

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA GAENSLY

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS AUTÓCTONES PRODUTORAS DA  
ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE EM MOSTO DE UVAS *Vitis labrusca* VISANDO O  
AUMENTO DO TEOR DE RESVERATROL LIVRE**

CURITIBA

2016

FERNANDA GAENSLY

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS AUTÓCTONES PRODUTORAS DA  
ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE EM MOSTO DE UVAS *Vitis labrusca* VISANDO O  
AUMENTO DO TEOR DE RESVERATROL LIVRE**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas (Banpesq n°2011006260).

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Tania Maria Bordin Bonfim  
Co-orientador: Gildo Almeida da Silva

CURITIBA

2016

Gaensly, Fernanda

Seleção de leveduras vínicas autóctones produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase em mosto de uvas *Vitis labrusca* visando o aumento do teor de resveratrol livre / Fernanda Gaensly - Curitiba, 2016.  
131 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tania Maria Bordin Bonfim

Coorientador: Professor Dr. Gildo Almeida da Silva

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Levedura vínica. 2.  $\beta$ -glicosidase. 3. Piceid. 4. Seleção de levedura. 5. *Hanseniaspora uvarum*.  
I. Bonfim, Tania Maria Bordin. II. Silva, Gildo Almeida da. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 663.2

# TERMO DE APROVAÇÃO

**FERNANDA GAENSLY**

**Título: "SELEÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS AUTÓCTONES PRODUTORAS DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE EM MOSTO DE UVAS *Vitis labrusca* VISANDO O AUMENTO DO TEOR DE RESVERATROL LIVRE"**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Maria Bordin Bonfim  
Orientadora



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Regina Tozato Prado  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Aparecida Vicente  
Universidade Federal do Paraná



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Grace Maria Ferreira de Castro Wille  
Universidade Federal do Paraná



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mara Woranovicz Barreira  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 22 de junho de 2016.

A presente tese é resultado do acordo cooperativo, que entre si celebram a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) junto à unidade Uva e Vinho de Bento Gonçalves, RS. Estas duas instituições estabeleceram um projeto de pesquisa que foi contemplado com a bolsa de doutorado que subsidiou esta tese perante o EDITAL CONJUNTO CAPES/EMBRAPA Nº 001/2011.

Os Projetos de Extensão Universitária "Isolamento, conservação e seleção de linhagens de leveduras com características enológicas para a elaboração de vinhos (PROEC 894/14), "Elaboração de vinhos por vitivinicultores do estado do Paraná com leveduras autóctones selecionada" (PROEC 090/09F) e o Programa de Extensão Universitária "Desenvolvimento e transferência de tecnologia para melhoria dos produtos da uva visando o fortalecimento da comunidade produtora" (PROEC 090/09) contribuíram para a realização da presente tese de doutorado.

Para Daniel e Olivia

## **AGRADECIMENTOS**

A construção de uma tese de doutorado é certamente uma das tarefas mais desafiadoras e interessantes da vida acadêmica, pois embora seja uma tarefa de natureza individual, o nome escrito na primeira destas folhas pouco importa, pois sozinha, nada teria feito. Um trabalho deste porte é um trabalho coletivo, sendo que muitas vezes, muitos nomes importantes são os que aparecem aqui, injustamente escondidos em meio a agradecimentos que muitas vezes sequer são lidos.

Portanto, primeiramente, gostaria de expressar não apenas meu agradecimento, mas minha sincera admiração à Prof. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim, pelos nove anos de orientação, pelo importante incentivo para que esta pesquisa tivesse início, meio e fim em todas as fases de sua realização, compreensão durante a orientação, disposição ao auxiliar na resolução dos inevitáveis problemas que aparecem em um percurso longo como esse, e principalmente pelo seu exemplo acadêmico, profissional e pessoal.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, no nome de seus coordenadores; Prof. Dr. Roberto Pontarolo, pelas conversas proferidas aos alunos, nos mostrando o que é ser um pesquisador no Brasil e de como devemos ter sempre em mente que as pesquisas devem proporcionar um retorno à nossa sociedade; Prof. Dr. Geraldo Picheth, pelo auxílio individualizado nas análises estatísticas, construção de gráficos, esquemas e tabelas, na elaboração dos artigos, por estar sempre disposto a dividir seu tempo e conhecimentos.

Ao Dr. Gildo Almeida da Silva, que mesmo de longe, depositou sua confiança e aceitou orientar este trabalho.

Aos técnicos Ms. Maria das Graças e Dr. Maurício Passos, pelos ensinamentos e acompanhamento na realização das análises de cromatografia líquida em alta eficiência.

Aos vitivinicultores do estado do Paraná, especialmente ao Sr. Bruno Batistão e Fernando Camargo, pelo tempo concedido, pelas uvas cedidas, pelas experiências divididas.

Aos colegas de pós-graduação do laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Rossana Calegari dos Santos, Bruna Carla Agustini, Paola Augusta Yaegashi Paludo, Kamilla Louise Schneider, Flávia Deffert, Samarina

Rodrigues Wlodarczyk, Gilberto Alves de Lima Júnior, pela convivência diária e pelo conhecimento compartilhado.

Às alunas de graduação Thalita Ukan Aguiar e Caroline Cristina Cornehl, pelo auxílio no isolamento e conservação das leveduras e pela confiança na orientação de Iniciação Científica.

Aos professores Dr. José Domingos Fontana e Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira, pelas contribuições a esta tese durante a qualificação.

Às professoras Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira pelas contribuições a esta tese durante a defesa.

Ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, em nome da Prof. Dra. Cláudia Carneiro Hecke Krüger, por compartilhar o equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.

À Embrapa Uva e Vinho, pelo auxílio nas análises de identificação das leveduras por biologia molecular PCR-RFLP.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo auxílio nas análises de identificação das leveduras por espectrometria de massa MALDI-TOF.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro e bolsa de doutorado.

E, finalmente, ao meu marido, Felipe Maia Gomide, e à minha mãe, Rosane Nadolny Gaensly, pelo incentivo, carinho e paciência durante estes anos.

*"You have brains in your head.*

*You have feet in your shoes.*

*You can steer yourself in any direction you choose.*

*You're on your own, and you know what you know.*

*And you are the guy who'll decide where to go."*

*- Dr. Seuss*

## RESUMO

O vinho tinto é uma das principais fonte de resveratrol na dieta. Diferentes estratégias têm sido adotadas em vinificação para obter vinhos enriquecidos com resveratrol pois consumidores pagariam mais em um produto funcional, visto que este estilbeno possui múltiplas atividades biológicas benéficas. Leveduras com ação da enzima  $\beta$ -glicosidase, isoladas de uvas, podem aumentar a concentração de resveratrol livre em vinhos hidrolisando seu glicosídeo, piceid, sem modificar a composição ou características organolépticas finais do produto. O objetivo deste trabalho foi isolar, selecionar e identificar leveduras de uvas do estado do Paraná, com ação da enzima  $\beta$ -glicosidase sobre o substrato piceid, visando o resveratrol livre, adequadas para a elaboração de vinhos. Um total de 308 leveduras obtidas de diferentes tempos de fermentação espontânea de mosto de uvas foram isoladas e avaliadas primeiramente utilizando os substratos celobiose, arbutin e esculin para verificar a reação de hidrólise catalisada pela enzima  $\beta$ -glicosidase. As 58 leveduras com capacidade hidrolítica foram identificadas por testes fenotípicos, espectrometria de massa MALDI-TOF/MS, reação em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) da região ITS do DNA ribossomal. A ação da enzima  $\beta$ -glicosidase no substrato piceid foi verificada nas leveduras identificadas. Uma levedura *Saccharomyces* e 32 leveduras não-*Saccharomyces* hidrolisaram o substrato piceid em resveratrol e glucose. Destas, durante a fermentação, quatorze leveduras hidrolisaram o substrato piceid presente no mosto de uva *Vitis labrusca* em resveratrol livre e glucose. Houve um aumento na concentração inicial de resveratrol livre de 102% sem exibir diferença significativa entre quatorze diferentes leveduras. Quatro leveduras *Hanseniaspora uvarum* apresentaram características enológicas desejadas e foram utilizadas em fermentações com mosto de uva *Vitis labrusca*, tanto em monocultura quanto em inóculo misto. Os resultados sugerem que a ação da enzima  $\beta$ -glicosidase de leveduras não depende somente da espécie avaliada, mas também das características individuais de cada levedura. Uma levedura *Hanseniaspora uvarum* isolada, quando utilizada em monocultura, inóculo misto ou inóculo misto sequencial, interferiu na elaboração de vinhos, aumentando a concentração de resveratrol livre.

Palavras-chave: Levedura vínica.  $\beta$ -glicosidase. Piceid. Seleção de levedura. *Hanseniaspora uvarum*.

## ABSTRACT

The red wine is one of the main resveratrol sources in the diet. Different strategies have been adopted in winery in order to obtain resveratrol-enriched wines, since consumers would pay more for a functional wine, as this stilbene possesses various beneficial biological activities. Wine yeasts endowed with  $\beta$ -glucosidase activity can increase the free resveratrol content in wines by hydrolyzing its glycoside, piceid, without modifying the product's final composition or organoleptic characteristics. The objective of this work was to isolate, select and identify yeasts from native grapes grown in Parana state vineyards endowed with  $\beta$ -glucosidase activity over the piceid substrate, aiming at free resveratrol, and adequate to be used in winery. A total of 308 yeasts, from different steps of the spontaneous fermentation from grape must, were isolated and tested, firstly over the substrates cellobiose, arbutin, and esculin to verify the reaction catalyzed by the  $\beta$ -glucosidase enzyme. The 58 yeasts with hydrolytic capability were identified by phenotypic analysis, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) from the ITS region of ribosomal DNA. The activity of the  $\beta$ -glucosidase over the substrate piceid was evaluated employing the identified yeasts. One *Saccharomyces* and 32 non-*Saccharomyces* yeasts hydrolyzed piceid to resveratrol and glucose. During the fermentation, fourteen out of the 33 yeasts hydrolyzed the substrate piceid existing in *Vitis labrusca* grape must to free resveratrol. A 102% increment from the initial free resveratrol was observed without significant difference between the fourteen different yeasts. Four *Hanseniaspora uvarum* also presented desired oenological characteristics and were later employed in grape must fermentation, in both single and mixed cultures. The results suggest that the  $\beta$ -glucosidase activity is more dependent on the yeasts' individual characteristics than on their species. One isolated *Hanseniaspora uvarum*, when employed in single, mixed or sequential mixed fermentation, can yield the production of resveratrol-enriched wines.

Keywords: Wine yeast.  $\beta$ -glucosidase. Piceid. Yeast selection. *Hanseniaspora uvarum*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE UVAS CULTIVADAS E UVAS SELVAGENS .....	22
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA GENÉRICA PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS TINTOS .....	27
FIGURA 3 -	ESTRUTURA DE REPETIÇÃO DO rDNA DE LEVEDURAS .....	36
FIGURA 4 -	ESTRUTURA DO RESVERATROL.....	42
FIGURA 5 -	BIOSÍNTESE DO RESVERATROL .....	43
FIGURA 6 -	NÚMERO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS ENCONTRADOS COM O TERMO "RESVERATROL" EM FUNÇÃO DO ANO DE PUBLICAÇÃO.....	45
FIGURA 7 -	FATORES QUE INFLUENCIAM A CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL DURANTE A ELABORAÇÃO DE VINHOS TINTOS.....	50
FIGURA 8 -	ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES .....	58
FIGURA 9 -	COLÔNIAS DE MICRO-ORGANISMOS CRESCIDOS NA TEMPERATURA DE 28 °C NA SUPERFÍCIE DE MEIO SÓLIDO YPG (pH 4,5) PROVENIENTES DA AMOSTRA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE MOSTO DE UVAS NATIVAS DE ALMIRANTE TAMANDARÉ .....	73
FIGURA 10 -	COLÔNIAS DE MICRO-ORGANISMOS CRESCIDOS NA TEMPERATURA DE 28 °C NA SUPERFÍCIE DE MEIO SÓLIDO YPG (pH 4,5) PROVENIENTES DA AMOSTRA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE MOSTO DE UVAS NATIVAS COLOMBO.....	73
FIGURA 11 -	CÉLULAS DA LEVEDURA CB1.031.34 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO .....	75
FIGURA 12 -	CÉLULAS DA LEVEDURA CB1.452.06 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO .....	75
FIGURA 13 -	CÉLULAS DA LEVEDURA AT1.462.79 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO .....	76
FIGURA 14 -	CÉLULAS DA LEVEDURA AT2.631.16 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO .....	76
FIGURA 15 -	CÉLULAS DA LEVEDURA CB1.731.17 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO .....	77
FIGURA 16 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA CELOBIOSE CATALISADA PELA ENZIMA $\beta$ - GLICOSIDASE.....	78
FIGURA 17 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ARBUTIN CATALISADA PELA ENZIMA $\beta$ - GLICOSIDASE.....	79

FIGURA 18 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ESCULIN CATALISADA PELA ENZIMA $\beta$ - GLICOSIDASE.....	80
FIGURA 19 -	NÚMERO DE LEVEDURAS PRODUTORAS OU NÃO DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM QUE FORAM ISOLADAS...	81
FIGURA 20 -	PROBABILIDADE (%) DAS LEVEDURAS SELECIONADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE DE PERTECEREM A CADA GÊNERO INDICADO .....	84
FIGURA 21 -	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E O NÚMERO DE LEVEDURAS SELECIONADAS DE CADA ESPÉCIE .....	85
FIGURA 22 -	REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PICEID CATALISADA PELA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE .....	88
FIGURA 23 -	CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS CONSUMIDOS ( $\text{g.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE.....	92
FIGURA 24 -	REPRESENTAÇÃO DA RAZÃO ENTRE A PORCENTAGEM DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE DE CADA LEVEDURA ISOLADA PRODUTORA DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE .....	93
FIGURA 25 -	CONCENTRAÇÕES DE ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE.....	94
FIGURA 26 -	CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ - GLICOSIDASE .....	95
FIGURA 27 -	CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE.....	96
FIGURA 28 -	LEVEDURAS NÃO- <i>Saccharomyces Hanseniaspora opuntiae</i> 199, <i>Candida zemplinina</i> 204, <i>Hanseniaspora uvarum</i> 296, <i>Candida zemplinina</i> 211, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> 232 E <i>Hanseniaspora opuntiae</i> 237 CRESCIDAS NA TEMPERATURA DE 28 °C NA SUPERFÍCIE DE MEIO SÓLIDO ACETATO DE CHUMBO.....	99
FIGURA 29 -	ESQUEMA DA SELEÇÃO DAS LEVEDURAS AUTÓCTONES DO ESTADO DO PARANÁ ISOLADAS COM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL E CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS .....	100
FIGURA 30 -	VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) EM FERMENTAÇÕES INICIADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LC-SC) E A LEVEDURA <i>Hanseniaspora uvarum</i> 187 (Hu 187) COM $10^7$ CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$ DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO.....	102

FIGURA 31 -	VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LC-SC) INICIADAS COM $10^7$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA E COM A LEVEDURA <i>Hanseniaspora uvarum</i> 187 (HU 187) INICIADAS COM $10^8$ E $10^9$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO .....	103
FIGURA 32 -	VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LC-SC) COM $10^7$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA E INICIADAS COM A LEVEDURA <i>Hanseniaspora uvarum</i> 187 (HU 187) COM $10^8$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO .....	105
FIGURA 33 -	VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LC-SC) COM $10^7$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA E INICIADAS COM A LEVEDURA <i>Hanseniaspora uvarum</i> 187 (HU 187) COM $10^8$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO .....	107
FIGURA 34 -	VALOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADOS COM AS LEVEDURAS <i>Hanseniaspora uvarum</i> 148 (HU 148), <i>Hanseniaspora uvarum</i> 187 (HU 187), <i>Hanseniaspora uvarum</i> 189 (HU 189) E <i>Hanseniaspora uvarum</i> 206 (HU 206) COM $10^8$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO .....	108
FIGURA 35 -	CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL (mg.L <sup>-1</sup> ), GLUCOSE RESIDUAL (g.L <sup>-1</sup> ), FRUTOSE RESIDUAL (g.L <sup>-1</sup> ), GLICEROL (g.L <sup>-1</sup> ), ÁCIDO ACÉTICO (g.L <sup>-1</sup> ) E ETANOL (g.L <sup>-1</sup> ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA <i>Vitis labrusca</i> INOCULADO COM AS LEVEDURAS <i>Hanseniaspora uvarum</i> 148 (HU 148), <i>Hanseniaspora uvarum</i> 187 (HU 187), <i>Hanseniaspora uvarum</i> 189 (HU 189) OU <i>Hanseniaspora uvarum</i> 206 (HU 206) .....	109
FIGURA 36 -	TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADOS COM AS LEVEDURAS <i>Hanseniaspora uvarum</i> 148 (HU 148), <i>Hanseniaspora uvarum</i> 187 (HU 187), <i>Hanseniaspora uvarum</i> 189 (HU 189) OU <i>Hanseniaspora uvarum</i> 206 (HU 206) COM $10^8$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA EM CONJUNTO COM A LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LC-SC) COM $10^7$ CÉLULAS.g <sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO .....	110

- FIGURA 37 - CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA *Vitis labrusca* INOCULADO NO INÍCIO COM INÓCULO MISTO DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) E DE CADA LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum*: *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206) ..... 111
- FIGURA 38 - VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) NAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) INICIADO COM  $10^7$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA APÓS 48 HORAS DA INOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206) INICIADAS COM  $10^8$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO..... 112
- FIGURA 39 - CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA *Vitis labrusca* INOCULADO NO INÍCIO COM LEVEDURAS *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206) E APÓS 48 HORAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC- SC)..... 114
- FIGURA 40 - CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA *Vitis labrusca* INOCULADA COM A LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187) COM  $10^8$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA EM MONOCULTURA, INÓCULO MISTO OU INÓCULO MISTO SEQUENCIAL APÓS 48 HORAS, COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) COM  $10^7$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA..... 116

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS EM UVAS E VINHOS.....	25
TABELA 2 - REAGENTES EMPREGADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA NA REAÇÃO DE PCR.....	64
TABELA 3 - TEMPOS DE RETENÇÃO, INTERVALOS DE CONCENTRAÇÕES AVALIADAS, EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ ) PARA OS PADRÕES PICEID E RESVERATROL .....	70
TABELA 4 - TEMPOS DE RETENÇÃO, INTERVALOS DE CONCENTRAÇÕES AVALIADAS, EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ ) PARA OS PADRÕES GLUCOSE, FRUTOSE, ÁCIDO ACÉTICO, GLICEROL E ETANOL.....	71
TABELA 5 - REAÇÕES EMPREGANDO OS SUBSTRATOS CELOBIOSE, ESCULIN E ARBUTIN E AS LEVEDURAS ISOLADAS .....	81
TABELA 6 - RESULTADO DAS REAÇÕES UTILIZANDO OS SUBSTRATOS CELOBIOSE, ARBUTIN, ESCULIN E PICEID CATALISADAS PELA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE DAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces</i> E NÃO- <i>Saccharomyces</i> .....	89

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
3.1	VITIVINICULTURA.....	21
3.2	LEVEDURAS.....	33
3.3	RESVERATROL.....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
4.1	AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO .....	53
4.2	COLETA DE UVAS .....	54
4.3	MEIOS DE CULTURA.....	55
4.4	ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS.....	56
4.5	SELEÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ - GLICOSIDASE .....	59
4.6	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE .....	60
4.6.1	Identificação fenotípica .....	60
4.6.2	Identificação taxonômica por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS.....	61
4.6.3	Identificação taxonômica por reação em cadeia da polimerase - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).....	63
4.7	DETECÇÃO DA AÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE DAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces</i> E NÃO- <i>Saccharomyces</i> NO SUBSTRATO PICEID.....	65
4.8	FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MOSTO DE UVA E AS LEVEDURAS <i>Saccharomyces</i> E NÃO- <i>Saccharomyces</i> ; PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE .....	66
4.9	LEVEDURAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE COM CAPACIDADE DE FORMAR SULFETO DE HIDROGÊNIO .....	67
4.10	COMPARAÇÃO DE FERMENTAÇÕES UTILIZANDO LEVEDURA AUTÓCTONE <i>Hanseniaspora uvarum</i> E LEVEDURA VÍNICA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	67

4.11	ANÁLISES .....	69
4.11.1	Determinação de resveratrol e piceid .....	69
4.11.2	Determinação de glucose, frutose, ácido acético, glicerol e etanol .....	70
4.11.3	Análises Estatísticas .....	71
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1	ISOLAMENTO DE LEVEDURAS .....	72
5.2	SELEÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE .....	78
5.3	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE .....	82
5.4	DETECÇÃO DA AÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE DAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces</i> E NÃO- <i>Saccharomyces</i> NO SUBSTRATO PICEID .....	87
5.5	FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MOSTO DE UVA E AS LEVEDURAS <i>Saccharomyces</i> E NÃO- <i>Saccharomyces</i> ISOLADAS; PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE.....	90
5.6	COMPARAÇÃO DE FERMENTAÇÕES UTILIZANDO LEVEDURA AUTÓCTONE <i>Hanseniaspora uvarum</i> E LEVEDURA VÍNICA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	101
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A vinicultura brasileira é uma atividade econômica que gera oportunidades de emprego, promove desenvolvimento econômico e sustentabilidade social. Em 2012, o Brasil ocupou a 13<sup>a</sup> posição no volume de vinho produzido mundialmente (FAOSTAT, 2014). Os estados do Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo e Paraná são os principais responsáveis pelo cultivo de uvas no Brasil, porém no ano de 2014 todos estes estados apresentaram redução na produção de uvas, enquanto que Bahia e Santa Catarina apresentaram um aumento de 46% e 24%, respectivamente (MELLO, 2015). Apesar da uva *Vitis vinifera* ser tradicionalmente utilizada em vinificação, 80% dos vinhos no Brasil são produzidos com uvas *Vitis labrusca*, os quais possuem grande aceitação pelos consumidores e consequente importância econômica (BIASOTO et al., 2014). De acordo com os vinicultores paranaenses, a quantidade de vinho produzido aumenta anualmente; para suprir a demanda crescente. Uma vez que o vinho regional é pouco valorizado, diferentes estratégias podem ser empregadas para agregar preço ao produto.

O resveratrol, um polifenol estilbenoide, é objeto de pesquisa de diversos estudos *in vitro* e *in vivo* que enfatizam seus benefícios à saúde (WU et al., 2013; POULSEN et al., 2014). O vinho tinto é a principal fonte de resveratrol na dieta, e a sua concentração nos vinhos depende da cultivar da uva, localização geográfica, estresse sofrido pela videira e práticas enológicas (STERVBO; VANG e BONNESEN, 2007; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

O aumento da concentração do resveratrol em vinhos a partir de seu glicosídeo precursor pode melhorar a farmacocinética deste estilbeno, pois este é melhor absorvido na sua forma livre (MENG et al., 2004; PATEL et al., 2011). Além disso, a forma livre do resveratrol não altera as características físico-químicas e sensoriais originais do vinho (TODARO et al., 2008). Barreiro-Hurlé et al. (2008) descrevem que consumidores pagariam até 55% a mais em um vinho com elevado teor de resveratrol.

Tendo em vista que a forma glicosídica do resveratrol, piceid, pode ser hidrolisada pela enzima  $\beta$ -glicosidase (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU et al., 2006) pode-se explorar o potencial da biodiversidade de leveduras autóctones realizando-se a busca por leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase. Como poucas leveduras *Saccharomyces sp.* produzem a enzima  $\beta$ -glicosidase, estudos

buscam leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de uvas para prover características específicas aos vinhos (COMITINI et al., 2011; DOMIZIO et al., 2011; HONG e PARK, 2013). A falta de metodologias capazes de simular condições de vinificação é um limitante para a seleção de leveduras com atividade  $\beta$ -glicosidásica pois não existem critérios específicos para a seleção de leveduras vínicas não-*Saccharomyces* (PÉREZ et al., 2011).

A condução de processos fermentativos com a inoculação controlada de diferentes espécies de leveduras é uma estratégia para melhor explorar as características enológicas de leveduras não-*Saccharomyces* e de se estudar como estas espécies interagem com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (COMITINI et al., 2011).

Portanto, este trabalho buscou isolar leveduras de uvas, provenientes do estado do Paraná, selecionando as produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase capazes de aumentar o teor de resveratrol livre a partir do substrato piceid e adequadas para a elaboração de vinhos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Isolar, selecionar e identificar leveduras de uvas, cultivadas no estado Paraná, produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase com ação sobre o substrato piceid visando o aumento do resveratrol livre, adequadas para a elaboração de vinhos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e conservar leveduras vínicas autóctones do estado do Paraná;

Selecionar, dentre as leveduras vínicas isoladas, as com ação da enzima  $\beta$ -glicosidase;

Identificar as leveduras selecionadas;

Verificar se as leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase são capazes de catalisar a reação de hidrólise do substrato piceid, em resveratrol livre e glucose, durante a fermentação alcoólica utilizada no processo de vinificação;

Realizar fermentações, utilizando mosto de uva *Vitis labrusca*, com as leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase e uma levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de comparar a capacidade de aumentar o teor de resveratrol livre.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 VITIVINICULTURA

<sup>1</sup>*"Eu acredito ser um grande erro considerar as elevadas taxas sobre vinho como um imposto sobre o luxo. Ao contrário, é uma taxa sobre a saúde de nossos cidadãos." (Thomas Jefferson)*

Vitivinicultura é o cultivo da videira (viticultura) destinada à produção de uvas para a elaboração de vinhos (vinicultura) (PEREIRA; GUERRA e MANFROI, 2009).

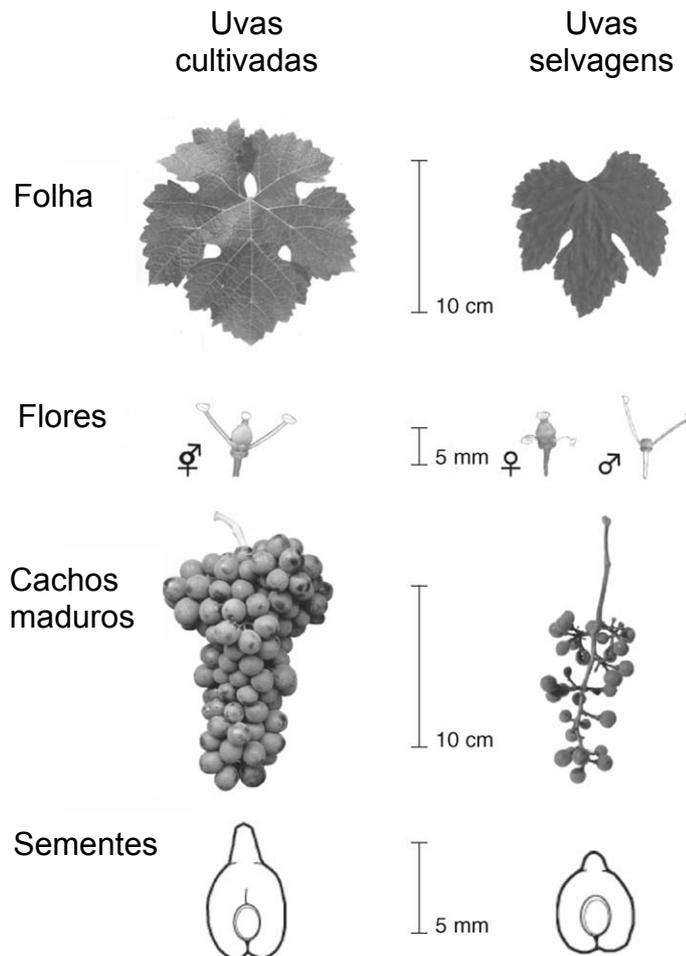
O vinho pode ser considerado o mais antigo empreendimento biotecnológico em que a humanidade está envolvida. Apesar da natureza artesanal de seu processo, a vinicultura inspira um grande número de pesquisas e publicações, maior que qualquer outra bebida ou alimento, e cientistas como Antoine-Laurent de Lavoisier e Louis Pasteur colocaram a enologia em destaque no ramo das ciências biológicas e químicas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; BORNEMAN; SCHMIDT e PRETORIUS, 2013).

A descoberta do vinho relaciona-se com o processo de domesticação das uvas, mesmo não sendo possível determinar qual processo ocorreu primeiro. Durante a domesticação das uvas, a biologia destas passou por diversas mudanças, representadas na FIGURA 1, visando aumentar o teor de açúcar para a consequente melhora na fermentação, melhor produtividade e processos mais previsíveis. As mudanças no grão, tamanho do cacho e da forma dioica nas plantas selvagens para a forma hermafrodita das plantas cultivadas foram de grande importância para a viticultura. As alterações na morfologia das sementes também ocorreram, e mesmo sem importância biológica conhecida, esta característica é utilizada para análises de descobertas arqueológicas para diferenciar uvas selvagens de uvas cultivadas (THIS; LACOMBE e THOMAS, 2006).

---

<sup>1</sup> *"I think it is a great error to consider a heavy tax on wines as a tax on luxury. On the contrary, it is a tax on the health of our citizens." (Thomas Jefferson, 1818)*

FIGURA 1 - DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE UVAS CULTIVADAS E UVAS SELVAGENS



FONTE: THIS; LACOMBE e THOMAS (2006).

NOTA: Estão representadas as diferenças nas folhas, flores (masculina e feminina para a uva selvagem), o cacho maduro e as sementes.

Dentre as diferentes variedades de uva existentes no mundo, a maioria pertence à espécie *Vitis vinifera*, originária do Cáucaso, de onde foi difundida por toda a costa mediterrânea há centenas de anos, tanto para a produção de fruta para consumo *in natura*, como para a elaboração de vinhos. O Brasil pertence ao chamado novo mundo vitivinícola, juntamente com Chile, Argentina, Estados Unidos, África do Sul e Austrália (GUERRA et al., 2009).

Apesar da uva *Vitis vinifera* ser a mais empregada para a elaboração de vinhos mundialmente, no Brasil a quantidade de vinhos elaborados com uvas americanas da espécie *Vitis labrusca* e/ou uvas híbridas obtidas do cruzamento entre *Vitis vinifera* e espécies híbridas americanas excede a quantidade dos vinhos elaborados com uvas *Vitis vinifera*, representando 80% dos vinhos produzidos. Em várias regiões brasileiras as condições climáticas não são favoráveis ao cultivo de uvas *Vitis vinifera*, uma vez que a colheita das uvas acontece durante períodos de

chuva. Além disso, as uvas americanas possuem a vantagem de serem mais resistentes a doenças, mostrando boa adaptação às condições climáticas adversas, como os verões muito úmidos (BIASOTO et al., 2014). No Brasil, as cultivares Bordô, Isabel, Niágara e Concord correspondem a 50% das uvas *Vitis labrusca* cultivadas (TOALDO et al., 2015).

O vinho é definido como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. O vinho de mesa é o vinho com teor alcoólico de 8,6% a 14% (v/v), e a legislação também define que o vinho de mesa de viníferas é o vinho elaborado exclusivamente com uvas *Vitis vinifera*, e o vinho de mesa de americanas é o vinho elaborado com uvas americanas e/ou híbridas, podendo conter uvas *Vitis vinifera* (BRASIL, 1988).

A abordagem da tecnologia que deve ser empregada no cultivo da videira para viticultura (produção de uvas de mesa para o consumo *in natura*) difere do cultivo para a vitivinicultura, pois, nesta última, deve-se buscar colher uvas que apresentem composição físico-química adequada e equilibrada para que os processos de transformação do mosto resultem em vinhos de qualidade (PEREIRA; GUERRA e MANFROI, 2009). Uma vez que as uvas constituem a matéria-prima para a elaboração de vinhos, o grau de maturação das uvas é um dos principais fatores que irão determinar a qualidade do vinho, especialmente no que se refere ao aumento do teor de açúcares e diminuição da acidez (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Os componentes da uva essenciais para a qualidade do vinho são os açúcares, os ácidos orgânicos, os aminoácidos e os compostos fenólicos (PEREIRA; GUERRA e MANFROI, 2009).

Os principais açúcares presentes na uva são glucose e frutose. Estes usualmente estão presentes na mesma proporção em uvas maduras, mas uvas que passaram da maturidade podem apresentar uma proporção superior de frutose, pois a glucose é preferencialmente metabolizada na respiração celular. Outros açúcares também estão presentes, mas em quantidades insignificantes. A sacarose raramente é encontrada em uvas *Vitis vinifera*, mas pode constituir até 10% do teor de açúcares em outras cultivares. A sacarose, presente naturalmente ou adicionada ao processo, é clivada pela enzima invertase em glucose e frutose durante a fermentação. O teor de açúcares depende da espécie, cultivar, grau de maturação e condições sanitárias da fruta. Cultivares de *Vitis vinifera* geralmente atingem um teor

de açúcares de 20% quando maduras; outras espécies, como a *Vitis labrusca*, raramente alcançam este teor sendo normalmente necessária a adição de açúcar ao mosto para que o teor alcoólico atinja o grau necessário (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008c). Os monossacarídeos existentes na uva podem se combinar para formar estruturas poliméricas, como pectinas, gomas, amidos, hemicelulose e celulose, ou se ligar a outros metabólitos secundários, como lactonas ou antocianinas, formando estruturas glicosídicas. A formação das estruturas glicosídicas é essencial para o seu acúmulo nos vacúolos celulares, pois a glicosilação aumenta a solubilidade destes compostos (JACKSON, 2008a).

Em uvas, os ácidos dicarboxílicos málico e tartárico normalmente representam 90% da acidez fixa. A concentração do ácido málico nas uvas tende a diminuir à medida que a fruta amadurece, principalmente nas estações quentes, e isto pode resultar em vinhos com pouco sabor e suscetíveis à contaminação. Em condições climáticas frias, o teor do ácido málico mantém-se elevado nas uvas, o que pode gerar vinhos de sabor azedo. Desta forma, o teor de ácido málico nas uvas é um dos indicadores para a determinação do melhor período para a colheita. A concentração do ácido tartárico, diferentemente do que ocorre com o ácido málico, não diminui no período de colheita e este é pouco metabolizado pelos micro-organismos presentes durante o processo de vinificação. Desta forma, ele é o ácido de escolha para aumentar a acidez de vinhos que apresentem elevado valor de pH (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008c).

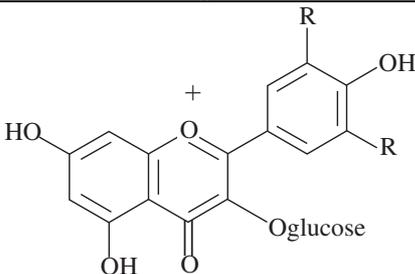
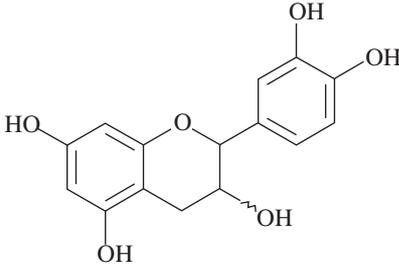
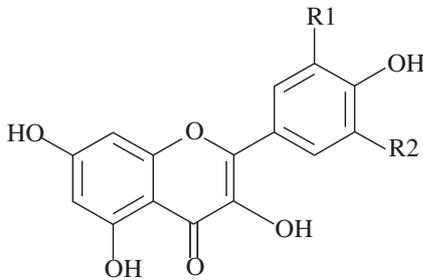
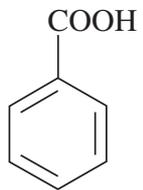
As uvas também possuem muitos compostos nitrogenados, incluindo formas inorgânicas, como amônia e nitratos, e diversas formas orgânicas, como amidas, aminas, aminoácidos, pirimidinas, bases nitrogenadas, proteínas, ácidos nucleicos. Os compostos orgânicos nitrogenados complexos, como pirimidinas, proteínas e ácidos nucleicos, são essenciais para o crescimento e metabolismo das uvas e das células de leveduras. Os aminoácidos são importantes como subunidades na biossíntese de enzimas e outras proteínas, também podem ser empregados como fonte de nitrogênio ou de energia para o metabolismo das leveduras (JACKSON, 2008c).

As uvas possuem concentrações elevadas de compostos fenólicos, presentes na casca, polpa e sementes, geralmente na forma de complexos glicosídicos ou polímeros, os quais dificilmente são degradados pelo suco digestivo,

o que limita a absorção dos compostos fenólicos pelo organismo humano (GÜRBÜZ et al., 2007).

Os principais compostos fenólicos presentes em mosto de uvas são: antocianinas, catequinas, flavonóis, ácidos fenólicos e resveratrol (TOALDO et al., 2015).

TABELA 1 - PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS EM UVAS E VINHOS

Composto fenólico	Estrutura genérica	Exemplos
Difenilpropanoides		Antocianinas (cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina)
		Flavonas (catequina, epicatequina, taninos condensados).
		Flavonóis (quercitina, kaempferol, miricetina)
Fenilpropanoides		Ácidos fenólicos (ácido benzoico, ácido gálico, benzaldeído)

FONTE: Adaptado de JACKSON (2008b).

