisation of Vine and Wine* (Organização Internacional da Vinha e do Vinho)
YPD – *Yeast Extract Peptone Dextrose* (extrato de levedura peptona dextrose)
UE – União Europeia

Variáveis

- A – Área
AT – Acidez total
C – Concentração
 $C_{\text{máx}}$ – Concentração máxima
D – Densidade
DO – Densidade ótica
 R^2 – *Coefficiente* de correlação
t – Tempo
TAV – Título Alcoométrico Volúmico

Expressões do latim

- e.g.* – por exemplo, do latim *Exempli gratia*
et al. – e outros, do latim *et alli*
i.e. – isto é, do latim *id est*

1. Introdução

1.1. Motivação e objetivos do trabalho

A elaboração de espumantes pelo método clássico é feita há muitos anos em todo o Mundo, tendo a sua origem em França. Em Portugal, este método já é praticamente utilizado por todas as empresas vinícolas e tem vindo a ser alvo de investigação e desenvolvimento no sentido de melhorar o produto e aumentar a qualidade.

Numa primeira fase, na vinificação, a etapa da fermentação alcoólica é a mais importante, sendo realizada por leveduras. As leveduras, têm a capacidade de transformar açúcares (glucose e frutose), provenientes das uvas, em etanol e dióxido de carbono, e muitos outros produtos secundários, através de reações bioquímicas. Faz parte da elaboração de espumante a etapa de elaboração do vinho base, sendo que numa primeira fase é necessário transformar o mosto de uvas brancas em vinho, através da fermentação alcoólica, e numa fase posterior uma segunda fermentação alcoólica em garrafa.

O aspeto visual num espumante tem muito relevo, sendo que a sua limpidez é um dos parâmetros mais avaliados em provas organoléticas, bem como a sua cor e efervescência. Neste estudo foi dada mais importância à limpidez e à efervescência. No caso da limpidez, a importância deste parâmetro prende-se com o propósito deste estudo, que foi investigar se a levedura proposta a comparar tem melhor capacidade do que a levedura comercial para elaborar um espumante com menos turvação nas várias técnicas aplicadas. Quanto à efervescência, ela é resultante da segunda fermentação em garrafa, ou seja, é o resultado do metabolismo da levedura. Esta segunda fermentação irá acrescentar também características aromáticas interessantes em função de cada estirpe de levedura, bem como a produção de CO₂.

Foi proposta a comparação do comportamento de uma estirpe de levedura na elaboração de vinho espumante pelo método clássico com outra já existente no mercado de vinificação, de modo a dar continuidade ao estudo do comportamento das estirpes em vinhos que a empresa tem vindo a elaborar. O objetivo desta dissertação foi o de verificar se a estirpe de interesse consegue fazer uma segunda fermentação em garrafa e comparar as características físico-químicas e organoléticas com

uma levedura comercial. Foi proposto verificar utilizando as leveduras da empresa na forma imobilizada, verificando assim se têm boa capacidade para produzir espumante de *vinho verde* branco com pouca turvação, evitando desta forma a etapa *rémuage* que faz parte da elaboração de espumante pelo método clássico.

1. 2. A VINALIA – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura

A elaboração desta dissertação decorreu na empresa VINALIA – Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, um *Spin-off* académico da Universidade do Minho, criado em 2006, que conta com o apoio de Professores e investigadores da mesma instituição como mentores científicos. Como interlocutor pluridisciplinar em investigação e desenvolvimento para o setor vitivinícola, a VINALIA disponibiliza uma vasta gama de serviços para os produtores de vinhos: consultadoria com vista à otimização da qualidade das uvas, das vinificações, e da estabilização e conservação de vinhos; análises químicas, físicas e microbiológicas dos vinhos; análise sensorial, e ainda estudos de mercado. A empresa organiza também formações à medida das necessidades das empresas ou associações, como é o exemplo de cursos à iniciação da prova de vinhos (<http://www.vinalia.com.pt>). A empresa possui uma estação piloto com 12 fermentadores de 20 L cada, com o acoplamento de sensores para monitorizar em tempo real os parâmetros mais significativos da fermentação.

A dissertação com o título “Estudo do comportamento de duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de espumante pelo método clássico”, foi proposta pela empresa VINALIA e foi realizada no âmbito da unidade curricular Dissertação em Engenharia Biológica do 5.º ano do Mestrado Integrado em Engenharia Biológica.

1. 3. Estrutura da dissertação

Este documento é constituído por 5 capítulos: introdução, revisão bibliográfica, materiais e métodos, resultados e discussão e por fim as conclusões e considerações finais.

O capítulo 1 apresenta a empresa em que o estudo foi realizado, define os objetivos, e o propósito da realização da tese e por fim a sua estrutura.

No capítulo 2 é feita uma revisão bibliográfica visando os vinhos espumantes, os vários métodos de processo, incluindo o uso de leveduras imobilizadas, e por fim as análises físico-químicas e a avaliação organoléptica usualmente necessárias para caracterizar o produto.

No 3.º Capítulo apresenta-se a explicação de toda a experiência através dos materiais e métodos, primeiramente a realização do inóculo de levedura em suspensão, de seguida a produção de vinho base à escala piloto, depois a produção do vinho espumante onde se explica o encapsulamento das leveduras e a monitorização do CO₂, e por fim é explicado todo o controlo de qualidade nos vinhos produzidos.

No capítulo 4 são apresentados todos os resultados, em quatro partes, a caracterização do vinho base, a caracterização do vinho espumante, a monitorização do CO₂ e a análise sensorial.

No último capítulo são apresentadas as conclusões finais e perspectivas de trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Vinho espumante

Os vinhos espumantes representam o grupo mais importante dos considerados vinhos especiais (Banu, 2000). São vinhos caracterizados por serem efervescentes, e pelo regulamento n.º (CE) 491/2009, são divididos em vinhos espumantes naturais, vinhos espumantes de qualidade, vinhos espumantes gaseificados e vinhos frisantes naturais e gaseificados. Os vinhos espumantes naturais são obtidos por 1.^a ou 2.^a fermentação, dependendo do método a ser usado, de mosto fresco ou vinho, têm um título alcoométrico volúmico total (TAV_t) maior ou igual a 8,5 %, com uma pressão, à temperatura ambiente, na abertura da garrafa, de 3 bar, sendo o dióxido de carbono libertado exclusivamente resultante da espumantização. O vinho espumante natural de qualidade é obtido a partir de um vinho base com TAV_t maior ou igual a 9 % e a pressão, à temperatura ambiente, na abertura da garrafa, é superior ou igual a 3,5 bar. Os vinhos espumantes gaseificados são resultantes de um vinho base sem denominação de origem (DO) ou indicação geográfica protegida (IGP), com uma pressão, à temperatura ambiente, na abertura de garrafa, de 3 bar, sendo o CO₂ adicionado totalmente ou parcialmente. O vinho frisante é um produto com pouco CO₂, cerca de 1,5 bar, e é produzido naturalmente no processo de fermentação da uva, tendo praticamente a metade do CO₂ dos espumantes. Os mais conhecidos vinhos frisantes são os *vinhos Lambrusco*, produzidos em Itália, conhecidos como lambruscos. Em vitivinicultura são vários os métodos de produção de "vinhos espumantes", termo que é exclusivamente usado em vinhos que tenham sido submetidos a fermentação alcoólica num recipiente fechado. Existe também a carbonatação artificial que consiste na injeção de dióxido de carbono gasoso (CO₂); os vinhos efervescentes elaborados por este método são denominados "vinhos espumantes gaseificados". Já o *Champagne* é o vinho espumante mais prestigiado e conhecido mundialmente.

Vinhos espumantes naturais são vinhos efervescentes que contêm dióxido de carbono de origem endógena, quer isto dizer que o CO₂ é produzido na segunda fermentação alcoólica realizada pela levedura. Na abertura da garrafa e ao deitar no copo, o vinho espumante produz uma efervescência forte e longa devido à libertação de dióxido de carbono. O CO₂ será primariamente

ocultado e aparecerá de novo na superfície do líquido (Cotea, 2005; Pomohaci e Stoian, 2001). A qualidade destes vinhos é apreciada pelo sabor, espuma contínua e a subtileza das pérolas (Petcu, 2006; Tapaloaga, 2013).

A Portaria n.º 924/2004, de 26 de julho, refere que em Portugal os vinhos espumantes podem ter as seguintes menções: “Reserva” – menção reservada a vinho espumante de qualidade, vinho espumante com indicação geográfica e vinho espumante com denominação de origem, desde que tenha entre 12 e 24 meses de engarrafamento antes do transvasamento, transbordamento ou extração da borra; “Super-reserva” ou (Extra-reserva) – menção reservada a vinho espumante de qualidade, vinho espumante com indicação geográfica e vinho espumante com denominação de origem, desde que tenha entre 24 e 36 meses de engarrafamento antes do transvasamento, transbordamento ou extração da borra; “Velha reserva” ou (Grande reserva) – menção reservada a vinho espumante de qualidade, vinho espumante com indicação geográfica e vinho espumante com denominação de origem, desde que tenha mais de 36 meses de engarrafamento antes do transvasamento, transbordamento ou extração da borra; “Colheita selecionada” – menção prevista para vinho desde que acondicionado em garrafa de vidro, apresente características organoléticas destacadas e conste de uma conta-corrente específica, sendo obrigatória a indicação do ano de colheita.

Os vinhos espumantes também podem ser classificados pelo teor de açúcar, pelo Regulamento (CE) n.º 607/2009, de 14 de julho. Tem-se o “bruto natural”, com teor de açúcares inferior a 3 g L^{-1} (estas menções só podem ser utilizadas no caso de produtos a que não tenha sido adicionado açúcar depois da fermentação secundária); o “extra bruto”, com teores de açúcares compreendido entre 0 g L^{-1} e 6 g L^{-1} ; o “bruto”, com teores de açúcares inferior a 12 g L^{-1} , o “extra seco”, com teores de açúcares compreendido entre 12 g L^{-1} e 17 g L^{-1} ; o “seco”, com teores de açúcares compreendido entre 17 g L^{-1} e 32 g L^{-1} ; o “meio seco”, com teores de açúcares compreendido entre 32 g L^{-1} e 50 g L^{-1} e, por último, o “doce”, com teores de açúcares superior a 50 g L^{-1} .

O *Champagne* é produzido de acordo com os regulamentos da OIV (*International Organisation of Vine and Wine*), numa área delimitada, área essa situada numa região nordeste de França, região de Champagne. As castas utilizadas são a *Pinot blanc*, a *Pinot meunier* e a *Chardonnay*. A sua produção obedece à utilização de variedades de uvas e técnicas de vinificação rigorosamente definidas. O vinho utilizado na segunda fermentação é denominado de vinho base e é composto por uma mistura de

vários vinhos da região que lhe confere uma qualidade mais harmoniosa. Os vinhos base têm um título alcoométrico volúmico pouco elevado (10 % a 11,5 %), e com um teor de acidez que permita a obtenção de *Champagne* com uma frescura adequada (8 g L⁻¹ a 9 g L⁻¹ de ácido tartárico) e pH aproximado de 3,2 (Blouim e Guimberteau, 2000). Além disso, são parâmetros importantes o baixo teor de açúcares residuais (menos de 2 g L⁻¹) e a baixa acidez volátil (inferior a 1 g L⁻¹), como ácido acético (Giovannini e Manfroi, 2009).

O espumante espanhol “Cava” é produzido em zonas de denominação de origem da região do CAVA, situada na Catalunha e é produzido por um método tradicional que consiste em duas fases. Numa primeira fase no caso dos espumantes brancos, o vinho base é elaborado com as castas, *Macabeo*, *Xarel·lo* e *Parellada*, que durante nove meses estagia em barricas de carvalho. Numa segunda fase é feita a fermentação alcoólica numa garrafa enrolhada, seguida de estágio em contato com borras pelo menos 9 meses. As características do vinho de base, a levedura e o tempo de envelhecimento em contacto com as borras são os fatores que mais influenciam a qualidade do espumante “Cava”. O processo implica mudanças químicas e bioquímicas que envolvem a modificação da qualidade final do vinho.

O espumante *Crémant* é produzido pelo método tradicional usado no *Champagne* numa área de denominação particular em França e com essencialmente as castas *Chardonnay* e *Pinot noir*. Em função da menção pode variar o estágio e a mistura de vinho do ano anterior. O estágio do vinho base em barrica pode ir de 9 meses a 24 meses.

No caso dos espumantes de *Vinho Verde*, os vinhos base apresentam ótimas características para a sua produção, devido sobretudo ao grande potencial de algumas castas da Região. A Região dos *Vinhos Verdes* produz vinhos que, pelas suas características de acidez natural e teor alcoólico relativamente baixo, tem grandes potencialidades para a produção de espumantes de qualidade. O *Vinho Verde Espumante* tem por base um *Vinho Verde*, podendo apenas ser elaborado pelo método clássico, em que a segunda fermentação ocorre em garrafa, durante um período mínimo de 9 meses (CVRVV, 2017).

2.2. Métodos de espumantização

São vários os métodos de espumantização. O mais antigo é denominado por ancestral, e é efetuado através de uma fermentação alcoólica parcial do vinho e submetido a uma filtração com temperaturas entre os $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$; de seguida é feita uma adição de sacarose em concentrações de 50 g L^{-1} a 100 g L^{-1} e posteriormente é engarrafado para maturação (LaVilla e Nenes, 2009).

Outro dos métodos utilizado é o *transfer method* (método de transferência) que consiste em usar um vinho base e fazer uma 2.^a fermentação parcial em garrafa. De seguida o vinho é colocado em cubas e posteriormente, é realizada uma filtração tangencial e colocado novamente em cubas com licor de expedição. Por fim é engarrafado usando as mesmas garrafas lavadas usadas na 2.^a fermentação (LaVilla e Nenes, 2009).

O método contínuo consiste em usar um vinho base já estabilizado juntamente com açúcar e levedura num conjunto de cubas integradas, cubas essas que permitem fazer a 2.^a fermentação, enriquecimento e clarificação, e também a refrigeração para estabilização do CO_2 . O período de tempo usado neste método é de 30 dias. Por fim é engarrafado e feita a maturação (LaVilla e Nenes, 2009)

Quase semelhante aos 3 processos anteriores tem-se o método "*Charmat*". A diferença está no uso de cubas separadas para as várias etapas. Usa-se uma cuba de fermentação durante 10 dias e de seguida uma filtração tangencial, é transferido para uma segunda cuba onde é adicionado o licor de expedição e por fim engarrafado (LaVilla e Nenes, 2009).