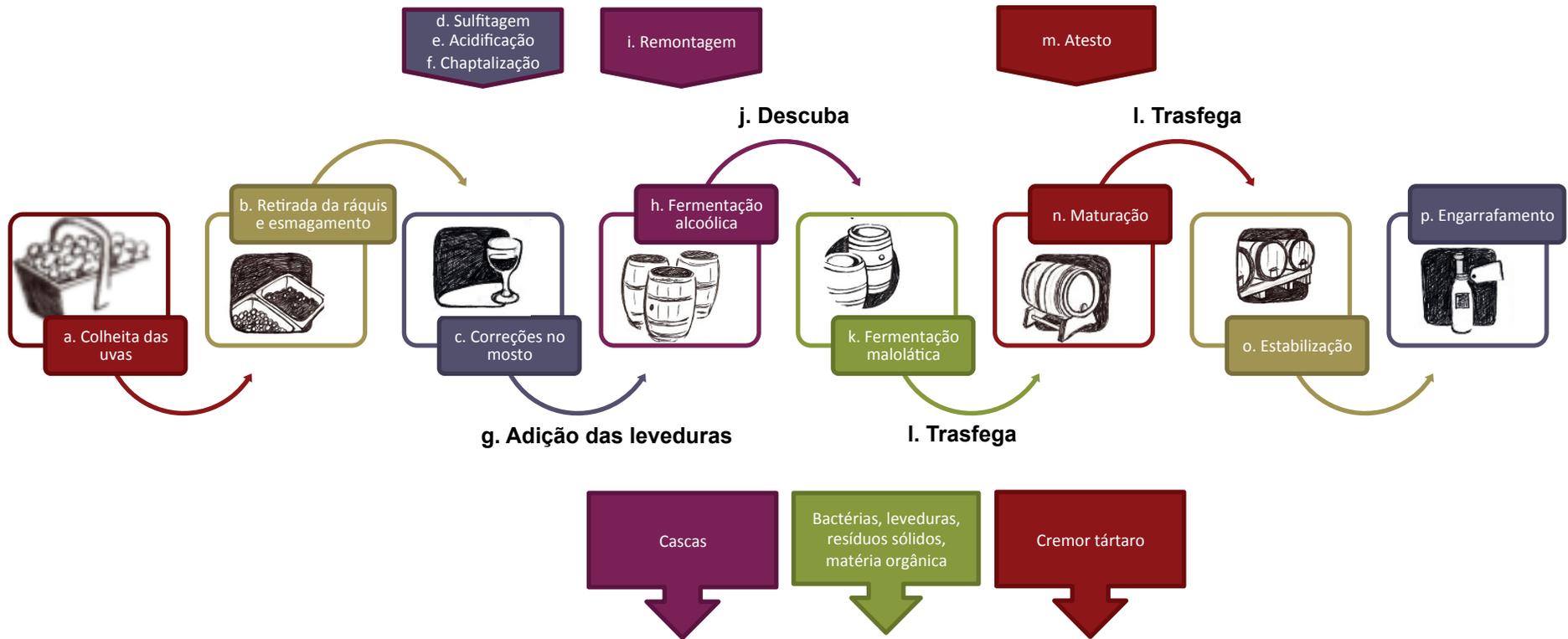
Os principais compostos fenólicos encontrados em uvas e vinhos (TABELA 1) podem ser difenilpropanoides (flavonoides) ou fenilpropanoides (não-flavonoides). Os flavonoides são caracterizados por possuírem um esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, constituídos por dois anéis fenólicos ligados por anel central pirano. Os flavonoides podem estar na forma livre, ou na forma polimérica com outros

flavonoides, açúcares, não-flavonoides, ou combinação destes. Aqueles esterificados com açúcares são chamados de glicosídeos. Sua função primária nas uvas é como defesa a patógenos microbianos, insetos e herbívoros. Os compostos fenólicos não-flavonoides possuem esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, estruturalmente mais simples que os flavonoides, mas de origem diversa. Os principais não-flavonoides presentes no vinho são derivados dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, sendo acumulados primeiramente nos vacúolos celulares das cascas e polpa das uvas, ocorrendo principalmente na forma de ésteres com ácido tartárico, mas também podem estar ligado com açúcares ou ácidos orgânicos (JACKSON, 2008c).

Durante a fermentação e a maturação nos processos de vinificação, os compostos fenólicos presentes no vinho passam por mudanças estruturais por meio de reações de oxidação e condensação, que têm impacto também na cor e adstringência do vinho. A concentração de compostos fenólicos nos vinhos está relacionada com a sua extração das partes sólidas da uvas e com a fermentação, sendo que durante a fermentação, os polímeros ou glicosídeos dos compostos fenólicos são quebrados em formas monoméricas, o que é benéfico do ponto de vista nutricional (GÜRBÜZ et al., 2007).

A representação esquemática de um processo de vinificação de vinho tinto está ilustrada na FIGURA 2.

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA GENÉRICA PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS TINTOS



FONTE: Adaptado de RIBÉREAU-GAYON et al. (2006); JACKSON (2008c).

NOTA: Estão representados os procedimentos de: a. colheita das uvas; b. retirada da ráquis e esmagamento; c. correções no mosto; d. sulfitagem; e. acidificação; f. chaptalização; g. adição das leveduras; h. fermentação alcoólica; i. remontagem; j. descuba; k. fermentação malolática; l. trasega; m. atesto; n. maturação; o. estabilização; p. engarrafamento.

A primeira condição para a qualidade do vinho é a qualidade da uva (PATO, 1978). A partir do momento em que se determina o momento da colheita das uvas (FIGURA 2, a) em função do pH, do teor de sólidos solúveis totais e da acidez total, as uvas devem ser colhidas no período da manhã quando as temperaturas estão mais amenas, o que reduz as reações de oxidação e de degradação dos compostos essenciais para a qualidade do vinho (PEREIRA; GUERRA e MANFROI, 2009).

No processo de vinificação, após a chegada das uvas na vinícola, é feita a retirada da ráquis e esmagamento dos grãos (FIGURA 2, b) de modo a permitir uma rápida liberação do mosto (JACKSON, 2008c).

Uma das primeiras correções no mosto de uva (FIGURA 2, c) é a sulfitação (FIGURA 2, d). Neste procedimento, o dióxido de enxofre, ou anidrido sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ), é adicionado ao mosto na forma de gás sulfuroso ou de metabissulfito de potássio em concentrações que podem variar de  $52 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $742 \text{ mg.L}^{-1}$  de mosto, dependendo do estado sanitário das uvas, bem como do pH do suco, que geralmente varia de 2,6 a 3,8. Sua principal função no mosto de uva é prevenir a oxidação e a contaminação por leveduras e bactérias contaminantes (PATO, 1978; PEREIRA; GUERRA e MANFROI, 2009). O procedimento de sulfitação é realizado algumas horas antes da inoculação da levedura para que o dióxido de enxofre livre, normalmente na sua forma ionizada – com maior ação tóxica – se combine com aldeídos, proteínas e com agentes oxidantes do mosto (açúcares e compostos fenólicos) formados na presença de oxigênio, o que diminui seu efeito antimicrobiano e permite a adição da cultura de levedura (JACKSON, 2008c).

Outra correção que pode ser realizada no mosto de uva é a acidificação (FIGURA 2, e), pois o meio com valor de pH alto é favorável ao desenvolvimento de bactérias (PATO, 1978). Entretanto, não existe uma recomendação precisa para os valores de pH ou de acidez no mosto. Uma faixa de pH inicial baixa, entre 3,3 e 3,6 são recomendáveis para vinho tinto pois o valor de pH tende a aumentar no decorrer da fermentação, como resultado da cristalização de tartaratos. A acidificação do mosto, quando necessária, é realizada pela adição direta de ácidos orgânicos, normalmente ácido tartárico, pois este é raramente degradado pelos microorganismos presentes. Além disso, o ácido tartárico induz a acidificação do mosto pela precipitação do excesso de potássio, na forma de sal de bitartarato. A acidificação do mosto é frequentemente necessária em regiões vinícolas quentes

devido ao metabolismo do ácido málico no momento da maturação das uvas (JACKSON, 2008c).

Quando a concentração de açúcares presentes no mosto de uva for insuficiente para atingir o teor alcoólico pode-se corrigir o mosto de uva pela adição de açúcar, procedimento conhecido como chaptalização (FIGURA 2, f). A chaptalização consiste na adição de sacarose ao mosto de uvas, a qual deve ser 99% pura, mas pode ser proveniente de qualquer planta. Apesar de vários fatores influenciarem a conversão de açúcar a etanol – como a levedura utilizada, oxigenação do mosto e concentração inicial de açúcar – normalmente para aumentar em 10 g a concentração final de etanol, deve-se adicionar 17 g de sacarose ao mosto, normalmente no final da fase de crescimento exponencial das leveduras (o que equivale de 2 a 4 dias após o início da fermentação alcoólica) pois neste momento a multiplicação celular está diminuída e a adição do açúcar não irá interromper a fermentação. A sacarose adicionada é rapidamente convertida a concentrações equimolares de glucose e frutose. Além de elevar o grau alcoólico, o processo de chaptalização aumenta também proporcionalmente os teores de glicerol, ácido succínico e 2,3-butanodiol (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008c).

Uma das principais etapas do processo de vinificação é a fermentação alcoólica (FIGURA 2, h), a qual é iniciada após a adição das células da levedura (FIGURA 2, g). A fermentação alcoólica consiste, resumidamente, na transformação anaeróbia de açúcares presentes no mosto – principalmente glucose e frutose – em etanol e dióxido de carbono por uma levedura, geralmente *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação pode iniciar-se espontaneamente, devido à presença de leveduras endêmicas à uva ou aos equipamentos de esmagamento, mas práticas usuais recomendam adicionar ao mosto uma levedura com características fermentativas conhecidas. Além do etanol, outros compostos são formados durante a fermentação alcoólica, tais como álcoois superiores, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol. Em processos de vinificação para elaboração de vinhos tintos a maceração – período em que a parte sólida da uva permanece em contato com o mosto – é prolongada, ocorre simultaneamente com a fermentação alcoólica e facilita a extração de constituintes da polpa, casca e sementes. Entre as substâncias extraídas estão os compostos fenólicos que irão contribuir para a coloração e estrutura do vinho, aromas e/ou seus precursores,

compostos nitrogenados, polissacarídeos e minerais (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008c; MORENO-ARRIBAS e POLO, 2009).

Durante a fermentação alcoólica são realizadas as remontagens (FIGURA 2, i), com o objetivo de extrair os componentes da parte sólida da uva, homogeneizar a massa vínica em fermentação, controlar a temperatura da fermentação e evitar o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis nas partes sólidas das uvas que não estejam submersas durante a fermentação. A remontagem consiste em retirar o mosto da parte inferior do recipiente e colocá-lo novamente na parte superior (RIZZON; MENEGUZZO e MANFROI, 2004).

Ao término da fermentação alcoólica é realizada a descuba (FIGURA 2, j) – processo de separação da parte sólida e líquida do mosto – e em seguida, pode-se optar pela etapa da fermentação malolática (FIGURA 2, k), ou seja, a transformação do ácido málico ( $pK_{a1} = 3,4$ ;  $pK_{a2} = 5,13$ ) em ácido láctico ( $pK_a = 3,85$ ) com conseqüente redução da acidez total. A fermentação malolática é conduzida por bactérias lácticas, que utilizam além do ácido málico, os açúcares residuais como substrato. Quando a concentração do açúcar residual está elevada, as bactérias lácticas podem realizar a fermentação manítica, com conseqüente formação de manitol (RIZZON; MENEGUZZO e MANFROI, 2004). A fermentação malolática é usualmente realizada em regiões de clima frio, pois neste caso, a redução da acidez melhora as características organolépticas no vinho. Em regiões vinícolas mais quentes a fermentação malolática é frequentemente desnecessária ou mesmo indesejada, sendo interrompida pela adição de dióxido de enxofre, procedimentos de clarificação ou armazenamento em temperaturas frias (JACKSON, 2008c).

No final da fermentação malolática, é feita uma trasfega (FIGURA 2, l) – ação de passar o vinho de um recipiente para outro – para eliminar as bactérias, leveduras, resíduos sólidos e matéria orgânica que se depositam no fundo do recipiente de fermentação, pois se o vinho permanecer em contato com este material pode adquirir sabores e aromas indesejados (RIZZON; MENEGUZZO e MANFROI, 2004).

Após a trasfega do vinho para um recipiente no qual ocorre a maturação (FIGURA 2, n), é realizado o atesto (FIGURA 2, m) que consiste em preencher o recipiente periodicamente com vinho, a medida em que o nível deste diminui, devido a evaporação ou mudanças de temperatura (RIZZON; MENEGUZZO e MANFROI, 2004). Durante a etapa de maturação, a proteção do vinho do contato com o

oxigênio pelo atesto diminui a oxidação e o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes. Na maturação ocorre a liberação do excesso de aromas vindos das leveduras, de dióxido de carbono e a precipitação do material em suspensão (JACKSON, 2008).

Após o tempo de maturação do vinho, é realizada trasfega do vinho para a estabilização (FIGURA 2, o) do vinho ou clarificação do vinho, que ocorre naturalmente, com a precipitação no recipiente de estabilização dos sais de tartarato, principalmente do bitartarato de potássio. Para acelerar a estabilização, pode-se resfriar o vinho a - 3 °C, durante aproximadamente 8 dias, o que leva a diminuição da solubilidade, com cristalização e conseqüente precipitação dos sais de tartarato (RIZZON; MENEGUZZO e MANFROI, 2004). Além dos cristais de tartarato, bactérias, leveduras, taninos e proteínas também precipitam. O engarrafamento (FIGURA 2, p) do vinho é feito após a estabilização (JACKSON, 2008c).

Buscando contribuir com alternativas para a melhoria da tecnologia de produção do vinho elaborado no estado do Paraná, foi iniciado em 1999 o programa de extensão “Desenvolvimento e transferência de tecnologia para melhoria dos produtos da uva visando o fortalecimento da comunidade produtora” (PROEC 90/09) da disciplina de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, do Curso de Farmácia, da Universidade Federal do Paraná. Em quinze anos de existência este programa tem contribuído com propostas fundamentadas para a transferência direta do conhecimento acadêmico considerando as necessidades individuais de cada vinicultor. Com as ações e sugestões propostas pelo programa, atualmente os vinhos produzidos pelos vinicultores participantes do programa de extensão estão adequados aos padrões de identidade e qualidade preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, bem como as instalações e equipamentos à legislação. Outro benefício do programa foi o incentivo aos filhos dos vinicultores à formação acadêmica para que se tornassem os responsáveis técnicos pelos seus próprios estabelecimentos de produção de vinho e a outros que permanecessem na vitivinicultura, permitindo a continuidade do negócio familiar.

De acordo com dados estatísticos disponíveis no portal do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) compilados pela unidade Uva e Vinho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em 2014 os estados com maior volume de produção de uva no Brasil foram, nesta ordem, Rio Grande do Sul,

Pernambuco, São Paulo e Paraná e 673 milhões de quilos de uvas (46,89% da produção nacional) foram destinados ao processamento para a produção de vinho, suco e derivados (MELLO, 2015).

Em 2014, o estado do Paraná produziu 80.910 toneladas de uvas (MELLO, 2015). Nas vinícolas paranaenses, toda a safra produzida anualmente é consumida, principalmente em virtude das características específicas do vinho da região. De acordo com os vinicultores, o volume de produção dos vinhos paranaenses aumenta anualmente, procurando atender à demanda. No entanto, o vinho elaborado na região ainda é pouco valorizado economicamente.

Para continuar contribuindo com o desenvolvimento tecnológico e industrial dos vitivinicultores do estado do Paraná, este projeto de doutorado está vinculado ao programa de Extensão como uma forma de que a tecnologia desenvolvida na Universidade seja transferida às indústrias produtoras de vinho do estado do Paraná, agregando parâmetros sensoriais específicos aos vinhos da região e, conseqüentemente, contribuindo com o aumento de vendas e o fortalecimento econômico e tecnológico da comunidade produtora.

## 3.2 LEVEDURAS

<sup>2</sup> "...a fermentação alcoólica é um processo relacionado à vida e à organização das células de leveduras, não à morte ou putrefação das células. Também não é um fenômeno de contato, pois neste caso a transformação dos açúcares ocorreria na presença do fermento sem dar nada a ele ou tomar qualquer coisa dele." (Louis Pasteur)

A qualidade do vinho é determinada tanto pela qualidade do mosto de uva quanto pela evolução da microbiota durante o processo de fermentação e vinificação (CSOMA et al., 2010).

A fermentação do mosto de uva para a elaboração de vinhos de qualidade é um processo ecológico e bioquímico complexo, que envolve o desenvolvimento sequencial de diferentes micro-organismos, dependendo de como estes são afetados pelo meio ambiente. Este processo inclui a interação de fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas, como também de micovírus e bacteriófagos, que afetam diretamente os micro-organismos provenientes das uvas. Dentre estes micro-organismos, as leveduras possuem papel central na interação com o mosto de uvas (PRETORIUS, 2000).

Entretanto, diferentemente do que ocorre com outros produtos de fermentação, o controle da evolução da microbiota durante a fermentação vínica não é e nem pode ser rigoroso. A variação no produto entre safras e entre regiões é de certa forma aceita e esperado, ganhando, inclusive, termos específicos como *vintage* ou *terroir*. Desta forma, variações na microbiota entre safras são apreciadas pelos consumidores (BOUNDY-MILLS, 2006). Além disso, apesar do sabor e aroma dos vinhos estarem primeiramente relacionados com a uva utilizada, as leveduras alteram o aroma dos vinhos e sua qualidade com a produção e excreção de metabólitos durante sua multiplicação e autólise (JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006).

---

<sup>2</sup> "...la fermentation alcoolique est un acte corrélatif de la vie, de l'organisation de globules, non de la mort ou de la putréfaction de ces globules, pas plus qu'elle n'apparait comme un phénomène de contact où la transformation du sucre s'accomplirait en présence du ferment sans lui rien donner ni lui rien prendre" (Louis Pasteur, 1860)

Dos 100 gêneros de leveduras existentes, que representam as mais de 800 espécies descritas, aproximadamente vinte são relevantes ao processo de vinificação: *Brettanomyces* sp. e seu equivalente sexual *Dekkera* sp., *Candida* sp., *Citeromyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Hanseniaspora* e seu equivalente assexuado *Kloeckera* sp., *Issatchenkia* sp., *Kluyveromyces* sp., *Lodderomyces* sp., *Metschnikowia* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp., *Saccharomycodes* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Torulaspora* sp., *Zygoascus* sp. e *Zygosaccharomyces* sp. (BARNETT; PAYNE e YARROW, 2000; PRETORIUS, 2000; JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006).

Um dos avanços-chave da enologia moderna é o reconhecimento da importância da levedura como um agente imprescindível para a obtenção do vinho, dentro dos padrões de identidade e qualidade determinados pelas legislações vigentes locais. Portanto, é importante o conhecimento das propriedades genéticas e metabólicas das leveduras empregadas nos processos fermentativos enológicos, assim como a distinção entre as leveduras desejadas e contaminantes.

De forma geral, as leveduras são definidas como fungos unicelulares nos quais a reprodução assexuada (vegetativa) ocorre principalmente por brotamento. A maioria das leveduras *Saccharomyces* sp. exibem brotamento multilateral, um tipo de divisão celular na qual as células-filhas (brotos) podem aparecer em qualquer ponto da superfície celular. No brotamento bipolar, os brotos são formados apenas nos polos da célula, resultando em células com formato característico de limão, como em espécies de *Hanseniaspora* sp.. Além destes, as leveduras podem apresentar formatos redondos, ovoides ou cilíndricos. Apesar de serem normalmente unicelulares, algumas leveduras podem desenvolver micélio verdadeiro ou pseudo-micélio (DEÁK, 2008). As leveduras podem também se multiplicar por brotamento monopolar e por fissão, como ocorre, respectivamente, em leveduras dos gêneros *Malassezia* sp. e *Schizosaccharomyces* sp. (BARNETT; PAYNE e YARROW, 2000).

A classificação de leveduras em grupos taxonômicos superiores (como classe ou família) é fundamentado primeiramente na morfologia do estado sexual. Testes fisiológicos em conjunto com a observação microscópica das células vegetativas são necessários para delinear ou mesmo identificar gênero e espécie. Para a definição da espécie são necessários testes bioquímicos e fisiológicos, como a capacidade de assimilar e fermentar diferentes fontes de carbono e assimilar

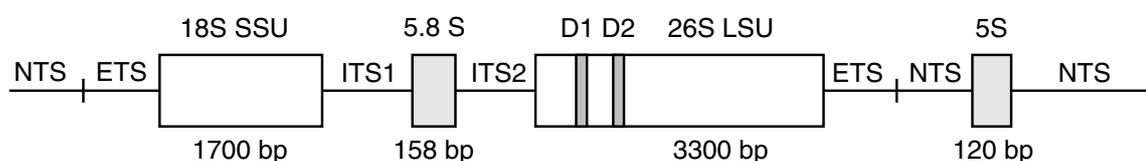
diferentes fontes de nitrogênio. Os resultados são comparados com descritores padrão que levam à identificação do gênero ou espécie (BARNETT; PAYNE e YARROW, 2000; DEÁK, 2008).

Entretanto, o uso das características morfológicas macroscópicas e microscópicas requerem a presença de microbiologistas experientes para interpretar os resultados uma vez que diferentes condições de cultivo, como o meio utilizado e o tempo de crescimento, podem levar a diferenças morfológicas (FERNÁNDEZ; UBEDA e BRIONES, 1999).

Para superar as dificuldades existentes na identificação de micro-organismos empregando métodos convencionais, técnicas de biologia molecular foram estabelecidas para fins taxonômicos. Olsen et al. (1985) mostraram que estudos comparativos de sequências de RNA ribossomal forneciam meios para analisar relações filogenéticas.

Os genes de DNA ribossomal (rDNA) que codificam para o RNA ribossomal (rRNA) são, portanto, frequentemente usados para estudos filogenéticos. Os ribossomos estão presentes em todos os organismos e o rDNA está presente em várias cópias tanto em subunidades pequenas (*small subunits* - SSU) como grandes (*large subunits* - LSU). O rDNA é constituído de vários domínios, alguns dos quais são mais conservados enquanto outros são mais variáveis e podem ser utilizados, para estudos evolutivos e para determinar relações filogenéticas entre as espécies, respectivamente. Em leveduras, o rDNA é constituído pela subunidade maior (LSU ou 26S rRNA), a subunidade menor (SSU ou 18S rRNA), genes 5S e 5.8S. Além disso, contém espaçadores transcritos internos (*internal spacers* - ITS) e espaçadores transcritos externos (*external spacers* - ETS). Entre cada unidade existe também um espaçador intergênico não-transcrito (*non-transcribed spacer* - NTS), sendo que o rDNA 5S normalmente está presente nesta região mas é transcrito separadamente do restante do gene (FIGURA 3). Ao mesmo tempo em que métodos rápidos e automatizados de sequenciamento por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram se tornando disponíveis, sequências parciais ou completas do rDNA 18S (~ 1700 nucleotídeos), dos domínios variáveis D1/D2 (~ 600 nucleotídeos) do rDNA 26S e das regiões ITS1-5.8S-ITS2 (~ 600 nucleotídeos) de inúmeras espécies de leveduras foram determinados para a construção de bancos de dados (DEÁK, 2008).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DE REPETIÇÃO DO rDNA DE LEVEDURAS



FONTE: DEÁK (2008).

NOTA: Estão identificadas as regiões codificadoras para as unidades 18S, 5.8S, 26S e 5S do rRNA, os espaçadores intergênicos não-transcritos (NTS), os espaçadores transcritos internos (ITS) e os espaçadores transcritos externos (ETS).

As sequências dos ITS incluem o gene 5.8S rRNA (a região codificadora conservada) e duas regiões flanqueantes, ITS1 e ITS2 (não-codificadoras e variáveis) que demonstram baixo polimorfismo intraespecífico e alta variabilidade interespecífica, e assim, úteis na identificação de diferentes fungos e leveduras. Mesmo espécies estreitamente relacionadas possuem sequências distintas nas regiões ITS1 e ITS2 que podem ser exploradas para a identificação de leveduras usando uma sequência específica de oligonucleotídeos iniciadores (DEÁK, 2008; DIGUTA et al., 2011; AGUSTINI et al., 2014).

Para a identificação de leveduras por PCR-RFLP, primeiramente é realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste na replicação enzimática de uma sequência-alvo *in vitro* por meio do emprego de iniciadores específicos. A segunda etapa da reação de PCR-RFLP, por sua vez, consiste na clivagem dos produtos de PCR por enzimas de restrição que cortam conjuntos palíndromos específicos. Em seguida, os fragmentos resultantes são separados por eletroforese em gel e o perfil de fragmentação é comparado ao perfil de espécies conhecidas para a identificação taxonômica do micro-organismo (GUILLAMÓN et al., 1998).

A espectrometria de massa MALDI-TOF/MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) é uma técnica utilizada também na identificação taxonômica de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Nesta técnica, é gerado um espectro de massa que equivale a um perfil molecular característico para cada gênero e espécie, devido à detecção, pelo equipamento, de proteínas e peptídeos de forte caráter básico e média hidrofobicidade, além de outros metabólitos secundários, como lipídios, que existem no citosol. Para leveduras, é necessária uma preparação prévia da amostra, que consiste em uma extração molecular, pois a parede celular da levedura impede a obtenção de

espectros de massa de qualidade, ou seja, com grande número de íons e melhor relação sinal : ruído (MARKLEIN et al., 2009; HENDRICKX et al., 2011).

Um dos habitats de leveduras mais estudados é o mosto de uvas. Já foram estudadas as populações de leveduras existentes nas uvas, as presentes nos locais de vinificação e as leveduras existentes durante as diferentes fases da fermentação. As leveduras presentes nas uvas variam de acordo com fatores, como: localização geográfica, altitude, aspecto e idade do vinhedo, condições climáticas (temperatura, chuvas, umidade, influência marítima), tipo de solo, variedade da uva (cultivar, espessura da casca), práticas vitícolas (fertilização, irrigação, manejo do solo, uso de fungicidas, inseticidas, herbicidas e uso de enxofre), fases de desenvolvimento e sanidade das uvas (danos físicos, presença de insetos) e práticas de descarte de resíduos pela vinícola (BOUNDY-MILLS, 2006; JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006).

Durante a fermentação espontânea do mosto de uva, observa-se primeiramente o aparecimento de leveduras apiculadas *Kloeckera* sp. (forma anamórfica) e *Hanseniaspora* sp. (forma teleomórfica), pois são as que correspondem por 50 a 75% do total da população de leveduras nas superfícies das uvas (PRETORIUS, 2000; CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004). Além destas leveduras apiculadas, também estão presentes no início da fermentação leveduras dos gêneros *Candida* sp., *Metschnikowia* sp. e *Pichia* sp., com características fermentativas fracas ou ausentes. Leveduras do gênero *Pichia* sp. possuem a capacidade de formarem películas (filme) na superfície dos vinhos. Tanto as leveduras apiculadas quanto as formadoras de películas são consideradas contaminantes no processo fermentativo, uma vez que boas práticas de fabricação usualmente previnem o seu aparecimento (BARATA; MALFEITO-FERREIRA e LOUREIRO, 2012).

A disponibilidade de nutrientes no mosto de uva permite o aparecimento ocasionalmente de diferentes espécies de *Brettanomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp. e *Zygosaccharomyces* sp., com atributos vínicos importantes que evidenciam as características enológicas de uma determinada região. Entretanto, a baixa tolerância ao etanol destas leveduras e sua incapacidade em fermentar todos os açúcares presentes no mosto são as razões pela sua substituição natural por leveduras *Saccharomyces* sp. (PRETORIUS, 2000; CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004).

Apesar do mosto de uva ser completo em nutrientes, ele permite o crescimento de um número limitado de espécies microbianas. O baixo valor de pH (2,9 - 3,7) e o alto teor de açúcares (15 - 30%) exercem um efeito seletivo aos microorganismos, de forma que apenas um pequeno número de espécies de bactérias e leveduras consegue proliferar. O efeito seletivo do mosto é acentuado quando as condições anaeróbias são estabelecidas no processo, alguns nutrientes são consumidos e a concentração de etanol aumenta. Espécies fermentativas de *Saccharomyces* sp. (*Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo) são encontradas em número muito pequeno em uvas sadias, e raramente são isoladas das uvas ou dos solos dos vinhedos. Entretanto, *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura que está mais presente nos recipientes e equipamentos das vinícolas, demonstrando os efeitos seletivos do mosto de uva e do vinho como substrato (PRETORIUS, 2000).

Quando o mosto de uva é empregado como meio de cultura, as pressões seletivas favorecem a levedura com o sistema fermentativo mais eficiente. Desta forma, a conversão do mosto de uva em vinho é quase que exclusivamente realizada pela espécie mais tolerante ao etanol, geralmente uma levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* (PRETORIUS, 2000; CSOMA et al., 2010).

Um dos avanços tecnológicos para a vinificação foi a inoculação do mosto de uva com culturas comerciais selecionadas de *Saccharomyces* sp., pois o controle microbiológico do processo fermentativo permite não apenas entender as etapas da fermentação alcoólica mas também minimizar os riscos de se obter um produto com defeitos de origem microbiológica. Desta forma, durante os últimos 50 anos o processo de vinificação se industrializou e se modernizou com o conhecimento de duas espécies de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus* (PRETORIUS, 2000; FLEET, 2008).

O uso de leveduras não-*Saccharomyces* como iniciadoras de processos de vinificação indicam que estas leveduras possuem alguns efeitos benéficos e efeitos negativos, como, por exemplo, a formação de elevadas concentrações de ácido acético. Além disso, a maioria das espécies não-*Saccharomyces* vindas de ambientes vínicos possuem potencial fermentativo limitado, como baixo poder fermentativo e pouca resistência ao dióxido de enxofre. Ainda, o uso das leveduras não-*Saccharomyces* em processos de vinificação é limitado devido à incapacidade destas leveduras em resistirem às condições de vinificação, mais especificamente ao etanol. No entanto, existe uma reavaliação do papel que as leveduras não-

*Saccharomyces* podem exercer nos processos fermentativos (PINA et al., 2004; COMITINI et al., 2011).

A microbiota de leveduras presentes durante o processo fermentativo vínico é complexo e envolve não apenas a sucessão de diferentes espécies de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* como também o desenvolvimento sequencial de diferentes variedades da mesma espécie (TOFALO et al., 2012), pois numa determinada região, pode haver diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (TOFALO et al., 2014).

Mesmo quando uma cultura selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em vinificação, outras leveduras não-*Saccharomyces* podem persistir durante todo o processo fermentativo, como exemplo, já foram isoladas espécies pertencentes aos gêneros *Hanseniaspora* sp., *Candida* sp. e *Kluyveromyces* sp. com tolerância ao etanol similar à *Saccharomyces cerevisiae*, várias espécies dos gêneros *Zygosaccharomyces* sp., *Saccharomycodes* sp. e *Schizosaccharomyces* sp. com capacidade fermentativa e também tolerantes ao etanol (FLEET, 2008; COMITINI et al., 2011).

Algumas leveduras podem apresentar uma velocidade de crescimento muito lenta e não se estabelecerem ao final do processo fermentativo, mas mesmo assim possuem outras propriedades enológicas que justificam seu estudo. Espécies de *Hanseniaspora* sp. podem produzir glicosidases e proteases em maior quantidade que espécies de *Saccharomyces* sp. promovendo uma maior diversidade de compostos aromáticos voláteis ao vinho; *Candida stellata* ou *Candida zemplinina* pode contribuir com teores aumentados de glicerol; *Kluyveromyces thermotolerans* pode diminuir o teor de ácido láctico, e espécies de *Schizosaccharomyces* sp. podem diminuir a acidez do vinho pelo metabolismo do ácido málico (FLEET, 2008; COMITINI et al., 2011). Leveduras dos gêneros *Hanseniaspora* sp., *Pichia* sp., *Saccharomycodes* sp. e *Zygosaccharomyces* sp. produzem glicosidases relacionadas com a liberação de compostos aromáticos de precursores não-aromáticos presentes nas uvas (DOMIZIO et al., 2011).

Em 2013, pesquisadores compararam o uso de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum* em processos fermentativos de uvas *Vitis labrusca* e verificaram que não houve diferença no perfil fermentativo dos processos. O processo fermentativo realizado com a levedura *Hanseniaspora uvarum*

apresentou maiores concentrações de ácido láctico, aldeídos e maior escore na avaliação sensorial (HONG e PARK, 2013).

Apesar de leveduras não-*Saccharomyces* terem sido vistas originalmente como um inconveniente microbiano em vinificação, vinicultores do Velho Mundo vinícola (França, Itália, Portugal, Espanha, Alemanha) tinham as leveduras indígenas como parte integral da autenticidade de seus vinhos, uma vez que estas leveduras provêm tanto algumas características regionais distintas quanto outras desejadas. Vinhos elaborados por processo de vinificação espontânea, apesar de apresentarem o risco de estagnar ou deteriorar, são considerados de melhor complexidade, textura e integração tanto de aromas quanto de sabores comparativamente ao vinho produzido com leveduras selecionadas, principalmente devido a produtos finais específicos do metabolismo das diferentes espécies de leveduras (JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006).

Observa-se um crescente interesse pela fermentação espontânea das uvas, principalmente como um meio de evitar perfis aromáticos padronizados dos vinhos, como o que pode ocorrer com o uso de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do mosto (SUÁREZ-LEPE e MORATA, 2012; SANNINO et al., 2013).

Desta maneira, o uso de leveduras não-*Saccharomyces* em combinação com leveduras *Saccharomyces* pode ser uma ferramenta útil para se obter os benefícios de fermentações espontâneas, evitando-se os riscos de uma fermentação lenta ou parada (COMITINI et al., 2011).

As leveduras não-*Saccharomyces* podem ser empregadas em processos de vinificação juntamente com leveduras *Saccharomyces* utilizando inoculação mista ou sequencial. Ciani et al. (2006) verificaram que os processos fermentativos realizados com inoculação mista de *Saccharomyces cerevisiae* com uma levedura não-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspota delbruekii* ou *Kluyveromyces thermotolerans*) não mostraram influências negativas no decorrer da fermentação ou no aroma final dos vinhos. Os vinhos produzidos apresentaram perfis analíticos similares ou mesmo melhores àqueles produzidos com inoculação única da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, a inoculação sequencial favoreceu a persistência das leveduras não-*Saccharomyces*, e elevadas concentrações destas leveduras levaram a condições de estresse, fermentações lentas e/ou paradas.

A condução de processos fermentativos com a inoculação controlada de culturas de diferentes espécies de leveduras é uma estratégia para melhor explorar as características enológicas de leveduras não-*Saccharomyces* e de se estudar como estas diferentes espécies interagem com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (COMITINI et al., 2011).

De forma a explorar os potenciais benefícios que leveduras não-*Saccharomyces* podem exercer na produção de vinhos e minimizar possíveis efeitos indesejados, a população de leveduras nas uvas e no mosto e efeitos de práticas vinícolas sobre estas leveduras devem ser melhor estudados, bem como as características metabólicas de leveduras não-*Saccharomyces*. A seleção de leveduras é importante visto que nem todas as linhagens, dentro de uma mesma espécie, apresentam as mesmas características desejadas para um processo de vinificação, pois as características desejáveis às leveduras vínicas *Saccharomyces cerevisiae* não necessariamente se aplicam às leveduras não-*Saccharomyces* (JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006).

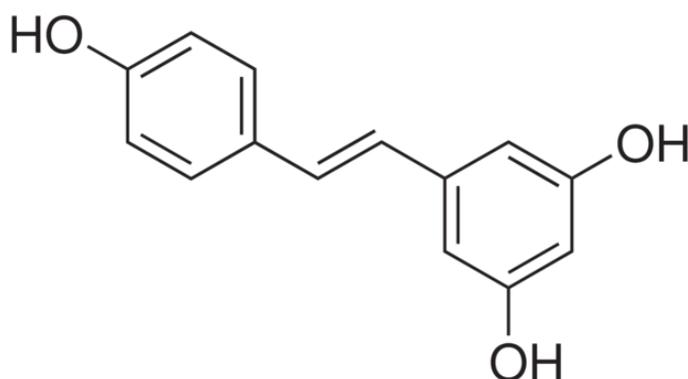
Sabe-se que mosto de uvas *Vitis labrusca* possui algumas desvantagens para vinificação, como baixo teor de açúcares totais (13 - 15%), elevado teor de ácido málico (4 - 16 mg.mL<sup>-1</sup>) e um aroma característico devido à presença de antranilato de metila (HONG e PARK, 2013). Entretanto, o uso de leveduras autóctones da região que estejam adaptadas a este substrato pode melhorar as características fermentativas e organolépticas, mantendo a tipicidade dos vinhos produzidos. O uso de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de vinhedos do estado do Paraná, em combinação ou não com leveduras comerciais usualmente utilizadas pelos vitivinicultores paranaenses, pode agregar valor aos vinhos, mantendo as características organolépticas de fermentação espontânea, mas em condições controladas de vinificação.

### 3.3 RESVERATROL

<sup>3</sup> "Será que o vinho possui um composto biológico que está presente nas dietas típicas somente em pequenas quantidades? Na verdade ele possui: o resveratrol." (David Goldberg, 1995)

Os estilbenos representam uma classe de produtos naturais biologicamente ativos provenientes principalmente de plantas. O núcleo dos estilbenos é baseado em um esqueleto contendo 14 átomos de carbono composto por dois anéis fenil ligados por uma ponte de etileno. O resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno ou 3, 5, 4'-estilbenotriol; MM: 228,25) (FIGURA 4) é um composto fenólico da família dos estilbenos que é estudado devido às suas inúmeras atividades biológicas (CICHEWICZ e KOUZI, 2002; DONNEZ et al., 2011).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DO RESVERATROL



FONTE: CICHEWICZ e KOUZI (2002)

Em 1976, Langcake e Pryce (1976) publicaram o primeiro estudo demonstrando a ocorrência de estilbenos em plantas da família Vitaceae.