Por fim tem-se o método clássico, o mais usado e mais conceituado em Portugal, ou também denominado tradicional, que consiste em usar um vinho base e fazer uma 2.^a fermentação completa em garrafa durante aproximadamente 60 dias, as garrafas com o vinho base e a mistura de levedura e sacarose são armazenadas em locais com condições de temperatura constante de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde irá ocorrer a segunda fermentação alcoólica. Depois de findada a fermentação é feita a *rémuage*, que consiste em colocar as garrafas com gargalo para baixo a um ângulo de 45° e ir rodando $\frac{1}{4}$ de volta ao longo de 15 dias até que os depósitos de levedura se encontrem no gargalo. Este passo tem como objetivo permitir a sedimentação das leveduras inativas, que realizaram a fermentação em garrafa, para que não fique um espumante turvo. Ao fim de 15 dias é feito o *dégorgement* com o

objetivo de retirar definitivamente as leveduras, num processo rápido, em que é retirada a cápsula. No processo, após congelamento do gargalo, deixa-se expelir, pela pressão, a pequena porção de leveduras depositada no gargalo, sendo também adicionado o licor de expedição e por fim enrolhado e colocado o arame. Após a conclusão deste processo, o espumante é colocado em maturação em caves. No caso dos *Champagne*, *Cava* e *Crémants* todo o processo é igual e só varia o tempo de maturação. (Cavazzani, 1989).

Um bom vinho base de qualidade, uma seleção de estirpes e uma temperatura controlada são requisitos fundamentais para garantir um processo de segunda fermentação correta. A seleção de levedura é um dos fatores mais importantes que deve ser considerado nos processos de fermentação secundária para a produção de vinho espumante. Na verdade, afirma-se que a estirpe de levedura usada para a refermentação poderá desempenhar um papel importante no processo de envelhecimento e que pode afetar a composição final dos vinhos espumantes. Tal facto deve-se à particularidade, da segunda fermentação ocorrer em garrafas seladas sem dissipação de compostos. Muitas estirpes de *S. cerevisiae* produzem vinhos espumantes de elevada qualidade, mas com características diferentes. A levedura pode afetar a qualidade do vinho espumante, tal como a variedade de uva. De facto, algumas estirpes de levedura produzem compostos voláteis que contribuem para o aroma final originando uma boa qualidade de vinho espumante a partir de vinhos base não-aromáticos. Da mesma forma, um vinho espumante produzido usando uma levedura selecionada e um vinho base aromático, pode levar ao produto final com muito aroma (Zambonelli, 2006).

A elaboração do espumante segue certos procedimentos que visam proteger a acidez e a fineza do aroma da uva. Para atingir estes objetivos, a colheita é realizada à mão, de modo a eliminar cachos com problemas como a podridão, e também, aquando do enchimento moderado das caixas, deverá haver cuidado para não romper os bagos e possibilitar o ataque de bactérias acéticas. As uvas são transportadas o mais rápido possível, sendo assim protegidas, durante o transporte, do sol, das altas temperaturas e da poeira. Na chegada à adega as uvas são classificadas pela variedade, pela origem, pelo teor de açúcar e pelo estado sanitário (Azevedo e Velloso, 2006).

Uma das características do vinho base para espumante é apresentar estabilidade físico-química adequada, ou seja, uma acidez equilibrada. Por isso, não deve conter quantidade elevada de

substâncias proteicas e elementos minerais, especialmente ferro e cobre, que provoquem turvações. Recomenda-se reduzir o teor de ácido tartárico e de seus respectivos sais através de refrigeração (Rizzon e Miele, 2006).

Ao preparar o engarrafamento, os novos vinhos base são clarificados através de filtração, e colados utilizando cola de peixe (15 mg L⁻¹ a 25 mg L⁻¹) ou gelatina (40 mg L⁻¹ a 70 mg L⁻¹), com ou sem taninos (20 mg L⁻¹ a 40 mg L⁻¹) (Marchal *et al.*, 1997).

O objetivo é fazer um vinho base com um teor moderado de álcool, geralmente um máximo de 11 %, isto porque no caso dos espumantes a segunda fermentação em garrafa produz cerca de 1 % a 1,5 %, sendo o máximo aconselhável de 13 %. O vinho base deve ter um certo nível de acidez total, para garantir o equilíbrio certo no produto acabado. As uvas são colhidas num estado de maturação saudável, e devem ser pressionadas com muito cuidado para evitar o contato com o engaço que lhe dará o amargor resultante e caráter herbáceo. As colheitas deverão ser executadas à mão com posterior triagem de modo a eliminar uvas defeituosas, danificadas ou podres. O objetivo é obter uma percentagem relativamente baixa de uvas estragadas que têm um impacto negativo na qualidade do vinho. As uvas inteiras são transportadas em recipientes contendo 45 kg a 50 kg, com furos para drenar todo o sumo indesejado, evitando o contato com a película, a fermentação acidental, e manter as uvas em condições aeróbicas. Estes recipientes são cuidadosamente lavados após cada utilização. As uvas devem ser pisadas logo após a colheita, sem comprimir, para evitar o contato entre a engaço e sumo, e as várias frações de mosto são mantidos separadamente (Azevedo e Velloso, 2006).

A segunda fermentação requer a inoculação do vinho de base com uma estirpe especial de levedura, isto é, requer uma levedura que consiga realizar fermentação alcoólica em condições diferentes da do vinho base, a levedura tem de conseguir a fermentação em ambientes com etanol e alguma acidez. São usadas geralmente estirpes de *Saccharomyces bayanus*. Devido às condições especiais e exigentes que prevalecem durante a segunda fermentação, as leveduras devem ser capazes de iniciar a fermentação com teor alcoólico entre 8 % e 12 %. As temperaturas deverão rondar os 10 °C, com valores de pH tão baixo quanto 2,8, e com conteúdos de dióxido de enxofre livre até 25 mg L⁻¹. No passado, os frascos eram selados com uma rolha de cortiça, presa com uma braçadeira de metal reutilizável, chamada agrafó, este foi substituído pelo *muselete* possuindo uma coroa de polietileno. O *bidule* é uma cápsula recuada que se coloca no interior do gargalo para ajudar a manter a levedura, sendo coletado durante a *rémuage*, facilitando um *dégorgement* mais limpo. As

tampas metálicas são muito mais baratas e facilmente removidas por máquinas automatizadas. No entanto, Vasserot *et al.* (2001) observaram que a vedação de tampas de garrafa com coroa tem a capacidade de favorecer a acumulação excessiva de sulfureto de dimetilo prejudicando a qualidade final do aroma.

Ao vinho base, adiciona-se uma mistura de leveduras e sacarose, e a segunda fermentação alcoólica ocorre a temperatura controlada, processo que produz gás carbônico naturalmente. A uma temperatura 20 °C, são necessários 24 g L⁻¹ de açúcar para resultar numa pressão 6,08 bar (Saracco e Gozzelino, 1995). A levedura utilizada, costuma ser da espécie *S. cerevisiae*, deve ser inoculada de modo a conter uma população inicial de 10⁶ mL⁻¹ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.3. Uso de leveduras imobilizadas

A produção de vinhos espumantes é um longo processo que segue várias etapas, a maioria delas requer muito tempo e trabalho manual qualificado e dispendioso. Por estas razões, muitas tentativas para simplificar o processo de produção foram feitas ao longo dos anos e, ao mesmo tempo, têm sido realizadas tentativas para preservar as características do produto típico e único. Algumas novas abordagens neste domínio incluem a conceção de procedimentos para acelerar o processo natural de autólise durante a produção de vinho espumante, e da melhoria das leveduras utilizadas para a fermentação secundária (Pozo-Bayon *et al.*, 2009).

A tecnologia de levedura imobilizada para produção de vinho espumante, como mostra a Figura 1, em comparação com o tradicional *Méthode Champenoise*, tem várias vantagens, nomeadamente: o custo, a possibilidade de controlar a fermentação e minimizar a sua duração, com o objetivo de a reduzir drasticamente, ou mesmo eliminar a *rémuage*, resultando em ganho de espaço de armazenamento na adega. Por isto, o processo fermentativo realizado pela levedura é também facilitado, sob uma pressão de CO₂, com as células de levedura parcialmente protegidas contra a toxicidade do etanol (Berovic *et al.*, 2014).

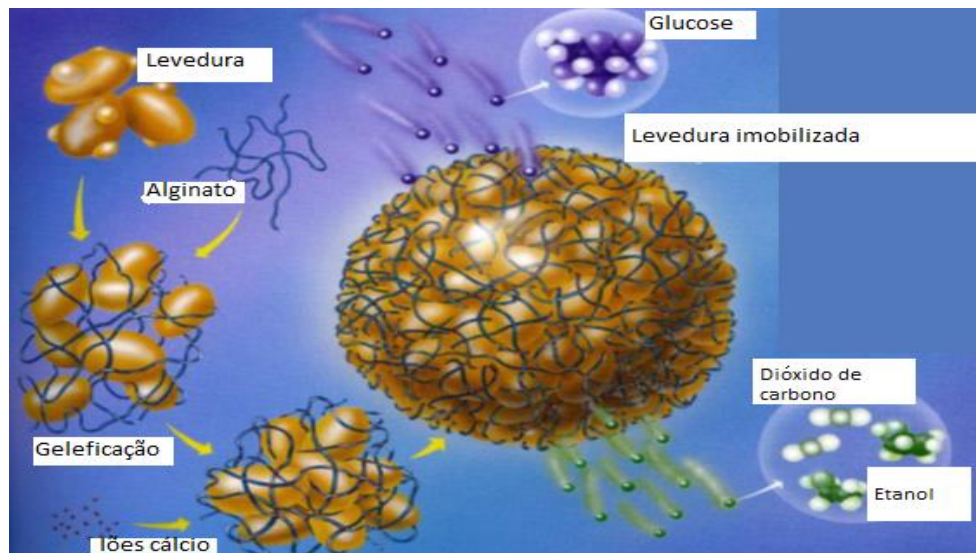


Figura 1 – Ilustração representativa de levedura imobilizada em alginato (adaptado de <http://oregonstate.edu/instruct/bb100/fall12/c2/f2.36z044.jpg>).

A levedura imobilizada reduz a fase de *rémuage*, isto é, reduz a duração total de sedimentação da levedura para alguns segundos. O tamanho das pérolas é um fator determinante na aceleração da sua sedimentação. Nesta técnica, a imobilização não impede a autólise de leveduras e posteriormente o envelhecimento do vinho (Diviès, 1989; Yokotsuka *et al.*, 1997). Os ácidos aminados são absorvidos pelas células de levedura numa fase posterior, sendo libertados no vinho ao longo de um período de maturação. A tecnologia de levedura imobilizada é relativamente nova. Esta tecnologia, em comparação com o método tradicional *Champenoise*, apresenta várias vantagens em relação ao custo, à capacidade de controlar a fermentação e minimizar a sua duração, bem como o resultado da *rémuage* e do *dégorgement*. Eliminando estas fases ganha-se tempo e espaço de armazenamento na adega. Também facilita a fermentação por leveduras, sob pressão de CO₂, com células de levedura parcialmente protegidas contra a toxicidade de etanol e do CO₂. O fator crítico na utilização de leveduras imobilizadas na produção de vinho espumante é o vazamento de células a partir das esferas de gel para a garrafa, o que deixa o vinho com células livres contrariando assim as vantagens mencionadas anteriormente. A forma de evitar isso é a imobilização por revestimento duplo dos grânulos com uma camada de gel, sem microrganismos (Duteurtre *et al.*, 1987; Klein e Wagner, 1986;).

O alginato de sódio é uma substância GRAS, de algas castanhas, usado essencialmente como espessante, emulsionante, estabilizador e agente gelificante na produção de alimentos (Gemeiner *et al.*, 1994). Esta substância foi um dos primeiros polímeros a ser utilizados no aprisionamento de

células microbianas (Bucke, 1987; Scher, 1977). O alginato de sódio reage com íons Ca^+ formando redes (géis), como mostra a Figura 2. A elevada concentração e propriedades do gel de alginato dependem da proporção dos dois monossacarídeos, ácido 1,4- β -D-manurónico (M) e ácido 1,4-L-gulurónico (G), bem como os blocos de MM e GG, sequências irregulares M e G, o seu comprimento de bloco e arranjo. O ácido 1,4-L-gulurónico (G) e os alginatos têm maior capacidade para formar géis.

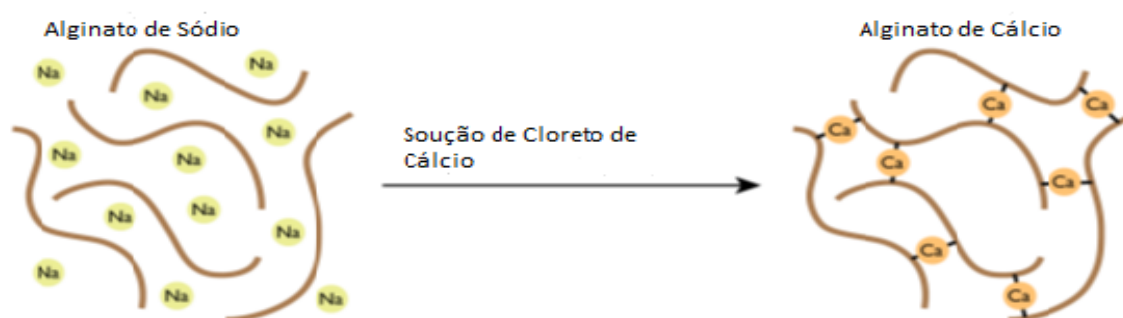


Figura 2 – Ilustração representativa da gelificação (adaptado de <https://scienceandfooducla.wordpress.com/2013/06/11/deconstructed-apple-pie/>).

A forma mais comum de células do alginato é a forma em pérolas com 0,5 mm a 3,5 mm de diâmetro. Estas formam-se quando uma gota de solução de alginato de sódio é mergulhada numa solução de CaCl_2 . Grânulos menores possibilitam a ampliação de cargas celulares e distâncias menores das células para o meio, assim, melhor substrato e difusão de oxigênio. Após a produção das esferas estas são curadas durante 24 h, numa solução de CaCl_2 a 20 g L^{-1} , para que os grânulos sejam endurecidos e se reduza o seu volume a 30 %. As esferas são lavadas com água estéril e introduzidas nas garrafas para a segunda fermentação (Skjak-Braek *et al.*, 1989).

2.4. Utilização de HPLC e de FTIR no controlo de qualidade nos vinhos

A monitorização dos parâmetros físico-químicos é usada para acompanhamento das fermentações e do produto final. Os ácidos orgânicos, o etanol, o glicerol bem como a acidez volátil, frutose e glucose e a acidez total são parâmetros essenciais na caracterização de um vinho.

A qualidade do aroma constitui o primeiro elemento de um vinho de qualidade, e a sua análise é hoje uma ciência multidisciplinar. O aroma pode ser estudado por três abordagens: a composição química, a análise sensorial e a análise olfatométrica. O perfil aromático de um vinho base e de vinhos espumantes é amplamente investigada hoje em dia (Torrens et al., 2004). As análises dos compostos referidos atrás são essencialmente feitas hoje em dia por GC, e a composição química essencialmente por HPLC e FTIR.

2.4.1. HPLC

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação e análise em que a amostra é arrastada por um eluente líquido – fase móvel – através de um adsorvente sólido – fase estacionária. A fase móvel (eluente) é aspirada a partir de um reservatório por uma bomba e circula por todo o sistema a uma pressão elevada, a um determinado caudal e temperatura. A montante da bomba é colocado, normalmente, um filtro para evitar a entrada de pequenas partículas no sistema. A amostra a analisar é introduzida por uma seringa no sistema de injeção (constituído por um *loop* de volume fixo) e é arrastada pelo eluente através da coluna cromatográfica que contém a fase estacionária. Muitas separações são efetuadas a temperatura superior à ambiente, sendo necessário nesse caso termostatar a coluna com o auxílio de um forno. À saída da coluna, as substâncias individualizadas passam por um sistema adequado de deteção (*e.g.* espectrofotómetro, refratómetro, etc.) que deve estar acoplado a um computador possuindo software adequado a aquisição e processamento dos dados.

Esta tecnologia permite analisar, nos vinhos base e nos espumantes, a glucose, a frutose, o etanol, o glicerol e os ácidos orgânicos (cítrico, tartárico, málico, láctico succínico e acético), de modo a ajudar a caracterizá-los (Genisheva *et al.*, 2014).

Atualmente, a técnica HPLC constitui um dos métodos mais poderosos em química analítica, permitindo separar, identificar e quantificar compostos presentes em qualquer amostra solúvel numa matriz líquida (Moreira e Santos 2004).

2.4.2. FTIR

A espectroscopia de Infravermelho por FTIR – *Fourier Transform InfraRed Spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier) veio proporcionar muitas vantagens para a análise de vinho, permitindo uma rápida resposta e com elevada precisão para um diverso número de parâmetros. Bons resultados foram obtidos para etanol, acidez total, e açúcares totais em vinhos doces (Moreira *et al.*, 2002). Na verdade, o etanol, os ácidos orgânicos e outros compostos, presentes em concentrações elevadas no vinho, podem produzir grandes interferências na análise de compostos, como a acidez volátil e os açúcares em vinhos secos, quando as fortes bandas de absorção de infravermelho não diferem significativamente de outros compostos abundantes (Moreira *et al.*, 2002).

A técnica FTIR trouxe vantagens analíticas inúmeras, tais como economia de tempo e a elevada resolução alcançada. A sua aplicação para análise do vinho proporciona excelentes resultados em termos de precisão e exatidão. A aplicação da análise de FTIR para vinho é um método de análise indireto, uma vez que é necessário um método alternativo de análise para os compostos orgânicos e inorgânicos. Estes podem ser determinados se uma calibração que correlaciona o espectro de Infravermelhos e os resultados analíticos de referência. De acordo com a lei de Beer-Lambert, a concentração do composto a ser determinado é diretamente proporcional à sua absorvância num comprimento de onda determinado. Esta relação é afetada pela presença de outros compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda (Moreira *et al.*, 2002).

Indústrias como as de laticínios, carne, vinho, óleos comestíveis, chocolates, comida de animais, produtos farmacêuticos, produtos químicos, combustível biológico, grãos, cerveja, ração, forragem e moagem usam soluções analíticas da FTIR. As soluções incluem a espectroscopia de infravermelho próximo, infravermelho, a tecnologia de raios-X. A solução desenvolvida recentemente para o

controlo de vinho de qualidade é FTIR, que fornece informações sobre os compostos apenas com um teste simples. O equipamento FTIR mede os parâmetros de qualidade do mosto de uva em fermentação e do vinho a partir de uma pequena quantidade de amostra sem tratamento prévio. No caso dos vinhos são medidos sete parâmetros: açúcares, pH, acidez total, ácido málico, etanol, acidez volátil e cor.

Técnica FTIR é simples de usar e não requer o uso de químicos. Uma interface de fácil utilização permite que praticamente qualquer pessoa possa utilizar o instrumento e gravar um resultado da análise válida.

O FTIR é composto por duas unidades modulares construídas em plataformas semelhantes, uma unidade de análise de vinho via Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e uma unidade opcional de coloração no visível (VIS). FTIR é uma técnica rápida, que utiliza uma quantidade mínima de amostra (Russell e Fraser, 1994). O princípio da tecnologia FTIR consiste em analisar a amostra pelo espectro infravermelho, numa faixa espectral entre 780 nm e 10 000 nm. A luz é absorvida pela amostra, e por fim, a absorção é convertida através transformada de Fourier, modelo matemático para uma previsão da concentração de vários constituintes. O método FTIR substitui várias soluções de análise demoradas com um único teste realizado no local. É uma solução analítica, simples e rápida de usar, que mede vários parâmetros de mosto de uvas, mosto durante o processo de fermentação e vinho acabado, tornando possível uma análise mais aprofundada e com maior frequência (Moreira *et al.*, 2002).

2.5. Análise Sensorial de vinhos espumantes

Análise sensorial também pode ser utilizada como um método quantitativo para avaliar a qualidade efetiva de vinho espumante. A avaliação deve ser feita por juízes treinados. Assim, análises químicas e sensoriais podem ser duas técnicas complementares fornecendo assim uma grande quantidade de informações sobre a qualidade do vinho. Por outro lado, alguns trabalhos lidam com a caracterização do perfil de aroma dos vinhos espumantes por olfatométrica (GC-O), devido à dificuldade de deteção de alguns compostos voláteis com elevado impacto olfativo, por detetores instrumentais. Esta técnica não pode prever com precisão a mistura do componente aromático bruto do vinho (Torrens *et al.*, 2004).

Segundo a norma NP 4263:1994, pode-se definir Análise Sensorial ou Exame Organolético como o “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”. O termo organolético é definido como sendo o que “qualifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos”. O exame organolético ou prova sensorial consiste na apreciação através de três dos cinco sentidos: a visão, o gosto e o olfato. Os três exames são realizados pela seguinte ordem:

- i. exame visual;
- ii. exame olfativo;
- iii. exame gustativo.

A visão permite avaliar a intensidade de diferentes parâmetros tais como a cor, a limpidez e a efervescência. Cada casta tem as suas características próprias, e a cor depende de vários fatores, destacando-se o envelhecimento. Nos brancos, o envelhecimento provoca a mudança da cor citrino descorado (vinhos jovens) para dourado (vinhos envelhecidos). No que diz respeito à limpidez, está dependente dos processos tecnológicos a que o vinho esteve sujeito, tais como trasfegas, filtrações, centrifugações, e à presença (ou não) de alterações químicas e microbiológicas. Deve-se inclinar suavemente o copo de modo a criar uma superfície elíptica, portanto maior, para facilitar a observação do vinho. O vinho é composto por uma série de moléculas voláteis com poder odorífero. É com o sentido do olfato que se reconhece e classifica estes compostos. O copo deve ser agitado por forma a facilitar a libertação dos compostos do aroma. Com a aproximação do copo ao nariz, ocorre a sensação que consiste na excitação (inconsciente) do nariz; posteriormente ocorre a deteção/perceção, ou seja, assinala-se a presença da sensação e, por fim, procede-se à identificação, sendo capaz de atribuir um nome à perceção passada (Clarke e Baker, 2004). O gosto é o terceiro e último sentido a ser utilizado. As papilas gustativas encontram-se na superfície da língua. São as células sensoriais que percebem os quatro gostos elementares, amargo, ácido, salgado e doce. Os açúcares (glucose, frutose, entre outros) conferem doçura ao vinho; os ácidos (tartárico, málico, acético, etc.) a acidez. Por sua vez, o gosto a salgado advém dos sais, *e.g.* cloreto de sódio; e o gosto amargo é devido aos compostos fenólicos. O doce é detetado nos primeiros 2 s a 3 s. Ao fim de 5 s a 12 s diminui o doce e aumenta progressivamente o ácido e o salgado. No final, domina a perceção do gosto ácido e fundamentalmente a do gosto amargo (Jackson, 2002). A prova dá-se por concluída

quando o vinho é caracterizado segundo os três exames, a cor/limpeza, a efervescência, a espuma, o tamanho da bolha, a duração da espuma, o aroma e o gosto, levando o provador a concluir a maior ou menor originalidade de um vinho, o seu equilíbrio, harmonia e tipicidade.

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo, estão enunciados os procedimentos experimentais usados nas distintas etapas de produção dos vinhos base e dos espumantes. De início a preparação do inóculo, de seguida a elaboração do vinho base, depois a fase da produção das amostras de espumante e por fim o controlo de qualidade dos vinhos. Foi elaborado um teste a 6 leveduras durante a elaboração do vinho base de modo a ser selecionada a que melhor desempenho demonstrasse. Estas leveduras são propriedade da empresa e foram identificadas neste trabalho como A, B, C, D, E e F. A nomenclatura foi assim escolhida porque são leveduras que a empresa está a caracterizar e a estudar, sendo as mesmas já alvo de sequenciação.

Foram aplicadas 6 leveduras em 12 cubas de 20 L cada. De seguida foi selecionado o vinho base com a levedura E porque além de ser a de interesse para comparar com a levedura comercial de 2.^a fermentação, apresentava um vinho base com menos turvação do que as restantes.

O acompanhamento dos parâmetros físico-químicos no vinho base foi realizado usando a tecnologia FTIR (*Oenofoss*TM). Já para as amostras de espumante o acompanhamento foi feito por HPLC. A monitorização do CO₂ foi realizada pela introdução de um manómetro na rolha de plástico de espumante. As amostras finais de espumantes foram avaliadas por um painel de provadores. Foi seguida a cronologia como representa a Figura 3.

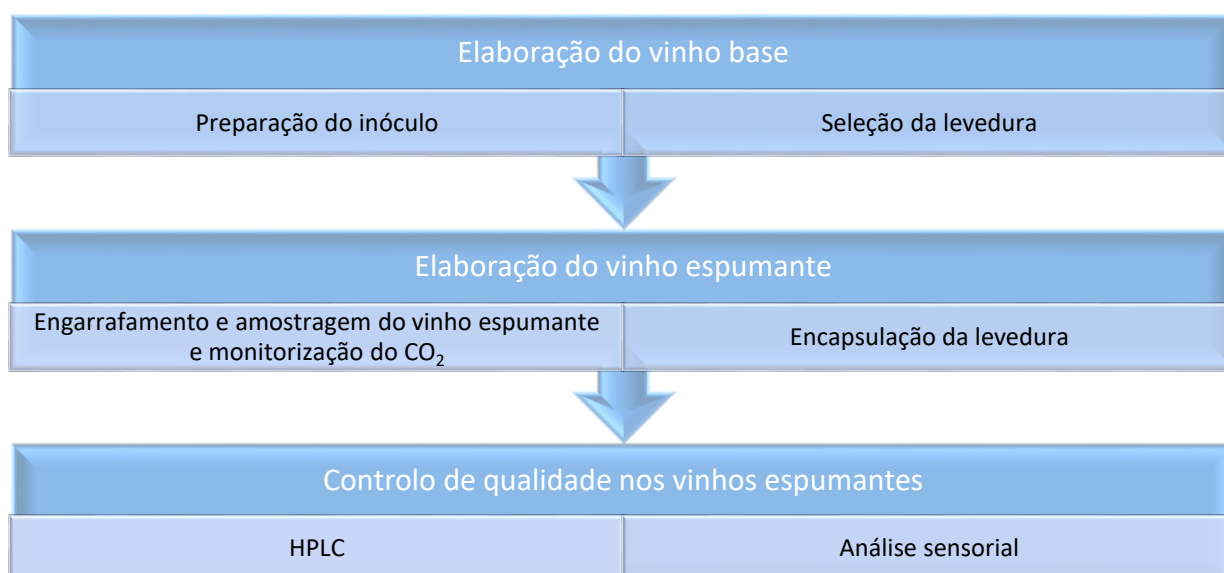


Figura 3 – Etapas do trabalho elaborado.

3.1. Preparação do inóculo

Para as várias leveduras em estudo (A, B, C, D, E e F), a elaboração do inóculo foi realizado da mesma forma. Foi usado meio YPD, glucose 20 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹ e peptona bacteriológica 20 g L⁻¹. Foi à autoclave durante 15 min a 120 °C e depois deixou-se arrefecer. De seguida foi preparado um pré-inóculo de leveduras em 50 mL de YPD deixando crescer durante 48 h. O inóculo foi adicionado ao mosto conforme a Tabela 1. Durante a fermentação foi adicionado a mesma quantidade de um segundo inóculo nas cubas que apresentavam fermentações deficientes. A concentração celular do inóculo introduzido em cada cuba foi de 10⁶ mL⁻¹ e para isso foram adicionado cerca de 200 mL de suspensão de levedura. O inóculo foi adicionado como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Inóculo adicionado e respetivas cubas

Cuba	1.º inóculo	2.º inóculo
1	A	
2	B	
3	B	
4	C	E
5	C	
6	D	
7	D	
8	E	
9	E	
10	E	
11	F	E
12	F	E

3.2. Produção do vinho base

Na Figura 4 é apresentado o planeamento, em organograma, da produção do vinho base. Foi elaborado com o inóculo descrito na Tabela 1, para seleccionar a levedura que posteriormente será usada na elaboração dos vinhos espumante.

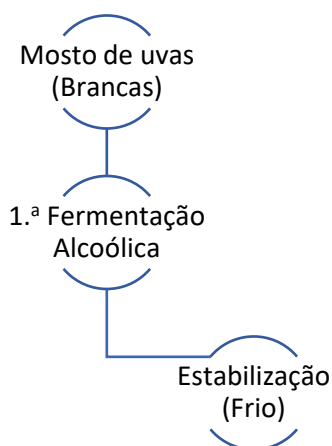


Figura 4 – Organograma preparação do vinho base.

A produção do vinho base foi realizada numa estação piloto, capaz de recriar as condições gerais de fermentação utilizadas em adegas. Esta é constituída por 12 cubas em aço inoxidável, com temperatura controlada. As cubas têm capacidade de 20 L cada e permitem acoplar sensores para monitorizar diversos parâmetros, como a temperatura e pH durante a fermentação (Figura 5).



Figura 5 – Estação piloto usada na elaboração do vinho base.