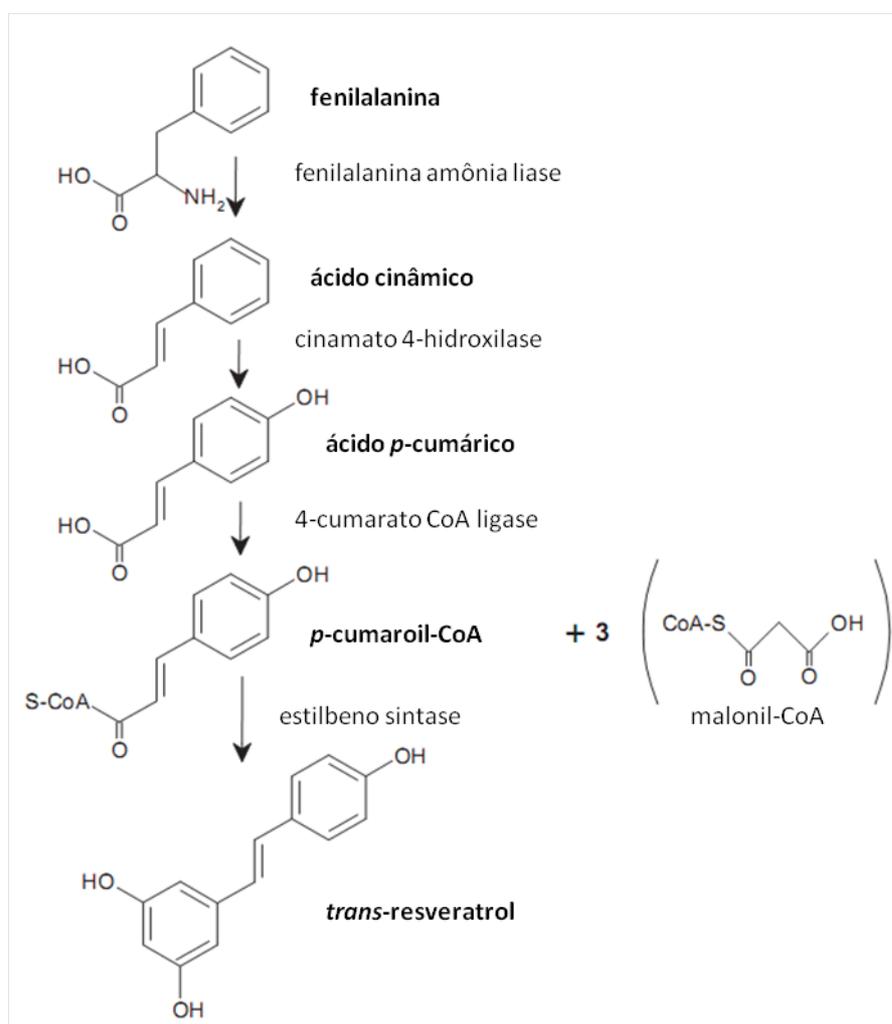
Os estilbenos são encontrados em muitas plantas, entretanto sua fonte na alimentação é limitada somente a amendoins, pistaches, cerejas, chocolate, uvas e seus derivados. Dentre estes, as uvas apresentam a maior concentração de resveratrol, presente nas cascas e sementes (GUERRERO et al., 2009).

---

<sup>3</sup> "Does wine contain a biological component that is present in only limited amounts in a typical diet? Indeed, it does: resveratrol."(David Goldberg, 1995)

A biossíntese do resveratrol (FIGURA 5) é dependente de uma única enzima-chave conhecida como estilbeno-sintase ou resveratrol-sintase, que é parte da via metabólica mista fenilpropanoide-policetídeo. A estilbeno-sintase catalisa a formação do resveratrol pela condensação de uma molécula de *p*-cumaroil CoA com três moléculas de malonil CoA, sendo estes metabólitos intermediários presentes em plantas (CICHEWICZ e KOUZI, 2002).

FIGURA 5 - BIOSÍNTESE DO RESVERATROL



FONTE: FERNÁNDEZ-MAR et al. (2012).

A estilbeno-sintase não está constitutivamente presente nos vegetais; é expressa como uma resposta a fatores de estresse, como danos nas plantas. Muitos fatores podem iniciar a síntese do resveratrol pela indução da expressão da enzima estilbeno-sintase (CICHEWICZ e KOUZI, 2002). Alguns desses fatores incluem a irradiação ultravioleta (LANGCAKE e PRYCE, 1977), infecções por micro-

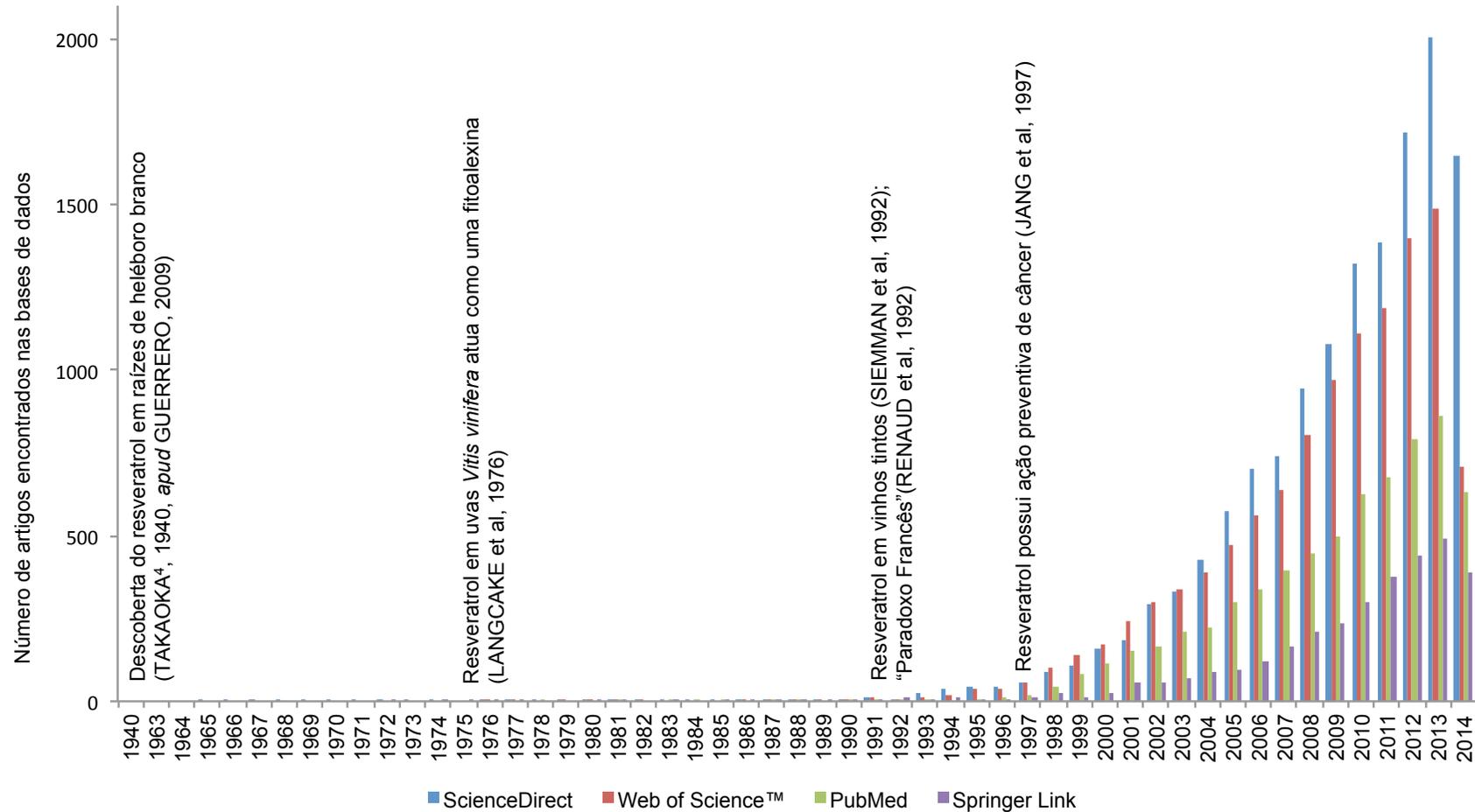
organismos (LANGCAKE, 1981), estímulos químicos e danos mecânicos às plantas (CICHEWICZ e KOUZI, 2002).

O *trans*-resveratrol, juntamente com seu isômero *cis* e seus glicosídeos (*trans* e *cis*-piceid), são encontrados em folhas de videiras e nas cascas das uvas, atuando como fungicidas principalmente contra as espécies *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola*, e comportam-se como uma fitoalexina, sintetizado pelas uvas após estresse biótico ou abiótico (TODARO et al., 2008). O resveratrol não é o único estilbeno sintetizado em resposta ao estresse sofrido pela planta, mas corresponde à viniferina-mãe, da qual outras moléculas de estilbenos são formadas (BHAT; II e PEZZUTO, 2001).

Além da função do resveratrol como fitoalexina em plantas, diversas pesquisas demonstram, *in vivo* e *in vitro*, que o resveratrol está associado a benefícios para a saúde humana (CICHEWICZ e KOUZI, 2002; PATEL et al., 2011; POULSEN et al., 2014).

Estas pesquisas (FIGURA 6) tiveram início após se observar que o consumo diário de vinho pelos franceses – particularmente vinho tinto – mesmo associado a dietas gordurosas e fumo intenso, levou à diminuição de morbidade e mortalidade causadas por doenças coronárias em 40% comparativamente ao restante da população europeia, o chamado “*Paradoxo Francês*”. Os autores atribuíram o efeito inibidor da agregação plaquetária, com consequente redução do risco coronariano, inicialmente ao etanol presente no vinho (RENAUD e DE LORGERIL, 1992). Outros estudos que mostraram que o vinho possui mais efeitos benéficos para a saúde do que outras bebidas alcoólicas, direcionou as pesquisas científicas para os compostos fenólicos presentes no vinho, mais especificamente ao resveratrol (GUERRERO et al., 2010).

FIGURA 6 - NÚMERO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS ENCONTRADOS COM O TERMO "RESVERATROL" EM FUNÇÃO DO ANO DE PUBLICAÇÃO



FONTES: O autor (2016).

NOTA: Buscas nas bases de dados *ScienceDirect*, *Web of Science*, *PubMed* e *Springer Link* empregando o termo "resveratrol" e ano de publicação, de 1940 até 2014. Artigos em destaque, no respectivo ano de publicação.

<sup>4</sup> TAKAOKA, M., J. Of the phenolic substances of White hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). **Journal of the Faculty of Science**, Kokkaido Imperial University, v.3, p.1-16. 1940.

Ainda que Semba et al. (2014) tenham mostrado que metabólitos urinários de resveratrol não estão relacionados com incidência de doença coronariana, câncer e longevidade, estudos *in vivo* são realizados em animais e humanos para tentar compreender a farmacologia do resveratrol (PARK e PEZZUTO, 2015). Em 2016, uma revisão sistemática mostra que concentração de triglicerídeos no plasma eram significativamente inferiores no grupo tratado com resveratrol em comparação ao grupo placebo (WHITBY et al., 2016). Com relação as atividades enzimáticas, fatores de transcrição e vias metabólicas, os efeitos do resveratrol incluem o aumento da oxidação dos ácidos graxos, melhoras na biogênese, respiração mitocondrial e gluconeogênese; alteração da microbiota intestinal, e na proliferação e diferenciação de células-tronco (DIAZ-GEREVINI et al., 2016).

O vinho tinto possui maior efeito benéfico comparativamente ao vinho branco devido ao seu elevado teor de compostos fenólicos extraídos das cascas das uvas e das sementes durante o processo de maceração (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

O vinho tinto contém 20 vezes mais compostos fenólicos que o vinho branco, e mesmo o consumo de frutas e vegetais não provêm à dieta quantidade significativa de compostos fenólicos, pois estas moléculas estão presente nos alimentos em formas poliméricas ou glicosiladas, e sua baixa solubilidade em meio aquoso limita ou mesmo anula sua absorção. Durante o processo de fermentação das uvas, estes agregados poliméricos são clivados às suas formas monoméricas e o teor de pelo menos 10% de etanol presente nos vinhos mantém os compostos fenólicos solúveis, tanto no vinho, quanto no intestino humano (GOLDBERG, 1995; GÜRBÜZ et al., 2007).

Goldberg et al. (2003) demonstraram que polifenóis, após absorção em humanos, estão presentes no soro e urina predominantemente na forma conjugada; desta forma os autores salientam que vários trabalhos *in vitro* reportados pela literatura com relação aos efeitos anti-inflamatórios e anticarcinogênicos de polifenóis livres são irrelevantes, pois estes agentes são absorvidos como glucuronídeos ou sulfatos.

Dietas incluindo vinho tinto aumentam a capacidade antioxidante total no plasma, a concentração de lipoproteínas HDL e atividades fibrinolíticas e antitrombóticas, reduzem a agregação plaquetária e dano oxidativo. Estudos realizados em diversas partes do mundo, com grupos populacionais diversos, sugerem que o

consumo moderado de vinho tinto – duas taças por dia – reduz o risco de doença cardiovascular quando se compara com indivíduos que abusam ou que não consomem vinho (BHAT; II e PEZZUTO, 2001; MURIAS et al., 2005; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

Além dos compostos fenólicos quercitina, rutina, catequina e epicatequina, o vinho tinto é a fonte significativa de resveratrol na dieta humana. A quantidade de resveratrol nos vinhos depende de diversos fatores, entre os quais: variedade da uva, região geográfica, fatores agronômicos, fatores climáticos, estresses sofridos pela planta e práticas enológicas. Dentre as práticas enológicas, o tempo de maceração das cascas e hidrólises enzimáticas são os fatores que mais contribuem com o teor final de resveratrol em vinhos (GOLDBERG, 1995; COUNET; CALLEMIEN e COLLIN, 2006; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

A difusão dos estilbenos para o vinho é um processo que alcança o seu máximo teor após 10 a 12 dias de maceração. Alguns autores sugerem que a extração do resveratrol das cascas da uva está relacionada com o aumento da concentração de etanol durante o processo fermentativo. O processo de produção do vinho também pode induzir mudanças significativas no teor de resveratrol. Vinhos obtidos empregando-se processos tradicionais de vinificação (fermentação das cascas com ou sem ramos) possuem maior teor de resveratrol que aqueles obtidos utilizando processo de vinificação por maceração carbônica (SUN et al., 2006).

É difícil prever a quantidade de resveratrol presente em um vinho, pois são muitos os fatores que afetam tanto a sua biossíntese nas uvas bem como sua transferência para o vinho. Já foram descritos na literatura teores de resveratrol em vinhos desde indetectáveis até  $14,3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Em vinhos tintos, a concentração média de *trans*-resveratrol é de  $3,15 \text{ mg.L}^{-1}$  e de *cis*-resveratrol,  $1,84 \text{ mg.L}^{-1}$  (COUNET; CALLEMIEN e COLLIN, 2006).

No Brasil, estudos demonstram que vinhos tintos da região sul possuem teores elevados de resveratrol. Souto *et al.* (2001) determinaram o teor de *trans*-resveratrol de 36 vinhos tintos comerciais e os teores variaram de  $0,82 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $5,75 \text{ mg.L}^{-1}$ , com média de  $2,57 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Também foi determinado o teor de diferentes estilbenos derivados do resveratrol (*trans*-astringina, *trans*-piceid, *cis*-resveratrol, *trans*-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferina e  $\delta$ -viniferina) em doze amostras de vinhos comerciais do Rio Grande do Sul. Os autores verificaram que valores de *trans*-piceid são mais elevados em vinhos elaborados com uvas Merlot, média de  $13 \text{ mg.L}^{-1}$ , valor sete vezes superior aos valores encontrados em vinhos produzidos com uvas Cabernet-Sauvignon, média de  $1,9 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os valores de *trans*-resveratrol variaram de indetectáveis até  $5,34 \text{ mg.L}^{-1}$ , e os teores de *cis*-resveratrol, de  $1,7 \text{ mg.L}^{-1}$  até  $22,99 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os autores chamam a atenção pelo fato de o teor do isômero *cis* ser cinco vezes superior ao *trans*-resveratrol (VITRAC et al., 2005).

Lucena et al. (2010) pesquisaram o teor de *cis* e *trans*-resveratrol em oito amostras de vinhos produzidos no Vale do São Francisco. O valor médio do teor de *cis*-resveratrol foi de  $2,66 \text{ mg.L}^{-1}$ , significativamente mais elevados que o teor médio obtido para o *trans*-resveratrol,  $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Alguns pesquisadores buscam aumentar o teor de resveratrol em vinhos, realizando fermentações experimentais com leveduras transgênicas ou empregando enzimas hidrolíticas (LA TORRE et al., 2004; ZHANG et al., 2007).

O uso de leveduras transgênicas na produção de vinhos em escala comercial enfrenta obstáculos, tais como questões científicas, técnicas, econômicas, mercadológicas, de segurança, regulatórias e éticas; e leveduras geneticamente modificadas apenas poderão ser utilizadas como iniciadoras de processos fermentativos desde que tanto os governantes, a indústria e os consumidores estejam certos de que são seguras tanto do ponto de vista de saúde pública quanto ambiental, e tragam benefícios reais à saúde (BECKER et al., 2003; FLEET, 2008).

As  $\beta$ -glicosidases (1,4- $\beta$ -D-glicosidase, EC 3.2.1.21), um grupo heterogêneo de exo-glicosil hidrolases, catalisam ligações  $\beta$ -glicosídicas de alquil e aril glicosídios, dissacarídeos e pequenos oligossacarídeos da glucose pela transferência de grupos glucosil para oxigênios nucleofílicos (RODRÍGUEZ et al., 2007; ZHANG et al., 2014).

A enzima  $\beta$ -glicosidase já foi isolada de plantas, da uva e de micro-organismos. Durante a maturação das uvas, as  $\beta$ -glicosidases endógenas da planta realizam hidrólise de glicosídios, mas de forma limitada, uma vez que as enzimas endógenas

são caracterizadas por uma especificidade restrita à aglicona e são inibidas por concentrações de glucose superior a 1% (CORDERO OTERO et al., 2003).

As enzimas provenientes de plantas e da uva possuem aplicação enológica restrita, uma vez que estas  $\beta$ -glicosidases são geralmente inibidas em condições de vinificação, ou seja, baixo valor de pH, elevada concentração inicial de açúcares e final de etanol (VILLENA ARÉVALO et al., 2005; JENG et al., 2011). As  $\beta$ -glicosidases são utilizadas no mosto de uva na produção de vinhos para hidrolisar glicoconjugados de precursores aromáticos visando aumentar o aroma de vinhos (HEMAVATHI e RAGHAVARAO, 2011).

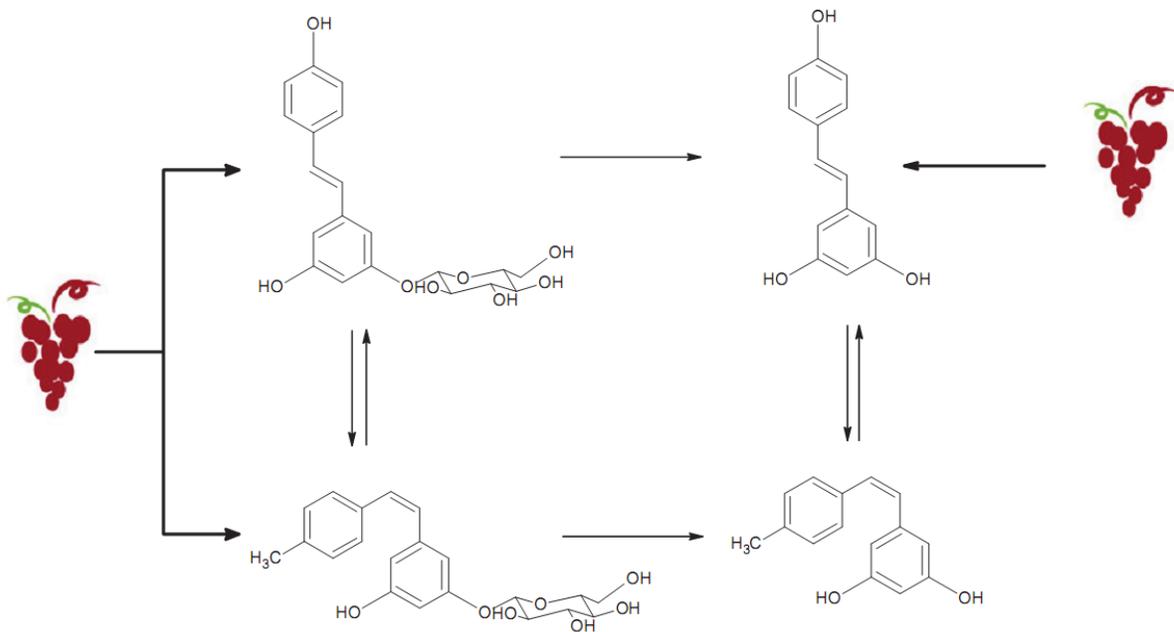
A atividade glicosidásica em micro-organismos é descrita em espécies de leveduras dos gêneros *Hanseniaspora* sp., *Pichia* sp., *Candida* sp., *Saccharomyces* sp., *Metschnikowia* sp. e *Brettanomyces* sp., presentes naturalmente em uvas e vinhos, entretanto é raramente encontrada na espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Spagna et al. (2002b) relataram que leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam baixa atividade  $\beta$ -glicosidásica, e que mesmo quando presente, esta atividade pode ser inibida em condições de vinificação. Entretanto, outros estudos verificaram que a enzima  $\beta$ -glicosidase sintetizada por *Saccharomyces cerevisiae* não é inibida por altas concentrações de açúcares no mosto de vinificação (GIL et al., 2005), sua atividade permanece em concentrações de etanol entre 10 e 15% (PÉREZ et al., 2011), mas pode exibir atividade antocianase, o que pode interferir na cor do vinho (TODARO et al., 2008).

Visando melhorar os atributos sensoriais dos vinhos, é importante estudar o potencial da biodiversidade presente nas leveduras nativas e prospectar espécies produtoras de diferentes enzimas em ecossistemas enológicos específicos. Como poucas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* possuem atividade  $\beta$ -glicosidásica, estudos tem buscado espécies autóctones de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de uvas para prover características especiais aos vinhos (PÉREZ et al., 2011).

A existência de atividade  $\beta$ -glicosidásica sobre glicosídeos naturais com diferentes agliconas pode ampliar a diversidade de substratos em mosto e vinho que podem ser hidrolisados por leveduras de origem enológica (RODRÍGUEZ et al., 2007).

A enzima  $\beta$ -glicosidase é uma enzima versátil, sendo classificada conforme dois métodos, descritos em literatura, de acordo sua especificidade aos substratos e bem como a identidade da sequência dos seus nucleotídios. Considerando a especificidade ao substrato, as enzimas  $\beta$ -glicosidase são classificadas como: (1) aril  $\beta$ -glicosidases, que atuam em aril glicosídeos; (2) celobiasas verdadeiras, que hidrolisam celobiose para a liberação de glucose; e (3) enzimas com ampla especificidade de substrato, que atuam em inúmeros substratos diferentes (SINGHANIA et al., 2013).

FIGURA 7 - FATORES QUE INFLUENCIAM A CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL DURANTE A ELABORAÇÃO DE VINHOS TINTOS



FONTE: BAVARESCO et al. (2012)

NOTA: Setas em negrito indicam extração direta da uva, setas em única direção indicam hidrólise do piceid, setas duplas indicam isomerização *cis-trans*.

A concentração de resveratrol em vinhos tintos é influenciada principalmente pelo tempo de contato com as cascas das uvas durante o processo produtivo. Tanto o *trans*-resveratrol quanto seus glicosídeos (*trans*- e *cis*-piceid) são facilmente transferidos da uva para o mosto. Suas concentrações aumentam rapidamente acompanhando a produção de etanol, e o contato prolongado com as cascas pode auxiliar na extração de demais componentes sólidos das uvas. Os isômeros *cis*- e *trans*-piceid, sendo mais polares, são extraídos anteriormente à sua aglicona, e suas concentrações diminuem

no mosto durante a fermentação devido a reações de hidrólise, liberando o resveratrol. A extração do resveratrol da cascas das uvas melhora com a presença do etanol, que aumenta sua solubilidade e mobilidade. A concentração final do *trans*-resveratrol no vinho irá depender de três fatores concomitantes, de acordo com a FIGURA 7: extração direta das cascas das uvas, hidrólise enzimática dos glicosídeos com formação das agliconas e isomerização *cis-trans* (BAVARESCO et al., 2012).

A concentração de *trans* e *cis*-resveratrol livres no mosto e nos vinhos pode ser influenciada por algumas práticas, entre elas, o uso de  $\beta$ -glicosidase. Foi descrito que as formas glicosídicas do resveratrol (*trans* e *cis*-piceid) podem ser hidrolisadas pela enzima  $\beta$ -glicosidase presente naturalmente nas uvas ou adicionada durante o processo fermentativo. Além disso, a hidrólise lenta do piceid ocorre durante o processo de envelhecimento do vinho em barris de carvalho, alterando a proporção entre resveratrol ligado e resveratrol livre (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU et al., 2006).

Todaro *et al.* (2008) estudaram o uso de  $\beta$ -glicosidase purificada, proveniente de *Aspergillus niger* e de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com atividade  $\beta$ -glicosidásica, para aumentar o teor de resveratrol livre em vinhos típicos da Sicília a partir da hidrólise do piceid. Os autores obtiveram um aumento de 75% no teor de resveratrol livre quando utilizaram a enzima proveniente de *Aspergillus niger*. Quando foi empregada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com atividade  $\beta$ -glicosidásica, o incremento do resveratrol livre foi de 25% e houve uma diminuição do teor de antocianinas em 12%.

Sabendo-se que existem quatro principais derivados de resveratrol em vinhos (aglicona e piceid, ambos nas formas *cis* e *trans*), Meng *et al.* (2004) compararam a biodisponibilidade do resveratrol após a ingestão oral em humanos de suco de uva e da aglicona pura dissolvida em matriz alcoólica. Os autores determinaram os níveis plasmáticos e urinários do resveratrol e seu principal metabólito (glucuronídeo do resveratrol). Após administração da aglicona pura em humanos (dose de  $0,03 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), foram observados principalmente conjugados glucuronídeos do resveratrol na urina após duas a três horas, em concentrações correspondentes a 52% da dose inicial administrada. Entretanto, após administração de suco de uva, menos de 1% da dose administrada foi identificada na urina, e não foram detectados níveis plasmáticos de

resveratrol. Os autores explicam que em suco de uva, as formas predominantes do resveratrol são *trans* e *cis*-piceid, sendo o teor de resveratrol livre muito baixo. Os autores sugerem a menor biodisponibilidade de glicosídeos de resveratrol comparativamente à aglicona livre.

Diferentemente de outras drogas empregadas para a prevenção e tratamento de doenças, o resveratrol possui uma estrutura química simples, que pode interagir com uma ampla gama de receptores e enzimas, atuando como ativador ou inibidor de várias vias metabólicas. A diversidade de atividades biológicas que são mediadas pelo resveratrol sugere que o seu mecanismo de ação deve ser complexo, e isso é de grande interesse para as áreas da biologia e farmacologia (BHAT; II e PEZZUTO, 2001).

Apesar de existirem poucos estudos clínicos empregando o resveratrol como fármaco, doses de até  $1 \text{ g.dia}^{-1}$  são consideradas seguras e bem toleradas, pois foram observados efeitos colaterais moderados quando a dose diária ultrapassou este valor (PATEL et al., 2011). Além disso, existe uma grande diferença interindividual em relação à absorção de resveratrol após a ingestão moderada de vinho tinto. O fato de só se encontrar a forma conjugada do resveratrol em soro humano após a ingestão da forma livre contradiz possíveis efeitos benéficos em se empregar suplementos de resveratrol na dieta, pois os benefícios associados com o consumo de vinho tinto ocorrem, provavelmente, devido ao conjunto dos compostos antioxidantes presentes no vinho (VITAGLIONE et al., 2005).

Barreiro-Hurlé et al. (2008) avaliaram o potencial de mercado de vinho como sendo um produto funcional, no qual o vinho tinto teria a concentração de resveratrol aumentada. Os resultados sugerem que os consumidores estariam dispostos a pagar um valor de até 55% a mais em um vinho com elevado teor de resveratrol. Além disso, vinhos funcionais apresentaram maior aceitação de mercado do que vinho orgânico.

Buscando ampliar as alternativas para melhorar as propriedades funcionais dos vinhos produzidos no estado do Paraná, este trabalho teve como objetivo identificar leveduras autóctones, selecionadas de uvas provenientes desse estado, que exibam capacidade de transformar piceid em resveratrol livre e apresentem propriedades fermentativas adequadas para o processo de vinificação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

O patrimônio genético, no caso de leveduras, pode ser definido como informação de origem genética contida em amostras do todo ou de parte de espécime microbiana, na forma de moléculas e substâncias provenientes do metabolismo destes seres vivos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticados, ou mantidos em condições *ex situ*, desde que coletados *in situ* no território nacional (BRASIL, 2001).

Desde 1988 a exploração do patrimônio genético depende de concessão da União, e desde 2002 o acesso ao patrimônio genético existente no País para fins de pesquisa científica depende de autorização emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), e o acesso ao patrimônio genético para fins de bioprospecção e desenvolvimento tecnológico, bem como o acesso ao conhecimento tradicional associado, dependem de autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), ficando sujeito à repartição de benefícios, nos termos e nas condições legalmente estabelecidos (BRASIL, 2007). O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) é credenciado do CGEN para autorizar o acesso à amostra de componente do patrimônio genético para as finalidades de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico, excluindo-se atividades que envolvam o conhecimento tradicional associado.

Embora a pesquisa científica não tenha fins comerciais porque não apresenta um potencial de uso econômico previamente identificado, existe a obrigatoriedade de autorização prévia ao início das atividades com o patrimônio genético. De acordo com a Resolução nº 8 de 24 de setembro de 2003, que caracteriza como caso de relevante interesse público o acesso a componente do patrimônio genético existente, em área privada para pesquisa científica, que contribua para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade do País, e não apresente potencial de uso econômico previamente identificado, o pesquisador responsável deverá fornecer ao CGEN ou à instituição credenciada as coordenadas geográficas de cada ponto de coleta bem como a listagem

do material coletado devidamente identificado, preferencialmente em nível de espécie.

Durante o desenvolvimento desta pesquisa, entrou em vigor em 17 de novembro de 2015 a "Nova Lei da Biodiversidade", Lei 13.123/2015 (BRASIL, 2015). A partir desta data as pesquisas com o patrimônio genético brasileiro não necessitam de autorização prévia para o seu desenvolvimento. Em 5 de abril de 2016 entrou em consulta pública o Decreto para regulamentar a Lei 13.123 de 17 de novembro de 2015. Este decreto considera parte do patrimônio genético existente no território nacional o micro-organismo que tenha sido isolado a partir de substratos do território nacional (BRASIL, 2016).

Portanto, esta pesquisa inicialmente solicitou autorização de acesso de componente do patrimônio genético; com a finalidade de pesquisa científica, frente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); para a realização do isolamento de leveduras autóctones do estado do Paraná.

#### 4.2 COLETA DE UVAS

A coleta de uvas para isolamento de leveduras foi realizada durante os meses de janeiro e fevereiro de 2012 em vinhedos dos municípios de Colombo (25° 17' 30" S, 49° 13' 27" W), Almirante Tamandaré (25° 19' 30" S, 49° 18' 36" W) e Campo Largo (25° 27' 32" S, 49° 31' 40" W), estado do Paraná. Cachos de uva sadios da espécie *Vitis labrusca*, cultivar Bordô (Terci), e da espécie *Vitis vinifera*, cultivar Merlot, Cabernet Sauvignon e Viognier, foram randomicamente coletados utilizando sacos plásticos desinfetados e luvas estéreis, armazenados em caixas de isopor e transportados ao laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, da Universidade Federal do Paraná.

Durante as safras da uva de 2013 e 2014, foram adquiridas uvas *Vitis labrusca*, cultivar Bordô (Terci), do município de Colombo, estado do Paraná, para uso em processos de fermentação (ver 4.8 e 4.10). Os cachos foram transportados em caixas plásticas ao laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, da Universidade Federal do Paraná.

### 4.3 MEIOS DE CULTURA

Para o isolamento, manutenção, crescimento das leveduras, bem como para a realização de testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono, e formação de sulfeto de hidrogênio pelas leveduras; foram utilizados meios de cultura, conforme descrito a seguir.

O meio *yeast peptone glucose* (YPG) possui os seguintes componentes:  $\alpha$ -D-glucose 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona 20 g.L<sup>-1</sup>, água destilada.

O meio *yeast medium* (YM) é constituído pelos seguintes componentes:  $\alpha$ -D-glucose 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona 5 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 3 g.L<sup>-1</sup>, extrato de malte 3 g.L<sup>-1</sup>, água destilada.

O meio líquido *yeast nitrogen base* (YNB, DIFCO®) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

O meio líquido lisina (HIMEDIA®) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

O meio líquido dextrose (BBL®) foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

O meio líquido acetato de chumbo é composto pelos seguintes componentes:  $\alpha$ -D-glucose 40 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, peptona 3 g.L<sup>-1</sup>, acetato de chumbo 1 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de amônio 0,2 g.L<sup>-1</sup>, água destilada, conforme descrito por ONO et al. (1991).

Para a pesagem dos componentes dos meios de cultura, foram utilizadas as balanças analítica eletrônica Bioprecisa® 210 G FA 2104N ou digital Marte® AS200.

O pH dos meios foi ajustado, quando necessário, empregando-se solução de ácido sulfúrico 1 mol.L<sup>-1</sup> ou solução de hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup> com o auxílio do potenciômetro WTW® 330i.

Os meios de cultura foram acrescidos de ágar 20 g.L<sup>-1</sup> quando utilizados na forma sólida.

Os meios foram esterilizados em autoclave vertical Phoenix® AV50 30 L, empregando-se calor úmido a 121 °C de temperatura, com pressão de 1 atm, com tempo de esterilização definido a partir do tamanho do recipiente e do volume de meio empregado.

#### 4.4 ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS

As uvas coletadas do estado do Paraná (FIGURA 8, a) foram removidas dos cachos e esmagadas dentro de sacos plásticos desinfetados com álcool 70%, com o auxílio de luvas estéreis, resultando em mosto de uva.

Foram transferidos cerca de 200 mL do mosto de uva para frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade (FIGURA 8, b), os quais foram mantidos em estufa microbiológica Fabbe BOD Tecnal<sup>®</sup> TE-391 a 24 °C até o término da fermentação espontânea.

Diariamente, amostras de cada frasco foram coletadas e diluídas em uma série de tubos de diluição (FIGURA 8, c), e em seguida, amostras de todas as diluições foram inoculadas na superfície de placas de Petri contendo meio sólido YPG (pH 4,5) e distribuídas pelo método de espalhamento utilizando alça de Drigalski estéril, em ambiente estéril da cabine do fluxo laminar TROX do Brasil<sup>®</sup> FLV classe I (FIGURA 8, d). As placas com meio inoculadas foram deixadas em estufa a 28 °C durante até 72 horas.

As colônias isoladas com características macroscópicas de leveduras (FIGURA 8, e) foram transferidas com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril para tubos contendo meio sólido YPG (pH 5,2) e estes foram mantidos em estufa a 28 °C durante até 72 horas (FIGURA 8, f).

Após a visualização do crescimento celular, transferiu-se uma alçada de células para um frasco de Erlenmeyer de 25 mL de capacidade contendo 5 mL de meio líquido YPG (pH 5,2). Os frascos inoculados foram colocados em incubadora refrigerada com agitação Tecnal<sup>®</sup> TE-421 a 28 °C, 150 rpm, durante 24 horas (FIGURA 8, g).

Em seguida, verificou-se a ausência de contaminantes no cultivo e as características morfológicas microscópicas de levedura por técnica a fresco, conforme descrito por TORTORA; FUNKE e CASE (2012) utilizando microscópio ótico Olympus<sup>®</sup> CX 41 (FIGURA 8, h).

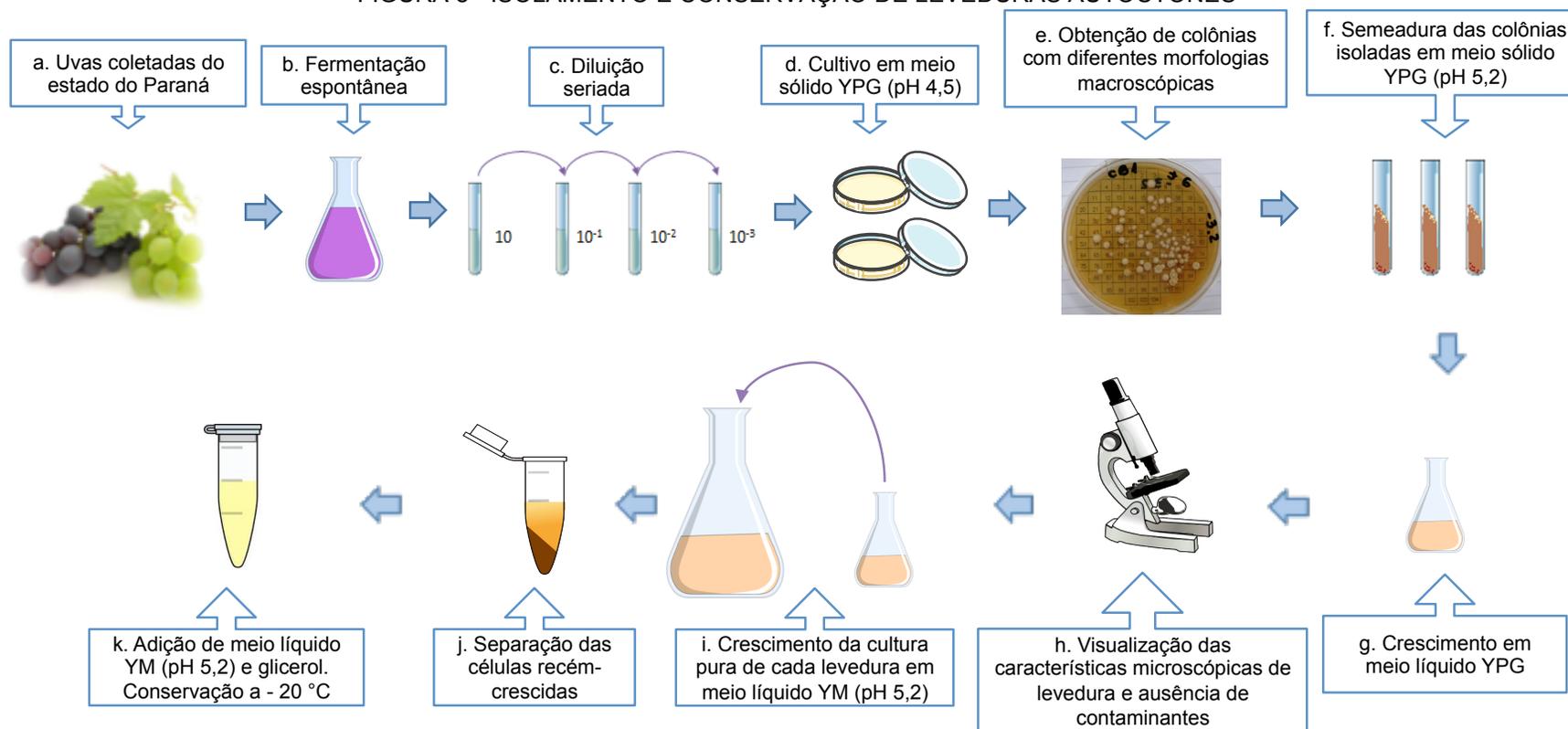
Um volume de 1 mL do cultivo foi transferido para frasco de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de meio líquido YM (pH 5,2). Os frascos inoculados foram colocados em agitador-incubador a 28 °C, 150 rpm. Após 24 horas,

um volume de 5 mL de cultivo foi transferido para frasco de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio líquido YM (pH 5,2) (FIGURA 8, i). Os frascos inoculados foram colocados em agitador-incubador a 28 °C, 150 rpm, durante até 24 horas.

Após a verificação do crescimento de cada levedura isolada, as células foram separadas do restante do cultivo por centrifugação (Centrifuga Sigma<sup>®</sup> 1-14) a 300 xg (FIGURA 8, j), e o sobrenadante foi substituído por 800 µL de meio líquido YM (pH 5,2) e 200 µL de glicerol. Os frascos de polipropileno contendo as células de levedura foram mantidos em *freezer* Cònsul<sup>®</sup> a - 20 °C (FIGURA 8 , k).

A nomenclatura para as leveduras isoladas foi realizada utilizando as letras e números da uva que foram isoladas (CB1, AT1, AT2, AT3, CL1 ou CL2), seguido do dia da fermentação espontânea (0 a 9), número da placa de Petri que foram semeadas (dois dígitos numéricos) e o número da posição em que a colônia se desenvolveu na placa (dois dígitos numéricos, de 00 a 99).

FIGURA 8 - ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Representação esquemática do procedimento realizado para isolamento e conservação de leveduras provenientes de uvas cultivadas no estado do Paraná.

#### 4.5 SELEÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE

Nos ensaios para detectar a presença da enzima  $\beta$ -glicosidase nas leveduras isoladas, foram empregadas as leveduras *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563 e *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 como referências. As leveduras foram adquiridas da *ARS Culture Collection* e ativadas de acordo com as instruções recebidas juntamente com os micro-organismos. Após ativação e crescimento, as leveduras foram conservadas (ver 4.4).

Cada uma das 308 leveduras isoladas e as leveduras referência, conservadas por congelamento, foram descongeladas, homogeneizadas e semeadas em meio sólido YM inclinado (pH 5,5) contido em tubos, os quais foram mantidos na temperatura de 28 °C durante até 72 horas. Após verificar o crescimento das células de cada levedura, estas foram removidas do meio sólido com o auxílio de uma alça bacteriológica e suspensas em água destilada estéril. A suspensão de células de cada levedura foi empregada como inóculo nos ensaios para verificar a presença da enzima  $\beta$ -glicosidase.

Primeiramente, as leveduras isoladas foram investigadas quanto à sua capacidade de crescer na presença de celobiose como única fonte de carbono. Com o auxílio de uma alça bacteriológica calibrada, um volume de 10  $\mu$ L de suspensão de cada levedura, isoladas e controles, foi semeado em placas de Petri contendo o meio YNB 6,7 g.L<sup>-1</sup> adicionado de celobiose (Sigma-Aldrich®, SP, Brasil) 10 g.L<sup>-1</sup> e ágar 20 g.L<sup>-1</sup> (pH 5,5). Concomitantemente, as suspensões das leveduras isoladas e controles também foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido YM (pH 5,5). As placas de Petri semeadas foram mantidas na temperatura de 28 °C durante até 72 horas.

A presença da enzima  $\beta$ -glicosidase em cada levedura isolada e nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 e *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563 também foi avaliada utilizando os substratos esculin e arbutin como única fonte de carbono no meio de cultivo. Um volume de 200  $\mu$ L de suspensão de cada levedura, isoladas e controles, foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 5 mL de meio YNB 6,7 g.L<sup>-1</sup> adicionado de arbutin (Sigma-Aldrich®, SP, Brasil) 0,75 g.L<sup>-1</sup> e citrato férrico (Merck®, SP, Brasil) 0,1 g.L<sup>-1</sup> (pH 5,5) e em meio YNB 6,7 g.L<sup>-1</sup> adicionado de esculin (Sigma-Aldrich®, SP, Brasil)

0,94 g.L<sup>-1</sup> e citrato férrico 0,1 g.L<sup>-1</sup> (pH 5,5). Para a adição do citrato férrico, foi preparada uma solução de citrato férrico 1% que foi esterilizada separadamente e adicionada quando os meios estavam na temperatura ambiente (GAENSLY et al., 2014). Um volume de 200 µL de suspensão de cada uma das leveduras, isoladas e controles, também foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 5 mL de meio líquido YM (pH 5,5). Os frascos de Erlenmeyer inoculados foram mantidos em agitador-incubador a 28 °C, 150 rpm, durante 48 horas. Os ensaios que utilizaram como única fonte de carbono os substratos arbutin ou esculin foram interpretados de acordo com a mudança de coloração do meio de cultivo.

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA β-GLICOSIDASE

##### 4.6.1 Identificação fenotípica

As leveduras isoladas e selecionadas como β-glicosidase positivas foram avaliadas em relação à utilização das fontes de carbono amido solúvel (Merck®, SP, Brasil), celobiose (Sigma-Aldrich®, SP, Brasil), glucose (Merck®, SP, Brasil), lactose (Fluka® SP, Brasil) e manitol (Merck®, SP, Brasil), e da fonte de nitrogênio lisina para o crescimento e das fontes de carbono glucose e lactose para fermentação (BARNETT; PAYNE e YARROW, 2000).

Nos testes para verificar o crescimento das leveduras isoladas e selecionadas também foram inoculadas leveduras como controle positivo nos meios contendo como únicas fontes de carbono amido, glucose, lactose e manitol (*Cryptococcus flavus* NRRL Y-1585), celobiose e glucose (*Candida wickerhamii* NRRL Y-2563), e no meio com única fonte de nitrogênio lisina (*Pichia guilliermondii* NRRL Y-2075); e leveduras como controle negativo para celobiose, manitol e lisina (*Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632), amido (*Candida wickerhamii* NRRL Y-2563), e lactose (*Pichia guilliermondii* NRRL Y-2075).

Nos testes de fermentação da glucose foi inoculada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 como controle positivo no meio utilizado e como controles negativos para fermentação da glucose e da lactose, as leveduras

*Cryptococcus flavus* NRRL Y-1585 e *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632, respectivamente.

Inicialmente, todas as leveduras selecionadas e as leveduras controle positivo e negativo, foram crescidas em meio líquido YM (pH 5,5), em agitador-incubador, na temperatura de 28 °C, 150 rpm, durante 48 horas. As células provenientes do cultivo de cada levedura foram separadas por centrifugação a 300  $\times g$  e suspensas em água destilada estéril. Em seguida, foram determinadas as concentrações celulares (células.mL<sup>-1</sup>) por contagem em câmara de Neubauer dupla melhorada espelhada New Optics<sup>®</sup>, conforme MADIGAN et al. (2010), das suspensões recém-preparadas de cada levedura. As suspensões das leveduras foram utilizadas nos testes de crescimento e de fermentação.

Para os testes de crescimento das leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase nos meios de cultivo empregados, um volume de 4  $\mu$ L de suspensão de células recém-crescidas de cada levedura selecionada e controle foi inoculado de maneira pontual sobre os meios sólidos YNB (DIFCO<sup>®</sup>) e lisina (pH 5,5) (HIMEDIA<sup>®</sup>). O meio sólido YNB (DIFCO<sup>®</sup>) foi adicionado de 10 g.L<sup>-1</sup> de: amido, ou celobiose, ou D-glucose, ou lactose, ou D-manitol (pH 5,5). As placas contendo os meios de cultivo inoculados foram mantidas em temperatura de 25 °C por um período de até sete dias, avaliando-se visualmente o crescimento das leveduras.

Para a realização dos testes de fermentação das fontes de carbono glucose e lactose foram utilizados 10 mL dos meios caldo dextrose (BBL<sup>®</sup>) (pH 5,5) e o meio líquido YNB (DIFCO<sup>®</sup>) adicionado de 10 g.L<sup>-1</sup> de lactose (pH 5,5), respectivamente, em tubos de ensaio contendo tubos de Durham (BARNETT; PAYNE e YARROW, 2000). Em seguida, uma alíquota de 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup> da suspensão de cada levedura selecionada e controle foi inoculada em cada tubo. Os tubos inoculados foram mantidos a 25 °C durante sete dias.

#### 4.6.2 Identificação taxonômica por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS

A identificação das leveduras selecionadas foi efetuada em parceria com a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF), seguindo metodologia analítica preconizada por Agustini et al. (2014).

Cada uma das leveduras selecionadas foi semeada em tubo contendo meio sólido YPG inclinado (pH 5,5), e os tubos foram mantidos em temperatura de 28 °C

durante 48 horas. Após este período, em tubos estéreis de polipropileno de 1,5 mL de capacidade, com tampa, foram preparadas suspensões de cada uma das leveduras, suspendendo-se uma alçada de células equivalente a 10  $\mu\text{L}$  em 300  $\mu\text{L}$  de água ultrapura esterilizada e em seguida adicionando 900  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. As suspensões foram homogeneizadas com auxílio de homogeneizador tipo vórtex, Biomixer<sup>®</sup> QL-901.

Os tubos de polipropileno contendo as suspensões de células das leveduras  $\beta$ -glicosidase positivas foram encaminhados à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Posteriormente, os tubos de polipropileno com as suspensões de células foram centrifugados a 10000  $xg$  durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado, após seco na temperatura ambiente, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 70% e 30  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. O conteúdo dos tubos de polipropileno foi homogeneizado e os tubos foram centrifugados em rotação de 10000  $xg$  durante 2 minutos. Em seguida, um volume de 1  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada tubo, diluído na proporção de 1:4 em água ultrapura, foi transferido para um dos 96 poços da placa-alvo do espectro de massa. Após a secagem do sobrenadante diluído no poço da placa-alvo, foi adicionado o volume de 1  $\mu\text{L}$  da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, constituída por uma solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , diluída em acetonitrila: água: ácido trifluoroacético 3% na proporção de 50:40:10 (v:v:v).

As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF MicroFlex<sup>®</sup> LRF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), empregando laser de nitrogênio (337 nm), em 20 - 65% de intensidade. O modo de aquisição do equipamento é espiral. Os espectros foram obtidos em modo positivo, utilizando aceleração de 20 Hz no modo linear. A amplitude de massa para a obtenção do espectro foi ajustada para a faixa de 2.000 a 20.000 Da. Para cada espectro foram utilizados 240 disparos de laser, em 6 etapas de 40 disparos cada, empregando posições diferentes de incidência no alvo. Os espectros foram adquiridos no modo de aquisição automático e os picos detectados usando o algoritmo centroide, com as configurações padrão do fabricante (relação sinal / ruído: 2; limite mínimo de intensidade: 600; número máximo de picos: 300).

Os espectros de massa adquiridos foram comparados aos espectros de massa disponíveis no banco de dados do programa MALDI Biotyper<sup>®</sup> (versão 3.0.1,

Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para a identificação taxonômica das leveduras selecionadas.

Os resultados são apresentados na forma de valores de log escores, os quais são gerados pela comparação entre a lista de íons de uma levedura isolada desconhecido com um espectro de referência contido no banco de dados do programa. Uma identificação é considerada confiável quanto à espécie quando o valor de log escore resultante for  $\geq 2,0$ , quando o valor de log escore do resultado estiver entre 1,7 e 2,0 é confirmado apenas o gênero da levedura e quando o resultado do valor do log escore for  $\leq 1,7$  indica que não houve identificação.

#### 4.6.3 Identificação taxonômica por reação em cadeia da polimerase - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

A identificação das leveduras selecionadas foi realizada em parceria com a EMBRAPA Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS) seguindo metodologia analítica preconizada por Agustini et al. (2014).

As leveduras que não puderam ser identificadas quanto à espécie por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS foram identificadas pela reação em cadeia da polimerase - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP, *Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região do DNA ribossomal nuclear (rDNA), incluindo os dois espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2 (espaçadores internos transcritos, do inglês *internal transcribed spacers*) e o gene 5.8S empregando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

Cada levedura foi crescida em meio sólido YPG inclinado (pH 5,5), e os tubos foram mantidos em temperatura de 28 °C. Após 48 horas, as células foram removidas do meio de cultivo com o auxílio de uma alça bacteriológica esterilizada e suspensas em água destilada esterilizada na concentração de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> para cada levedura. O DNA genômico foi extraído conforme descrito por Silva et al. (2012). No processo de extração, as suspensões de cada levedura foram congeladas a -20 °C e descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas em homogeneizador tipo vórtex.

TABELA 2 - REAGENTES EMPREGADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA NA REAÇÃO DE PCR

Componentes	Concentração
Tris-HCl 200 mmol.L <sup>-1</sup>	20 mmol.L <sup>-1</sup>
Cloreto de potássio (Promega, USA) 500 mmol.L <sup>-1</sup>	50 mmol.L <sup>-1</sup>
Cloreto de magnésio (Promega, USA) 50 mmol.L <sup>-1</sup>	1,5 mmol.L <sup>-1</sup>
Nucleotídeos trifosfatados (Sigma, USA) 1 mmol.L <sup>-1</sup>	200 µmol.L <sup>-1</sup>
Oligonucleotídeos iniciadores (Sigma, USA) (ITS1 e ITS4) 20 µmol.L <sup>-1</sup>	0,8 µmol.L <sup>-1</sup>
Taq DNA polimerase (Promega, USA) 5 U.µL <sup>-1</sup>	1,5 U
DNA amostral	20 - 40 ng
Volume final	25 µL

FONTE: AGUSTINI et al. (2014).

Para a reação em cadeia da polimerase foi empregado o meio reacional descrito na TABELA 2 e as reações foram realizadas em termociclador Proflex<sup>®</sup> PCR System (Applied Biosystems), conforme procedimentos estabelecido por Agustini et al. (2014), com algumas modificações. A reação foi iniciada com uma desnaturação a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos para desnaturação, na temperatura de 60 °C durante um minuto, para pareamento e 72 °C durante um minuto, para a extensão. O processo foi finalizado com uma extensão a 72 °C durante 10 minutos (AGUSTINI et al., 2014).

A detecção dos produtos da reação em cadeia da polimerase foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em solução tampão TRIS-Borato-EDTA (TBE) 1x, constituído por trisaminometano (TRIS) 90 mmol.L<sup>-1</sup>, ácido bórico 90 mmol.L<sup>-1</sup> e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mmol.L<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 4,5 µL do produto da reação em cadeia da polimerase e 0,6 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25% e glicerol 30%) foram adicionados em cada poço do gel de eletroforese.

A separação dos produtos da reação em cadeia da polimerase foi realizada em sistema horizontal KASAVI (K33-300V, Taiwan), com imersão do gel em tampão TBE 1x, e aplicação de voltagem de 120 V durante 90 minutos. Foi empregado o marcador de peso molecular empregado foi EasyGen<sup>®</sup> 100bp (EasyPath<sup>®</sup>). Para a revelação de todos os géis resultantes das eletroforeses realizadas, imergiu-se cada gel em brometo de etídeo a 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> durante 20 minutos e fotodocumentado pelo Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR System BioRad<sup>®</sup> Laboratories, USA).

Os produtos da reação em cadeia da polimerase resultantes foram clivados, de forma individual, por meio do emprego das endonucleases de restrição *HaeIII* (5' GG↓CC 3') (Promega, USA), *CfoI* (5' C↓GCG 3') (Promega, USA) e *HinI* (5' G↓CTNA 3') (Promega, USA). As preparações das amostras se deram pela

adição de 3,5 µL de água ultrapura, 1 µL de tampão da enzima, 0,5 µL de enzima e 5 µL do produto da reação em cadeia da polimerase. Em seguida, cada tubo de polipropileno foi mantido em estufa na temperatura de 37 °C durante duas horas, para a reação da enzimas de restrição, segundo as orientações do fabricante. Este procedimento foi realizado para cada levedura.

Para a detecção dos fragmentos gerados pela ação das enzimas foi utilizado gel de agarose 3% (p/v) em solução tampão de TBE 1x. Para a aplicação no gel de eletroforese 1,2 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25% e glicerol 30%) foi adicionado ao volume total de cada reação. Em seguida, o total de cada tubo de polipropileno foi transferido a um dos poços do gel. O marcador molecular empregado foi 100 pb DNA Ladder<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil). As condições para a separação eletroforética, revelação e documentação foram as mesmas utilizadas para a reação em cadeia da polimerase empregando os iniciadores ITS1 e ITS4.

#### 4.7 DETECÇÃO DA AÇÃO DA ENZIMA β-GLICOSIDASE DAS LEVEDURAS *Saccharomyces* E NÃO-*Saccharomyces* NO SUBSTRATO PICEID

As leveduras isoladas produtoras da enzima β-glicosidase e as leveduras *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563 (controle positivo) e *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 (controle negativo) foram utilizadas nos ensaios empregando o piceid como substrato.

Primeiramente, as leveduras foram crescidas em meio líquido YM (pH 5,5), na temperatura de 26 °C, 150 rpm, durante até 48 horas. Em seguida os cultivos foram centrifugados e as células foram suspensas em água destilada estéril. Destas suspensões, uma alíquota com a concentração de  $5 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> foi inoculada em meio YNB 6,7 g.L<sup>-1</sup> (pH 5,5) adicionado do substrato piceid 0,54 g.L<sup>-1</sup>. O substrato piceid, previamente esterilizado por filtração em membrana filtrante Millex<sup>®</sup> PVDF, 0,22 µm, foi adicionado quando o meio YNB estava a temperatura ambiente, para prevenir sua possível hidrólise pelo calor. Os frascos de Erlenmeyer de 50 mL, contendo 5 mL do meio inoculados foram mantidos em agitador-incubador na temperatura de 26 °C, 150 rpm. Após 36 horas, uma alíquota de cada cultivo foi centrifugada a 4722 xg durante 10 minutos e o sobrenadante submetido à análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (ver 4.11.1).

#### 4.8 FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MOSTO DE UVA E AS LEVEDURAS *Saccharomyces* E NÃO-*Saccharomyces*; PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE

As leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* que hidrolisaram o substrato piceid foram crescidas em meio líquido YM (pH 5,5), em agitador-incubador, na temperatura de 26 °C, 150 rpm, durante até 48 horas. Em seguida as células dos cultivos de cada levedura foram separadas do sobrenadante, suspensas em água destilada estéril e foi determinada a concentração celular (células.mL<sup>-1</sup>) de cada suspensão. As suspensões recém-preparadas de cada levedura foram utilizadas como inóculo nas fermentações do mosto de uva.

Bagas de uvas da espécie *Vitis labrusca* da cultivar Bordô (Terci) provenientes do município de Colombo, Paraná, foram lavadas, separadas da ráquis, esmagadas. Ao mosto obtido, foram adicionados 100 mg.L<sup>-1</sup> de metabissulfito de potássio. Após o período de 3 horas da adição do metabissulfito de potássio, as cascas foram separadas do mosto e foi realizada a transferência de 100 mL do mosto para frascos de Erlenmeyer de 300 mL. Após 5 horas da adição do metabissulfito de potássio foi adicionado em cada frasco com mosto de uva um volume da suspensão de células de uma levedura isolada. Em seguida, foram coletadas amostras e determinado os valores de pH, com o auxílio do potenciômetro WTW<sup>®</sup> 330i, e os teores de sólidos solúveis, empregando o refratômetro portátil RF15 Ade Advanced Optics<sup>®</sup>. Os frascos com mosto de uva inoculados foram mantidos em condição estática durante cinco dias na temperatura de 20 °C. Após este período, as células foram separadas do líquido fermentado por centrifugação a 14500 xg. Nas amostras coletadas do mosto de uva logo após a inoculação (tempo zero) e nos líquidos fermentados foram determinadas as concentrações de resveratrol, glucose, frutose, glicerol, ácido acético e etanol por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (ver 4.11). As fermentações de mosto de uva inoculadas com cada levedura foram realizados em duplicata.

#### 4.9 LEVEDURAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE COM CAPACIDADE DE FORMAR SULFETO DE HIDROGÊNIO

As leveduras isoladas que foram avaliadas em mosto de uva para verificar a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase durante a fermentação alcoólica foram também avaliadas com relação à capacidade de produzir sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). As suspensões celulares recém-preparadas das leveduras foram semeadas em meio sólido YPG e em meio sólido acetato de chumbo contidos em placas de Petri. As placas contendo os meios semeados foram mantidas em temperatura de 28 °C durante cinco dias. Após este período, o crescimento celular foi avaliado nas placas contendo meio YPG com as células semeadas e o escurecimento do meio foi verificado nas placas contendo o meio acetato de chumbo.

#### 4.10 COMPARAÇÃO DE FERMENTAÇÕES UTILIZANDO LEVEDURA AUTÓCTONE *Hanseniaspora uvarum* E LEVEDURA VÍNICA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras isoladas que mantiveram a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase durante a fermentação alcoólica de mosto de uva e que também não formaram sulfeto de hidrogênio, foram utilizadas em fermentações alcoólicas de mosto de uvas da espécie *Vitis labrusca* da cultivar Bordô (Terci) provenientes do município de Colombo, Paraná. Para a realização das fermentações, também foi utilizada a levedura vínica comercial *Saccharomyces cerevisiae* Maurivin B, gentilmente cedida por vinicultores do estado do Paraná.

Tubos de polipropileno contendo as células congeladas de cada levedura isolada e selecionada foram descongelados, centrifugados a 4722  $xg$  e as células contidas em cada tubo foram suspensas em meio YPG (pH 5,5) e transferidas para frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio YPG (pH 5,5). Os frascos foram mantidos em agitador-incubador na temperatura de 28 °C, 150 rpm, durante 24 horas. Após este período, o conteúdo de cada frasco foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio YPG (pH 5,5), os quais também foram mantidos em agitador-incubador na temperatura de 28 °C, 150 rpm, durante 24 horas. Após o crescimento das células, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de Falcon estéreis, as células das leveduras foram separadas

do meio de cultivo por centrifugação a 4722  $xg$  e lavadas com água destilada estéril, até a completa remoção do meio de cultivo. Os tubos de Falcon contendo as células permaneceram em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas e após este período as células foram liofilizadas em liofilizador de bancada Lodan<sup>®</sup>.

Posteriormente, foi determinado o número de células viáveis por contagem microscópica direta, empregando câmara de Neubauer<sup>®</sup>, conforme Madigan et al. (2010), e calculado o número de células viáveis por grama de levedura seca, utilizando as células secas de cada levedura isolada e selecionada e as células secas da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a realização das fermentações, uma massa de células de levedura seca correspondente à concentração celular desejada no mosto de uva foi transferida para frascos de Erlenmeyer contendo 5 mL de água destilada esterilizada e os frascos contendo as células foram mantidos em banho-maria na temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. O conteúdo de cada frasco foi utilizado como inóculo. Concomitantemente, bagas de uvas lavadas e livres da ráquis, foram esmagadas. O mosto resultante foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 300 mL. Ao mosto foram adicionados  $100\text{ mg.L}^{-1}$  de metabissulfito de potássio. Após 5 horas do início da adição do metabissulfito de potássio foram coletadas alíquotas para análises das concentrações iniciais de resveratrol, glucose e frutose (ver 4.11). Em seguida, foi adicionado, em cada frasco contendo o mosto de uva, o volume da suspensão de células de uma ou mais leveduras. O processo fermentativo foi conduzido com três tratamentos e três repetições:

(1) Monocultura: o mosto foi inoculado empregando-se inóculo simples de uma das leveduras isoladas ou da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

(2) Inóculo misto: o mosto foi inoculado simultaneamente com suspensões de células de uma das leveduras isoladas juntamente com a suspensão de células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

(3) Inóculo misto sequencial: o mosto foi inoculado com suspensões de uma das leveduras isoladas no início da fermentação, e após 48 horas foi inoculada a suspensão da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

A realização da chaptalização do mosto (tempo zero) ou do líquido fermentado (tempo 72 horas), foi realizada pela adição de sacarose, na forma de açúcar cristal.

Os frascos com mosto de uva inoculados foram mantidos em condição estática até o término das fermentações em sala climatizada a 17 °C. Os procedimentos de remontagem, nos quais as cascas foram abaixadas, foram realizados duas vezes por dia, e durante estes processos, alíquotas foram coletadas para a medição de sólidos solúveis totais com o auxílio de um refratômetro portátil. Ao término das fermentações, foi realizado o procedimento de descuba (retirada das cascas), as células foram separadas do líquido fermentado por centrifugação e foram determinadas as concentrações de resveratrol, glucose, frutose, glicerol, ácido acético e etanol por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (ver 4.11). As fermentações de mosto de uva para cada condição avaliada foram realizadas em triplicata.

## 4.11 ANÁLISES

### 4.11.1 Determinação de resveratrol e piceid

As análises dos teores de piceid e resveratrol foram realizadas em um equipamento de Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência Varian® Pro Star (Lake Forest, CA) compreendendo o módulo ProStar 230 referente a bomba, o módulo ProStar 320 referente ao detector UV-VIS e amostrador modelo 410, da Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A determinação cromatográfica dos estilbenos resveratrol e piceid foi realizada de acordo com Gerogiannaki-Christopoulou et al. (2006) e Malovaná et al. (2001) com modificações necessárias determinadas experimentalmente, de acordo com a resposta do equipamento.

Os padrões de *trans*-resveratrol (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) e *trans*-piceid (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) foram dissolvidos em metanol. As soluções foram armazenadas em temperatura de - 20 °C, ao abrigo da luz, e o oxigênio removido com injeção de nitrogênio. As soluções de trabalho foram preparadas após diluição da solução padrão utilizando água ultrapura.

As condições cromatográficas empregadas foram: eluição gradiente com fase móvel composta por (A) água-ácido acético (98:2) e (B) metanol, coluna cromatográfica Microsorb-MV 100-5 C-18 (250 mm x 4,6 mm<sup>2</sup>; 5 µm; Varian Inc, Califórnia, Estados Unidos), fluxo de 1000 µL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20 µL,

temperatura de 40 °C e detecção dos compostos de interesse por absorvância ( $\lambda = 288 \text{ nm}$  e  $\lambda = 308 \text{ nm}$ ). O gradiente linear para a fase móvel (A) seguiu o seguinte protocolo: 0 min, 100%; 10 min, 85%; 15 min, 75%; 20 min, 70%; 25 min, 65%; 35min, 50%; 40 min, 40%; 45 min, 20%; 55 min, 100%.

A avaliação dos cromatogramas obtidos foi realizada por meio do software Workstation Star 6.0. A quantificação do resveratrol e piceid foram realizadas por meio de curvas de calibração, conforme TABELA 3. Os compostos presentes nas amostras foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos seus respectivos padrões e também por análise do perfil espectral (UV).

TABELA 3 - TEMPOS DE RETENÇÃO, INTERVALOS DE CONCENTRAÇÕES AVALIADAS, EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ ) PARA OS PADRÕES PICEID E RESVERATROL

Padrão	Tempo de retenção (min)	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Equação da reta	$R^2$
Piceid	27,85	1,00 - 15,00	$y = 94,086x + 14,486$	0,998
Resveratrol	34,78	1,00 - 15,00	$y = 170,2x - 141,89$	0,996

FONTE: O autor (2016).

#### 4.11.2 Determinação de glucose, frutose, ácido acético, glicerol e etanol

Para a determinação das concentrações de glucose, frutose, ácido acético, glicerol e etanol foi utilizado um equipamento de Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência Varian<sup>®</sup> Pro Star (Lake Forest, CA) acoplado ao detector de índice de refração de mesma marca, modelo RI 350, bomba Pro Star 230 e amostrador modelo 410, do Departamento de Nutrição. A avaliação dos cromatogramas obtidos foi realizada por meio do software Workstation Star 6.0.

A separação cromatográfica e quantificação de glucose, frutose, ácido acético, glicerol e etanol foi realizada empregando uma coluna cromatográfica analítica trocadora de íons Agilent<sup>®</sup> Hi-Plex H (300 mm x 7.7 mm, 8  $\mu\text{m}$ ), utilizando um volume de 20  $\mu\text{L}$  de amostra a cada injeção. Foi utilizada fase móvel isocrática composta por ácido sulfúrico 8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  em um fluxo de 400  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  na temperatura ambiente (BALL et al., 2008). Os analitos foram detectados utilizando um detector de índice de refração. Os padrões de glucose (Merck<sup>®</sup>, SP, Brasil), frutose (Fluka<sup>®</sup> SP, Brasil), ácido acético (LAS do Brasil<sup>®</sup>, GO, Brasil), glicerol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, SP, Brasil) e etanol (Fluka<sup>®</sup> SP, Brasil) foram dissolvidos em solução de ácido sulfúrico 8

mmol.L<sup>-1</sup> e suas concentrações presentes nas amostras foram determinadas por meio de curvas de calibração, conforme TABELA 4.

TABELA 4 - TEMPOS DE RETENÇÃO, INTERVALOS DE CONCENTRAÇÕES AVALIADAS, EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO (R<sup>2</sup>) PARA OS PADRÕES GLUCOSE, FRUTOSE, ÁCIDO ACÉTICO, GLICEROL E ETANOL

Padrão	Tempo de retenção (min)	Concentração (mg.ml <sup>-1</sup> )	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Glucose	10,59	0,100 - 2,000	y = 1E+06x + 8163	0,999
Frutose	11,41	0,100 - 2,000	y = 1E+06x - 74357	0,997
Glicerol	14,75	0,121 - 2,428	y = 703162x + 14995	0,999
Ácido Acético	17,10	0,100 - 2,000	y = 276118x + 10985	0,996
Etanol	22,26	0,072 - 2,163	y = 675245x - 41574	0,999

FONTE: O autor (2016).

#### 4.11.3 Análises Estatísticas

As amostras foram quantificadas em triplicatas para todas as determinações analíticas. As análises de normalidade foram realizadas pelo teste de Kolmogorov. A comparação entre as médias obtidas foi realizada com análise de variância (ANOVA) corrigida pelo teste Tukey HSD (*Honest Significant Difference*) com um nível de significância de 95% (P < 0,05). O grau de correlação entre variáveis foi medido empregando o coeficiente de correlação de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Statistica<sup>®</sup> para Windows, v. 8.0. Os gráficos foram elaborados utilizando o *software* Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> para Mac, v. 14.6.4.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS

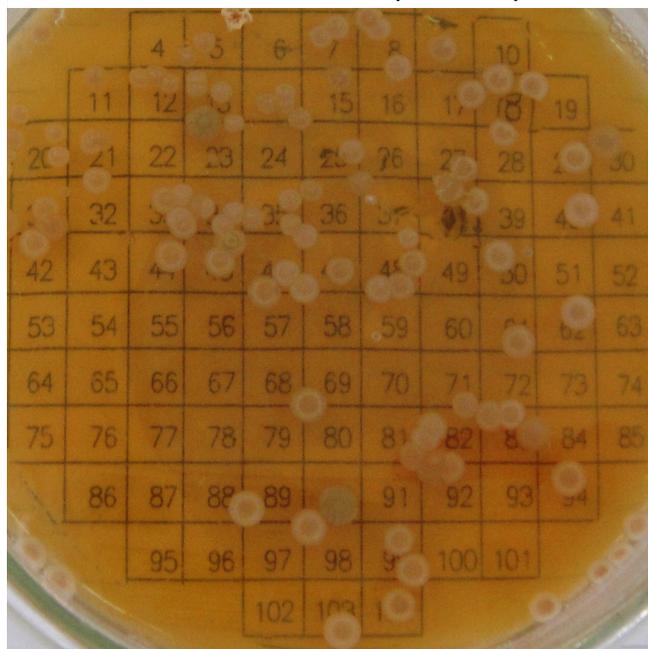
Após obtenção da autorização nº 010198/2013-0, para acesso de componente do patrimônio genético com a finalidade de pesquisa científica, foram isoladas e conservadas por congelamento (ver 4.4) 308 leveduras provenientes de uvas cultivadas no Estado do Paraná: uvas *Vitis labrusca*, cultivar Bordô (Terci), do município de Colombo (identificadas como CB1), uvas *Vitis labrusca*, cultivar Bordô (Terci), oriundas de dois vinhedos distintos do município de Almirante Tamandaré (identificadas como AT1 e AT2), uvas *Vitis vinifera*, cultivar Carbernet Sauvignon, do município de Almirante Tamandaré (identificadas como AT3), e uvas *Vitis vinifera*, cultivar Merlot (identificadas como CL1) e cultivar Viognier (identificadas como CL2) do município de Campo Largo.

As leveduras foram isoladas durante o processo de fermentação espontânea do mosto, desde o tempo zero (uvas recém-esmagadas) até o tempo 9 (9º dia da fermentação espontânea).

Após a escolha de colônias com características morfológicas macroscópicas de leveduras (FIGURA 9 e FIGURA 10), cada colônia isolada foi cultivada e suas características morfológicas microscópicas foram examinadas. As leveduras visualizadas apresentaram características morfológicas variadas (FIGURAS 11, 12, 13, 14 e 15), sugerindo uma possível diversidade de gêneros e espécies dentre as leveduras isoladas.

FIGURA 9 - COLÔNIAS DE MICRO-ORGANISMOS CRESCIDOS NA TEMPERATURA DE 28 °C NA SUPERFÍCIE DE MEIO SÓLIDO YPG (pH 4,5) PROVENIENTES DA AMOSTRA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE MOSTO DE UVAS NATIVAS DE ALMIRANTE TAMANDARÉ

Almirante Tamandaré, tempo zero, placa 32

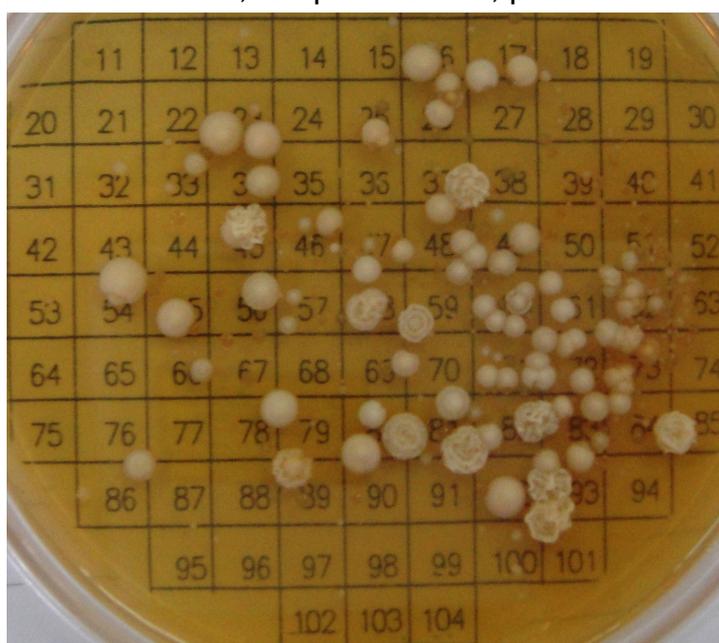


FONTE: O autor (2016).

NOTA: Amostra de mosto de uvas antes do início da fermentação espontânea (tempo zero hora).

FIGURA 10 - COLÔNIAS DE MICRO-ORGANISMOS CRESCIDOS NA TEMPERATURA DE 28 °C NA SUPERFÍCIE DE MEIO SÓLIDO YPG (pH 4,5) PROVENIENTES DA AMOSTRA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE MOSTO DE UVAS NATIVAS COLOMBO

Colombo, tempo seis dias, placa 32



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Amostra do sexto dia da fermentação espontânea.

Observa-se na FIGURA 9 que a maioria das colônias são de coloração creme, com aspecto liso e delimitadas. No entanto, as colônias localizadas nas posições 23 e 90 apresentam coloração cinza e igualmente à colônia localizada na posição 5, possuem aspecto rugoso.

Percebe-se na FIGURA 10 que a maioria das colônias são de coloração branca, de aspecto liso e delimitadas. Colônias crescidas na superfície do meio sólido com aspecto rugoso e não-delimitadas podem ser visualizadas nas posições 37, 45, 59, 80, 81, 82, 85, 89, 93 e 101.

As colônias de micro-organismos crescidas na superfície do meio sólido YGP foram formadas por células presentes nas amostras do mosto de uvas coletadas no início (FIGURA 9) e após seis dias da fermentação espontânea (FIGURA 10) de uvas nativas dos municípios de Almirante Tamandaré e Colombo, respectivamente. Verifica-se pela diferença das características morfológicas macroscópicas das colônias de micro-organismos predominantes nas FIGURAS 9 e 10 que, após seis dias da fermentação espontânea, ocorreu uma seleção das células pelas condições ambientais da fermentação, em relação às células naturalmente presentes na uva (tempo zero hora da fermentação). Essa sucessão de micro-organismos durante o processo de elaboração de vinho também tem sido relatada por Pretorius (2000).

As colônias de leveduras crescidas a partir de células presentes nas amostras do mosto de uvas coletadas no início e após quatro, seis e sete dias da fermentação espontânea de uvas foram cultivadas em meio líquido (ver 4.4) e suas células foram visualizadas em microscopia óptica de campo claro.

As células das leveduras isoladas apresentadas nas FIGURAS 11 e 12 são provenientes do cultivo realizado em meio líquido, a partir de uma colônia isolada procedente de amostra do início (tempo zero) e do quarto dia, respectivamente, da fermentação espontânea de uvas nativas de Colombo. As células das leveduras isoladas apresentadas nas FIGURAS 13 e 14 resultam do cultivo realizado em meio líquido a partir de uma colônia isolada proveniente de amostra do quarto dia e do sexto dia, respectivamente, da fermentação espontânea de uvas nativas de Almirante Tamandaré. As células da levedura isolada apresentada na FIGURA 15 originam-se do cultivo realizado em meio líquido de uma colônia isolada provinda de amostra do sétimo dia da fermentação espontânea de uvas nativas de Colombo.