Foi utilizado um mosto dessulfitado para produção do vinho base, constituído por uvas das castas *Avesso*, *Arinto*, *Trajadura* e *Loureiro* com uma densidade de 1,069 (álcool provável de 9,5 %), um valor de pH igual 3,28, uma acidez total de 5,5 g L⁻¹ (como ácido tartárico) e com um teor de

açúcares de 163 g L⁻¹, parâmetros medidos pela tecnologia FTIR (equipamento *Oenofoss*TM). Na produção do vinho base foram realizadas 4 tarefas. Primeiramente foram higienizadas as 12 cubas, segundo o mosto foi colocado nas mesmas e foi adicionado o inóculo, em terceiro foi feito o acompanhamento dos parâmetros analíticos pela tecnologia FTIR (equipamento *Oenofoss*TM) e por fim foi feita a estabilização do vinho base.

As fermentações foram realizadas em duplicado para cada estirpe exceto para a levedura A, onde foi vinificada uma só amostra, num volume de 20 L, e com temperatura controlada (18 °C). O progresso das fermentações foi monitorizado pela medição diária da densidade por aerometria, segundo o método OIV-MA-AS2-01B: R2009, descrito pela OIV. No primeiro dia foram feitas remontagens nas várias cubas de fermentação, visando o arejamento das fermentações. As fermentações foram terminadas (adicionando SO₂) quando a densidade atingiu valores próximos de 1,005. A dose de SO₂ total adicionada a cada cuba foi 120 mg L⁻¹ e segundo o Regulamento (CE) n.º 606/2009, o limite legal do teor de SO₂ total para vinhos brancos e rosés é 200 mg L⁻¹. O método de sulfitação consistiu na utilização do metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅) em pó, permitindo a sua dissolução completa e garantindo assim uma boa homogeneização. Logo após o término da fermentação alcoólica, cada cuba foi colocada a uma temperatura de 6 °C para estabilização do vinho. Posteriormente este foi engarrafado.

3.3. Elaboração do vinho espumante

Na Figura 6 é apresentado o organograma da elaboração do vinho espumante, utilizando a levedura E e a levedura comercial, em suspensão e na forma imobilizada. No caso da levedura E e da levedura comercial em suspensão, foi elaborado o processo com e sem *dégorgement*. A levedura comercial usada na elaboração do vinho espumante para comparação foi a Lalvin EC – 1118.

Na elaboração do espumante pelo método clássico foram preparadas amostras com o vinho base elaborado pela levedura E proveniente das cubas 8, 9 e 10. Foram elaborados 8 espumantes, 4 amostras com inóculo de levedura comercial e 4 com inóculo de levedura E. Nesta parte do trabalho foram realizadas 5 tarefas, a primeira foi preparar o inóculo das duas leveduras a testar em suspensão, a segunda foi preparar a encapsulação das mesmas em alginato de cálcio, a terceira foi adicionar as leveduras, o açúcar e fazer o enchimento com vinho base, em quarto lugar para as

leveduras em suspensão foi feita a *rémuage* e, por fim, na quinta tarefa, foi realizado o controlo de qualidade nos vinhos (análises físico-químicas e sensoriais).

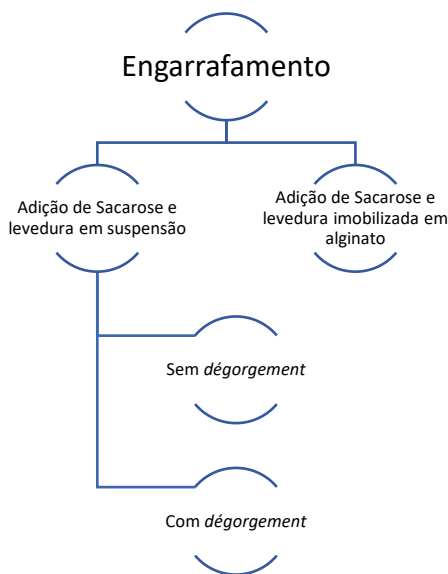


Figura 6 – Organograma da preparação do vinho espumante.

Os inóculos foram preparados pelo mesmo método usado no subcapítulo 3.1, sendo adicionados na mesma proporção, *i.e.* $7,5 \times 10^8$ células de levedura em cada garrafa. A cada garrafa de 750 mL, para obter uma pressão final de aproximadamente 6 bar, foram adicionadas 18 g de sacarose. Encheram-se as garrafas de 0,75 L com o vinho base, adicionaram-se de seguida a sacarose comercial e a levedura, de seguida foram agitadas para ajudar na dissolução da sacarose e enroladas com rolha de espumante de plástico. Para evitar possível saída da rolha, durante a segunda fermentação, foi colocado um arame à volta do gargalo a envolver a mesma. Deste modo, após a formação de CO₂, a rolha não sai. As garrafas foram rotuladas como mostra a Tabela 2 e foram colocadas deitadas durante 2 meses numa zona ao abrigo da luz e à temperatura de 11 °C.

A designação das várias amostras foi feita de modo a facilitar a identificação do tipo de segunda fermentação realizado em garrafa: em pé significa que as amostras se encontravam na vertical para testar a fermentação com menos área de contacto da levedura com o vinho; com congelamento do gargalo identifica as que foram posteriormente tratadas com *rémuage* e fizeram a fermentação na horizontal; sem congelamento foram as que não se fez o *rémuage* colocadas na horizontal e, por fim; a denominação alginato que significa que as leveduras foram imobilizadas em alginato de cálcio e

colocadas também na horizontal. Foram elaborados vários vinhos espumantes, mas a abertura foi feita de uma só garrafa em boas condições.

Tabela 2 – Identificação das amostras

Amostra	Designação
EP _{comercial}	Em pé comercial
CCG _E	Com congelamento do gargalo E
Imob _{comercial}	Alginato comercial
EP _E	Em pé E
Imob _E	Alginato E
SCG _E	Sem congelamento do gargalo E
SCG _{comercial}	Sem congelamento do gargalo comercial
CCG _{comercial}	Com congelamento do gargalo comercial

3.3.1. Encapsulação das leveduras

Para a imobilização da levedura, foram preparados 10 mL de uma suspensão a 20 g L⁻¹ da levedura comercial e da levedura E. De seguida foi preparada uma matriz líquida de alginato de sódio a 21,8 g L⁻¹ em água destilada, aquecida para dissolver o alginato e depois arrefecida a 45 °C. Logo de seguida foi feita a junção da suspensão quer da levedura comercial, quer da levedura E de modo a ficarem imobilizadas no gel. Usando uma seringa foi-se juntando a matriz lentamente, gota a gota, a cerca de 100 mL da solução aquosa de cloreto de cálcio a 20 g L⁻¹, mantendo-se em agitação, à temperatura ambiente durante 15 min até completar a gelificação. As esferas formadas foram lavadas com solução tampão acetato (pH 4,5) contendo 10 g L⁻¹ de CaCl₂, e posteriormente usadas no engarrafamento.

3.3.2. Monitorização do CO₂

A monitorização da produção de CO₂, durante a fermentação em garrafa, foi feita utilizando um manómetro (Figura 6) introduzido na rolha de plástico. Foi elaborada uma amostra de cada designação referida anteriormente na Figura 7.

A leitura do manómetro foi feita diariamente, exceto ao fim de semana durante os dois meses da fermentação em garrafa.

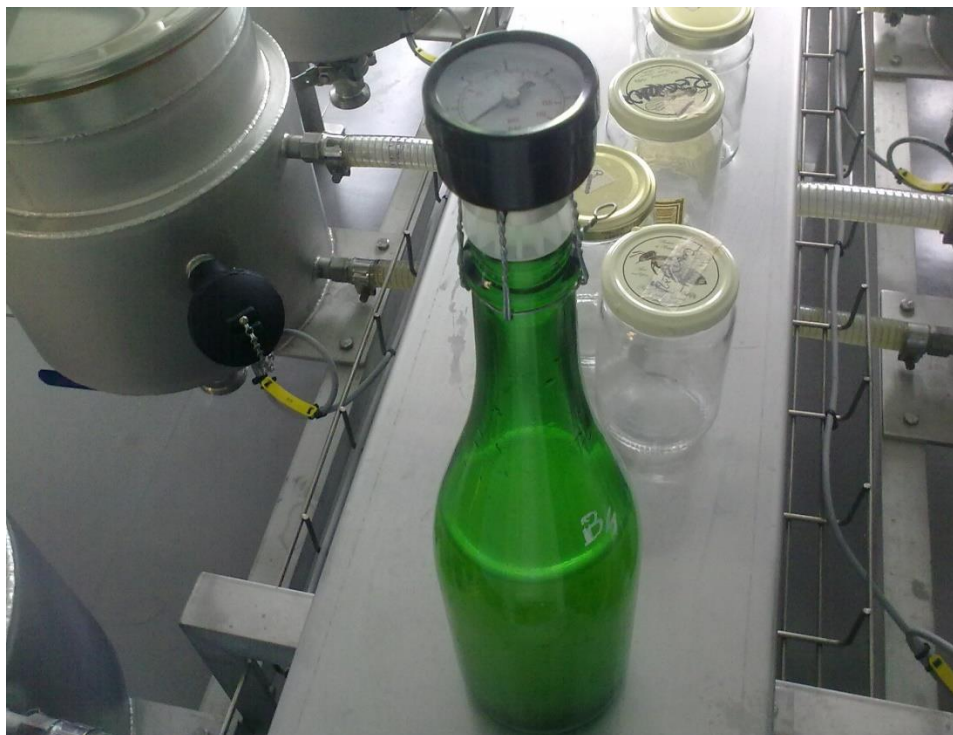


Figura 7 – Manómetro para avaliação da produção de CO₂ nas amostras de espumante.

3.4. Controlo de qualidade nos vinhos

Nesta secção serão explicados os métodos usados na monitorização da fermentação durante a produção do vinho base e a caracterização das amostras de vinho espumante.

3.4.1. Monitorização da fermentação alcoólica dos vinhos base

Foram recolhidas amostras do mosto em fermentação de dois em dois dias, visando a sua análise pela tecnologia FTIR (equipamento *Oenofoss*TM). Os parâmetros analisados foram a densidade, a glucose, a frutose, o pH e o título alcoométrico volúmico (TAV).

Foram medidas as densidades diariamente ao longo do tempo de fermentação nas cubas, através de um densímetro. A medição da densidade foi usada para verificar o quando do término da fermentação. Ao atingir uma densidade perto do valor 1,005, foi forçada a paragem da fermentação com a adição do metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) como foi referido no subcapítulo 3.2.

Os parâmetros acima referidos na monitorização da fermentação alcoólica dos vinhos base foram analisados pela tecnologia FTIR (*Oenofoss*TM). As amostras analisadas não sofreram qualquer tratamento prévio. Colocou-se cerca de 600 μ L da amostra a analisar sob o feixe de luz. Após 2 min, os resultados foram recolhidos através do *software* próprio do equipamento (Figura 8). O processo respeitou as regras descritas na OIV-OENO 390-2010. O equipamento possui análises predefinidas, ou seja, análise de mosto, análise de vinho em fermentação e análise de vinho final.

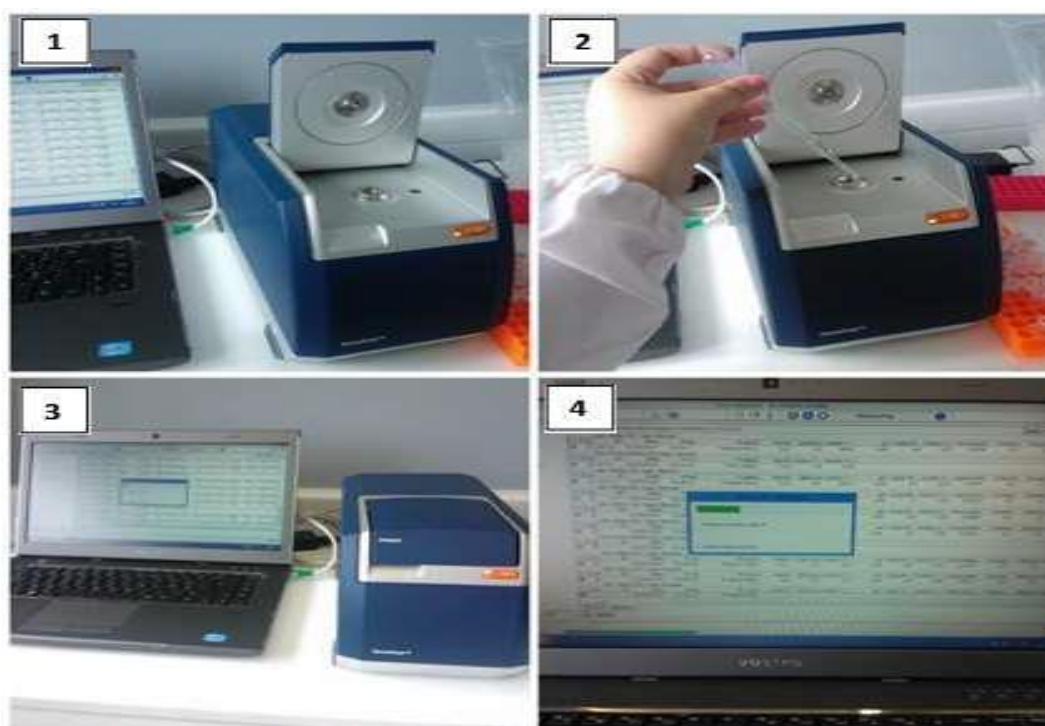


Figura 8 – Esquema ilustrativo de uma análise FTIR no *Oenofoss*TM.

3.4.2. Caraterização dos vinhos espumantes

3.4.2.1. Parâmetros físico-químicos

O vinho espumante produzido foi analisado por HPLC (açúcares, ácidos orgânicos, glicerol e etanol), bem como pela tecnologia FTIR *Oenofoss*TM (TAV). As amostras foram congeladas até ao dia

da análise. Os ácidos orgânicos (cítrico, tartárico e málico), os açúcares (glucose e frutose), o glicerol e o etanol (TAV) foram analisados num HPLC constituído por uma bomba Jasco 880-Pu, detetores UV/Vis Jasco 870-UV e RI Jasco 830-RI e forno para aquecimento da coluna. A análise foi efetuada numa coluna “*organic acids Chrompack*” (300 mm × 6,5 mm), utilizando H₂SO₄ a 5 mmol L⁻¹ como eluente a um caudal de 0,30 mL min⁻¹; a temperatura do forno foi de 80 °C. Utilizou-se um “*loop*” de 20 µL para a injeção da amostra. A deteção dos ácidos orgânicos foi feita por espectrofotometria a 210 nm e a dos açúcares, do glicerol e do etanol por refratometria. O processo de quantificação foi efetuado por comparação dos tempos de retenção após a injeção de padrões de concentrações conhecidas e a construção de uma curva de calibração (Anexo B), pelo método do padrão externo (Genisheva *et al.*, 2014).

3.4.2.2 Prova organolética

A prova organolética foi realizada pelas 11 h numa sala do edifício IEMinho (Soutelo, Vila Verde), a qual foi preparada propositadamente para o efeito (Figura 9). O local, calmo e confortável, não apresentava odores anormais, e o acesso foi restrito a outros ocupantes durante a realização da prova, impedindo a quebra da concentração do provador. A temperatura da sala foi de 20 °C ± 2 °C. O copo selecionado para a prova, respeitou a norma ISO 3591:1977. A prova consistiu na avaliação de 8 diferentes vinhos espumantes, sem qualquer intervalo entre amostras. Os vinhos espumantes foram servidos aleatoriamente. O vinho foi servido à temperatura aproximada de 6 °C ± 2 °C (previamente refrigerado). Na realização da análise sensorial foi utilizado um painel de 9 provadores não treinados, com idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos, 5 do género masculino e 4 do género feminino.

A caracterização do produto foi feita com recurso à ficha de prova da Figura 10, avaliando os seguintes atributos: exame visual (limpidez, cor e qualidade da cor), exame olfativo (intensidade, floral, frutado, especiarias, mineral, vegetal e impressão geral) e exame gustativo (doçura, acidez, calor, amargor, estrutura, equilíbrio, persistência e impressão geral). Para caracterizar cada atributo foi usada uma escala de 1 a 5 valores e de 0 a 20 na nota final (apreciação global).



Figura 9 – Sala de provas organoléticas.

A caracterização do produto foi feita com recurso à ficha de prova da Figura 10, avaliando os seguintes atributos: exame visual (limpeza, cor e qualidade da cor), exame olfativo (intensidade, floral, frutado, especiarias, mineral, vegetal e impressão geral) e exame gustativo (doçura, acidez, calor, amargor, estrutura, equilíbrio, persistência e impressão geral). Para caracterizar cada atributo foi usada uma escala de 1 a 5 valores e de 0 a 20 na nota final (apreciação global).

Exame visual		Provedor:
Limpidez	0 1 2 3 4 5	Amostra:
Cor	0 1 2 3 4 5	
Qualidade da cor	0 1 2 3 4 5	
Exame olfativo		Descritores
Intensidade	0 1 2 3 4 5	-----
Floral	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto citrino	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto de árvore	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto tropical	0 1 2 3 4 5	-----
Fruto seco	0 1 2 3 4 5	-----
Especiarias	0 1 2 3 4 5	-----
Mineral	0 1 2 3 4 5	-----
Vegetal	0 1 2 3 4 5	-----
Impressão geral	0 1 2 3 4 5	-----
Exame gustativo		
Doçura	0 1 2 3 4 5	-----
Acidez	0 1 2 3 4 5	-----
Calor	0 1 2 3 4 5	-----
Amargor	0 1 2 3 4 5	-----
Estrutura	0 1 2 3 4 5	-----
Equilíbrio	0 1 2 3 4 5	-----
Persistência	0 1 2 3 4 5	-----
Impressão geral	0 1 2 3 4 5	-----
Nota final (0 a 20)		Observações

Figura 10 – Ficha de provas utilizada na avaliação dos espumantes.

4. Resultados e Discussão

Nesta secção apresentam-se os resultados obtidos no decurso deste trabalho e a sua discussão. Primeiramente, são apresentados os resultados referentes à elaboração do vinho base, tendo como foco a produção do vinho para fazer a espumantização, acompanhado analiticamente pela tecnologia FTIR (equipamento *Oenofoss*TM). De seguida apresentam-se os resultados referentes ao processo que envolveu a segunda fermentação (espumantização), com as análises físico-químicas por HPLC, e por último, a análise sensorial dos vinhos espumantes.

4.1. Vinhos base

A temperatura à qual ocorre a fermentação tem muita influência sobre a atividade das leveduras. Uma temperatura baixa ajuda a ter um rendimento maior em etanol, originando uma fermentação mais completa. A temperatura influencia a quantidade de produtos secundários formados e minimiza a perda por evaporação de constituintes (Hashizume, 2001). Deste modo a temperatura foi mantida a 18 °C. É pertinente a medição da temperatura e da densidade duas vezes por dia e de forma constante (Rizzon e Miele, 2006). O acompanhamento da fermentação é sugerido por meio da medição da temperatura e da densidade ou teor de açúcar, utilizando um densímetro ou refratómetro (Hashizume, 2001). Neste trabalho, a temperatura, durante e depois da fermentação alcoólica foi controlada pelo *chiller* acoplado à estação piloto, e a densidade foi também avaliada por aerometria. Esta diminuiu ao longo da fermentação, de 1,069 até valores de 1,003 a 1,005. A remontagem durante a fermentação promove o arejamento necessário à multiplicação das leveduras (Hashizume, 2001). A remontagem foi efetuada nos dois primeiros dias da fermentação alcoólica e depois já só foi feita nas cubas com fermentação deficientes. No fim das fermentações, os fermentadores foram fechados e deixados em repouso a uma temperatura de 6 °C para estabilização do vinho.

O tempo de fermentação variou em função da estirpe de levedura usada em cada cuba. Pode-se dizer que as estirpes que apresentaram a cinética de fermentação mais rápida foram a A, a B e a D pois atingiram a densidade pretendida em 9 dias como mostra a Tabela 3.

As estirpes que demoraram mais tempo a finalizar a fermentação foram a C, da cuba 5, e a F. Ambas demoraram 13 dias. Neste caso foi necessário fazer remontagens e adição de um novo inóculo com levedura E. Pode-se verificar que a estirpe C, da cuba 4, e a estirpe E, das cubas 8, 9 e 10, mantiveram uma característica de fermentação similar de 11 dias. As leveduras A e C, da cuba 5, e F, demoraram 13 dias a atingir a densidade 1,005 e 1,003.

Tabela 3 – Valores da densidade dos mostos durante a fermentação

Levedura/t/d	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	1,069	1,068	1,06	1,045	1,035	1,027	1,018	1,011	1,007	1,005				
B	1,069	1,069	1,06	1,045	1,035	1,028	1,022	1,011	1,007	1,003				
B	1,069	1,069	1,06	1,045	1,035	1,028	1,021	1,011	1,007	1,003				
C	1,069	1,069	1,068	1,068	1,065	1,060	1,052	1,041	1,031	1,019	1,010	1,005		
C	1,069	1,069	1,068	1,067	1,066	1,065	1,063	1,060	1,047	1,034	1,022	1,015	1,011	1,005
D	1,069	1,069	1,058	1,045	1,035	1,024	1,016	1,010	1,004	1,001				
D	1,069	1,069	1,060	1,043	1,032	1,027	1,018	1,011	1,005	1,003				
E	1,069	1,069	1,062	1,046	1,038	1,034	1,027	1,019	1,015	1,011	1,009	1,005		
E	1,069	1,069	1,062	1,046	1,038	1,032	1,024	1,017	1,013	1,01	1,007	1,004		
E	1,069	1,069	1,060	1,046	1,038	1,032	1,024	1,017	1,013	1,010	1,007	1,005		
F	1,069	1,069	1,068	1,067	1,062	1,057	1,048	1,038	1,032	1,023	1,016	1,012	1,008	1,003
F	1,069	1,069	1,068	1,067	1,060	1,055	1,048	1,038	1,032	1,023	1,016	1,014	1,008	1,003
	amostra retirada		amostra retirada		amostra retirada		amostra retirada		amostra retirada		amostra retirada		amostra retirada	amostra retirada
Legenda:	1		12		12		12		12		7		3	12
Remontagem	Adição do 2º Inóculo		Adição de Metabissulfito de Potássio											71

Para forçar a finalização da fermentação, a cada cuba foi adicionada uma dose de 120 mg L⁻¹ de SO₂ total a cada cuba. A sulfitação garante melhores resultados se misturada bem e de maneira homogênea no vinho. O SO₂ é usado nos vinhos como conservante, de modo a evitar oxidações indesejadas. Tem propriedades antissépticas e impede a deterioração do vinho provocada por bactérias e bolores evitando o seu crescimento e multiplicação. Os sulfitos tornam assim o vinho mais estável. Possui também efeito sensorial, permitindo a conservação dos aromas e contribuindo para o desenvolvimento de *bouquet* e permite a inibição das leveduras, dependendo da dose adicionada (Pato, 1988).

Daqui em diante serão apenas apresentados os resultados e feita a discussão das cubas com a estirpe E, isto porque foi a levedura selecionada para a realização dos vinhos espumante, por mostrar melhor aptidão.

Relativamente à densidade das cubas 8, 9 e 10 com a estirpe E, as curvas de fermentação são apresentadas na Figura 11. Foi obtido um vinho base razoável para a produção do espumante. Esta estirpe é a estirpe alvo de estudo por isso ter sido usada também no vinho base. O mosto apresentou um álcool provável de 9,5 %.

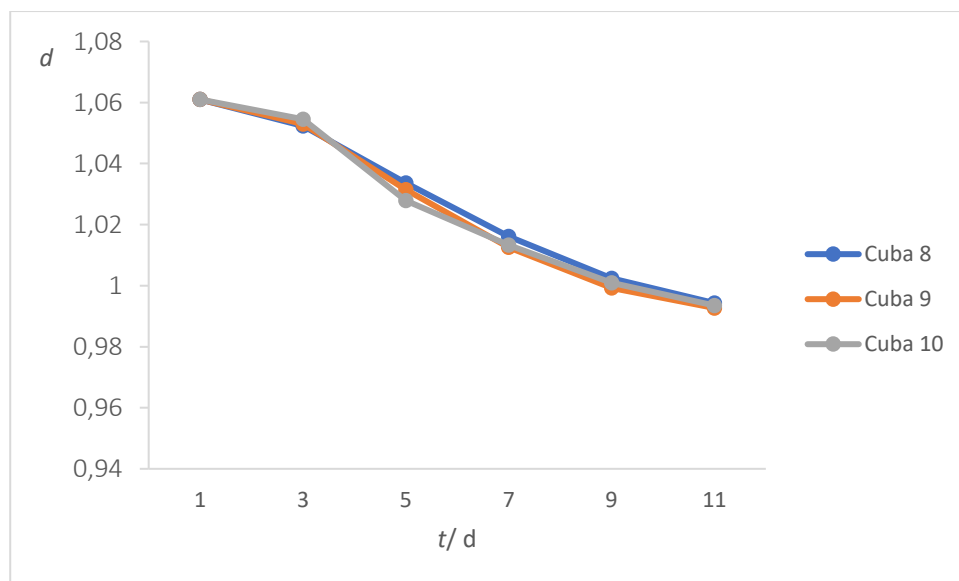


Figura 11 – Variação da densidade (d) ao longo do tempo de fermentação (t) do vinho base pela estirpe E.

Os resultados das análises químicas obtidas ao longo da fermentação, para as três cubas com a estirpe E, relativos ao consumo dos açúcares (Glucose + Frutose) e à produção de etanol através da tecnologia FTIR (*Oenofoss*TM) são apresentados na Figura 12.

Mediante os gráficos da Figura 12 verifica-se que o comportamento foi muito similar ao longo da fermentação para as três cubas, pois a tendência é de a glucose e frutose serem consumidas e haver produção de etanol.

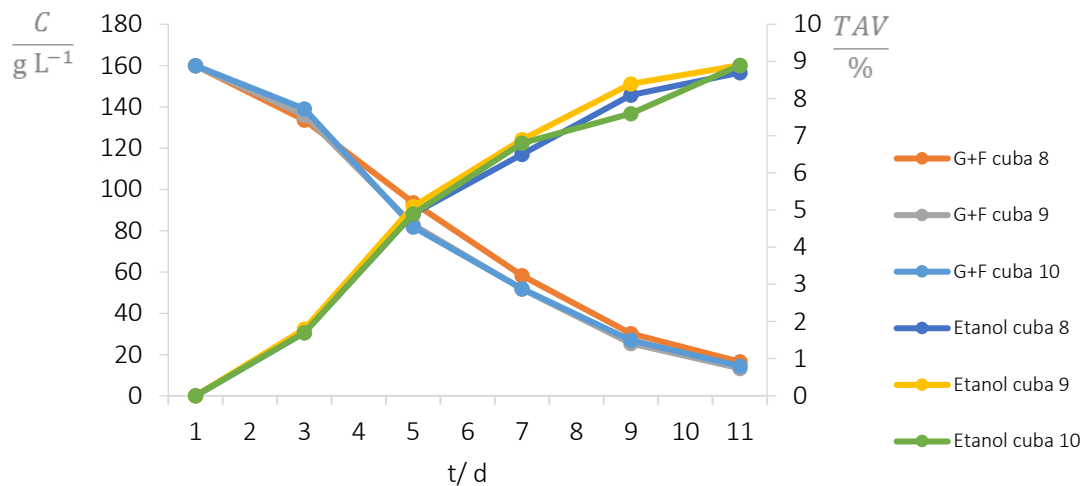


Figura 12 – Gráfico da variação da concentração dos açúcares – glucose + frutose, G+F – (C) e formação de etanol (TAV).

O etanol é um dos constituintes que mais influencia a qualidade do vinho. Este constituinte, como resultado de uma fermentação alcoólica, é o principal componente do vinho depois da água. O teor de etanol e de CO₂ num vinho está dependente das condições iniciais do mosto. Ele não tem só a função de influenciar as características organoléticas do produto como é também muito importante na sua conservação, através do controlo de agentes microbianos. Durante a fermentação há produção de grandes quantidades de etanol tornando o meio um ambiente anaeróbio, não permitindo o crescimento microbiano (Jackson, 2008). Durante a fermentação, a temperatura, a quantidade de açúcares e o tipo de levedura são essenciais para a produção de etanol. A levedura *S. cerevisiae* é resistente ao aumento de etanol durante a fermentação e sintetiza cerca de 1 %, em volume, por cada 16,5 g a 17,5 g de açúcares (frutose e glucose) por litro de mosto (Cheynier *et al.*, 2010). Assim, como o teor de açúcares apresentados pelo mosto era de 160,0 g L⁻¹ previa-se, caso o consumo fosse total um TAV próximo dos 9,5 %.

Para a cuba 8, o valor TAV obtido foi de 8,7 % e para as cubas 9 e 10 o valor obtido foi de 8,9 %, pela análise FTIR. A estirpe usada foi a E e pode-se concluir que o comportamento fermentativo foi igual ao que era espectável. Em todas as cubas com as restantes estirpes, a fermentação foi concluída. Verificou-se que os valores de TAV, para todas as cubas com diferentes estirpes, se encontram dentro do legislado na Portaria n.º 668/2010, estabelecendo um mínimo de 8 % e um máximo de 11,5 %.