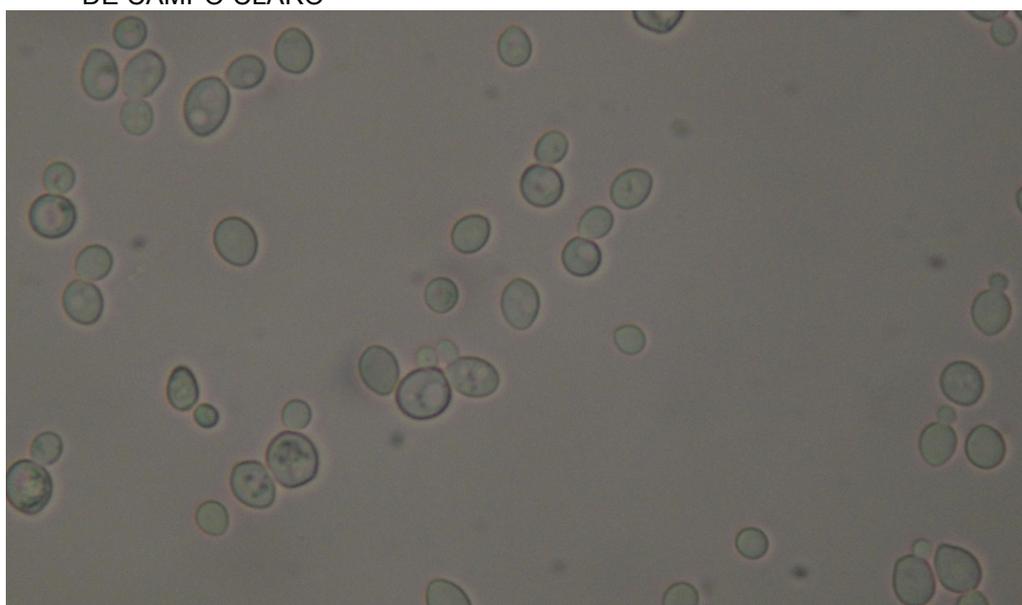
FIGURA 11 - CÉLULAS DA LEVEDURA CB1.031.34 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO



FONTE: O autor (2016).  
NOTA: Aumento de 400x.

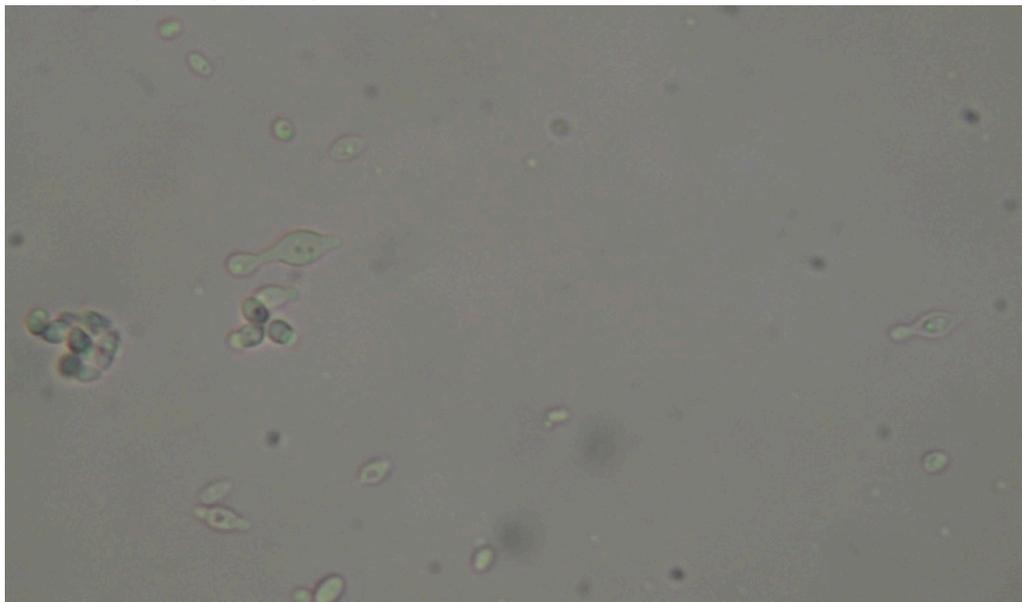
De um modo geral, as células da levedura isolada CB1.031.34, demonstradas na FIGURA 11, são cilíndricas com e sem brotos, apresentando formato de hifa e pseudo-hifa; e a levedura isolada CB1.452.06 (FIGURA 12) apresenta células isoladas e aos pares de formato redondo com e sem brotos.

FIGURA 12 - CÉLULAS DA LEVEDURA CB1.452.06 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO



FONTE: O autor (2016).  
NOTA: Aumento de 400x.

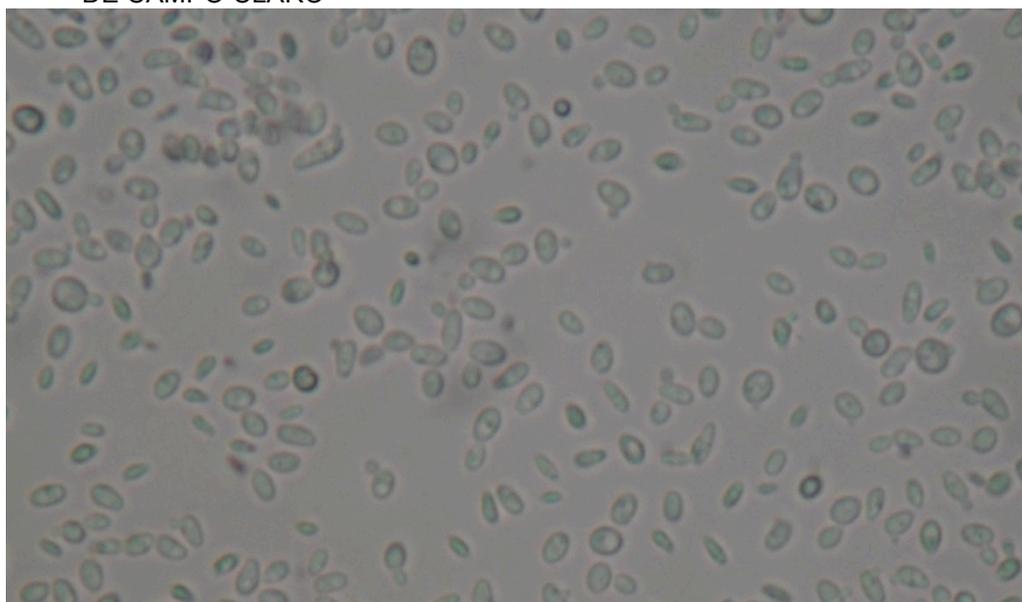
FIGURA 13 - CÉLULAS DA LEVEDURA AT1.462.79 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO



FONTE: O autor (2016).  
NOTA: Aumento de 400x.

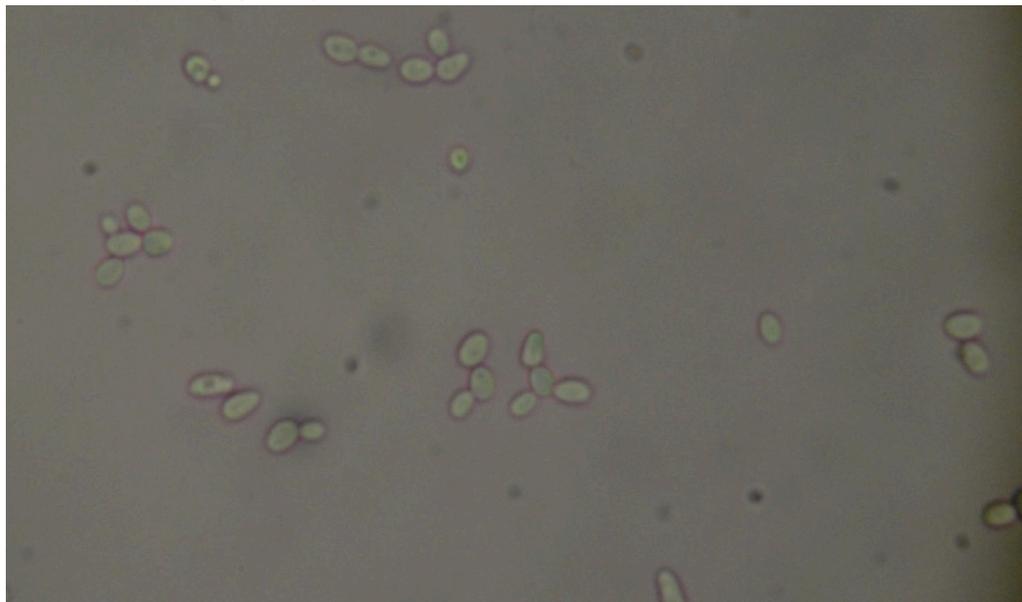
A levedura isolada AT1.462.79 (FIGURA 13) apresenta a maior parte de suas células ovoides, sem e com brotos, podendo estes serem bipolares. Conforme pode ser observado na FIGURA 14, a levedura isolada AT2.631.16 apresenta células isoladas sem e com brotos de formato redondo e ovoide.

FIGURA 14 - CÉLULAS DA LEVEDURA AT2.631.16 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO



FONTE: O autor (2016).  
NOTA: Aumento de 400x.

FIGURA 15 - CÉLULAS DA LEVEDURA CB1.731.17 OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO



FONTE: O autor (2016).  
NOTA: Aumento de 400x.

Na FIGURA 15, estão mostradas as células da levedura isolada CB1.731.17, na qual verifica-se a prevalência de células ovoides sem e com brotos e pseudo-hifa.

Após a visualização das características morfológicas microscópicas de todas as leveduras isoladas, cada levedura foi novamente cultivada até o final da fase exponencial do crescimento e conservada por congelamento utilizando como agente crioprotetor o glicerol.

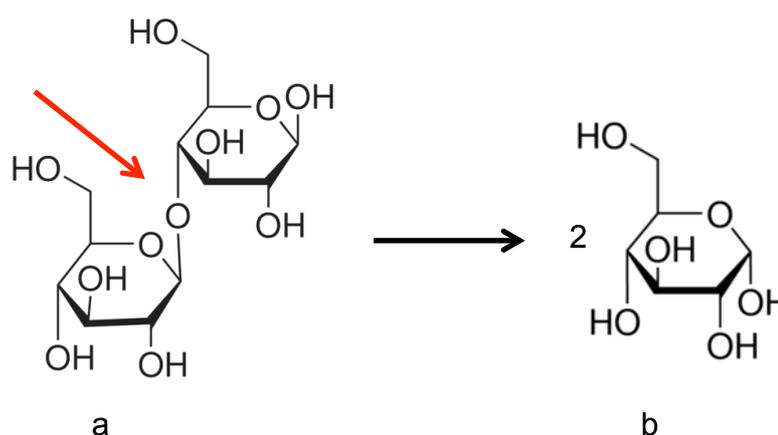
Para cada levedura isolada, três tubos de polipropileno contendo quantidade suficiente de células conservadas por congelamento foram remetidos à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPJ 00.348.003/001-10, para depósito na Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) (067/2012/SECEX/CGEN), conforme instituído pela Resolução nº 18 de 7 de julho de 2005, que estabelece critérios para depósito, uso e conservação de amostras representativas de cada população componente do patrimônio genético acessado em instituição credenciada como fiel depositária.

## 5.2 SELEÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE

Cada levedura isolada de diferentes tempos da fermentação espontânea, de uvas provenientes do estado do Paraná, e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 e *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563 foram avaliadas utilizando os substratos celobiose, esculin e arbutin como única fonte de carbono no meio de cultivo para verificar se havia reação de hidrólise catalisada pela enzima  $\beta$ -glicosidase. Concomitantemente a cada ensaio para a visualização da ausência ou presença dos produtos da reação de hidrólise pela enzima  $\beta$ -glicosidase, a viabilidade das células contidas na suspensão empregada como inóculo de cada levedura isolada e das leveduras controle foi confirmada pelo crescimento em meio YM.

A FIGURA 16 apresenta a estrutura da celobiose antes e após a hidrólise. A celobiose (FIGURA 16, a), um dissacarídeo constituído de duas moléculas de glucose com ligação glicosídica  $\beta(1\rightarrow4)$ , após sua hidrólise pela enzima  $\beta$ -glicosidase, resulta em duas moléculas de glucose (FIGURA 16, b), utilizada como fonte de carbono para o crescimento microbiano (MCBRIDE et al., 2005).

FIGURA 16 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA CELOBIOSE CATALISADA PELA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



FONTE: O autor (2016).

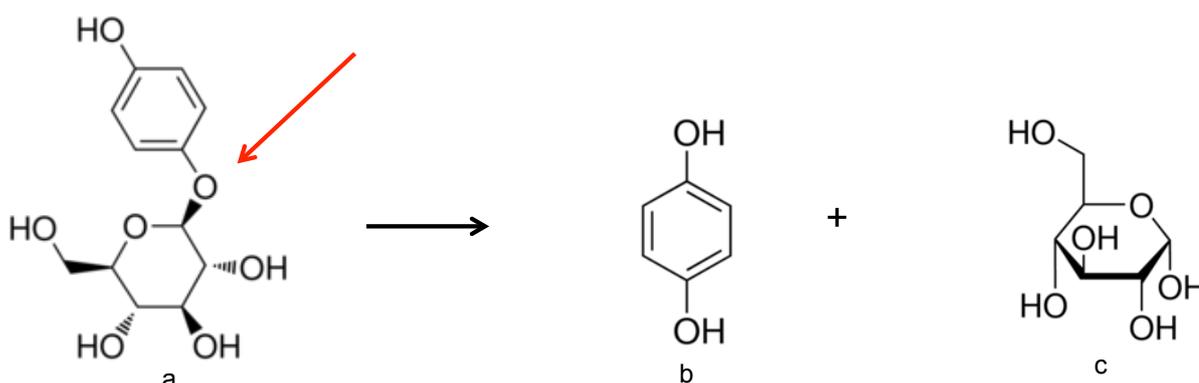
NOTA: Estão representados (a) celobiose e (b) glucose. A seta indica a ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ .

Das 308 leveduras isoladas, 89 leveduras cresceram no meio sólido contendo o substrato celobiose como única fonte de carbono, conforme o crescimento observado pela levedura *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563,  $\beta$ -

glicosidase positiva (FREER, 1993), e o não crescimento visualizado no meio semeado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632,  $\beta$ -glicosidase negativa.

Conforme apresentado na FIGURA 17, a reação de hidrólise do substrato arbutin (4-hidroxifenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, hidroquinona- $\beta$ -D-glucopiranosídeo) (FIGURA 17, a) pela enzima  $\beta$ -glicosidase, resulta na liberação de dois produtos, hidroquinona (1,4-diidroxibenzeno, 1,4-benzenodiol) (FIGURA 17, b) e glucose (FIGURA 17, c). Esta reação de hidrólise pode ser confirmada pelo aparecimento de coloração marrom escuro, a qual é resultante da reação entre a hidroquinona e o íon férrico presente no meio de cultivo (ROSI; VINELLA e DOMIZIO, 1994).

FIGURA 17 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ARBUTIN CATALISADA PELA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



FONTE: O autor (2016).

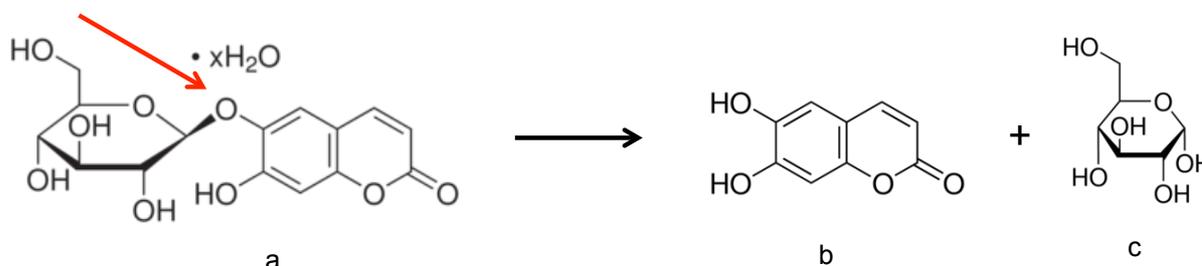
NOTA: Estão representados (a) arbutin, (b) hidroquinona e (c) glucose. A seta indica a ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ .

Das 308 leveduras isoladas e das leveduras controle positivo e negativo inoculadas em meio de cultivo contendo o substrato arbutin como única fonte de carbono, 149 leveduras alteraram a coloração do meio de cultivo para marrom, semelhante à coloração desenvolvida pela levedura *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563, e diferente do observado no meio de cultivo inoculado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632, que não desenvolveu coloração.

Como pode ser observado na FIGURA 18, a reação de hidrólise do substrato esculin (6,7-diidroxicumarina- $\beta$ -D-glucose) (FIGURA 18, a) pela enzima  $\beta$ -glicosidase resulta na liberação de dois produtos, esculetina (6,7-diidroxicumarina) (FIGURA 18, b) e glucose (FIGURA 18, c). O produto da reação esculetina reage

com o íon férrico presente no meio de cultivo, resultando em coloração marrom-escura (SAQIB e WHITNEY, 2006).

FIGURA 18 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ESCULIN CATALISADA PELA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Estão representados (a) esculin, (b) esculetina e (c) glucose. A seta indica a ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ .

Dentre as 308 leveduras isoladas que foram ensaiadas para a reação de hidrólise do substrato esculin, 165 leveduras alteraram a coloração do meio de cultivo para coloração marrom escura, similar àquela observada nos frascos inoculados com a levedura *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563. Os frascos inoculados com a suspensão de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 não apresentaram coloração marrom-escura.

As leveduras isoladas que cresceram na presença do substrato celobiose e que também apresentaram resultado positivo nos ensaios utilizando os substratos arbutin e/ou esculin, foram selecionadas como leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase.

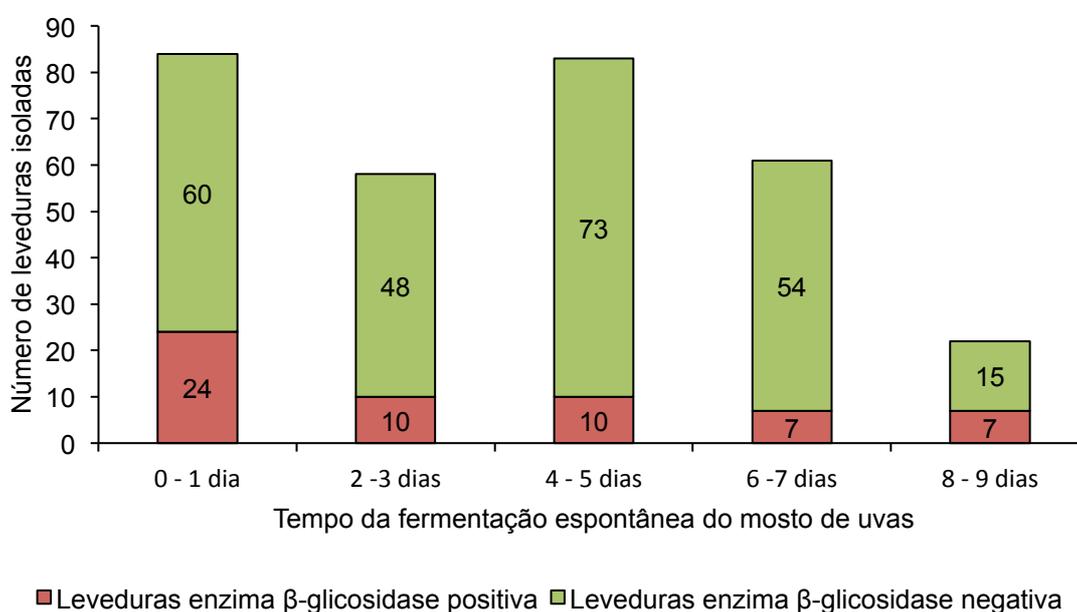
Considerando os resultados da visualização da ausência ou presença dos produtos da reação de hidrólise pela enzima  $\beta$ -glicosidase apresentados na TABELA 5, foram selecionadas 58 leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase (18,84% do total de leveduras isoladas). Destas, quarenta leveduras isoladas (13%) apresentaram resultado positivo nos ensaios utilizando os substratos celobiose, arbutin e esculin; oito leveduras isoladas (2,6%) apresentaram resultado positivo para os substratos celobiose e arbutin; e dez leveduras isoladas (3,24%) apresentaram resultado positivo para os substratos celobiose e esculin.

TABELA 5 - REAÇÕES EMPREGANDO OS SUBSTRATOS CELOBIOSE, ESCULIN E ARBUTIN E AS LEVEDURAS ISOLADAS

Resultados	Número de leveduras	% de leveduras
Positivo para celobiose, arbutin e esculin	40	13,0
Positivo para celobiose e arbutin	8	2,6
Positivo para celobiose e esculin	10	3,24
Positivo para arbutin e esculin	97	31,5
Positivo somente para celobiose	31	10,06
Positivo somente para arbutin	4	1,3
Positivo somente para esculin	18	5,84
Negativo para celobiose, arbutin e esculin	100	32,46

FONTE: O autor (2016).

O número de leveduras isoladas em cada tempo da fermentação espontânea que apresentaram resultado negativo ou positivo nos ensaios realizados utilizando como substratos celobiose, arbutin e esculin nas reações de hidrólise catalisadas pela enzima  $\beta$ -glicosidase estão demonstrados na FIGURA 19.

FIGURA 19 - NÚMERO DE LEVEDURAS PRODUTORAS OU NÃO DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA EM QUE FORAM ISOLADAS

FONTE: O autor (2016).

De acordo com a FIGURA 19, a maioria das leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase foram isoladas no início da fermentação espontânea, nos tempos zero e um dia. Percebe-se que a partir do sexto dia, ocorre um menor número de leveduras capazes de produzir a enzima  $\beta$ -glicosidase.

O resultado obtido de 28,9% de leveduras isoladas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase que cresceram em meio contendo o substrato celobiose está de acordo com Villena, Iranzo e Pérez (2007) que buscaram atividade  $\beta$ -glicosidásica em 102 leveduras isoladas de ecossistemas vínicos empregando celobiose como substrato. Destas 102 leveduras, 25% apresentaram crescimento em celobiose.

Rosi, Vinella e Domizio (1994) pesquisaram atividade  $\beta$ -glicosidásica empregando arbutin como substrato em 317 leveduras isoladas de uvas e vinhos e conseguiram resultado positivo em 20,5% das leveduras. Fernández, Úbeda e Briones (2000) também investigaram a presença da enzima  $\beta$ -glicosidase em 182 leveduras isoladas de mosto de uvas não fermentados empregando arbutin e tiveram resultado positivo para 14% das leveduras isoladas. Estes valores são inferiores ao obtido de 48,4% de leveduras isoladas que tiveram resultado positivo na reação de hidrólise utilizando o substrato arbutin.

O número de leveduras isoladas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase (18,84%) (TABELA 5) e o tempo da fermentação espontânea em que foram isoladas (FIGURA 19) é similar ao relatado por Spagna et al. (2002a). Os autores avaliaram a atividade  $\beta$ -glicosidásica utilizando *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo de 361 leveduras isoladas de amostras de mosto de uva em diferentes tempos de uma fermentação espontânea, e 18% das leveduras foram positivas para atividade  $\beta$ -glicosidásica, principalmente as leveduras isoladas nos primeiros dias da fermentação espontânea.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE

As 58 leveduras selecionadas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase foram testadas para verificar o seu crescimento nas fontes de carbono amido, celobiose, glucose, lactose e manitol, na fonte de nitrogênio lisina, e fermentação de glucose e lactose.

Das leveduras selecionadas e controles, cresceram nos meios de cultivo contendo como única fonte de carbono amido: 49 leveduras autóctones e a levedura *Cryptococcus flavus* NRRL Y-1585; celobiose e glucose: 58 leveduras autóctones e a levedura *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563; lactose: 45 leveduras autóctones e a

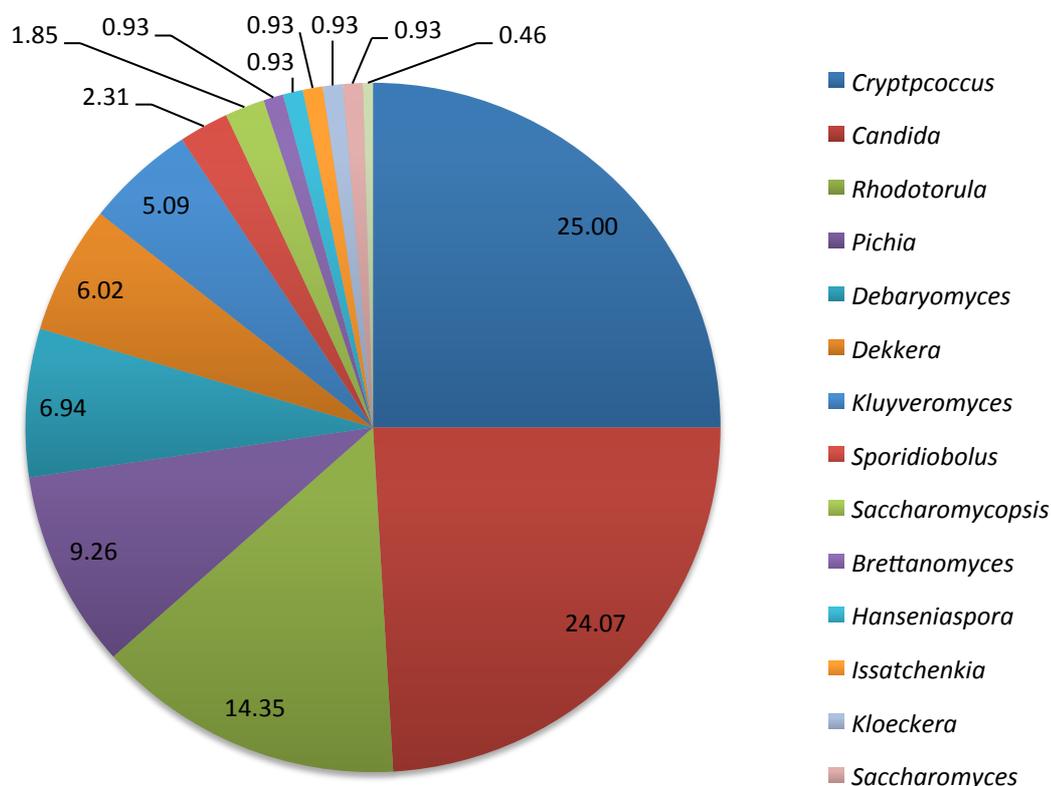
levedura *Cryptococcus flavus* NRRL Y-1585; e manitol: 36 leveduras autóctones e a levedura *Cryptococcus flavus* NRRL Y-1585. No meio de cultivo contendo lisina como única fonte de nitrogênio, foi observado o crescimento de 54 leveduras autóctones e da levedura *Pichia guilliermondii* NRRL Y-2075. Não foi verificado o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 nos meios com celobiose, manitol e lisina, da levedura *Candida wickerhamii* NRRL Y-2563 no meio contendo amido, e da levedura *Pichia guilliermondii* NRRL Y-2075 no meio com lactose.

Dentre as 58 leveduras avaliadas nos testes de fermentação, foi visualizada a formação de CO<sub>2</sub> no interior do tubo de Durham, indicando resultado positivo para fermentação. Treze leveduras autóctones e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 fermentaram glucose e três leveduras autóctones fermentaram lactose. Não foi observada a formação de CO<sub>2</sub> nos tubos contendo glucose e lactose inoculados com as leveduras controle *Cryptococcus flavus* NRRL Y-1585 e *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632, respectivamente.

Os resultados dos testes de crescimento e de fermentação de diferentes fontes de carbono, bem como do teste de crescimento na presença de lisina, foram analisados de acordo com as características fisiológicas propostas por BARNETT; PAYNE e YARROW (2000). A combinação dos resultados obtidos para cada levedura indicou os possíveis gêneros que as leveduras podem pertencer. A FIGURA 20 mostra a possibilidade, em percentual, que cada levedura tem de pertencer a cada gênero indicado.

Os testes convencionais, descritos por BARNETT; PAYNE e YARROW (2000) utilizados para realizar a identificação fenotípica das leveduras selecionadas, considerando características morfológicas e fisiológicas, foram capazes de indicar quatorze possíveis gêneros que as leveduras podem pertencer. Dentre os gêneros indicados na FIGURA 20, a maioria deles é de leveduras usualmente encontradas em uvas e vinhos (JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006).

FIGURA 20 - PROBABILIDADE (%) DAS LEVEDURAS SELECIONADAS PRODUTORAS DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE DE PERTECEREM A CADA GÊNERO INDICADO



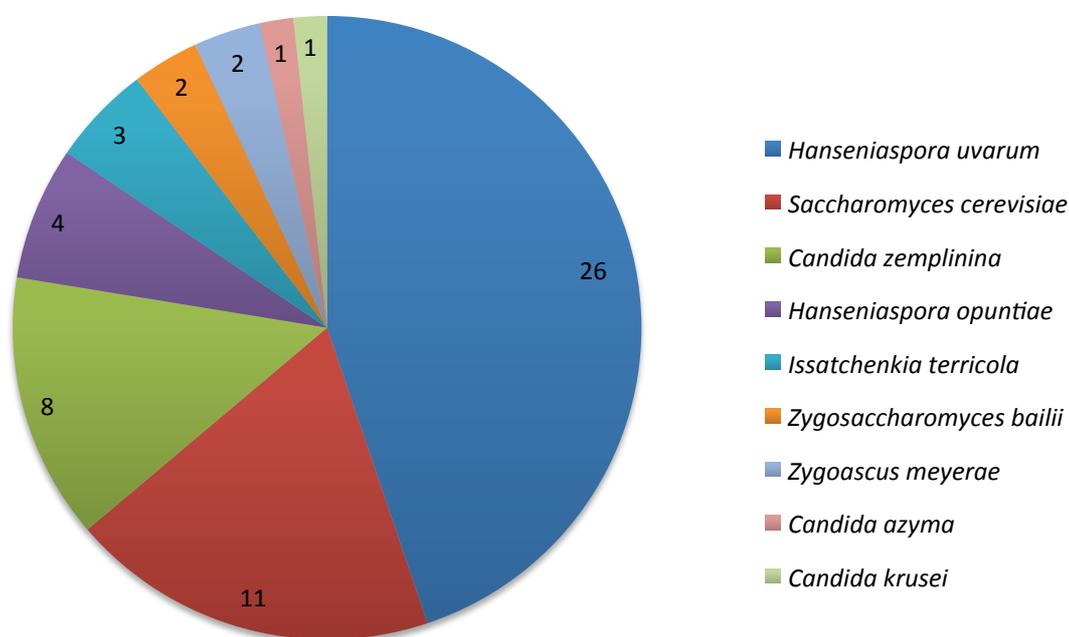
FONTE: O autor (2016).

A partir da análise do perfil molecular estabelecido pela espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) das 58 leveduras selecionadas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase, 46 leveduras apresentaram resultados de valores de log escores  $\geq 2,0$  e foram identificadas quanto à espécie, e seis leveduras apresentaram resultados de valores de log escores entre 1,7 e 2,0, confirmando o gênero.

As seis leveduras selecionadas que tiveram resultados de valores de log escores igual ou inferior a 1,7 e as seis leveduras que apresentaram somente a identificação do gênero, foram identificadas por PCR-RFLP.

A identificação taxonômica das leveduras selecionadas utilizando MALDI-TOF/MS e PCR-RFLP e o número de leveduras de cada espécie está mostrada na FIGURA 21.

FIGURA 21 - IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E O NÚMERO DE LEVEDURAS SELECIONADAS DE CADA ESPÉCIE



FONTE: O autor (2016).

As 58 leveduras isoladas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase e identificadas pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes e ordem Saccharomycetales (OFFORD e KIRK, 2016).

Conforme demonstrado na FIGURA 21, das 58 leveduras selecionadas, 26 leveduras foram identificadas como *Hanseniaspora uvarum* e quatro leveduras como *Hanseniaspora opuntiae*. Estas espécies estão inseridas na família Saccharomycodaceae. As leveduras *Hanseniaspora* spp. e seu equivalente assexuado *Kloeckera* spp. estão entre as primeiras espécies de leveduras descobertas em mosto de uvas em fermentação, em 1870 (DEÁK, 2008). Segundo Barata; Malfeito-Ferreira e Loureiro (2012), as leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Kloeckera apiculata* são as espécies de levedura mais comumente encontradas nas bagas de uva, o que está de acordo com a sua predominância no início da fermentação espontânea do mosto de uva. Chavan et al. (2009) também encontraram predominantemente *Hanseniaspora uvarum* no isolamento e identificação de leveduras de uvas utilizadas na China.

A espécie *Hanseniaspora opuntiae* foi primeiramente isolada do cacto *Opuntia ficus-indica* e descrita por Cadez et al. (2003).

Entre as leveduras selecionadas, onze foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* e duas como *Zygosaccharomyces bailii* (FIGURA 21), as quais são classificadas como pertencentes à família Saccharomycetaceae (DEÁK, 2008). A presença de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em uvas sadias é controversa, alguns autores afirmam que esta é uma espécie presente naturalmente em frutos e solo, e outros que esta é uma espécie domesticada, e que sua presença em uvas é devido ao seu transporte principalmente por insetos, das vinícolas até os frutos (QUEROL et al., 2003).

Também foram identificadas, do total de leveduras selecionadas, oito leveduras *Candida zemplinina*, uma levedura *Candida azyma* e uma levedura *Candida krusei* (FIGURA 21). As leveduras *Candida zemplinina* e *Candida azyma* pertencem à família Candidaceae (DEÁK, 2008), e a levedura *Candida krusei*, nome científico aceito *Issatchenkia orientalis*, à família Pichiaceae (OFFORD e KIRK, 2016).

A espécie *Candida zemplinina* foi primeiramente isolada de mosto de uvas botirizadas de vinhos Tokaj, região localizada entre o noroeste da Hungria e o sudoeste da Eslováquia, e está presente frequentemente em amostras de mosto ou vinhos (KRAKOVÁ et al., 2012). Devido à sua similaridade e co-ocorrência, tanto em uvas como em mosto fermentativo com a levedura *Candida stellata*, muitas leveduras destas espécies foram erroneamente classificadas (PFLIEGLER et al., 2014).

Chavan et al. (2009) foram os primeiros a isolar *Candida azyma* de uvas. Esta espécie, até então, havia sido encontrada somente em cana-de-açúcar (BARATA; MALFEITO-FERREIRA e LOUREIRO, 2012).

A levedura *Candida krusei* (forma teleomórfica: *Issatchenkia orientalis*) já foi isolada de uvas provenientes de vinhedos da África do Sul, bem como de vinhos provenientes da Argentina e de Bordeaux, França (JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006).

Ainda, conforme exposto na FIGURA 21, foram identificadas três leveduras da espécie *Issatchenkia terricola*, que pertence à família Pichiaceae, sendo também conhecida como *Pichia terricola* (DEÁK, 2008).

Também foram identificadas duas leveduras *Zygoascus meyeriae*, pertencentes à família Trichomonascaceae (DEÁK, 2008) entre as 58 leveduras selecionadas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase. A levedura *Zygoascus meyeriae* isolada de uvas e mosto fermentativo de uvas foi primeiramente descrita por Smith et al. (2005).

Das 58 leveduras isoladas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase, que apresentaram resultado positivo nos ensaios de reação de hidrólise dos substratos celobiose, arbutin e esculin (TABELA 4), 47 leveduras foram identificadas como não-*Saccharomyces* e onze como *Saccharomyces cerevisiae* (FIGURA 21).

Dentre os gêneros de leveduras que foram indicados nos testes de crescimento em amido, celobiose, glucose, lactose, manitol e lisina, e nos testes de fermentação de glucose e lactose (FIGURA 20), quatro gêneros foram confirmados empregando MALDI-TOF/MS e PCR-RFLP (FIGURA 21): *Hanseniaspora* sp., *Saccharomyces* sp., *Candida* sp. e *Issatchenkia* sp.. No entanto, conforme os dados mostrados na FIGURA 20, aproximadamente 2% das leveduras seriam do gênero *Hanseniaspora* sp., e foram identificadas 51,7% do total de leveduras como pertencentes a este gênero (FIGURA 21).

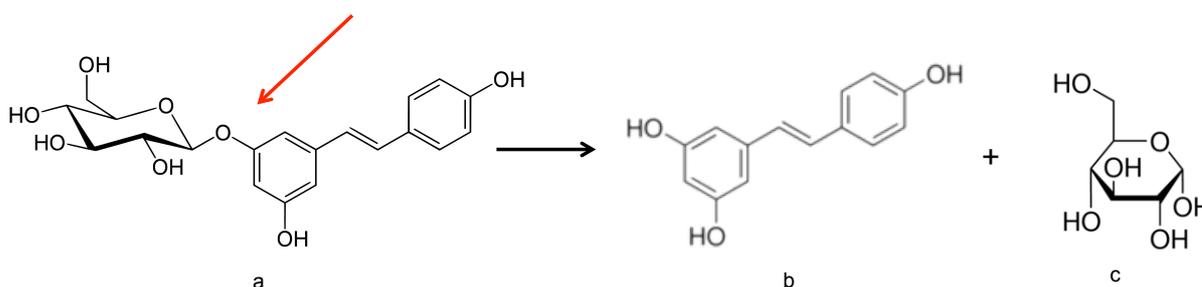
A classificação de leveduras de acordo com suas características fisiológicas é empregada e bem estabelecida para leveduras de interesse clínico. Leveduras ambientais, as quais podem apresentar diferenças metabólicas linhagem-dependente (CHAVAN et al., 2009), outras técnicas, como MALDI-TOF/MS e PCR-RFLP, tem contribuído na identificação, facilitando, com a criação de biblioteca suplementar, a identificação de micro-organismos autóctones de coleções (AGUSTINI et al., 2014).