A determinação do valor de pH no vinho é de extrema importância visto que, por ele, pode avaliar-se a capacidade que o vinho tem de resistir a infeções bacterianas ou tendência para contrair

casse férrica, ou a percentagem de SO_2 presente na forma elementar. É importante o valor de pH ser baixo pois será maior a proteção conferida ao vinho. Nos vinhos brancos é habitual encontrar valores de pH entre 3,1 e 3,4 (Ribéreau –Gayon *et al.*, 2006). Na Figura 13, são apresentados os valores de pH ao longo da fermentação, para as cubas 8, 9 e 10 respeitantes à levedura E.

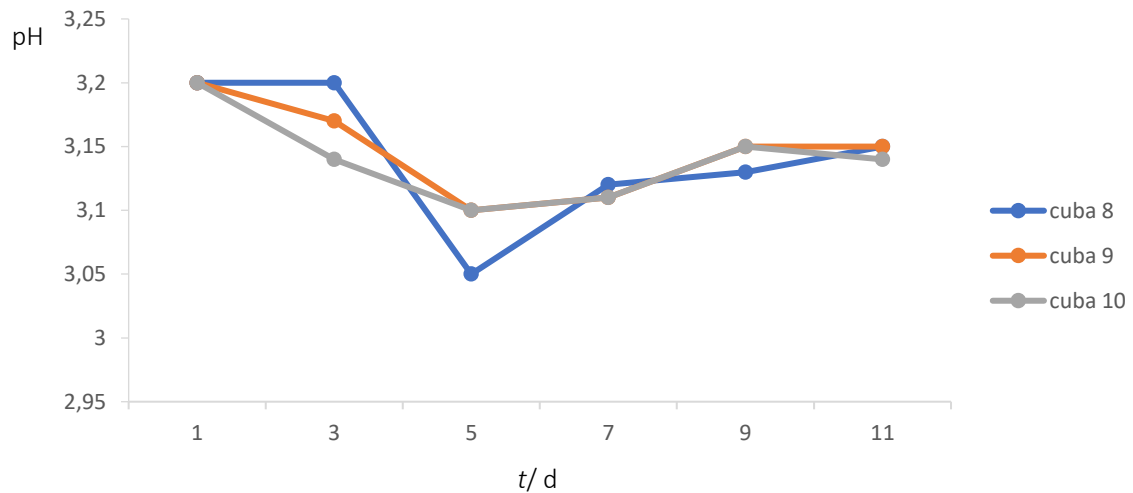


Figura 13 – Valor do pH para as várias cubas com a estirpe E ao longo do tempo (t) de fermentação.

No caso da cuba 8, o valor de pH foi de 3,15 no fim da fermentação estando dentro do parâmetro normal. Foi a cuba que iniciou a fermentação com o valor mais elevado de 3,2. Para a cuba 9, foi obtido o mesmo valor com um valor inicial ligeiramente mais baixo que o da cuba 8. No caso da cuba 10 pode-se observar que teve valores de pH mais baixos do que as outras duas cubas.

Os constituintes da acidez total (AT) do vinho são principalmente os ácidos tartárico, málico, cítrico, acético, láctico e succínico, sendo que mais de 90 % é composta apenas pelos ácidos tartárico e málico.

A acidez total desempenha um papel de extrema importância nas características organoléticas do vinho. É responsável por reforçar e conservar os aromas, dando corpo e frescura ao vinho.

A acidez total de um vinho deve estar compreendida entre $5,5 \text{ g L}^{-1}$ e $8,5 \text{ g L}^{-1}$ (expressa em ácido tartárico). Os vinhos brancos devem estar mais perto do limite superior e os vinhos tintos do limite inferior (Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Por outro lado, os vinhos com DO *Vinho Verde* deverão ter um limite mínimo de acidez fixa igual ou superior a $4,5 \text{ g L}^{-1}$ (Portaria n.º 668/2010, de 11 de agosto).

No que diz respeito à acidez total (expressa em ácido tartárico), foram encontrados valores, no final da fermentação, de 5,5 g L⁻¹, para a cuba 8, e de 5,6 g L⁻¹, para as cubas 9 e 10, indo de encontro aos valores referidos na bibliografia (Jackson, 2008, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Paralelamente, os valores de AT encontrados nas diferentes cubas respeitam o limite mínimo legislado para os Vinhos Verdes. No caso dos Vinhos Verdes é mais usual usar o valor da acidez fixa, isto é, ela é determinada pela subtração da acidez volátil à acidez total. A primeira, é constituída pelos ácidos orgânicos não voláteis, presentes no vinho e a segunda, pelos ácidos voláteis (João, 1997). O valor da acidez volátil determinado tecnologia FTIR (*Oenofoss*TM) nas três cubas foi de 0,11 g L⁻¹. Deste modo foi possível caracterizar a acidez fixa, na cuba 8 a acidez fixa foi de 5,39 g L⁻¹ e nas cubas 9 e 10 foi de 5,49 g L⁻¹.

O ácido tartárico (em conjunto com o ácido málico) corresponde a cerca de 90 % de AT. É dificilmente encontrado nas diferentes espécies vegetais, mas a videira é uma das poucas plantas onde ele está presente em quantidades elevadas. É o ácido mais importante dos ácidos fixos do vinho. O pH dos vinhos é fortemente influenciado por este ácido. Na fase de maturação do bago é de esperar encontrar valores de concentração entre 6,0 g L⁻¹ e 9,0 g L⁻¹ (Magalhães, 2008).

Em altas concentrações nos vinhos, o ácido tartárico confere aspereza e mesmo uma certa adstringência, mas em concentrações adequadas é o responsável pela fineza e frescura. No vinho, a acidez total encontrada está dentro dos parâmetros bibliográficos (João, 1997). Poderá haver uma pequena diferença que pode ser justificada pelo facto de as amostras terem sido congeladas antes de analisar, isto é, o ácido tartárico em temperaturas mais baixas forma cristais que precipitam e podem não ter sido quantificados (Andrade, 2012).

O ácido málico é o ácido mais presente na natureza, sendo a sua presença maioritária nos vegetais. É um ácido fraco e o seu teor normal presente no bago da uva pode variar entre 0,7 g L⁻¹ e 2,7 g L⁻¹ (Magalhães, 2008). Mas, as bactérias lácticas podem metabolizar este ácido na fermentação malolática (FML) diminuindo assim a sua concentração no vinho. Durante a FML, ocorre a descarboxilação do ácido málico em ácido láctico, com produção de CO₂, fazendo com que o ácido málico diminua a sua concentração, podendo até desaparecer por completo.

No caso do ácido cítrico encontrado no vinho é proveniente dos bagos de uvas. É um ácido orgânico forte, que normalmente está presente em quantidades reduzidas nos mostos e nos vinhos em pequenas quantidades. É um ácido que em conjunto com os ácidos sucínico e láctico só correspondem a cerca de 20 % da acidez total.

A acidez volátil é constituída por cerca de 96 % de ácido acético (Vilela-Moura *et al.*, 2011) e, por isso, normalmente usa-se a designação acidez volátil apenas para o ácido acético.

O ácido acético pode ser originado em qualquer momento da produção de vinho, através de deterioração microbiana das uvas infetadas por fungos *Botrytis cinerea*, mas esta não é a única origem do ácido acético. Ele pode aparecer também por leveduras durante a fermentação alcoólica e, mais tarde, pelas bactérias lácticas, durante a fermentação malolática (Vilela-Moura *et al.*, 2011). O Regulamento (CE) n.º 606/2009, refere que o limite legal de acidez volátil, expressa em ácido acético, para vinhos brancos, é 1,08 g L⁻¹. Visto que, nas três cubas o valor foi de 0,1 g L⁻¹ no fim a fermentação alcoólica, pode-se concluir que as uvas estavam sãs e não houve produção deste ácido de forma prejudicial. Os valores são inferiores ao limite legal máximo permitido. A maior fonte de ácido acético é proveniente das bactérias acéticas quando há contaminação.

4.2. Vinhos espumantes

Nesta secção do trabalho serão apresentados os resultados e a discussão dos vinhos espumantes. Inicialmente serão apresentados e discutidos os parâmetros físico-químicos, depois será abordada a monitorização da pressão de CO₂ e por fim a análise sensorial.

4.2.1. Caracterização físico-química

Nesta parte do trabalho serão apresentados os valores da avaliação físico-química dos vinhos espumantes produzidos.

A composição em açúcares nos vinhos espumantes varia essencialmente pelos açúcares presentes no vinho base (glucose e frutose) e por adição de açúcar antes da segunda fermentação. Os principais açúcares das uvas são a frutose e a glucose (açúcares fermentescíveis) existindo, contudo, outros açúcares (não fermentescíveis) em proporções mais pequenas como por exemplo, a xilose e a sacarose. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4 – Concentração (C) dos açúcares, glucose e frutose, após segunda fermentação, determinada por HPLC, com respetivos erros calculados para 95 % de confiança

$\frac{C}{g L^{-1}}$	EP _{comercial}	CCG _E	Imob _{comercial}	EP _E	Imob _E	SCG _E	SCG _{comercial}	CCG _{comercial}
Glucose	5,11 ± 1,92	7,35 ± 1,88	5,13 ± 1,92	5,93 ± 1,90	6,86 ± 1,89	5,51 ± 1,91	4,78 ± 1,93	4,78 ± 1,86
Frutose	7,77 ± 2,72	6,75 ± 2,76	5,43 ± 2,80	6,12 ± 2,78	5,37 ± 2,80	3,68 ± 2,86	5,82 ± 2,79	n.d.

n.d. – não determinado

O papel fundamental da glucose e da frutose é o de serem substratos para consumo da levedura no processo de espumantização, dando como resultado essencialmente etanol e CO₂ (Jackson, 2008). Os vinhos espumantes, podem ser classificados segundo os teores de açúcar, como “Bruto” se o teor de açúcares for compreendido entre 6 g L⁻¹ e 12 g L⁻¹ e “Meio seco” se o teor de açúcares for inferior a 12 g L⁻¹ e 17 g L⁻¹. Segundo a Tabela 4 pode-se concluir que as amostras, Imob_{comercial} SCG_E, SCG_{comercial} e CCG_{comercial} são espumantes com menção e as amostras EP_E, CCG_E, EP_{comercial}, Imob_E com menção “Meio seco”.

A Tabela 4 mostra também que as estirpes em estudo degradaram a quase totalidade dos açúcares fermentescíveis (glucose e frutose). É de salientar que, apesar de a glucose e a frutose coexistirem como substratos, a glucose é normalmente mais facilmente consumida. O valor máximo de glucose na amostra CCG_E, com valores de (7,35 ± 1,88) g L⁻¹ e o valor mínimo nas amostras SCG_{comercial} e CCG_{comercial} de (4,78 ± 1,93) g L⁻¹ e (4,78 ± 1,86) g L⁻¹. No caso da frutose o valor máximo foi atingido na amostra EP_{comercial} de (7,77 ± 2,72) g L⁻¹ e valor mínimo na amostra SCG_E de (3,68 ± 2,86) g L⁻¹.

Para os valores de TAV nas amostras de espumante, é importante relaciona-los com os valores obtidos no vinho base, isto porque seria espetável o aumento em aproximadamente de 1 % a 1,5 %. Tal facto aconteceu em todas as amostras. Os melhores resultados foram obtidos nas amostras com a levedura E, quer em suspensão quer imobilizadas, com valores acima dos 9,8 %. Em comparação com o valor do vinho base usado foi obtido um aumento superior a 1 %. As restantes amostras, com a levedura comercial em suspensão e imobilizadas, obtiveram quase o valor de 1 % como mostra a Figura 14.

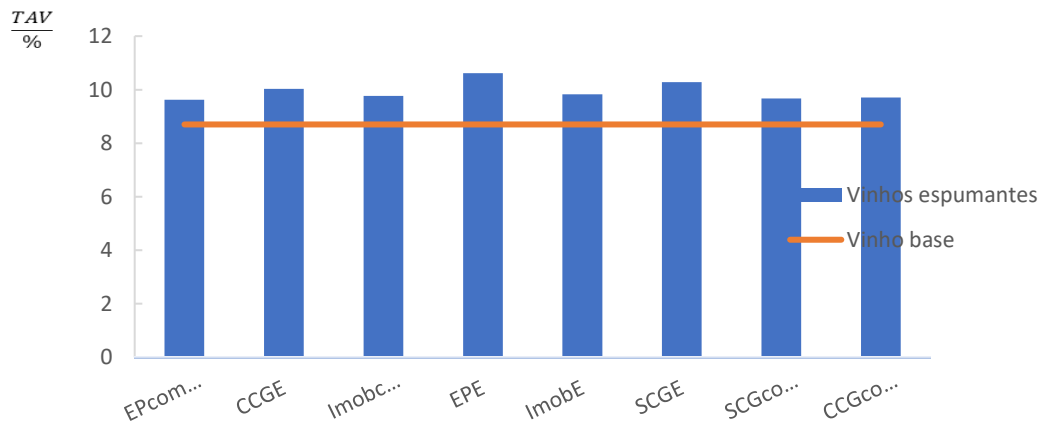


Figura 14 – Comparação dos valores de TAV do vinho base e das amostras de espumante.

O glicerol é resultante da fermentação gliceropirúvica realizada no interior da levedura, que consiste na transformação dos açúcares. É o terceiro componente mais abundante no vinho. É um dos principais produtos secundários produzidos, sobretudo no início da fermentação, aquando da multiplicação da levedura (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). Confere doçura, suavidade, consistência e corpo ao vinho. No entanto, não tem um impacto direto nas características aromáticas do vinho devido à sua natureza não volátil (Pretorius, 2000). São vários os fatores que influenciam a quantidade de glicerol presente nos vinhos. A estirpe é a principal, mas também fatores como o arejamento, a temperatura de fermentação, a composição dos mostos em termos de azoto, açúcares, sulfitos e pH, a casta e a infeção das uvas por *Botrytis cinerea* podem influenciar a concentração final de glicerol (Vieira, 2013). Os valores de concentração do glicerol encontram-se, geralmente, compreendidos entre 5 g L^{-1} e 12 g L^{-1} (Navarre, 1997). Sendo um produto que confere doçura e suavidade foi analisado só na parte da produção de espumante por 2.^a fermentação.

Os valores encontrados nas amostras de espumante estão representados na Tabela 5. Os resultados foram de encontro ao exposto na bibliografia (Navarre, 1997), ou seja, estão dentro dos valores normais. A amostra Imob_E foi a que apresentou maior teor de glicerol, atingindo um máximo de $(6,03 \pm 0,60) \text{ g L}^{-1}$. O valor mais baixo foi obtido na amostra EP_{comercial} com valor de $(4,07 \pm 0,67) \text{ g L}^{-1}$.

Tabela 5 – Concentração de glicerol (C) dos espumantes, com respetivos erros calculados para 95 % de confiança

$\frac{C}{g L^{-1}}$	EP _{comercial}	CCG _E	Imob _{comercial}	EP _E	Imob _E	SCG _E	SCG _{comercial}	CCG _{comercial}
Glicerol	4,07 ± 0,67	5,65 ± 0,61	4,19 ± 0,60	5,20 ± 0,61	6,04 ± 0,61	4,91 ± 0,60	4,61 ± 0,60	0,24 ± 0,68

A acidez no vinho base bem como nos espumantes é devida essencialmente aos ácidos tartárico, málico e cítrico. Estando contidos no vinho a sua concentração passará para os vinhos espumantes podendo sofrer algumas alterações (Magalhães, 2008). Na Tabela 6 pode-se consultar as concentrações dos diferentes ácidos orgânicos nas amostras de espumante.

Para o ácido tartárico os valores espectáveis são de 6,0 g L⁻¹ a 9,0 g L⁻¹ (Magalhães, 2008). O facto de as amostras terem sido congeladas sem diluição pode ter provocado através da temperatura baixa a formação de cristais tartáricos, influenciando assim os resultados para este ácido. Os valores estão todos mais baixos que o mínimo espectável.

Tabela 6 – Concentração (C) dos ácidos orgânicos dos espumantes, com respetivos erros calculados para 95 % de confiança

$\frac{C}{g L^{-1}}$	EP _{comercial}	CCG _E	Imob _{comercial}	EP _E	Imob _E	SCG _E	SCG _{comercial}	CCG _{comercial}
Ác. Cítrico	1,06 ± 0,14	0,85 ± 0,12	1,14 ± 0,14	1,13 ± 0,14	1,03 ± 0,13	0,90 ± 0,13	1,04 ± 0,14	0,98 ± 0,13
Ác. Succínico	2,64 ± 0,50	2,63 ± 0,50	2,44 ± 0,46	3,37 ± 0,65	2,47 ± 0,47	3,08 ± 0,59	2,70 ± 0,51	2,50 ± 0,47
Ác. Tartárico	2,25 ± 0,26	2,10 ± 0,26	2,51 ± 0,26	2,72 ± 0,26	2,10 ± 0,26	2,64 ± 0,26	2,90 ± 0,27	2,43 ± 0,26
Ác. Málico	7,72 ± 0,37	8,49 ± 0,41	8,22 ± 0,39	8,94 ± 0,43	8,19 ± 0,39	8,10 ± 0,39	8,02 ± 0,38	8,02 ± 0,38

O ácido cítrico do vinho provém das uvas e representa 20 % da acidez total. Os valores deste ácido estão normalizados como mostra a Tabela 6 e perante o Regulamento (CE) n.º 607/2009, mas, contudo, estão ligeiramente acima dos limites legais.

No caso do ácido málico, o seu valor habitual varia entre 0,7 g L⁻¹ a 2,7 g L⁻¹ (Magalhães, 2008) e neste caso os valores estão fora dos valores referenciados (Tabela 6). No caso do vinho base os valores foram superiores a 6,3 g L⁻¹, e deste modo podemos dizer que se tivesse havido fermentação maloalcoólica estes valores teriam descido.

A acidez total do espumante pode ser também caracterizada como a dos vinhos, através dos ácidos orgânicos mais o láctico e o succínico, sabendo que mais de 90 % é composta apenas pelos ácidos tartárico e málico. O valor de AT de um vinho deve estar compreendido entre $5,5 \text{ g L}^{-1}$ e $8,5 \text{ g L}^{-1}$ (expressa em ácido tartárico). Só a amostra EP_E está ligeiramente acima do referenciado, como se pode comprovar pela mesma Tabela 6 (Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Por outro lado, os vinhos brancos bem como os espumantes com DO *Vinho Verde*, deverão ter um limite mínimo de acidez fixa igual ou superior a $4,5 \text{ g L}^{-1}$ (Portaria n.º 668/2010). Os *vinhos verdes* normalmente têm uma acidez maior que os outros vinhos, sendo normal estar acima do que é considerado na bibliografia.

O conhecimento do valor de pH do vinho e dos espumantes é de elevada importância visto que, por ele, pode avaliar-se a resistência do espumante à infecção bacteriana. No entanto, é de ressaltar que quanto mais baixo for o valor, maior proteção é conferida ao vinho, possuindo maior resistência a infecções bacterianas devido ao meio ácido. Mais especificamente, nos vinhos brancos, que se podem relacionar com os vinhos espumantes, é habitual encontrar valores entre 3,1 e 3,4 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Para os vinhos espumantes e perante o gráfico da Tabela 7, os valores mais baixos foram encontrados nas amostras EP_E e $CCG_{\text{comercial}}$ e os valores de pH mais altos foram encontrados nas amostras $EP_{\text{comercial}}$ e $Imob_{\text{comercial}}$.

Tabela 7 – Valor do pH após segunda fermentação obtidos por FTIR.

$\frac{C}{\text{g L}^{-1}}$	$EP_{\text{comercial}}$	CCG_E	$Imob_{\text{comercial}}$	EP_E	$Imob_E$	SCG_E	$SCG_{\text{comercial}}$	$CCG_{\text{comercial}}$
pH	3,13	3,06	3,13	3,03	3,1	3,1	3,09	3,03

4.2.2. Monitorização da pressão do CO_2

O CO_2 foi testado durante a segunda fermentação. Era espectável que a pressão atingida fosse de 6 bar pela adição que foi feita da sacarose comercial.

Perante a Figura 15 pode-se dizer que a segunda fermentação foi realizada, ou seja, houve produção de CO₂ em todas as amostras. De salientar que terá havido fugas no sistema montado para esta monitorização como mostra o Anexo A, pois os resultados não foram os esperados. Verifica-se que a estirpe E tem boa capacidade fermentativa e respetiva produção de CO₂.

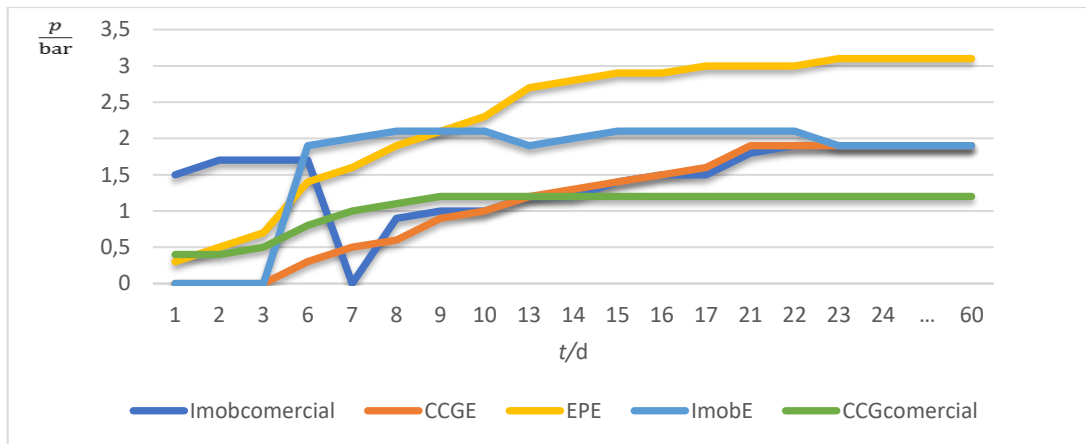


Figura 155 – Gráfico relativo à monitorização da pressão (p) conferida pela produção de CO₂ ao longo do tempo (t) da segunda fermentação alcoólica.

4.2.3 Análise sensorial

Nesta secção são apresentados os resultados da análise sensorial. O júri, composto por 9 elementos, realizou 3 exames aos espumantes (conforme a ficha de prova da Figura 10, subcapítulo 3.4.2.2):

- Exame visual
- Exame olfativo
- Exame gustativo

Nestes exames são envolvidos os três sentidos, a visão, o olfato e o paladar. A conjugação dos três dá uma apreciação global dos espumantes. Foram servidos 8 espumantes a uma temperatura de 6 °C.

Exame visual

No exame visual foram avaliados quatro parâmetros, a limpidez, a cor, a qualidade da cor e a efervescência, numa escala de avaliação entre 0 e 5.

A escala de limpidez, traduz-se da seguinte forma: 0-turvo, 1-ligeiramente turvo, 2-opalino, 3-ligeiramente opalino, 4-límpido e 5-cristalino.

Em relação à cor (referente a vinhos espumantes brancos) a escala foi: 0-citrino descorado, 1-citrino, 2-palha aberto, 3-palha, 4-ligeiramente dourado e 5-dourado.

No que diz respeito à qualidade da cor, foi considerado 0 como avaliação mínima e 5 avaliação máxima.

A escala de efervescência foi, 0-nula, 1-muito fraca, 2-fraca, 3-média, 4-muito forte.

Os valores apresentados na Tabela 8 dizem respeito à mediana dos valores avaliados pelos 9 provadores.

Perante os resultados obtidos pelos provadores, em relação à limpidez, as amostras Imob_{comercial} e Imob_E obtiveram o melhor resultado.

De salientar que estas duas amostras são as amostras com a estirpe E e a comercial immobilizadas em alginato. As amostras com resultados menos bons foram as EP_{comercial} e SCG_E com a estirpe comercial com fermentação em pé, e sem congelamento do gargalo com a estirpe E respetivamente. As amostras que obtiveram um resultado ligeiramente opalino foram as CCG_E, EP_E, SCG_{comercial} e CCG_{comercial}. No global pode-se concluir que as leveduras immobilizadas tiveram melhor desempenho.

Tabela 8 – Mediana dos valores obtidos no exame visual dos espumantes

Amostra	EP _{comercial}	CCG _E	Imob _{comercial}	EP _E	Imob _E	SCG _E	SCG _{comercial}	CCG _{comercial}
limpidez	2	3	4	3	4	2	3	3
cor	1	2	1	1	2	1	2	2
efervescência	3	4	3	3	4	4	4	3

No caso da cor, metade das amostras obtiveram cor de citrina ($EP_{comercial}$, $Imob_{comercial}$, EP_E e SCG_E) e a outra metade palha aberto (CCG_E , $Imob_E$, $SCG_{comercial}$ e $CCG_{comercial}$), cores características de um espumante jovem. Na comparação das duas estirpes este parâmetro não teve importância.

Na efervescência, a estirpe E ganhou vantagem em relação à estirpe comercial. As amostras CCG_E , $Imob_E$, SCG_E , e $CCG_{comercial}$ obtiveram a classificação de 4 querendo isto dizer que a quantidade de CO_2 é mais elevada em comparação com a comercial, que obteve 3.

No geral dos três parâmetros, o melhor valor foi a da amostra $Imob_E$, levedura E imobilizada em alginato.

Exame olfativo

No que diz respeito ao exame olfativo, foram avaliados dez parâmetros: intensidade, floral, fruto citrino, fruto de árvore, fruto tropical, fruto seco, especiarias, mineral, vegetal e impressão geral. Sendo a escala: 0-nula, 1-muito fraca, 2-fraca, 3-média, 4-forte e 5-muito forte, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 – Mediana dos valores obtidos no exame olfativo dos espumantes

Amostra	$EP_{comercial}$	CCG_E	$Imob_{comercial}$	EP_E	$Imob_E$	SCG_E	$SCG_{comercial}$	$CCG_{comercial}$
intensidade	3	3	3	3	3	3	3	3
floral	2	2	2	2	2	2	2	2
fruto citrino	2	2	2	2	1	1	2	2
fruto árvore	2	3	1	1	3	3	2	1
fruto tropical	0	0	0	0	0	0	1	0
fruto seco	0	0	2	0	0	1	0	0
especiarias	0	0	0	0	0	0	0	0
mineral	0	0	0	0	1	1	1	0
vegetal	1	1	2	0	1	1	0	1

Como se pode verificar na Tabela 9, nenhum dos espumantes obteve uma intensidade superior a 3, isto quer dizer que todos os aromas identificados foram sentidos de forma moderada. De destacar a amostra SCG_E que foi avaliada num total de 7 parâmetros denotando assim maior

variedade de aromas. As amostras com 6 parâmetros detetados são as $Imob_{comercial}$, $Imob_E$ e a $SCG_{comercial}$. A amostra $Imob_{comercial}$ obteve uma mediana superior qualitativamente em relação às outras duas.

De destacar que todas as amostras obtiveram os parâmetros floral, fruto cítrico e fruto de árvore, isto é característico dos *Vinhos Verdes*. As castas presentes no mosto (*Arinto*, *Avesso*, *Loureiro* e *Trajadura*) são também conhecidas pela atribuição de notas aromáticas frutadas (frutos citrinos) e florais (rosas).

Exame gustativo

No exame gustativo foram avaliados oito parâmetros: doçura, acidez, calor, amargor, estrutura, equilíbrio, persistência e impressão geral. A escala utilizada foi igual à utilizada no exame olfativo. Tal como no exame visual, os valores expostos na Tabela 10, dizem respeito à mediana dos valores avaliados pelos 9 provadores.

Tabela 10 – Mediana dos valores obtidos no exame gustativo dos espumantes

Amostras	$EP_{comercial}$	CCG_E	$Imob_{comercial}$	EP_E	$Imob_E$	SCG_E	$SCG_{comercial}$	$CCG_{comercial}$
doçura	3	2	2	2	1	2	3	2
acidez	2	3	2	2	3	3	2	2
calor	1	2	2	2	3	2	2	2
amargor	1	2	2	2	2	2	2	2
estrutura	3	3	2	2	2	2	3	2
equilíbrio	3	3	2	2	2	3	3	3
persistência	3	3	3	3	2	3	4	3

No que diz respeito à doçura, foram encontrados valores superiores nas amostras EP_{comercial} e SCG_{comercial}, ambas com a estirpe comercial com leveduras em suspensão. A amostra Imob_E obteve o menor valor de todas as amostras, em conformidade com o que foi dito para a estirpe comercial, esta terá uma maior capacidade para consumir os açúcares. A nível de acidez, os resultados são muito semelhantes em todas as amostras, que leva a dizer que a acidez está equilibrada. De destacar a CCG_E, Imob_E, e SCG_E que estão ligeiramente mais ácidas. Quanto ao amargor, os valores são baixos, valores de EP_{comercial} e CCG_E, ou seja, muito fraca e fraca, respetivamente. Para a qualidade do espumante é de interesse obter estes resultados neste parâmetro. Para o parâmetro de calor o maior resultado foi obtido na amostra Imob_E e o menor foi na EP_{comercial}. O etanol e o glicerol são responsáveis por caracterizar este parâmetro. A amostra Imob_E apresentou a maior concentração quer de etanol quer de glicerol, e a EP_{comercial} tem dos valores menores respetivamente (Vieira, 2013).