#### 5.4 DETECÇÃO DA AÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE DAS LEVEDURAS *Saccharomyces* E NÃO-*Saccharomyces* NO SUBSTRATO PICEID

O arbutin e o esculin são os substratos análogos mais confiáveis em relação aos compostos com ligações  $\beta$ -glicosídicas encontrados em uvas. Entretanto não existem estudos mostrando a correlação da hidrólise do arbutin e do esculin com a capacidade hidrolítica da enzima  $\beta$ -glicosidase de glicosídios naturalmente presentes em uvas (PÉREZ et al., 2011), como o substrato piceid.

Conforme representado na FIGURA 22, a ação da enzima  $\beta$ -glicosidase no substrato piceid (FIGURA 22, a) ocorre na ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ , resultando na formação dos produtos resveratrol (FIGURA 22, b) e glucose (FIGURA 22, c). A ocorrência da reação de hidrólise, catalisada pela enzima, foi verificada pelo aparecimento de sinal referente ao resveratrol, após análise do meio reacional por cromatografia em fase líquida de alta eficiência.

FIGURA 22 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PICEID CATALISADA PELA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Estão representados (a) piceid, (b) resveratrol e (c) glucose. A seta indica a ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ .

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 6, das 58 leveduras isoladas que apresentaram ação da enzima  $\beta$ -glicosidase em relação aos substratos celobiose e arbutin e/ou esculin, 33 leveduras (57%) hidrolisaram o substrato piceid em resveratrol e glucose. Dentre as leveduras encontram-se três leveduras *Candida zemplinina*, quatro leveduras *Hanseniaspora opuntiae*, 23 leveduras *Hanseniaspora uvarum*, uma levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura *Zygoascus meyeræ*, e uma levedura *Zygosaccharomyces bailii*.

A ação da enzima  $\beta$ -glicosidase de leveduras de uma mesma espécie nos diferentes substratos celobiose, arbutin, esculin e piceid, que possuem a ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ , pode ser verificada pelos resultados obtidos nos ensaios utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, mostrados na TABELA 6. Dentre as onze leveduras *Saccharomyces cerevisiae* produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase, apenas uma levedura foi capaz de hidrolisar o substrato piceid. Estes resultados obtidos para a espécie *Saccharomyces cerevisiae* estão de acordo com o citado em literatura, que descreve que a enzima  $\beta$ -glicosidase possui especificidade diferente por substratos distintos (FIA; GIOVANI e ROSI, 2005) e algumas espécies possuem comportamento heterogêneo dependendo da variedade da linhagem. Dentre 153

linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* examinadas por Rosi; Vinella e Domizio (1994), apenas uma levedura hidrolisou arbutin.

Em geral, a maioria das enzimas  $\beta$ -glicosidasas já caracterizadas são descritas como capazes de atuar em uma ampla variedade de substratos. Pouco se conhece como estas enzimas interagem com a parte da química estrutural da aglicona, que compreende a base da diversidade de compostos capazes de serem hidrolisados, sendo descritas diferenças sutis na especificidade com os substratos. Além disso, a liberação de glucose livre no meio, bem como a possível sacarificação seguida de fermentação com conseqüente formação de etanol, podem contribuir para processos de retro inibição da enzima  $\beta$ -glicosidase (SINGHANIA et al., 2013).

Strauss *et al.* (2001) investigaram a presença de diferentes enzimas em 245 leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de vinhedos da África do Sul e a presença da  $\beta$ -glicosidase não foi encontrada em nenhuma das leveduras isoladas usando arbutin como substrato. Entretanto, conforme os resultados apresentados na TABELA 6, para as 32 leveduras não-*Saccharomyces* avaliadas com os substratos celobiose, arbutin, esculin e piceid, todas foram capazes de hidrolisar pelo menos dois dos substratos empregados.

TABELA 6 - RESULTADO DAS REAÇÕES UTILIZANDO OS SUBSTRATOS CELOBIOSE, ARBUTIN, ESCULIN E PICEID CATALISADAS PELA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE DAS LEVEDURAS *Saccharomyces* E NÃO-*Saccharomyces*

(continua)

	Nome	Número de referência	Substratos			
			Celobiose	Arbutin	Esculin	Piceid
1	<i>Candida azyma</i>	156	+	+	+	-
2	<i>Candida krusei</i>	260	+	+	-	-
3	<i>Candida zemplinina</i>	268	+	+	-	-
4	<i>Candida zemplinina</i>	289	+	+	-	-
5	<i>Candida zemplinina</i>	215	+	+	+	-
6	<i>Candida zemplinina</i>	241	+	+	+	+
7	<i>Candida zemplinina</i>	204	+	+	+	+
8	<i>Candida zemplinina</i>	211	+	+	+	+
9	<i>Candida zemplinina</i>	279	+	+	-	-
10	<i>Candida zemplinina</i>	226	+	+	+	-
11	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	249	+	+	+	+
12	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	250	+	+	+	+
13	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	243	+	+	+	+
14	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	199	+	+	+	+
15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	219	+	-	+	-
16	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	216	+	-	+	-
17	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	15	+	-	+	-
18	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	172	+	+	+	+
19	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	121	+	+	+	+
20	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	148	+	+	+	+
21	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	299	+	+	+	+

TABELA 6 - RESULTADO DAS REAÇÕES UTILIZANDO OS SUBSTRATOS CELOBIOSE, ARBUTIN, ESCULIN E PICEID CATALISADAS PELA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE DAS LEVEDURAS *Saccharomyces* E NÃO-*Saccharomyces*

(conclusão)

Leveduras	Número de referência	Substratos				
		Celobiose	Arbutin	Esculin	Piceid	
22	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	117	+	+	+	+
23	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	120	+	+	+	+
24	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	178	+	+	+	+
25	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	248	+	+	+	+
26	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	187	+	+	+	+
27	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	185	+	+	+	+
28	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	189	+	+	+	+
29	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	166	+	+	+	+
30	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	237	+	+	+	+
31	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	174	+	+	+	+
32	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	152	+	+	+	+
33	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	116	+	+	+	+
34	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	206	+	+	+	+
35	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	296	+	+	+	+
36	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	160	+	+	+	+
37	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	153	+	+	+	+
38	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	3	+	+	+	+
39	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	151	+	+	+	+
40	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	8	+	+	+	+
41	<i>Issatchenkia terricola</i>	19	+	-	+	-
42	<i>Issatchenkia terricola</i>	162	+	+	+	-
43	<i>Issatchenkia terricola</i>	261	+	+	+	-
44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	290	+	-	+	-
45	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	224	+	-	+	-
46	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	281	+	-	+	-
47	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	105	+	-	+	-
48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	293	+	-	+	-
49	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33	+	-	+	-
50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	284	+	+	-	-
51	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	282	+	+	+	+
52	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	140	+	+	+	+
53	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	227	+	+	+	-
54	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	203	+	+	-	-
55	<i>Zygoascus meyerae</i>	159	+	+	-	+
56	<i>Zygoascus meyerae</i>	161	+	+	-	-
57	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	232	+	-	+	+
58	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	234	+	+	+	-
59	<i>Candida wickerhamii</i>	NRRL Y-2563	+	+	+	+
60	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NRRL Y-12632	-	-	-	-

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: (+) reação de hidrólise positiva (-) reação de hidrólise negativa.

## 5.5 FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MOSTO DE UVA E AS LEVEDURAS *Saccharomyces* E NÃO-*Saccharomyces* ISOLADAS; PRODUTORAS DA ENZIMA $\beta$ -GLICOSIDASE

Para verificar a influência das condições ambientais da fermentação alcoólica de um processo de vinificação na ação da enzima  $\beta$ -glicosidase de cada

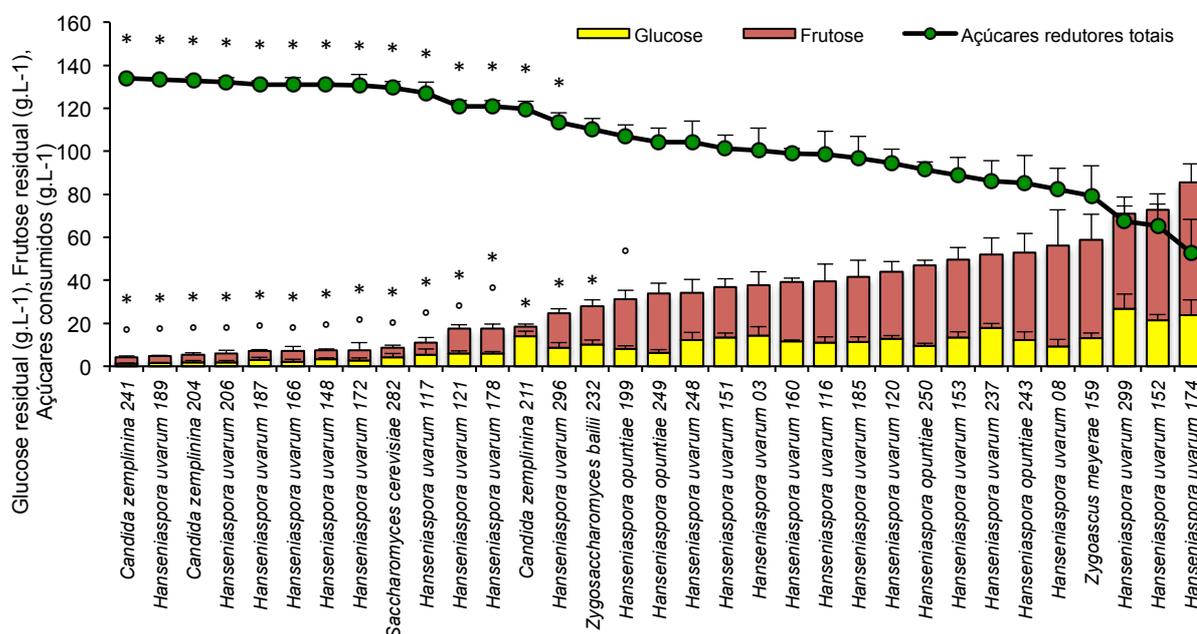
uma das 33 leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* isoladas que hidrolisaram piceid em resveratrol e glucose, foram realizadas fermentações com uvas *Vitis labrusca* cultivar Bordô (Terci) do estado do Paraná.

Em virtude das uvas maduras serem portadoras de inúmeros micro-organismos, foi adicionado o metabissulfito de potássio (sulfitagem) para inibir momentaneamente os micro-organismos existentes no mosto, em particular os indesejáveis. Estes micro-organismos não são destruídos, mas permanecem em estado latente (HASHIZUME, 2001) possibilitando a inoculação do mosto com as leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase em plena atividade, as quais dominaram as leveduras presentes no mosto. O mosto de uva sulfitado e sem as cascas, utilizado nas fermentações, apresentou os valores de sólidos solúveis de 13 °Brix, a 20 °C, concentração de açúcares redutores totais de  $138,24 \pm 29,08 \text{ g.L}^{-1}$ , pH de  $3,2 \pm 0,2$ .

O mosto de uva *Vitis labrusca*, no início de cada fermentação, foi inoculado com uma concentração celular de  $10^7$  células de leveduras por mililitro de mosto. Após cinco dias de cada fermentação, as células foram separadas e no líquido fermentado foram quantificadas as concentrações de glucose e frutose residuais; etanol, ácido acético e glicerol formados, e resveratrol, e os resultados obtidos estão representados nas FIGURAS 23, 25, 26 e 27, respectivamente.

Na FIGURA 23 estão representados os resultados determinados após cinco dias de fermentação das concentrações de glucose e frutose residuais e do consumo total de açúcares pelas leveduras avaliadas. As maiores concentrações de açúcares totais consumidos foram observadas nas fermentações realizadas por uma levedura *Saccharomyces* e treze leveduras não-*Saccharomyces*, sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ). O consumo de açúcares totais variou entre  $133,96 \pm 0,61 \text{ g.L}^{-1}$  e  $52,74 \pm 15,45 \text{ g.L}^{-1}$ , calculados nas fermentações que foram inoculadas com as leveduras *Candida zemplinina* 241 e *Hanseniaspora uvarum* 174, respectivamente. As menores concentrações de glucose residual foram determinadas nas fermentações realizadas por 14 leveduras, sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ); e as menores concentrações de frutose residual foram quantificadas em 15 fermentações, cada uma inoculada com uma levedura distinta, sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

FIGURA 23 - CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS CONSUMIDOS ( $\text{g.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



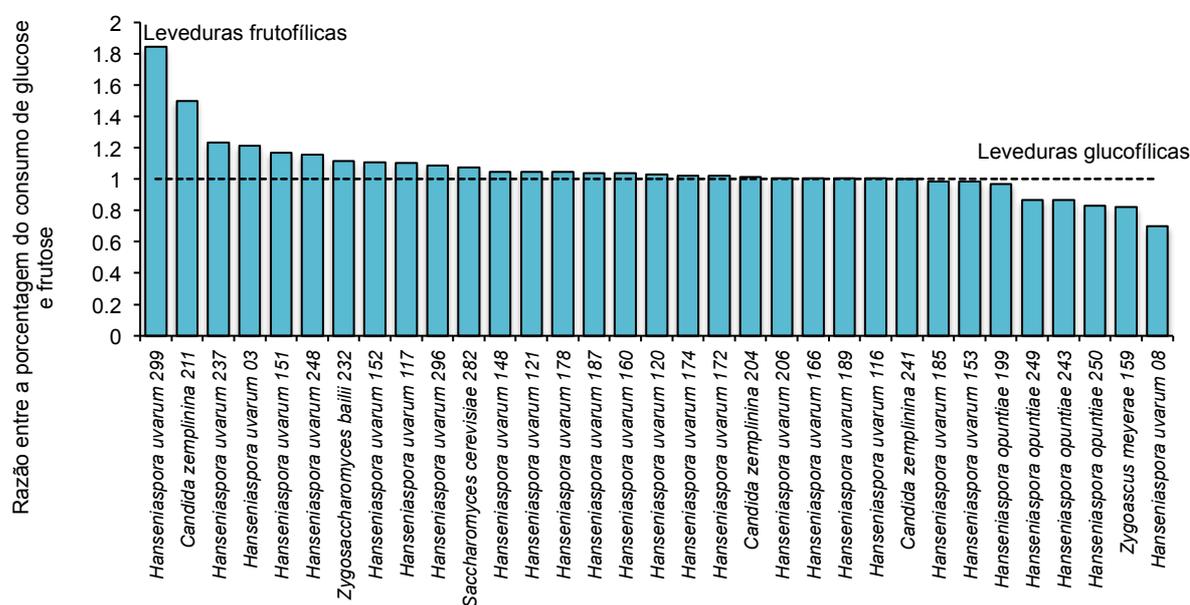
FONTE: O autor (2016).

NOTA: As barras e pontos representam a média e as barras de erro  $\pm 1$  desvio padrão para cada analito. A concentração de açúcares reductores totais consumidos está apresentada em ordem decrescente para as leveduras avaliadas. O \* acima das barras de erro representa ausência de diferença significativa no consumo de açúcares reductores totais e na concentração de frutose residual; o ° acima das barras de erro representa ausência de diferença significativa na concentração de glucose residual (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ ).

Verifica-se na FIGURA 23 que a levedura *Candida zemplinina* 211 apresentou um elevado consumo de açúcares totais, entretanto, a concentração de glucose residual presente ao final da fermentação realizada por esta levedura é significativamente superior (ANOVA,  $P < 0,05$ ) em relação às outras fermentações. As fermentações realizadas pelas leveduras *Hanseniaspora opuntiae* 199 e *Hanseniaspora opuntiae* 249 apresentaram uma concentração de glucose residual significativamente inferior (ANOVA,  $P > 0,05$ ), apesar do consumo de açúcares totais por estas leveduras nas fermentações não ter sido significativamente superior (ANOVA,  $P < 0,05$ ). O consumo de açúcares reductores totais na fermentação realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* 282 foi significativamente superior e os valores de glucose e frutose residuais foram significativamente inferiores, indicando que esta levedura consumiu glucose e frutose na mesma proporção durante a fermentação alcoólica.

Considerando as concentrações iniciais de glicose e frutose no mosto de uva de  $38,23 \pm 8,38 \text{ g.L}^{-1}$  e  $100,01 \pm 20,70 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, e a concentração residual de glicose e frutose no líquido fermentado por cada uma das leveduras após cinco dias de fermentação (FIGURA 23), foi calculada a razão entre as porcentagens de consumo de glicose e frutose para cada uma das leveduras isoladas (FIGURA 24).

FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO DA RAZÃO ENTRE A PORCENTAGEM DO CONSUMO DE GLUCOSE E FRUTOSE DE CADA LEVEDURA ISOLADA PRODUTORA DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



FONTE: O autor (2016).

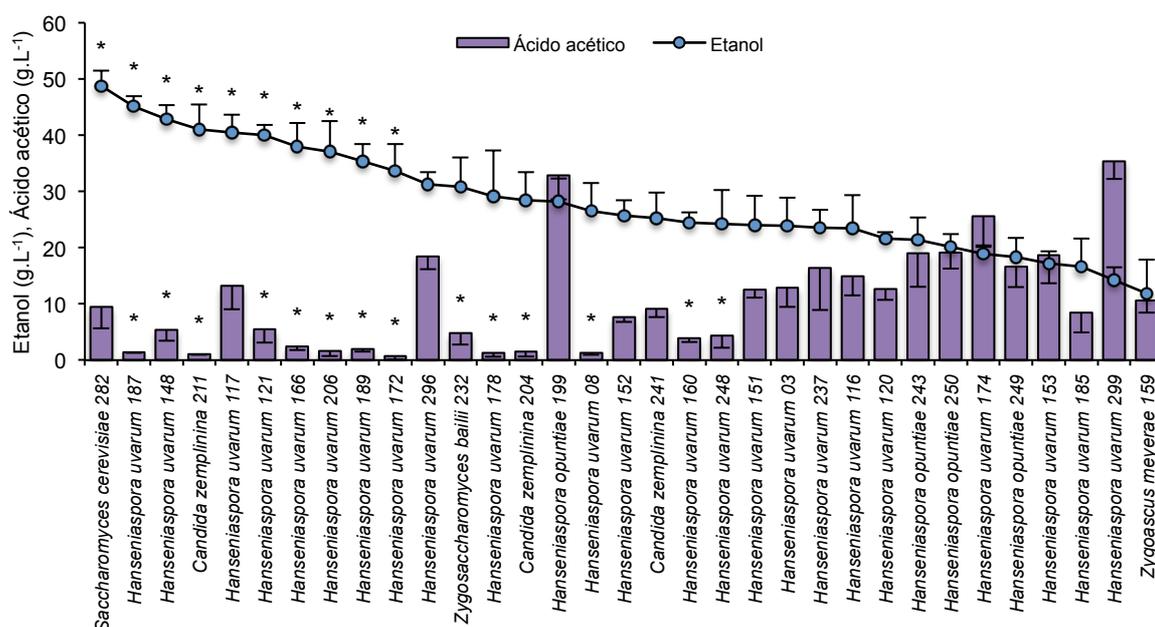
NOTA: A linha tracejada representa o consumo proporcional de glicose e frutose. Barras acima da linha tracejada representam leveduras frutofílicas. Barras abaixo da linha tracejada representam leveduras glucofílicas.

De acordo com os dados mostrados na FIGURA 24, a maioria das leveduras avaliadas, incluindo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* 282, consumiu glicose e frutose na mesma proporção. As leveduras não-*Saccharomyces* *Hanseniaspora uvarum* 299 e *Candida zemplinina* 211 demonstraram preferência pela frutose. A levedura *Candida zemplinina* é conhecida como uma das poucas leveduras frutofílicas de importância enológica (MAGYAR e TÓTH, 2011), entretanto, a maioria das leveduras utilizadas em processos de vinificação são glucofílicas, preferem fermentar glicose à frutose se ambas hexoses estiverem presentes no mosto (MORENO-ARRIBAS e POLO, 2009). Uma vez que a glicose é a fonte de carbono preferencialmente consumida por leveduras, a propriedade glucofílica de algumas

leveduras pode ser explicada em parte pela repressão catabólica e também pelo crescimento diáuxico, uma vez que houve consumo de frutose por todas as leveduras avaliadas (MADIGAN et al., 2010).

Os resultados das concentrações de etanol e ácido acético formados nas fermentações inoculadas com cada uma das leveduras isoladas e selecionadas estão demonstrados na FIGURA 25. As maiores concentrações de etanol foram observadas nas fermentações realizadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e por nove leveduras não-*Saccharomyces* avaliadas, sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ), e as menores concentrações de ácido acético sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ) foram detectadas nos líquidos fermentados de 14 leveduras não-*Saccharomyces*.

FIGURA 25 - CONCENTRAÇÕES DE ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



FONTE: O autor (2016).

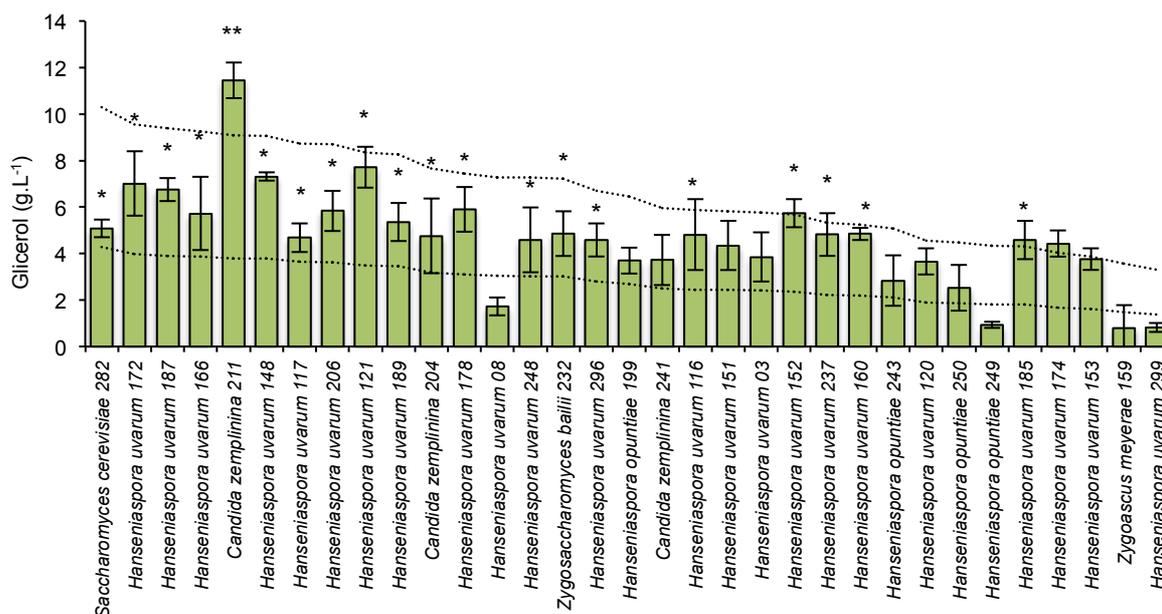
NOTA: As barras representam a média da concentração de ácido acético, pontos azuis representam a média da concentração de etanol e as barras de erro representam  $\pm 1$  desvio padrão para cada analito. A concentração de etanol está representada em ordem decrescente para as leveduras isoladas e selecionadas. O \* acima das barras de erro representa que não há diferença significativa (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ ).

A elevada formação de etanol, sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ) pelas leveduras *Hanseniaspora uvarum* denominadas 187, 148, 117, 121, 166, 206, 189 e 172 (FIGURA 25) está de acordo com estudos que verificaram que

leveduras apiculadas *Hanseniaspora* sp. podem persistir durante a fermentação alcoólica por períodos maiores do que se imaginava, resistir à elevadas concentrações de etanol e produzir etanol em concentrações similares às aquelas produzidas por leveduras industriais *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas em processos de vinificação (MOREIRA et al., 2011; HONG e PARK, 2013).

A FIGURA 26 demonstra a quantidade de glicerol no líquido fermentado de cada fermentação, bem como a sua concentração esperada. As concentrações esperadas de glicerol foram calculadas considerando a concentração de etanol formado nas fermentações realizadas por cada levedura (FIGURA 25), uma vez que são esperados valores entre um quinto a 1/12 do etanol formado em glicerol.

FIGURA 26 - CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



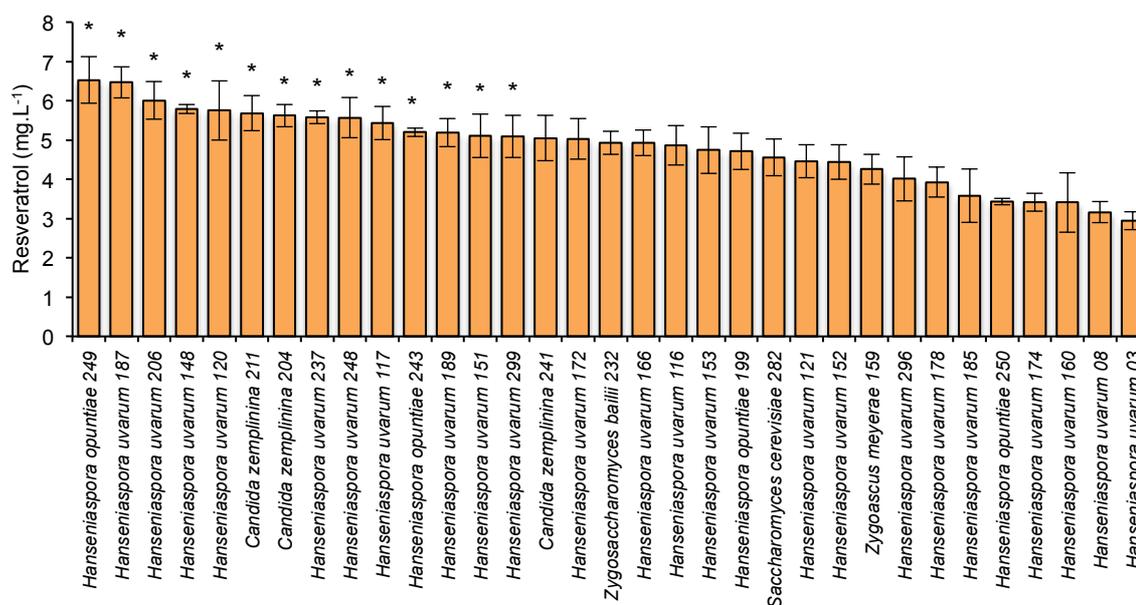
FONTE: O autor (2016).

NOTA: As barras representam a média da concentração de glicerol, as linhas pontilhadas representam a concentração esperada de glicerol (um quinto e 1/12 da concentração de etanol) e as barras de erro representam  $\pm 1$  desvio padrão. A concentração esperada de glicerol está apresentada em ordem decrescente para as leveduras isoladas e selecionadas. O \* acima das barras representa que não há diferença significativa (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ ). O \*\* acima da barra representa concentração significativamente superior de glicerol (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P < 0,05$ ).

A quantidade de glicerol formada pela levedura *Candida zemplinina* 211 foi  $11,45 \pm 0,76 \text{ g.L}^{-1}$ , superior ao esperado, que era de no máximo  $9 \text{ g.L}^{-1}$ , e significativamente superior ( $P < 0,05$ , ANOVA) à concentração de glicerol formada

nas fermentações realizadas pelas outras leveduras avaliadas. À parte aos resultados obtidos para a levedura *Candida zemplinina* 211, as maiores concentrações de glicerol foram observadas em fermentações realizadas por 19 leveduras sem diferença significativa entre eles (ANOVA,  $P > 0,05$ ), e as concentrações determinadas estão dentro da faixa esperada, considerando a formação de etanol nos processos fermentativos realizados por cada levedura. O glicerol é formado principalmente durante a fermentação gliceropirúvica, no início da fermentação alcoólica, nos processos de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Ribéreau-Gayon et al. (2006) que, algumas leveduras não-*Saccharomyces*, particularmente *Candida zemplinina* (previamente identificada como *Candida stellata*) e *Saccharomyces ludwigii* contribuem com elevadas concentrações de glicerol em vinhos. O glicerol, após o etanol, é o principal metabólito formado durante a fermentação de açúcares em etanol, e acrescenta corpo, dulçor e complexidade aos vinhos (LOIRA et al., 2014).

FIGURA 27 - CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) APÓS CINCO DIAS DE FERMENTAÇÃO DE MOSTO DE UVA PELAS LEVEDURAS ISOLADAS PRODUTORAS DA ENZIMA  $\beta$ -GLICOSIDASE



FONTE: O autor (2016).

NOTA: As barras representam a média e barras de erro  $\pm 1$  desvio padrão. A concentração de resveratrol está apresentada em ordem decrescente para as leveduras avaliadas. O \* acima das barras representa ausência de diferença significativa (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ ).

Apesar de estudos demonstrarem que a ação da enzima  $\beta$ -glicosidase de leveduras é inibida em condições de vinificação, principalmente em virtude do alto teor de glucose no mosto de uva, do baixo valor de pH, da baixa oxigenação e do elevado teor de etanol no processo de vinificação (ROSI; VINELLA e DOMIZIO, 1994; VILLENA ARÉVALO et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2007), conforme os resultados apresentados na FIGURA 27, sugere-se que 32 leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* isoladas com ação da enzima  $\beta$ -glicosidase, nas condições de fermentação alcoólica, hidrolisaram o substrato piceid presente no mosto de uva *Vitis labrusca* em resveratrol livre e glucose, e após cinco dias de fermentação, aumentaram a concentração inicial de resveratrol, de  $3,18 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ , em até 102 %. As maiores concentrações finais de resveratrol foram observadas nas fermentações realizadas por 14 leveduras, sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ).

É importante considerar que a levedura autóctone *Saccharomyces cerevisiae* 282 fermentou os açúcares do mosto de uva com conseqüente formação de etanol, o que sugere que a elevada concentração de açúcar inicial, o baixo valor de pH inicial, e a concentração final de etanol (FIGURA 25) não inibiram a reação catalisada pela enzima  $\beta$ -glicosidase produzida por esta levedura, o que resultou em um aumento na concentração de resveratrol após cinco dias de fermentação em 41% (de  $3,18 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $4,55 \pm 0,46 \text{ mg.L}^{-1}$ ), como demonstrado na FIGURA 26.

A atividade  $\beta$ -glicosidásica em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* já foi anteriormente encontrada em poucas leveduras, e quando presente esta atividade é muito baixa e facilmente inibida por concentrações elevadas de glucose e/ou etanol, anaerobiose e por dióxido de enxofre (CORDERO OTERO et al., 2003; VILLENA; IRANZO e PÉREZ, 2007). A atividade  $\beta$ -glicosidásica de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* diminuiu em 25% quando avaliada anaerobicamente em suco de uva (HERNÁNDEZ et al., 2003) e a máxima atividade  $\beta$ -glicosidásica para três leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em suco de uva foi observada durante a fase de crescimento exponencial das células (após 24 horas de fermentação), e tornou-se ausente após 48 horas, quando o valor de pH da fermentação era três (FIA; GIOVANI e ROSI, 2005). Já foi descrito que a atividade  $\beta$ -glicosidásica para algumas leveduras pode ser aumentada pela presença de etanol (ROSI; VINELLA e DOMIZIO, 1994).

As diferentes concentrações de resveratrol final determinadas nas fermentações realizadas por leveduras não-*Saccharomyces* da mesma espécie pode ser verificada comparando-se os resultados obtidos nas fermentações inoculadas com as leveduras da espécie *Hanseniaspora opuntiae*. As quatro leveduras *Hanseniaspora opuntiae* aumentaram a concentração de resveratrol após cinco dias de fermentação alcoólica, mas em níveis distintos: as leveduras *Hanseniaspora opuntiae* 249 e 243 aumentaram a concentração de resveratrol para um valor final médio de 5,76 mg.L<sup>-1</sup>, a levedura *Hanseniaspora opuntiae* 199 para um valor final médio de 4,71 mg.L<sup>-1</sup> e a levedura *Hanseniaspora opuntiae* 250 para 3,42 mg.L<sup>-1</sup> de resveratrol. As médias do valor de resveratrol final obtido foram significativamente diferentes entre elas (ANOVA, P < 0,05).

As leveduras da espécie *Hanseniaspora uvarum* também apresentaram diferenças para os valores médios da concentração final de resveratrol: a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 aumentou a concentração de resveratrol para um valor médio de 6,53 mg.L<sup>-1</sup> e a levedura *Hanseniaspora uvarum* 03 manteve a concentração de resveratrol inicial, indicando que provavelmente a enzima β-glicosidase desta única levedura, dentre as avaliadas, foi inativada pelas condições da fermentação alcoólica.

A concentração de resveratrol e dos metabólitos de importância enológica formados durante a fermentação alcoólica realizada individualmente com cada uma das 32 leveduras isoladas e produtoras da enzima β-glicosidase foram analisados por correlação linear de Pearson. Uma correlação significativa foi verificada quando foi comparado consumo de açúcares com formação de etanol, glicerol e ácido acético, conforme esperado. Da mesma forma, os resultados mostraram que existe uma correlação (27%) significativa (P = 0,006) quando comparada a formação de etanol com o aumento da concentração de resveratrol nas fermentações.

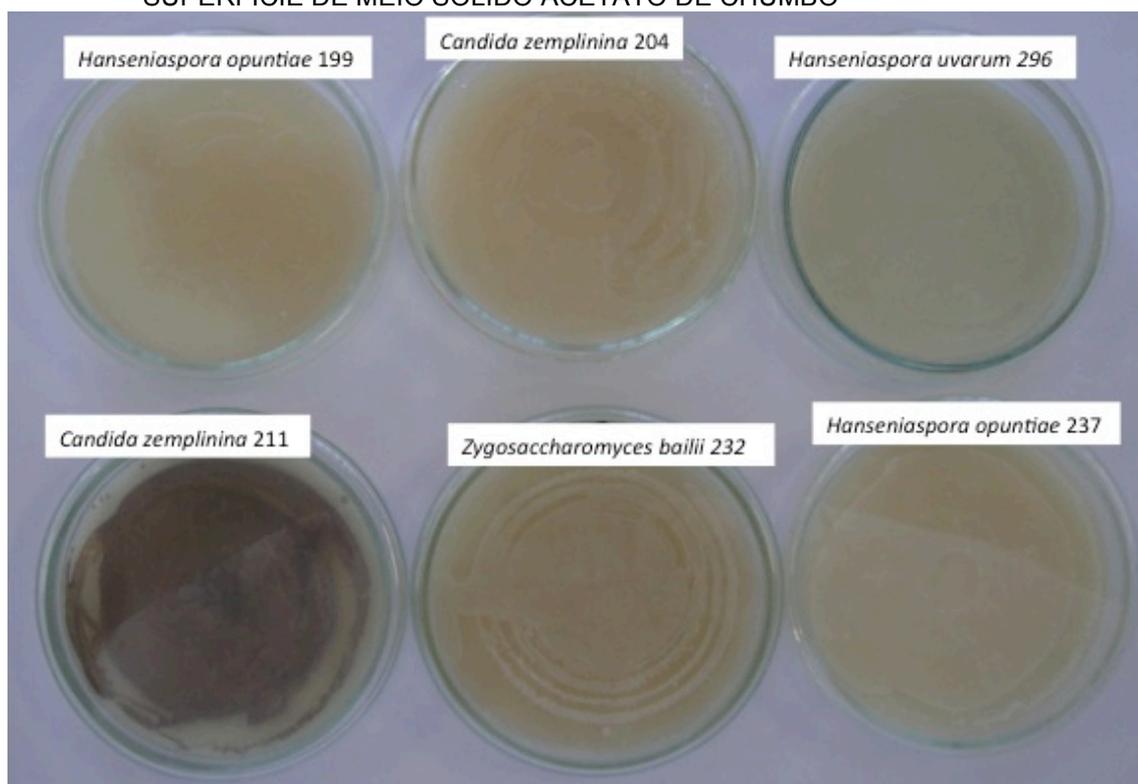
A comparação de leveduras autóctones não-*Saccharomyces* do estado do Paraná, avaliadas nas mesmas condições fermentativas, revelou tanto benefícios enológicos (formação de etanol e glicerol) quanto efeitos prejudiciais (alto teor de açúcar residual, elevada formação de ácido acético). Segundo dados de literatura, leveduras vínicas não-*Saccharomyces* têm revelado tanto características positivas quanto negativas em fermentação (FLEET, 2008; COMITINI et al., 2011).

A produção de vinhos empregando leveduras que excretam sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) produzem vinhos defeituosos (FLEET, 2003) pois o H<sub>2</sub>S contribui

com odores desagradáveis e nauseantes (JACKSON, 2008c). Como leveduras podem formar  $H_2S$ , todas as leveduras isoladas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase também foram avaliadas quanto à capacidade de produção de  $H_2S$ , para prevenir quaisquer consequências não desejadas.

A levedura *Candida zemplinina* 211 foi a única levedura dentre as 33 leveduras selecionadas que desenvolveu coloração escura em meio acetato de chumbo, indicando a formação de  $H_2S$ , conforme ilustrado na FIGURA 28. Portanto, apesar da elevada formação de glicerol, uma característica desejada em leveduras empregadas em processos de vinificação, a levedura *Candida zemplinina* 211 não se mostrou adequada para ser empregada em processos de vinificação.

FIGURA 28 - LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* *Hanseniaspora opuntiae* 199, *Candida zemplinina* 204, *Hanseniaspora uvarum* 296, *Candida zemplinina* 211, *Zygosaccharomyces baillii* 232 E *Hanseniaspora opuntiae* 237 CRESCIDAS NA TEMPERATURA DE 28 °C NA SUPERFÍCIE DE MEIO SÓLIDO ACETATO DE CHUMBO



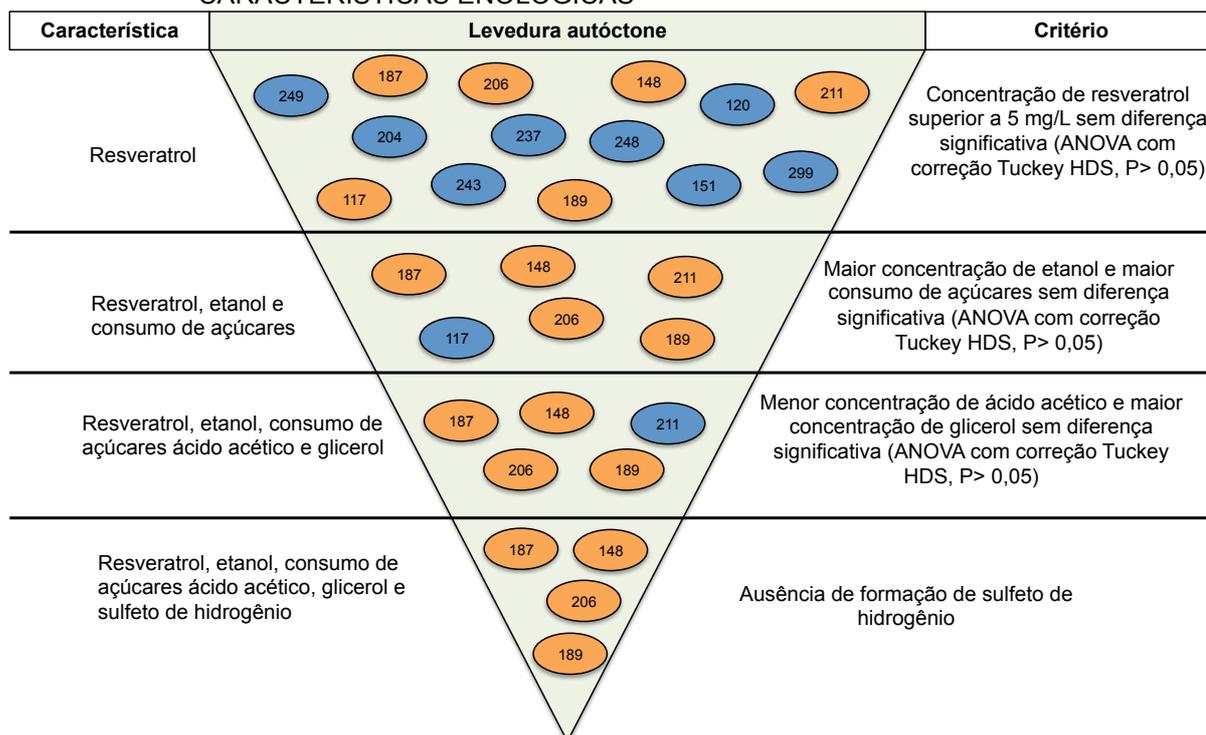
FONTE: O autor (2016).

NOTA: O desenvolvimento de coloração marrom escura no meio de cultivo indica leveduras que formam sulfeto de hidrogênio.

De acordo com Neto e Mendes-Ferreira (2005) a quantidade de  $H_2S$  produzida durante a vinificação é influenciada pela levedura utilizada e pelas condições do mosto, e usualmente leveduras não-*Saccharomyces* produzem mais  $H_2S$  comparativamente à leveduras *Saccharomyces* sp., desta forma, é importante a

determinação prévia do potencial de produção de H<sub>2</sub>S pelas leveduras antes da sua inoculação em mosto de uva e do uso de leveduras não produtoras em processos de vinificação industriais.

FIGURA 29 - ESQUEMA DA SELEÇÃO DAS LEVEDURAS AUTÓCTONES DO ESTADO DO PARANÁ ISOLADAS COM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE RESVERATROL E CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS



FONTE: O autor (2016).

NOTA: O número dentro de cada círculo indica a identificação da levedura selecionada: 117: *Hanseniaspora uvarum* 117, 120: *Hanseniaspora uvarum* 120, 148: *Hanseniaspora uvarum* 148, 151: *Hanseniaspora uvarum* 151, 187: *Hanseniaspora uvarum* 187, 189: *Hanseniaspora uvarum* 189, 204: *Candida zemplinina* 204, 206: *Hanseniaspora uvarum* 206, 211: *Candida zemplinina* 211, 237: *Hanseniaspora opuntiae* 237, 243: *Hanseniaspora opuntiae* 243, 248: *Hanseniaspora uvarum* 248, 249: *Hanseniaspora opuntiae* 249, e 299: *Hanseniaspora uvarum* 299. Círculo alaranjado indica que a levedura atende o critério estabelecido.

Para selecionar uma levedura visando o aumento da concentração de resveratrol em vinhos, tanto a ação da enzima  $\beta$ -glicosidase quanto características metabólicas fermentativas adequadas devem ser consideradas na levedura. Conforme esquema representado na FIGURA 29, das 33 leveduras que hidrolisaram piceid, 14 leveduras aumentaram a concentração inicial de resveratrol em mosto de uvas *Vitis labrusca* para valores em torno de 5,64 mg.L<sup>-1</sup> sem diferença significativa (ANOVA, P > 0,05). Destas, um total de seis leveduras autóctones foram capazes de aumentar a concentração de resveratrol e consumir açúcares e formar etanol; destas

seis, cinco leveduras produziram baixas concentrações de ácido acético e altas concentrações de glicerol, e destas cinco, quatro leveduras não formaram sulfeto de hidrogênio.

Considerando-se o aumento da concentração de resveratrol após cinco dias de fermentação bem como os metabólitos de importância enológica, as leveduras *Hanseniaspora uvarum* 148, *Hanseniaspora uvarum* 187, *Hanseniaspora uvarum* 189 e *Hanseniaspora uvarum* 206 demonstraram um metabolismo fermentativo mais adequado à enologia sem diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ) entre elas.

Apesar de desejado e esperado que uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* realize a fermentação alcoólica, leveduras vínicas não-*Saccharomyces* estão adaptadas ao ambiente específico da uva (JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006) e evidências experimentais enfatizam o papel positivo que leveduras não-*Saccharomyces* podem ter para a composição do vinho, com consequente consideração do papel que estas podem desempenhar em processos de vinificação (FERNÁNDEZ; ÚBEDA e BRIONES, 2000; CIANI et al., 2010; COMITINI et al., 2011).

## 5.6 COMPARAÇÃO DE FERMENTAÇÕES UTILIZANDO LEVEDURA AUTÓCTONE *Hanseniaspora uvarum* E LEVEDURA VÍNICA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae*

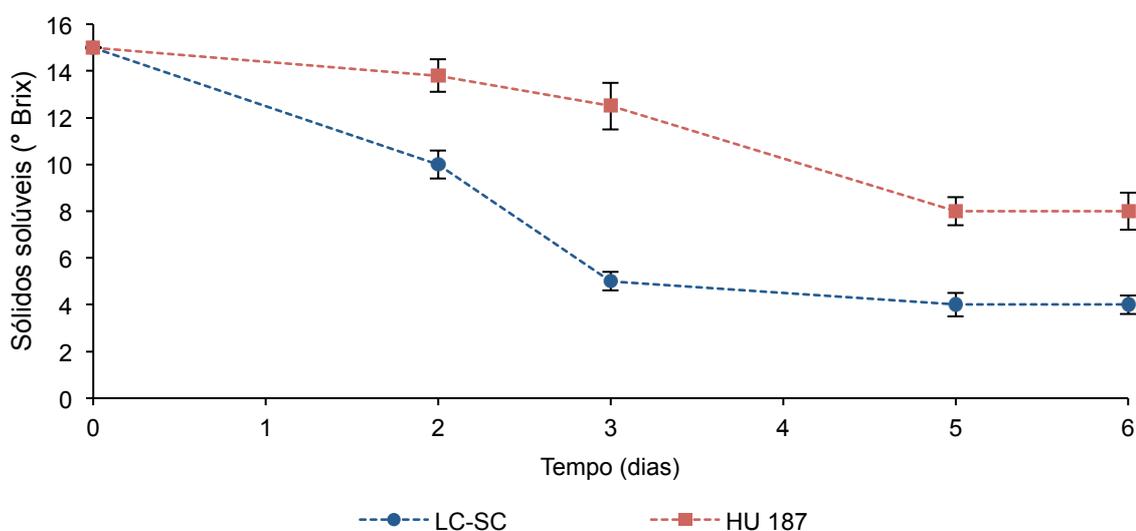
A levedura autóctone *Hanseniaspora uvarum* 187 foi escolhida arbitrariamente dentre as quatro leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase que aumentaram o teor de resveratrol e apresentaram características enológicas (FIGURA 29) para ser utilizada em fermentações com mosto de uva *Vitis labrusca* do estado do Paraná. Concomitantemente às fermentações com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187, foram realizadas fermentações empregando a levedura vínica comercial *Saccharomyces cerevisiae*, que já é utilizada em processos industriais de vinificação por vinicultores paranaenses, visando a comparação das fermentações.

Os mostos foram inoculadas com as leveduras *Hanseniaspora uvarum* 187 e *Saccharomyces cerevisiae*. O mosto de uva com cascas, sulfitado, foi empregado, uma vez que em processos de vinificação em tinto a fermentação alcoólica ocorre na presença das cascas. Os mostos foram inoculadas com concentração inicial de

$1,3 \times 10^7$  células.g<sup>-1</sup> de uva para cada levedura, sendo que esta relação equivale à recomendação do fabricante da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, ou seja, 20 g de levedura seca a cada 100 Kg de uva. Em cada fermentação, após a inoculação, foram coletadas amostras a cada dia e determinada a densidade, com os resultados apresentados em valores de sólidos solúveis, a 20 °C.

Conforme os resultados apresentados na FIGURA 30, as fermentações inoculadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 e com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram os valores de sólidos solúveis de 15 °Brix, a 20 °C, no tempo inicial, e os valores de sólidos solúveis permaneceram constantes, em torno de 8 °Brix e 4 °Brix, a 20 °C, respectivamente, a partir do quinto dia da fermentação.

FIGURA 30 - VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) EM FERMENTAÇÕES INICIADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) E A LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187) COM  $10^7$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

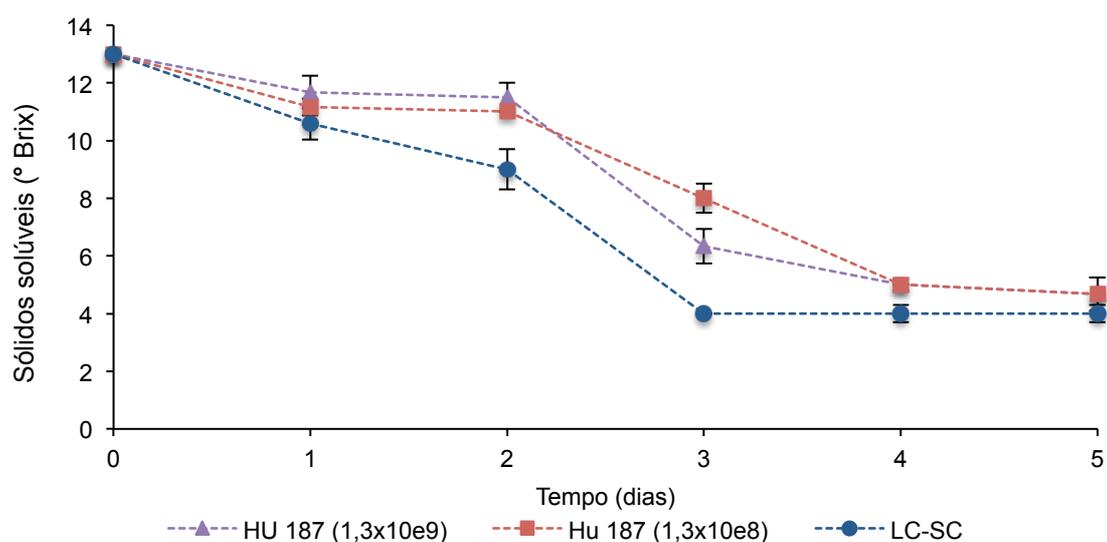
Nas fermentações realizadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 e com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* houve formação de espuma na superfície do mosto. O início do desprendimento de gás carbônico ocorreu no terceiro e no segundo dia, respectivamente, indicando o início da fase tumultuosa da fermentação alcoólica.

Segundo Walter (1953) e Stabnikova *et al.* (2008), a capacidade fermentativa das leveduras é definida como o grau em que uma levedura consegue

decompor uma quantidade conhecida de açúcar em um determinado tempo, sendo esta capacidade fermentativa determinada pela detecção do gás carbônico produzido. Portanto, a diminuição dos valores de sólidos solúveis durante o tempo de fermentação, conforme demonstrado na FIGURA 30, e o desprendimento de gás carbônico visualizado, sugerem que a capacidade fermentativa da levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 é inferior à capacidade fermentativa da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, conforme relatado por Jolly, Augustyn e Pretorius (2006), que leveduras não-*Saccharomyces* podem ser benéficas à vinificação e que estas leveduras possuem baixo poder fermentativo.

Sabe-se que para garantir em condições econômicas a fermentação de um dado volume de mosto, deve-se determinar um volume de suspensão de micro-organismo de concentração adequada para iniciar os processos fermentativos (CARVALHO e SATO, 2001). Desta forma, foi verificado se fermentações realizadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 com concentração inicial de células aumentada poderia seguir um perfil de diminuição de sólidos solúveis similar às fermentações realizadas com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* iniciadas com concentração de  $1,3 \times 10^7$  células.g<sup>-1</sup> de uva.

FIGURA 31 - VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) INICIADAS COM  $10^7$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA E COM A LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187) INICIADAS COM  $10^8$  E  $10^9$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

Nas fermentações utilizando o mosto de uva com valores iniciais de sólidos solúveis de 13 °Brix, a 20 °C, e iniciadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 nas concentrações de  $1,3 \times 10^8$  células.g<sup>-1</sup> de uva e  $1,3 \times 10^9$  células.g<sup>-1</sup> de uva, ocorreu a diminuição da densidade do mosto até o quarto dia para um valor de sólidos solúveis de 5 °Brix, a 20 °C, estando este valor próximo ao valor de sólidos solúveis determinado na fermentação realizada com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, que foi de 4 °Brix, a 20 °C, a partir do terceiro dia.

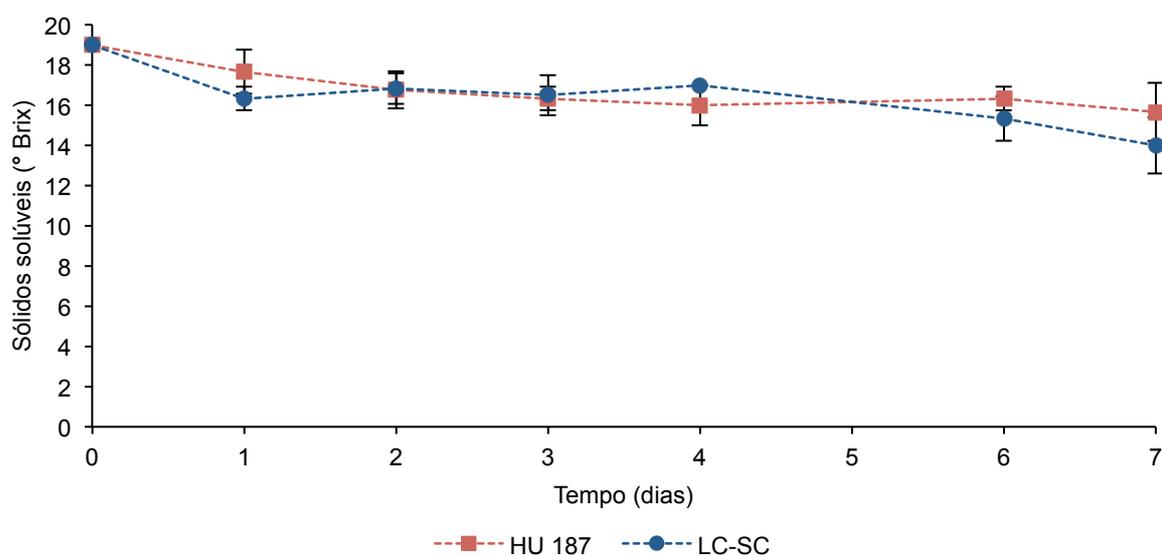
A elevada concentração de células de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas. Como consequência, resulta em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade das células da levedura (LIMA; BASSO e AMORIM, 2001). Considerando os dados de literatura e os resultados obtidos nas fermentações para as duas concentrações de inóculo, foi estabelecida a concentração inicial de  $1,3 \times 10^8$  células.g<sup>-1</sup> de uva para a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 para ser empregada em todas as fermentações.

As uvas *Vitis labrusca* cultivadas no estado do Paraná utilizadas em processos de vinificação usualmente apresentam valores iniciais de sólidos solúveis em torno de 14 °Brix (DORNELES et al., 2005), portanto, os vinicultores necessitam adicionar açúcar de cana-de-açúcar ao mosto de uva – procedimento este denominado de chaptalização – conforme a Lei n° 7.678 de 8 de novembro de 1988, de forma a garantir vinhos com teor de etanol adequado à legislação vigente, conforme a Portaria n° 374 de 27 de novembro de 2014, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Rizzon e Miele (2006) demonstraram para um mosto de uvas *Vitis labrusca* da Serra Gaúcha, no Rio Grande do Sul, o valor de sólidos solúveis de 17,2 °Brix; um valor de sólidos solúveis de 22,5 °Brix foi medido em mosto de uva *Vitis labrusca* na Argentina (COMBINA et al., 2005), e valor de sólidos solúveis de 15,5 °Brix foi mensurado em mosto de uvas com 60% de uvas *Vitis labrusca* e 40% de uvas *Vitis vinifera* na Coréia (LEE et al., 2006). As diferenças observadas entre os valores de densidade não estão somente relacionados com as cultivares difundidas em cada região. Dependem também das condições climáticas no período de maturação da uva, sendo que maior precipitação pluviométrica e menor luminosidade contribuem para uvas com valores mais baixos de açúcares, e conseqüentemente, menores valores de °Brix (RIZZON e MIELE, 2006).

Para verificar o efeito da adição de sacarose no mosto de uva com cascas sulfitado, aumentando a densidade inicial do mosto para um valor de sólidos solúveis de aproximadamente 20° Brix, foram realizadas fermentações em mosto de uva chaptalizado utilizando a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 com concentração inicial de  $1,3 \times 10^8$  células.g<sup>-1</sup> de uva e a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* com concentração inicial de  $1,3 \times 10^7$  células.g<sup>-1</sup> de uva, e os resultados referentes à determinação diária do valor de sólidos solúveis estão demonstrados na FIGURA 32.

FIGURA 32 - VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) COM  $10^7$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA E INICIADAS COM A LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187) COM  $10^8$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

Verificou-se que nas fermentações realizadas com mosto chaptalizado, a densidade permaneceu praticamente constante no período de um a quatro dias, como teor de sólidos solúveis em valores em torno de 17 °Brix, a 20 °C. Os dados apresentados na FIGURA 32 sugerem que a quantidade inicial de sólidos solúveis de 19 °Brix provavelmente inibiu o metabolismo respiratório das leveduras, não permitindo que estas se multiplicassem no mosto.

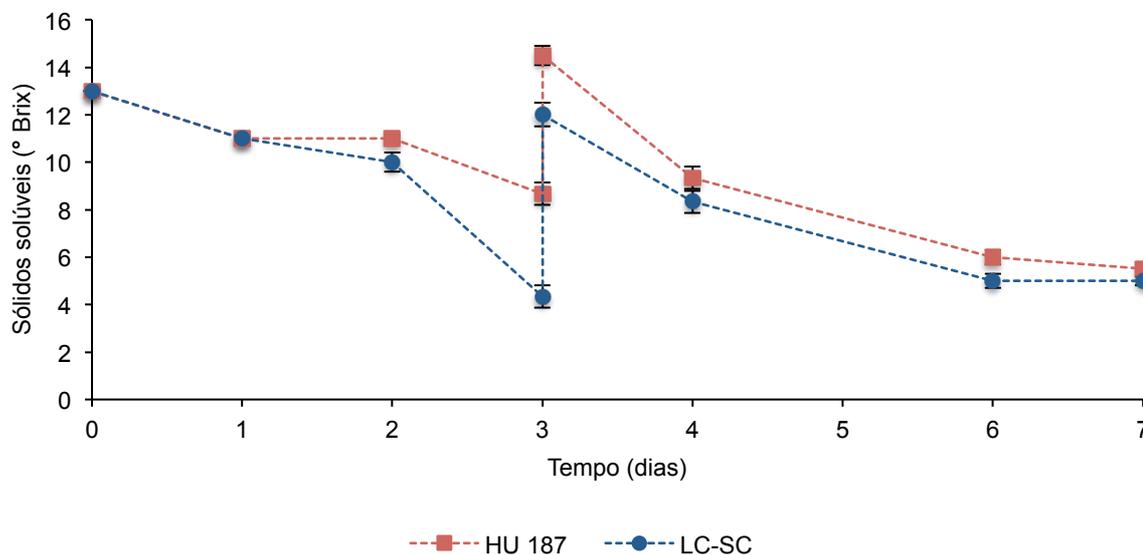
Um tempo superior à 48 horas em que a densidade do mosto não se altera confirma uma parada ou uma estagnação no processo fermentativo. O risco de deterioração microbiana é o principal problema de uma parada de fermentação, pois

no momento em que se observa uma inércia fermentativa por parte das leveduras, bactérias podem atuar e causar as mais variadas alterações no processo. As bactérias lácticas podem se estabelecer no mosto fermentativo exclusivamente transformando o ácido málico em ácido láctico, na fermentação malolática. Se o metabolismo das leveduras não persistir até o consumo total dos açúcares presentes no mosto, as bactérias se multiplicam, e nesta situação, a acidez volátil pode aumentar rapidamente pela formação de ácido acético a partir da glucose, chegando à níveis inaceitáveis. Muitos fatores podem levar à uma parada de fermentação, dentre eles: temperaturas excessivas no início da fermentação, falta de controle de temperatura durante o processo, baixo teor de oxigênio dissolvido e concentrações elevadas de açúcares no mosto (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Em decorrência da paralisação das fermentações (FIGURA 32) provavelmente devido à elevada densidade inicial do mosto em virtude da adição de açúcares antes da inoculação das leveduras, também foram realizadas fermentações chaptalizando o líquido fermentado, 72 horas após inoculação de cada levedura. As fermentações foram iniciadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* com  $1,3 \times 10^8$  células.g<sup>-1</sup> de uva, e com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de  $1,3 \times 10^7$  células.g<sup>-1</sup> de uva, e antes do início do metabolismo fermentativo das leveduras, verificado visualmente pelo aparecimento de espuma, foi realizada a chaptalização para obter o valor de sólidos solúveis finais de 20 °Brix, considerando o °Brix inicial do mosto.

Verifica-se pelos resultados apresentados na FIGURA 33 que as fermentações iniciadas com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* após três dias tinham valores de sólidos solúveis de 4 °Brix, a 20 °C, corroborando com os resultados apresentado na FIGURA 31. A levedura autóctone *Hanseniaspora uvarum* 187 diminuiu a concentração dos sólidos solúveis até valores próximos aos determinados na fermentação iniciada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em valores em torno de 5,5 °Brix.

FIGURA 33 - VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) COM  $10^7$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA E INICIADAS COM A LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187) COM  $10^8$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO



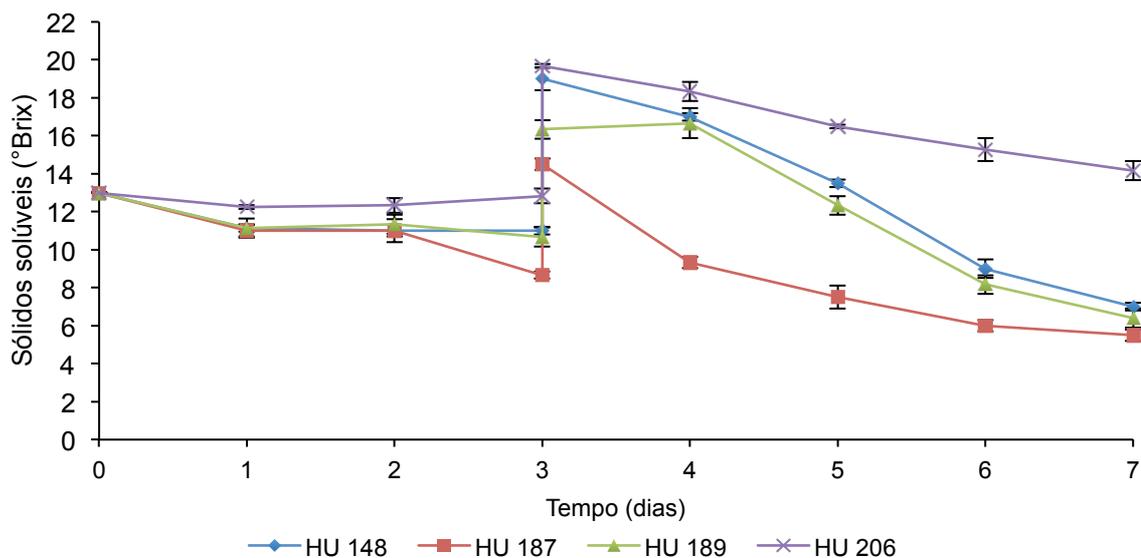
FONTE: O autor (2016).

Considerando os dados apresentados nas FIGURAS 32 e 33, tanto para a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 quanto para a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de evitar a ocorrência de paradas de fermentações, o procedimento de chaptalização do mosto de uvas *Vitis labrusca* deve ser realizado no início do metabolismo fermentativo da levedura inoculada nos processos de vinificação. Estes resultados também podem ser transmitidos para os produtores paranaenses, por intermédio do Programa de Extensão, desejando contribuir com a melhoria dos processos de vinificação, uma vez que o procedimento de chaptalização normalmente é realizado no início do processo.

A partir dos resultados obtidos nas fermentações inoculadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187, a concentração de inóculo de  $1,3 \times 10^8$  células.g<sup>-1</sup> de uva e o procedimento de chaptalização do mosto de uva com cascas sulfitado após 72 horas da inoculação foram empregados em todas as fermentações realizadas com monocultura (inóculo simples) das leveduras autóctones isoladas e selecionadas *Hanseniaspora uvarum* 148, *Hanseniaspora uvarum* 187, *Hanseniaspora uvarum* 189 e *Hanseniaspora uvarum* 206 (FIGURA 29). Nas fermentações realizadas, foram medidos os teores de sólidos solúveis a cada dia, conforme exposto na FIGURA 34, e determinadas as concentrações de resveratrol,

glucose residual, frutose residual, glicerol, ácido acético e etanol no término da fermentação alcoólica, e os resultados estão apresentados na FIGURA 35.

FIGURA 34 - VALOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADOS COM AS LEVEDURAS *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) E *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206) COM  $10^8$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO



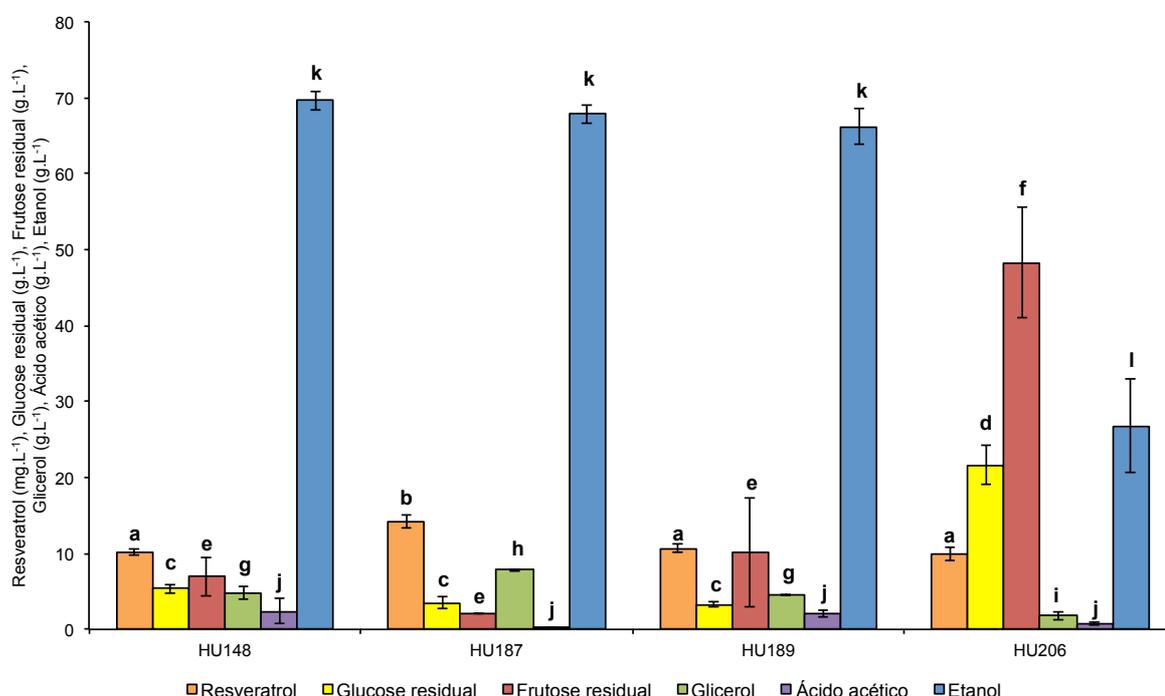
FONTE: O autor (2016).

Os valores de densidade expostos na FIGURA 34 demonstram que, comparativamente às leveduras *Hanseniaspora uvarum* 148, *Hanseniaspora uvarum* 189 e *Hanseniaspora uvarum* 206, a fermentação empregando a monocultura da levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 apresentou maior diminuição do valor de sólidos solúveis durante o período da fermentação, permanecendo constante em aproximadamente 6 °Brix.

Observa-se pelos resultados exibidos na FIGURA 35 que não houve diferença significativa nas concentrações de resveratrol, glucose residual, frutose residual, glicerol, ácido acético e etanol quantificadas no término das fermentações inoculadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 148 e com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 189. No entanto, nas fermentações inoculadas com a monocultura da levedura *Hanseniaspora uvarum* 206 foram detectadas as menores formações de etanol (ANOVA, P = 0,0002) e glicerol (ANOVA, P = 0,002) e maiores concentrações de glucose e frutose residual (ANOVA, P = 0,0005) entre as quatro leveduras não-*Saccharomyces* avaliadas. Nas fermentações inoculadas com a

levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 foram conseguidas no término da fermentação alcoólica as maiores concentrações de resveratrol, de  $14,17 \pm 0,80 \text{ mg.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,004$ ), e de glicerol, de  $8,81 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,002$ ), em comparação às concentrações de resveratrol e glicerol obtidas nas fermentações inoculadas com as leveduras *Hanseniaspora uvarum* 148, 189 e 206.

FIGURA 35 - CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA *Vitis labrusca* INOCULADO COM AS LEVEDURAS *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206)



FONTE: O autor (2016).

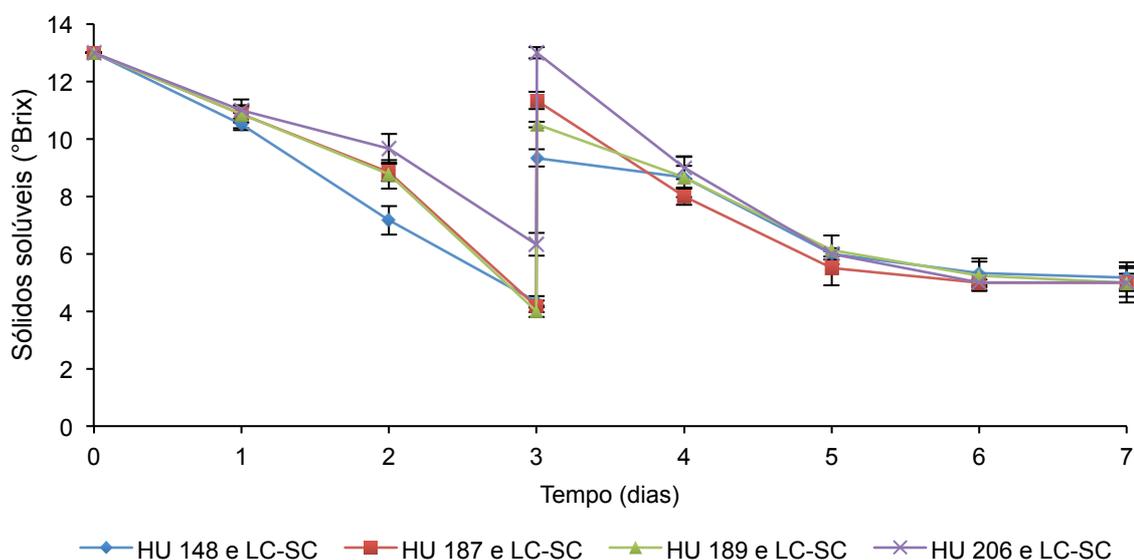
NOTA: As barras representam a média das concentrações dos analitos e as barras de erro representam  $\pm 1$  desvio padrão para cada analito. Resultados referentes às concentrações dos analitos classificados com letras distintas são diferentes entre si (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ )

A concentração de glicerol determinada nas fermentações alcoólicas realizadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 está de acordo com o relatado por Ribéreau-Gayon et al. (2006), onde afirmam que as leveduras vnicas apresentam formação de glicerol distintas, variando de  $4,20 \text{ g.L}^{-1}$  a  $10,40 \text{ g.L}^{-1}$ . O glicerol é um dos compostos encontrados no vinho, e contribui diretamente com o sabor adocicado (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

As leveduras *Hanseniaspora uvarum* 148, *Hanseniaspora uvarum* 187, *Hanseniaspora uvarum* 189 e *Hanseniaspora uvarum* 206 conseguiram aumentar a concentração de resveratrol em fermentações utilizando mosto de uva conforme o utilizado em processos de vinificação pelos vinicultores do estado do Paraná. Considerando que em processos de vinificação as leveduras *Saccharomyces* sp. são as principais responsáveis pela fermentação alcoólica, foram realizadas fermentações com inóculo misto, ou co-cultura, utilizando mosto de uvas com casca sulfitado, chaptalizado após 72 horas da adição do inóculo. O inóculo misto utilizado nas fermentações foi constituído por uma concentração de  $1,3 \times 10^8$  células.g<sup>-1</sup> de uva de uma das leveduras autóctones *Hanseniaspora uvarum* e de uma concentração de  $1,3 \times 10^7$  células.g<sup>-1</sup> de uva da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados das fermentações com inóculo misto em relação aos sólidos solúveis medidos a cada dia estão ilustrados na FIGURA 36. Os valores mensurados de resveratrol, glucose residual, frutose residual, glicerol, ácido acético e etanol no término das fermentações inoculadas no início (tempo zero) com inóculo misto formado por células de cada uma das leveduras autóctones *Hanseniaspora uvarum* somado com células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* estão dispostos na FIGURA 37.

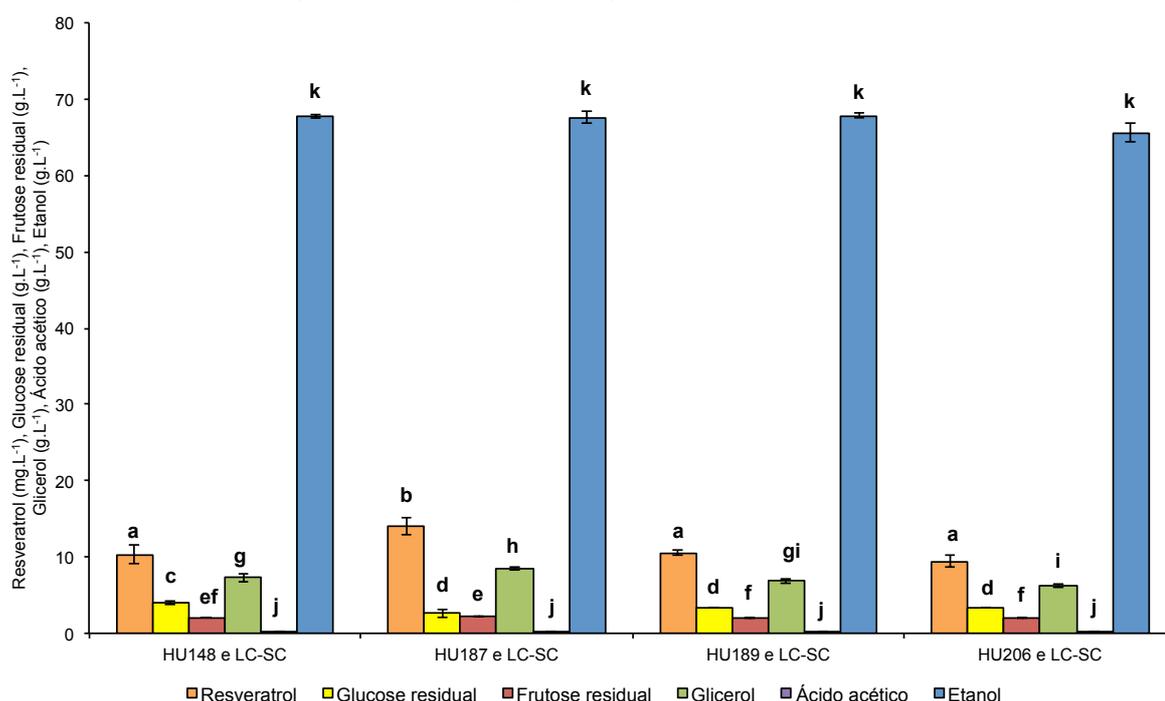
FIGURA 36 - TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS (°Brix) NAS FERMENTAÇÕES INICIADOS COM AS LEVEDURAS *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206) COM  $10^8$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA EM CONJUNTO COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) COM  $10^7$  CÉLULAS.g<sup>-1</sup> DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

Os valores representados na FIGURA 36 mostram que, em todas as fermentações realizadas com inóculo misto, com células de uma levedura *Hanseniaspora uvarum* somados às células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, ocorreu a diminuição do teor de sólidos solúveis até valores de 5 °Brix, no quinto dia. Comparando-se os dados ilustrados nas FIGURAS 33 e 35, em que foi utilizado inóculo simples (monocultura) e inóculo misto, respectivamente, verifica-se que o inóculo misto resultou na diminuição do teor de sólidos solúveis nas fermentações com as leveduras *Hanseniaspora uvarum* 148, *Hanseniaspora uvarum* 189 e *Hanseniaspora uvarum* 206.

FIGURA 37 - CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA *Vitis labrusca* INOCULADO NO INÍCIO COM INÓCULO MISTO DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) E DE CADA LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum*: *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206)



FONTE: O autor (2016).