De destacar, em relação à persistência, que a amostra SCG_{comercial} (sem congelamento do gargalo comercial) obteve o melhor resultado. Para os dois outros parâmetros avaliados não se obteve nada que se possa destacar.

Apreciação Global

Foi pedido aos 9 provadores que avaliassem cada espumante numa escala de 0–20. A escala foi a seguinte: 0–4 – mau; 6–8 – medíocre; 10 – suficiente; 12–14 – bom; 16–18 – muito bom e 20 – excelente, como mostra a Tabela 10.

Na Tabela 11 estão representadas as medianas das avaliações de cada vinho espumante produzido. A preferência dos provadores manteve o mesmo padrão, e avaliou todos acima de bom e abaixo de muito bom. A amostra CCG_E foi a mais apreciada. A amostra CCG_E foi realizada com a levedura E, com levedura em suspensão, levando a concluir que a levedura E tem potencial para a produção de espumante de qualidade. A nível de limpidez não foi a melhor, foram obtidos resultados superiores em amostras no qual a levedura estava imobilizada.

Tabela 11 – Mediana dos valores obtidos na apreciação global dos espumantes

Amostra	EP _{comercial}	CCG _E	Imob _{comercial}	EP _E	Imob _E	SCG _E	SCG _{comercial}	CCG _{comercial}
Apreciação Global	12	14	12	12	12	12	12	13

5. Conclusões e Considerações finais

Foi proposto comparar duas leveduras na produção de vinho espumante pelo método clássico, tendo sido utilizada uma levedura já conhecida e também uma nova levedura da coleção da empresa VINALIA. Após a experiência pode-se dizer que ambas conseguiram realizar a 2.^a fermentação em garrafa na produção de vinho espumante branco. A levedura da coleção teve um bom desempenho e tem muito potencial na eliminação da etapa *rémuage*.

Perante o trabalho realizado pode-se concluir que a levedura Imob_E alvo de estudo teve um bom comportamento em relação à levedura comercial.

Houve produção de CO₂ em todas as amostras de vinho espumante.

A levedura Imob_E tem forte potencial na eliminação da etapa *rémuage*.

Na avaliação organolética, ao nível do exame visual, os melhores resultados foram conseguidos com as duas leveduras imobilizadas. A estirpe Imob_E obteve mais um valor que a comercial na cor e na efervescência, o que nos leva a concluir que teve um melhor desempenho.

Os resultados obtidos poderiam ter sido melhores pois o mosto usado não era fresco e de qualidade.

Pode-se concluir que foram obtidos bons resultados, as leveduras imobilizadas em alginato dão garantia de uma segunda fermentação. Podem ser aplicadas para redução do tempo de *rémuage* ou mesmo a sua eliminação.

A realização do presente trabalho permitiu obter informação relevante acerca do comportamento fermentativo das diferentes estirpes utilizando mosto branco dessulfitado. No entanto, seria importante testar o comportamento das estirpes num mosto fresco. Por outro lado, estudos em mosto tinto poderão valorizar o estudo das estirpes em questão. No sentido de verificar a capacidade da estirpe em *Vinhos Verdes* tintos. Visando a descrição do comportamento fermentativo de cada estirpe, seria interessante quantificar a produção de H₂S.

Por forma a evitar a incapacidade de dissolução do ácido tartárico, após congelamento, aconselha-se a diluir a amostra de 1:2, antes de a congelar. Para melhorar a monitorização do CO₂ era importante ter um instrumento melhor e mais adequado de modo a evitar fugas da garrafa. Seria também muito interessante ter analisado os compostos odoríferos presentes nestes vinhos.

Referências bibliográficas

- Andrade M. (2012)** Estabilização tartárica de vinhos por combinação de nanofiltração e permuta catiónica. *Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Vinho. Universidade Católica Portuguesa, Portugal.*
- Azevedo A.; Velloso G. (2006)** Chandon: a crença no espumante brasileiro de qualidade. *Wine Style 6*: 7-11.
- Banu C. (2000)** Biotehnologii in industria alimentara, *Ed. Tehnica*, Bucuresti
- Berovic M., Berlot M., Kralj S., Makovec D. (2014)** A new method for the rapid separation of magnetized yeast in sparkling wine. *Biochemical Engineering Journal* 88, 77–84
- Blouim J., Guimberteau G., (2000)** Maturation et maturité des raisins. Bordeaux: *Éditions Féret*,. 151p.
- Bucke C. (1987)** Methods In Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells. 2nd Edition, eds. Mosbach, *Academic Press*, Orlando, Vol 135, p. 175-189.
- Cavazzani N. (1989)** Fabricación de vinos espumosos. *Editorial Acribia*, Zaragoza. 166 p.
- Cheynier V., Schneider R., Salmon J., Fulcrand H. (2010)** Chemistry of wine. In: Mander L., Liu H.W. (eds): *Comprehensive Natural Products II. Elsevier*, Oxford: 1119–1172.
- Clarke R. e Bakker J. (2004)** Wine Flavour Chemistry. *Blackwell Publishing Ltd.*
- Cotea V. (2005)** Tehnologia vinurilor efervescente, *Ed. Academiei Romane*, Bucuresti.
- CVRVV – Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (2017)** disponível em www.vinhoverde.pt
- Tapaloaga D., (2013)** Sparkling wine quality in a Romanian wine processing unit-study case. *University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest*, 59 Mârçÿti Blvd, District 1, 011464, Bucharest, Romania.
- Diviès C. (1989)** On the utilisation of entrapped microorganisms in the industry of fermented beverages. p. 153-165, In: C. Cantarelli and G. Lanzarini, *Biotechnology Applications in beverage production, Elsevier*, London.
- Duteurtre B., Ors P., Hennequin D. (1987)** Les levures incluses. Développement semi-industriel. *Vignerons Champ.*, 108 (11), p. 595-602.

- Gemeiner P., Rexova-Benkova F., Svec F., Norrllow O. (1994)** Natural and Synthetic carriers suitable for immobilization of viable cells, active organelles and molecules. p. 67-84. IN Veliky I.A. and McLean R.J.C. eds. *Immobilized Biosystems, theory and practical application*. BChapman & Hall, London.
- Genisheva Z., Vilanova M., Mussatto S.I., Teixeira J.A., Oliveira J.M. (2014)** Consecutive alcoholic fermentations of white grape musts with yeasts immobilized on grape skins – effect of biocatalyst storage and SO₂ concentration on wine characteristics. *LWT – Food Science and Technology* 59, 1114-1122
- Giovannini E.; Manfroi, V. (2009)** Viticultura e Enologia: elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros. *Bento Gonçalves: IFRS*, 2009.
- Hashizume T. (2001)** Tecnologia do vinho. Aquarone E, Borzani W, Schimidell W, Lima UA, *Biotechnologia industrial*, 21–66.
- Jackson R.S. (2002)** Wine Tasting: A Professional Handbook. *Elsevier Academic Press*.
- Jackson R.S. (2008)** Wine Science: Principles and Applications, *Elsevier Inc 3rd ed.*
- Klein J., Wagner F. (1986)** Methods for the immobilisation of microbial cells. *Appl. Biochem. Bioeng.* 4, p. 11-51.
- LaVilla J., Nenes F.M., (2009)** The Wine, Beer, and Spirits Handbook: A Guide to Styles and Service. *The International Culinary Schools at The Art Institutes*. 1st edition. <http://eu.wiley.com/WileyCDA/Section/id-302479.html?query=The+International+Culinary+Schools+at+The+Art+Institutes>.
- Magalhães N. (2008)** Tratado de Viticultura A videira A vinha O terroir. *Chaves Ferreira Publicações*.
- Marchal R., Seguin V., Maujean A. (1997)**. Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the Champagne region using the Bradford method. *Am. J. Enol. Vitic.* 1997, 48, 303.
- Moreira J.L., Marcos A.M., Barros P. (2002)** Analysis of Portuguese Wines by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 17, 23–33.
- Moreira J.L, Santos L. (2004)** Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 263–268.
- Navarre C (1997)** Enologia: Técnicas de produção do vinho. *Publicações Europa-América. Lisboa*.
- NP 4263 (1994)** Análise Sensorial- *Vocabulário*. *IPQ, Lisboa*.
- OIV-OENO 390 (2010)** Guidelines on infrared analysers in oenology.

- Pato O (1988)** O vinho: sua preparação e conservação. *Livraria Clássica Editora*, 8. Ed. Lisboa.
- Pedro J., (1997)** Aprendendo a Química: *Química*, 65 1997, *Universidade do Minho, Guimarães*
- Petcu C., (2006)** HACCP-Food safety guarantor, *Ed. Idea Design*, ISBN 973-624-415-6, ISBN 978-973-624-415-5, *Bucuresti*.
- Pretorius, I.S., (2000)** Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. *Yeast* 16, 675-729.
- Pomohaci N., Stoian V., (2001)** – Operations and treatments applied to wine. *Oenology vol. 2. Ceres, Bucharest*.
- Pozo-Bayon M.A., Martinez-Rodriguez A., Pueyo E., Moreno-Arribas M.V. (2009)** Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends Food Sci. Technol.* 20: 289-299.
- Ribéreu-Gayon P., Dubourdieu D., Donéche B., Lonvaud A. (2006)** Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications, *2nd ed. John Wiley & Sons Ltd., England*.
- Rizzon L.A., Miele A. (2006)** Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil. *Ciência Rural* 36, 959–964.
- Russell J.D., Fraser A.R. (1994)** Infrared methods. Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods, *Springer-Science+Business Media, B.V* 11–67.
- Saracco C., Gozzelino A. (1995)** Produzione dei vini espumanti e frizzanti. *Edagricole – Edizioni Agricole della Calderini*, Bologna, 110 p.
- Skjak-Braek G., Grasdalen H., Smidsrod O. (1989)**. Inhomogeneous polysaccharide ionic gel. *Carbohydr. Polym.*, 10, 31- 54.
- Torrens J., Riu-Aumatell M., Lopez-Tamames E., Buxaderas S. (2004)** Volatile compounds of red and white wines by headspace–solid-phase microextraction using different fibers. *J. Chromatogr. Sci.* 42, 310–316.
- Vieira E. (2013)** Estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Wine – Wine Solutions*, Lda. Patent WO2013153540 A1.
- Vilela-Moura A., Schuller D., Mendes-Faia A., Silva R.D., Chaves S.R., Sousa M.J., Côte-Real M. (2011)** The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality:

reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 271–280.

Yokotsuka K., Mizuo Y., Toshihide M. (1997) Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 471–481.

Zambonelli C. (2006). La rifermentazione in bottiglia. In: Edagricole (Ed.) *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. I processi biologici e le tecnologie della vinificazione, 207

Anexos

Anexo A. Monitorização da pressão do CO₂

A monitorização do CO₂ foi monitorizada durante os dois meses de espumantização. Na Tabela A.1 são só apresentados os valores até ao dia 35 e depois o dia 60 porque os valores foram iguais.

Tabela A.1 – Monitorização da pressão (p) de CO₂ com as respetivas fugas a cor azul

	Imob _{comercial}	Extra em pé	CCG _E	EP _E	Imob _E	CCG _{comercial}
Dia	p /bar					
1	1,5	0,0	0,5	0,3	0,0	0,4
2	1,7	0,0	0,8	0,5	0,0	0,4
3	1,7	0,0	1,2	0,7	0,0	0,5
6	1,7	0,3	1,7	1,4	1,9	0,8
7	0,0	0,5	2,0	1,6	2,0	1,0
8	0,9	0,6	2,1	1,9	2,1	1,1
9	1,0	0,9	0,0	2,1	2,1	1,2
10	1,0	1,0	0,5	2,3	2,1	1,2
13	1,2	1,2	1,2	2,7	1,9	1,2
14	1,2	1,3	1,5	2,8	2,0	1,2
15	1,4	1,4	1,7	2,9	2,1	1,2
16	1,5	1,5	2,0	2,9	2,1	1,2
17	1,5	1,6	2,2	3,0	2,1	1,2
21	1,8	1,9	3,0	3,0	2,1	1,2
22	1,9	1,9	3,1	3,0	2,1	1,2
23	1,9	1,9	3,2	3,1	1,9	1,2
24	1,9	1,9	3,7	3,1	1,9	1,2
25	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
28	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
29	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
30	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
31	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
32	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
35	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
...	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2
60	1,9	1,9	3,9	3,1	1,9	1,2

Nota: a cor cinza significa fuga.

Anexo B. Curvas calibração das análises por HPLC

As retas de calibração, construídas com 6 pontos (incluindo o zero), e respectivas concentrações máximas para cada composto, estão apresentadas na Tabela A.2.

Tabela A.2 – Curvas de calibração utilizadas nas determinações por HPLC área (A) em função da concentração (C) e respetivo coeficiente de correlação, e concentrações máximas usadas

Composto	Curva de calibração	Concentração Máxima, $C_{\text{máx}}$
Glucose	$\frac{A}{\text{mV s}} = (861.21 \pm 57.80) \frac{C}{\text{g L}^{-1}} + (271.33 \pm 521.49); R^2 = 0.998$	14,90 g L ⁻¹
Frutose	$\frac{A}{\text{mV s}} = (849,61 \pm 82,79) \frac{C}{\text{g L}^{-1}} + (341,31 \pm 751,29); R^2 = 0.995$	14,99 g L ⁻¹
Etanol	$\frac{A}{\text{mV s}} = (305,64 \pm 27,69) \frac{C}{\text{mL L}^{-1}} + (695,24 \pm 1173,74); R^2 = 0.996$	70 mL L ⁻¹
Glicerol	$\frac{A}{\text{mV s}} = (690,28 \pm 50,78) \frac{C}{\text{g L}^{-1}} + (81,46 \pm 139,48); R^2 = 0.997$	4,54 g L ⁻¹
Ácido Cítrico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (4405,9 \pm 457,55) \frac{C}{\text{g L}^{-1}} + (60,348 \pm 125,95); R^2 = 0.994$	0,46 g L ⁻¹
Ácido Tartárico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (6754 \pm 480,29) \frac{C}{\text{g L}^{-1}} + (395,67 \pm 581,66); R^2 = 0.997$	2,00 g L ⁻¹
Ácido Málico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (3690,9 \pm 200,05) \frac{C}{\text{g L}^{-1}} + (105,39 \pm 171,47); R^2 = 0.998$	1,42 g L ⁻¹
Ácido Succínico	$\frac{A}{\text{mV s}} = (2695,2 \pm 576,49) \frac{C}{\text{g L}^{-1}} + (38,87 \pm 165,96); R^2 = 0.977$	0,48 g L ⁻¹