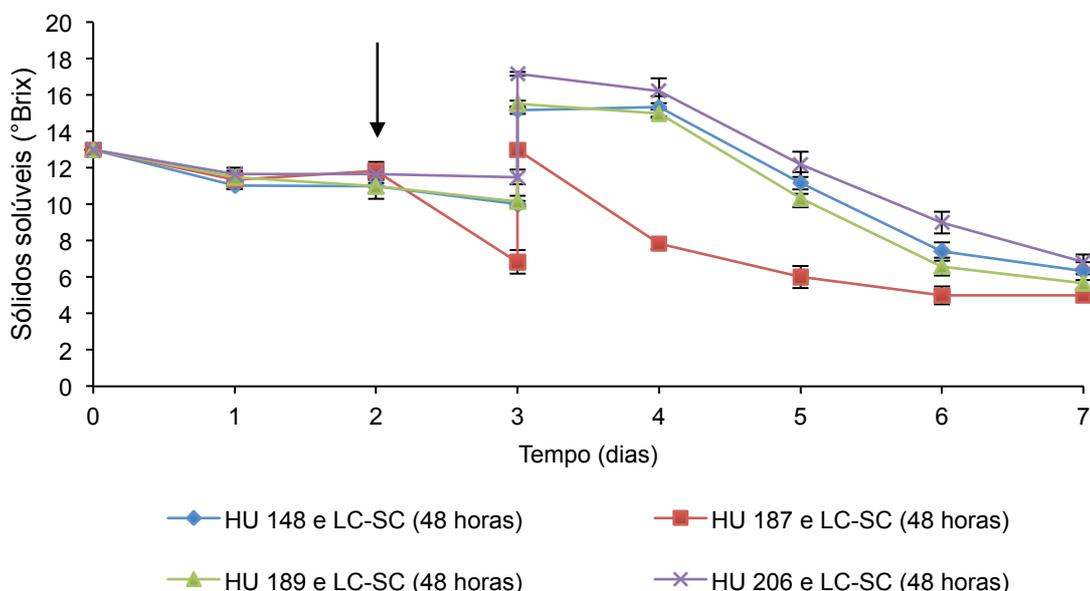
NOTA: As barras representam a média das concentrações dos analitos e as barras de erro representam  $\pm 1$  desvio padrão para cada analito. Resultados referentes às concentrações dos analitos classificados com letras distintas são diferentes entre si (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ ).

Percebe-se pelos resultados apresentados na FIGURA 37 que as concentrações de etanol, em torno de  $66 \text{ g.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,06$ ) e de ácido

acético, em torno de  $0,16 \text{ g.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,77$ ), determinadas em todas as fermentações foram semelhantes, e que as formações de resveratrol e glicerol foram superiores, com valores de  $14,07 \pm 1,17 \text{ mg.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,02$ ) e de  $8,53 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,01$ ), respectivamente, nas fermentações realizadas com inóculo misto de células das leveduras *Hanseniaspora uvarum* 187 e *Saccharomyces cerevisiae* em relação às demais fermentações.

Também foram realizadas fermentações com inóculo misto sequencial em que a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* foi adicionada 48 horas após a inoculação da levedura *Hanseniaspora uvarum*. Os dados em relação ao teor de sólidos solúveis das fermentações com inóculo misto sequencial estão demonstrados na FIGURA 38, e os resultados das concentrações de resveratrol, glucose residual, frutose residual, glicerol, ácido acético e etanol determinados no final da fermentação, representados na FIGURA 39.

FIGURA 38 - VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) NAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) INICIADO COM  $10^7$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA APÓS 48 HORAS DA INOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206) INICIADAS COM  $10^8$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) DE FERMENTAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

NOTA: A seta representa o tempo da inoculação da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de  $10^7$  células. $\text{g}^{-1}$  de uva.

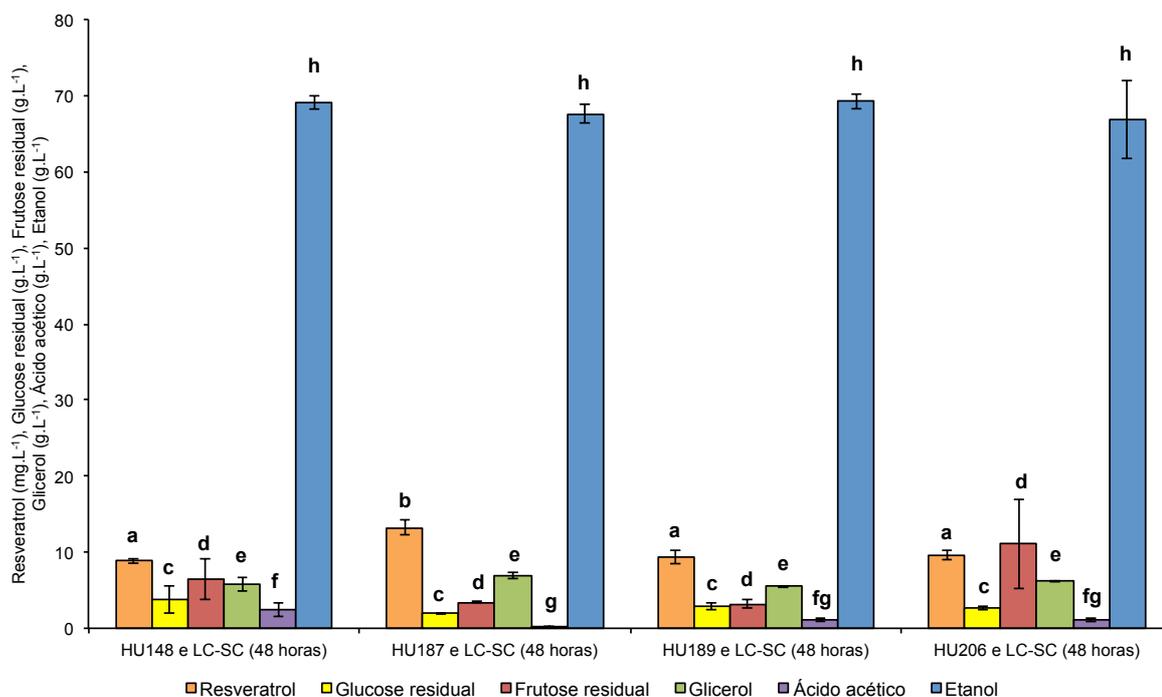
Conforme os dados presentes na FIGURA 38, nas fermentações com inóculo misto sequencial verifica-se, em comparação com as fermentações com inóculo misto (FIGURA 36), que em todas as fermentações inoculadas primeiramente com a levedura *Hanseniaspora uvarum* e posteriormente com a levedura comercial não foi verificado um favorecimento na diminuição do teor de sólidos solúveis, pois valores em torno de 5 °Brix foram observados somente no sétimo dia das fermentações, enquanto que nas fermentações empregando inóculo misto, este valor foi encontrado no quinto dia.

Comparando as FIGURAS 36 e 38, onde estão demonstrados os dados referentes ao teor de sólidos solúveis nas fermentações com inoculação mista e inoculação mista sequencial, respectivamente, percebe-se que os resultados demonstrados estão de acordo com Loira et al. (2015) que relatam diferenças entre fermentações quando utiliza-se inoculação mista sequencial. Os autores propõem que a inoculação mista sequencial permite a expressão de particularidades metabólicas de leveduras não-*Saccharomyces* e que a inoculação mista resulta em maior uniformidade de resultados.

Os resultados representados na FIGURA 39, mostram que a concentração de resveratrol foi superior (ANOVA,  $P = 0,005$ ) nas fermentações iniciadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187, com concentração de  $13,23 \pm 0,94 \text{ mg.L}^{-1}$ . A concentração residual de glicose e de frutose, formação de etanol e de glicerol não apresentaram diferença significativa (ANOVA,  $P > 0,05$ ) entre as fermentações realizadas. A formação de ácido acético foi significativamente superior (ANOVA,  $P = 0,01$ ) nas fermentações iniciadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 148 comparativamente às iniciadas com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187, e foi quantitativamente inferior ( $0,27 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ ) na fermentação iniciada com a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187, apesar de estatisticamente semelhante às fermentações iniciadas com as leveduras *Hanseniaspora uvarum* 189 e *Hanseniaspora uvarum* 206, com valores de  $1,15 \pm 0,23 \text{ g.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,37$ ) e  $1,10 \pm 0,27 \text{ g.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P = 0,41$ ), respectivamente.

Conforme os resultados determinados das fermentações com inóculo misto sequencial e mostrados na FIGURA 39, não foi verificado um aumento na concentração de resveratrol e de etanol em todas as fermentações realizadas em comparação aos resultados das fermentações iniciadas com inóculo misto, apresentados na FIGURA 38.

FIGURA 39 - CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA *Vitis labrusca* INOCULADO NO INÍCIO COM LEVEDURAS *Hanseniaspora uvarum* 148 (HU 148), *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187), *Hanseniaspora uvarum* 189 (HU 189) OU *Hanseniaspora uvarum* 206 (HU 206) E APÓS 48 HORAS COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC)



FONTE: O autor (2016).

NOTA: As barras representam a média das concentrações dos analitos e as barras de erro representam  $\pm 1$  desvio padrão para cada analito. Resultados referentes às concentrações dos analitos classificados com letras distintas são diferentes entre si (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ ).

Em relação aos valores de sólidos solúveis observados em todas as fermentações inoculadas com as leveduras *Hanseniaspora uvarum* 148, *Hanseniaspora uvarum* 189 e *Hanseniaspora uvarum* 206, empregando inóculo simples (monocultura) (FIGURA 34) e inóculo misto sequencial (FIGURA 38), verifica-se que os resultados encontrados estão de acordo com o relatado em literatura, onde as leveduras não-*Saccharomyces* utilizadas em fermentações sequenciais conseguem se multiplicar e fermentar o mosto entre uma hora e quinze dias antes da inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (JOLLY; AUGUSTYN e PRETORIUS, 2006), pois as fermentações foram conduzidas por um tempo de sete dias.

Considerando que não ocorreu aumento nas concentrações de resveratrol e de etanol quando foi utilizado inóculo misto e inóculo misto sequencial nas

fermentações, este fato pode ser explicado pela hipótese de que o emprego de inoculação mista de leveduras não-*Saccharomyces* com leveduras *Saccharomyces* pode provocar um desenvolvimento inicial rápido de leveduras não-*Saccharomyces*, possuindo um efeito inibitório no subsequente metabolismo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (MEDINA, 2012).

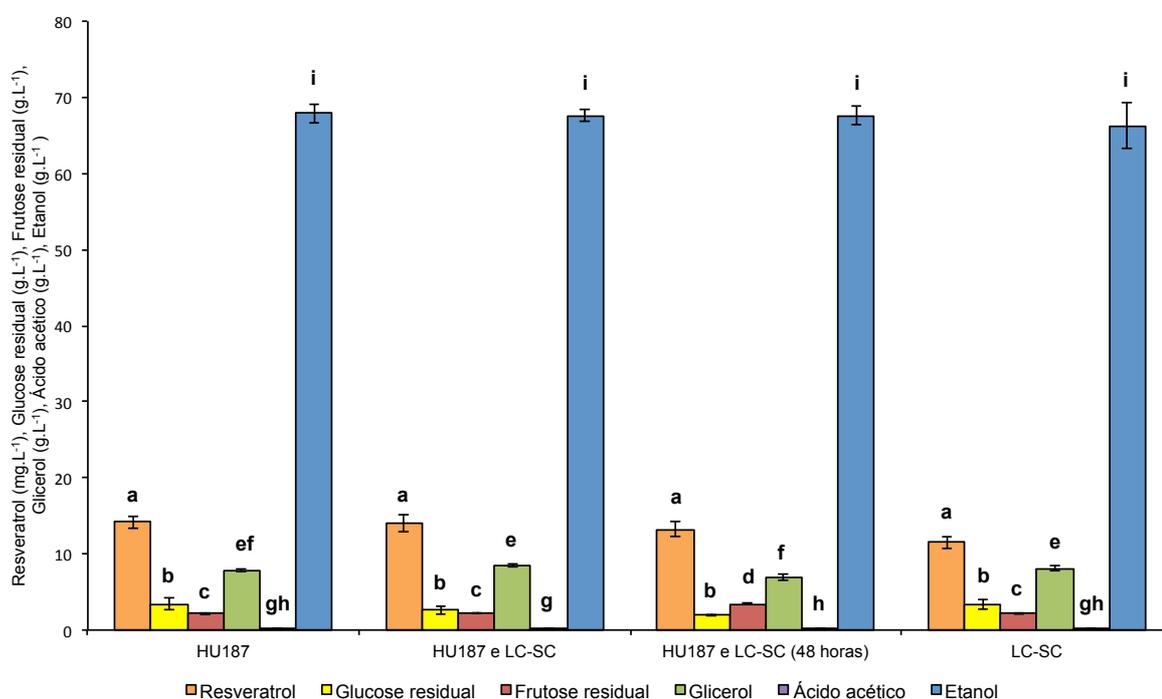
Dentre as quatro leveduras autóctones selecionadas produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase, a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 apresentou melhor capacidade de diminuir o valor de sólidos solúveis presentes no mosto de uva com cascas, sulfitado e chaptalizado, quando empregada em monocultura, inóculo misto e inóculo misto sequencial (FIGURAS 34, 36 e 38). Também foi a levedura não-*Saccharomyces* que, ao ser utilizada em fermentações, possibilitou concentrações finais superiores de resveratrol e glicerol, comparativamente às outras leveduras não-*Saccharomyces* selecionadas (FIGURAS 35, 37 e 39).

Considerando os dados expostos em literatura, onde informam que a concentração de resveratrol livre também depende do etanol formado na presença das cascas das uvas durante a fermentação alcoólica (BAVARESCO et al., 2012), foram realizadas análises estatísticas comparando as concentrações de resveratrol, glucose residual, frutose residual, glicerol, ácido acético e etanol detectadas no final das fermentações realizadas utilizando a levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 em monocultura; inóculo misto da levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 adicionado da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*; inóculo misto sequencial da levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 e da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, com a fermentação utilizando a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* em monocultura, conforme os resultados apresentados na FIGURA 40.

Conforme apresentado na FIGURA 40, as concentrações de etanol detectadas nas fermentações realizadas com as monoculturas das leveduras *Hanseniaspora uvarum* 187 e levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, bem como utilizando inóculo misto e inóculo misto sequencial destas leveduras, foram de  $67,87 \pm 1,22 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $66,29 \pm 3,06 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $67,57 \pm 0,79 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $67,56 \pm 1,19 \text{ g.L}^{-1}$  (ANOVA,  $P > 0,05$ ), respectivamente, estatisticamente semelhantes, e as quantidades de açúcares residuais (glucose e frutose) de  $5,57 \pm 0,86 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $5,66 \pm 0,71 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $4,75 \pm 0,53 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $5,36 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Analisando os resultados das concentrações de etanol e de açúcares residuais no término das fermentações, percebe-se que as concentrações de açúcares no mosto foram insuficientes para

atingir o teor alcoólico final necessário para atender a legislação brasileira para vinhos de mesa utilizando uvas *Vitis labrusca* (mínimo de 8,6% e máximo de 14% vol/vol, a 20 °C, conforme a Portaria n° 374 de 27 de novembro de 2014, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

FIGURA 40 - CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), GLUCOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), FRUTOSE RESIDUAL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), GLICEROL ( $\text{g.L}^{-1}$ ), ÁCIDO ACÉTICO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) E ETANOL ( $\text{g.L}^{-1}$ ) DETERMINADAS NO FINAL DE CADA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO DE UVA *Vitis labrusca* INOCULADA COM A LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum* 187 (HU 187) COM  $10^8$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA EM MONOCULTURA, INÓCULO MISTO OU INÓCULO MISTO SEQUENCIAL APÓS 48 HORAS, COM A LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (LC-SC) COM  $10^7$  CÉLULAS. $\text{g}^{-1}$  DE UVA



FONTE: O autor (2016).

NOTA: As barras representam a média das concentrações dos analitos e as barras de erro representam  $\pm 1$  desvio padrão para cada analito. Resultados referentes às concentrações dos analitos classificados com letras distintas são diferentes entre si (ANOVA com correção de Tuckey HSD,  $P > 0,05$ ).

A concentração de resveratrol quantificada nas fermentações realizadas empregando monocultura ( $14,17 \pm 0,80 \text{ mg.L}^{-1}$ ), inóculo misto ( $14,07 \pm 1,17 \text{ mg.L}^{-1}$ ), e inóculo misto sequencial ( $13,23 \pm 0,94 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi comparada com a concentração de resveratrol detectada na fermentação utilizando a monocultura da levedura comercial ( $11,51 \pm 0,79 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e foram obtidos os valores de  $P = 0,08$  (ANOVA),  $P = 0,09$  (ANOVA) e  $P = 0,32$  (ANOVA), respectivamente.

Pérez et al. (2011) ressaltam a importância de se utilizar meios diferenciais para detectar leveduras produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase em coleções com grande número de micro-organismos, uma vez que poucas leveduras com esta enzima foram identificadas, e isto torna-se um limitante do seu potencial enológico.

Muitos produtores acreditam que o caminho para a inovação em vinhos é pelo uso de métodos tradicionais de fermentação, baseados na fermentação espontânea, empregando leveduras da região (SANNINO et al., 2013).

Ao avaliar diferentes espécies de leveduras não-*Saccharomyces*, estudos concluem que a combinação de leveduras *Saccharomyces* com leveduras não-*Saccharomyces* apresentam formação de substâncias distintas em vinhos daquelas presentes quando se emprega a monocultura de uma levedura avaliada, indicando que as leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* não apenas coexistem passivamente no mosto fermentativo, mas interagem metabolicamente. Neste contexto, o uso de inóculo misto de leveduras *Saccharomyces* com não-*Saccharomyces*, pode ser utilizado em processos de vinificação conferindo vantagens de reproduzir o que ocorre em uma fermentação espontânea, referente a aspectos biológicos e técnicos, bem como permitindo também a síntese de aromas mais complexos (SUN et al., 2014).

Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho de Wang; Mas e Esteve-Zarzoso, (2015) que, ao avaliarem a interação entre leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica, relataram que o etanol não é um fator crítico para o desenvolvimento da levedura *Hanseniaspora uvarum*, além de demonstrarem alta tolerância desta espécie ao etanol. Os resultados dos autores sugerem que outros metabólitos secretados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* são a principal causa da diminuição da população de leveduras não-*Saccharomyces* ao término da fermentação alcoólica.

## 6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com base na biodiversidade das leveduras autóctones, isoladas e investigadas provenientes da microbiota das uvas do estado do Paraná, sabendo-se que estas foram caracterizadas para uso em processos de vinificação, considerando não somente a ação da enzima  $\beta$ -glicosidase, mas também avaliando a formação de metabólitos de importância enológica; verifica-se que a maneira de como as leveduras não-*Saccharomyces* são inoculadas ao mosto fermentativo não induz diferenças significativas nos teores determinados de açúcares residuais, glicerol, ácido acético e etanol formado.

Entretanto, sabe-se que resultados obtidos em escala de laboratório não são necessariamente os esperados em fermentações em escala industrial, e que para atender a legislação vigente, que regula a gestão do patrimônio genético brasileiro, é necessária a obtenção da autorização para desenvolvimento tecnológico anteriormente aos procedimentos que buscam a elaboração ou modificações de produtos ou processos existentes com aplicação econômica.

Desta forma, os produtores de vinho do estado do Paraná, que gentilmente colaboraram com o desenvolvimento desta tese, possuem, teoricamente, uma levedura isolada das uvas da região, que apresentou características enológicas adequadas, e ainda mostrou-se promissora para a elaboração de vinhos com concentração de resveratrol aumentada. Convém salientar que é necessário obter a autorização para Desenvolvimento Tecnológico frente ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético antes de empregar a levedura isolada em escala industrial, realizar testes organolépticos ou ainda determinar possíveis modificações no perfil aromático dos vinhos.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a escolha de uma levedura para a elaboração de vinhos com teor de resveratrol aumentado deve considerar além da ação da enzima  $\beta$ -glicosidase em condições de vinificação, também as características desejáveis do metabolismo fermentativo de leveduras, principalmente a formação de etanol. A levedura *Hanseniaspora uvarum* 187 pode contribuir com a elaboração de vinhos em monocultura, inóculo misto ou inóculo misto sequencial.

## REFERÊNCIAS

- AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH, C., JR.; BONFIM, T. M.; DA SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5645-54, 2014.
- BALL, S.; BULLOK, S.; LLOYD, L.; MAPP, K. **Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium**. 2008. Agilent Hi-Plex Columns for Carbohydrates, Alcohols, and Acids.
- BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 243-259, 2012.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge, U.K.; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000.
- BARREIRO-HURLÉ, J.; COLOMBO, S.; CANTOS-VILLAR, E. Is there a market for functional wines? Consumer preferences and willingness to pay for resveratrol-enriched red wine. **Food Quality and Preference**, v. 19, n. 4, p. 360-371, 2008.
- BAVARESCO, L.; MATTIVI, F.; DE ROSSO, M.; FLAMINI, R. Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1366-1381, 2012.
- BECKER, J. V. W.; ARMSTRONG, G. O.; VAN DER MERWE, M. J.; LAMBRECHTS, M. G.; VIVIER, M. A.; PRETORIUS, I. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 1, p. 79-85, 2003.
- BHAT, K. P. L.; II, J. W. K.; PEZZUTO, J. M. Biological effects of resveratrol. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, n. 6, p. 1041-1064, 2001.
- BIASOTO, A. C. T.; NETTO, F. M.; MARQUES, E. J. N.; DA SILVA, M. A. A. P. Acceptability and preference drivers of red wines produced from *Vitis labrusca* and hybrid grapes. **Food Research International**, v. 62, n. 0, p. 456-466, 2014.
- BORNEMAN, A. R.; SCHMIDT, S. A.; PRETORIUS, I. S. At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 263-271, 2013.
- BOUNDY-MILLS, K. Methods for investigating yeast biodiversity. Em: CARLOS ROSA, G. B. P. T. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Germany: Springer-Verlag, 2006. p.67-100.
- BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/1980-1988/L7678.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L7678.htm)>. Acesso em: 11 mar 2015.

BRASIL. Medida provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/mpv/2186-16.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm)>. Acesso em: 15 jun 2015.

BRASIL. Regras para o acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional associado. **Ministério do Meio Ambiente. Departamento do Patrimônio Genético**. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_dpg/\\_arquivos/cartilha.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/_arquivos/cartilha.pdf)>. Acesso em: 15 jun 2015.

BRASIL. Lei 13.123 de 20 de maio de 2015. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm)>. Acesso em: 20 mai 2016.

BRASIL. Consulta Pública em 5 de abril de 2016. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Consulta\\_Publica/consultapatrimonioidsp%20.htm#anexo](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Consulta_Publica/consultapatrimonioidsp%20.htm#anexo)>. Acesso em: 20 mai 2016.

CADEZ, N.; POOT, G. A.; RASPOR, P.; SMITH, M. T. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, n. 5, p. 1671-80, 2003.

CARVALHO, J. C. M. D.; SATO, S. Fermentação descontínua. Em: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. p.193-204.

CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNI, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 801-808, 2009.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 239-245, 2006.

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

CICHEWICZ, R. H.; KOUZI, S. A. Resveratrol oligomers: Structure, chemistry, and biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 507-579, 2002.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F. J. L.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 149-155, 2004.

COMBINA, M.; ELÍA, A.; MERCADO, L.; CATANIA, C.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 237-243, 2005.

COMITINI, F.; GOBBI, M.; DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 873-882, 2011.

CORDERO OTERO, R. R.; UBEDA IRANZO, J. F.; BRIONES-PEREZ, A. I.; POTGIETER, N.; VILLENA, M. A.; PRETORIUS, I. S.; RENSBURG, P. V. Characterization of the  $\beta$ -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 8, p. 2564-2569, 2003.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: new sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 649-657, 2006.

CSOMA, H.; ZAKANY, N.; CAPECE, A.; ROMANO, P.; SIPICZKI, M. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 239-248, 2010.

DEÁK, T. **Handbook of food spoilage yeasts**. 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.

DIAZ-GEREVINI, G. T.; REPOSSI, G.; DAIN, A.; TARRES, M. C.; DAS, U. N.; EYNARD, A. R. Beneficial action of resveratrol: How and why? **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 174-178, 2016.

DIGUTA, C. F.; VINCENT, B.; GUILLOUX-BENATIER, M.; ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, S. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1145-1154, 2011.

DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; COMITINI, F.; GOBBI, M.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 170-180, 2011.

DONNEZ, D.; KIM, K.-H.; ANTOINE, S.; CONREUX, A.; DE LUCA, V.; JEANDET, P.; CLÉMENT, C.; COUROT, E. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1056-1062, 2011.

DORNELES, D.; MACHADO, I. M. P.; CHOCIAI, M. B.; BONFIM, T. M. B. Influence of the use of selected and non-selected yeasts in red wine production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 747-751, 2005.

FAOSTAT. Roma: Economic and Social Development Department, 1961 - 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/>>. Acesso em: 15/02/2015.

FERNÁNDEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n. 1-2, p. 29-36, 2000.

FERNÁNDEZ, M. T.; UBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, n. 1, p. 223-229, 1999.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, 2012.

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

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

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

FREER, S. N. Kinetic characterization of a  $\beta$ -glucosidase from a yeast, *Candida wickerhamii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 13, p. 9337-42, 1993.

GAENSLY, F.; PICHETH, G.; BRAND, D.; BONFIM, T. M. B. The uptake of different iron salts by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 491-494, 2014.

GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; ATHANASOPOULOS, P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, I. A.; SPANOS, M. *trans*-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. **Food Control**, v. 17, n. 9, p. 700-706, 2006.

GIL, J. V.; MANZANARES, P.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 1, p. 57-68, 2005.

GOLDBERG, D. M. Does wine work? **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 14-16, 1995.

GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; SOLEAS, G. J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 79-87, 2003.

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. 1 ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009.

GUERRERO, R. F.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Wine, resveratrol and health: a review. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 5, p. 635-659, 2009.

GUERRERO, R. F.; PUERTAS, B.; JIMÉNEZ, M. J.; CACHO, J.; CANTOS-VILLAR, E. Monitoring the process to obtain red wine enriched in resveratrol and piceatannol without quality loss. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 195-202, 2010.

GUILLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 5, p. 387-392, 1998.

GÜRBÜZ, O.; GÖÇMEN, D.; DAGDELEN, F.; GÜRSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BÜYÜKUYSAL, L.; USTA, M. Determination of flavan-3-ols and *trans*-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 518-525, 2007.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. Em: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A. **Biotecnologia industrial** São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. p.21-68.

HEMAVATHI, A. B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Differential partitioning of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucosidase using aqueous two phase extraction. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 649-655, 2011.

HENDRICKX, M.; GOFFINET, J.-S.; SWINNE, D.; DETANDT, M. Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 4, p. 544-548, 2011.

HERNÁNDEZ, L. F.; ESPINOSA, J. C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BRIONES, A.  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 171-176, 2003.

HONG, Y.-A.; PARK, H.-D. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell early grapes: potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 207-214, 2013.

JACKSON, R. S. 3 - Grapevine Structure and Function. Em: JACKSON, R. S. **Wine Science (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, 2008a. p.50-107.

JACKSON, R. S. 6 - Chemical Constituents of Grapes and Wine. Em: JACKSON, R. S. **Wine Science (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, 2008b. p.270-331.

JACKSON, R. S. 7 - Fermentation. Em: JACKSON, R. S. **Wine Science (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, 2008c. p.332-417.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997.

JENG, W.-Y.; WANG, N.-C.; LIN, M.-H.; LIN, C.-T.; LIAW, Y.-C.; CHANG, W.-J.; LIU, C.-I.; LIANG, P.-H.; WANG, A. H. J. Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. **Journal of Structural Biology**, v. 173, n. 1, p. 46-56, 2011.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **South African Journal for Enology Viticulture**, v. 27, n. 1, p. 15-39, 2006.

KRAKOVÁ, L.; CHOVANOVÁ, K.; ŽENIŠOVÁ, K.; TURCOVSKÁ, V.; BREŽNÁ, B.; KUČHTA, T.; PANGALLO, D. Yeast diversity investigation of wine-related samples from two different Slovakian wine-producing areas through a multistep procedure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 406-411, 2012.

LA TORRE, G. L.; LAGANÁ, G.; BELLOCCO, E.; VILASI, F.; SALVO, F.; DUGO, G. Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 259-266, 2004.

LANGCAKE, P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin,  $\alpha$ -viniferin and pterostilbene. **Physiological Plant Pathology**, v. 18, n. 2, p. 213-226, 1981.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology**, v. 9, n. 1, p. 77-86, 1976.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. **Phytochemistry**, v. 16, n. 8, p. 1193-1196, 1977.

LEE, S.-J.; LEE, J.-E.; KIM, H.-W.; KIM, S.-S.; KOH, K.-H. Development of Korean red wines using *Vitis labrusca* varieties: instrumental and sensory characterization. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 385-393, 2006.

LIMA, U. D. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. D. Produção de etanol. Em: LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. p.1-43.

LOIRA, I.; MORATA, A.; COMUZZO, P.; CALLEJO, M. J.; GONZÁLEZ, C.; CALDERÓN, F.; SUÁREZ-LEPE, J. A. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. **Food Research International**, v. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.030>, 2015.

LOIRA, I.; VEJARANO, R.; BAÑUELOS, M. A.; MORATA, A.; TESFAYE, W.; UTHURRY, C.; VILLA, A.; CINTORA, I.; SUÁREZ-LEPE, J. A. Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, Part 1, p. 915-922, 2014.

LUCENA, A. P. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL, J. A. C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 1, p. 30-36, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Crescimento microbiano. Em: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.141-174.

MAGYAR, I.; TÓTH, T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 94-100, 2011.

MALOVANÁ, S.; GARCÍA MONTELONGO, F. J.; PÉREZ, J. P.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, n. 2, p. 245-253, 2001.

MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLLER, E.; HORRÉ, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, M.; BIERBAUM, G.; HOERAUF, A.; SAHL, H.-G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2912, 2009.

MCBRIDE, J. E.; ZIETSMAN, J. J.; VAN ZYL, W. H.; LYND, L. R. Utilization of cellobiose by recombinant b-glucosidase-expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 93-101, 2005.

MEDINA, K.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 245-250, 2012.

MELLO, L. M. R. D. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2014**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2015. Comunicado técnico.

MENG, X.; MALIAKAL, P.; LU, H.; LEE, M.-J.; YANG, C. S. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 935-942, 2004.

MOREIRA, N.; PINA, C.; MENDES, F.; COUTO, J. A.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and

*Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 662-667, 2011.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine chemistry and biochemistry**. 1 ed. Nova Iorque: Springer, 2009.

MURIAS, M.; JÄGER, W.; HANDLER, N.; ERKER, T.; HORVATH, Z.; SZEKERES, T.; NOHL, H.; GILLE, L. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 903-912, 2005.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, p. 275-278, 2005.

OFFORD, L. C.; KIRK, P. M. **Saccharomycetes**. ROSKOV, Y.; ABUCAY, L.; ORRELL, T.; NICOLSON, D.; KUNZE, T.; FLANN, C.; BAILLY, N.; KIRK, P.; BOURGOIN, T.; DE- WALT, R.; DECOCK, W.; DE WEVER, A. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. Naturalis, Leiden, the Netherlands. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/col>>. Acesso em: 17 abr 2016.

OLSEN, G. J.; PACE, N. R.; NUEL, M.; KAINE, B. P.; GUPTA, R.; WOESE, C. R. Sequence of the 16S rRNA gene from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* and its evolutionary implications. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, n. 4, p. 301-307, 1985.

ONO, B.; ISHII, N.; FUJINO, S.; AOYAMA, I. Role of hydrosulfide ions (HS<sup>-</sup>) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3183 - 3186, 1991.

PARK, E.-J.; PEZZUTO, J. M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1071-1113, 2015.

PATEL, K. R.; SCOTT, E.; BROWN, V. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P.; BROWN, K. Clinical trials of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 161-169, 2011.

PATO, O. **O vinho, sua preparação e conservação**. 6 ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1978.

PEREIRA, G. E.; GUERRA, C. C.; MANFROI, L. Vitivinicultura e enologia. Em: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. D. S. **A vitivinicultura no semiárido brasileiro**. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p.677-724.

PÉREZ, G.; FARIÑA, L.; BARQUET, M.; BOIDO, E.; GAGGERO, C.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. A quick screening method to identify  $\beta$ -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 47-55, 2011.

PFLIEGLER, W. P.; HORVÁTH, E.; KÁLLAI, Z.; SÍPICZKI, M. Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5–6, p. 402-410, 2014.

PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J. A.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 439-447, 2004.

POULSEN, M. M.; ORNSTRUP, M. J.; HARSLØF, T.; JESSEN, N.; LANGDAHL, B. L.; RICHELSEN, B.; JØRGENSEN, J. O. L.; PEDERSEN, S. B. Short-term resveratrol supplementation stimulates serum levels of bone-specific alkaline phosphatase in obese non-diabetic men. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 0, p. 305-310, 2014.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; DEL OLMO, M. L.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 3-10, 2003.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, 1992.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **The microbiology of wine and vinifications**. 2 ed. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J.; MANFROI, L. Processo de produção. Em: **Processamento de uva - vinho tinto, graspera e vinagre**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 959-964, 2006.

RODRÍGUEZ, M. E.; LOPES, C.; VALLES, S.; GIRAUDO, M. R.; CABALLERO, A. Selection and preliminary characterization of  $\beta$ -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6-7, p. 812-820, 2007.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 77, p. 519-527, 1994.

SANNINO, C.; FRANCESCA, N.; CORONA, O.; SETTANNI, L.; CRUCIATA, M.; MOSCHETTI, G. Effect of the natural winemaking process applied at industrial level on the microbiological and chemical characteristics of wine. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 3, p. 347-356, 2013.

SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. Esculin gel diffusion assay (EGDA): A simple and sensitive method for screening  $\beta$ -glucosidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 182-184, 2006.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 1, p. 49-52, 1992.

SILVA, G. A. D.; BERNARDI, T. L.; SCHAKER, P. D. C.; MENEGOTTO, M.; VALENTE, P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 319-327, 2012.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of  $\beta$ -glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, n. 0, p. 500-507, 2013.

SMITH, M. T.; ROBERT, V.; POOT, G. A.; EPPING, W.; DE COCK, A. W. Taxonomy and phylogeny of the ascomycetous yeast genus *Zygoascus*, with proposal of *Zygoascus meyeræ* sp. nov. and related anamorphic varieties. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, n. Pt 3, p. 1353-63, 2005.

SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 441-445, 2001.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1036-1041, 2002a.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1030-1035, 2002b.

STABNIKOVA, O.; IVANOV, V.; LARIONOVA, I.; STABNIKOV, V.; BRYSEWSKA, M. A.; LEWIS, J. Ukrainian dietary bakery products with selenium-enriched yeast. **LWT**, v. 41, n. 5, p. 890-895, 2008.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**, v. 101, n. 449-457, p. 9, 2007.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 182-190, 2001.

SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A. New trends in yeast selection for winemaking. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 39-50, 2012.

SUN, B.; RIBES, A. M.; LEANDRO, M. C.; BELCHIOR, A. P.; SPRANGER, M. I. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, p. 382-390, 2006.

SUN, S. Y.; GONG, H. S.; JIANG, X. M.; ZHAO, Y. P. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. **Food Microbiology**, v. 44, n. 0, p. 15-23, 2014.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 9, p. 511-519, 2006.

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; ALVES, T. D. L.; DE GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; CUNHA, H. P.; DA SILVA, E. L.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the southern region of Brazil: phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, v. 173, n. 0, p. 527-535, 2015.

TODARO, A.; PALMERI, R.; BARBAGALLO, R. N.; PIFFERI, P. G.; SPAGNA, G. Increase of *trans*-resveratrol in typical Sicilian wine using  $\beta$ -glucosidase from various sources. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1570-1575, 2008.

TOFALO, R.; PERPETUINI, G.; FASOLI, G.; SCHIRONE, M.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Biodiversity study of wine yeasts belonging to the "terroir" of Montepulciano d'Abruzzo "Colline Teramane" revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. **Food Microbiology**, v. 39, p. 7-12, 2014.

TOFALO, R.; SCHIRONE, M.; TORRIANI, S.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; PERPETUINI, G.; SUZZI, G. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 18-26, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento microbiano. Em: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.156-183.

VILLENA ARÉVALO, M.; IRANZO ÚBEDA, J. F.; OTERO CORDERO, R. R.; PÉREZ BRIONES, A. I. Optimization of a rapid method for studying the cellular location of  $\beta$ -glucosidase activity in wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 558-564, 2005.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. Ú.; PÉREZ, A. I. B.  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 420-425, 2007.

VITAGLIONE, P.; SFORZA, S.; GALAVERNA, G.; GHIDINI, C.; CAPORASO, N.; VESCOVI, P. P.; FOGLIANO, V.; MARCHELLI, R. Bioavailability of *trans*-resveratrol

from red wine in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 5, p. 495-504, 2005.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.-C.; MERILLON, J.-M.; TEISSEDE, P.-L. Determination of stilbenes ( $\delta$ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5664-5669, 2005.

WALTER, F. G. **The manufacture of compressed yeast**. 2 ed. London,: Chapman & Hall, 1953.

WANG, C.; MAS, A.; ESTEVE-ZARZOSO, B. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 67-74, 2015.

WHITBY, S.; CHRISTENSON, J.; DUFFICY, L.; ROACH, P.; THOMAS, J.; NAUMOVSKI, N. The effects of resveratrol supplementation on obesity in humans: A systematic review. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 4, p. 46, 2016.

WU, C.-F.; YANG, J.-Y.; WANG, F.; WANG, X.-X. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2013.

ZHANG, C.; LI, D.; YU, H.; ZHANG, B.; JIN, F. Purification and characterization of piceid- $\beta$ -d-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 83-88, 2007.

ZHANG, J.; WANG, D.; PAN, J.; WANG, J.; ZHAO, H.; LI, Q.; ZHOU, X. Efficient resveratrol production by immobilized  $\beta$ -glucosidase on cross-linked chitosan microsphere modified by L-lysine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, n. 0, p. 29-34, 2014.