

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**CAPACIDADE DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* EM INIBIR A  
AÇÃO DE *Brettanomyces custersianus* DURANTE O PROCESSO DE  
ELABORAÇÃO DE VINHO**

Carolina Madalozzo Poletto  
Engenheira de Alimentos - URI

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Março, 2009

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

P763c Poletto, Carolina Madalozzo

Capacidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em inibir a ação de *Brettanomyces custersianus* durante o processo de elaboração de vinho / Carolina Madalozzo Poletto – 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Patrícia Valente da Silva

Co-orientação: Prof. Gildo Almeida da Silva

1. Leveduras 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. *Brettanomyces custersianus* 4. Fermentação 5. Vinho I. Silva, Patrícia Valente da, orient. II. Silva, Gildo Almeida da, co-orient. III. Título.

CDU 579.2 (043)

## **AGRADECIMENTOS**

Considerando esta dissertação como resultado de uma grande caminhada, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na elaboração deste trabalho:

À professora, orientadora e amiga Dra. Patrícia Valente da Silva, pela sensibilidade que a diferencia como educadora, por ter sido companheira na orientação deste trabalho e nas disciplinas realizadas durante o curso de Mestrado.

Ao querido professor, co-orientador e amigo Dr. Gildo Almeida da Silva, pelo incentivo, conhecimentos transmitidos, amizade e carinho que partilhamos durante todo o período de convívio. Pelo confiança em mim depositada, e principalmente pela orientação à vida sempre enfatizada durante as conversas no laboratório. Por me mostrar como a diferença pode ser importante.

Em especial à minha família, pelo incentivo que me deram durante todo o trabalho mesmo às custas de ausências e sacrifícios, pelas palavras de apoio nas horas de aperto.

Ao meu noivo, pelo carinho, compreensão, horas de viagem até Porto Alegre e Bento Gonçalves durante os 2 anos que estivemos distantes, por estar sempre junto nos momentos mais importantes.

Às colegas de laboratório da UFRGS e da EMBRAPA Uva e Vinho pela companhia, por toda e qualquer ajuda prestada durante os experimentos, e principalmente pelas risadas nas horas de descontração.

À UFRGS por oportunizar o ingresso no PPG e condições para concluir os estudos durante o período do curso.

À EMBRAPA Uva e Vinho Bento Gonçalves/RS por disponibilizar o estabelecimento para a execução de todos os experimentos referentes à dissertação.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

# CAPACIDADE DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* EM INIBIR A AÇÃO DE *Brettanomyces custersianus* DURANTE O PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHO

Autor: Carolina Madalozzo Poletto

Orientador: Dr. Patrícia Valente da Silva

Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

## <sup>1</sup>RESUMO

Leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* causam sérios problemas ao vinho, afetando as propriedades sensoriais do produto final. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em inibir a atividade de *Brettanomyces custersianus* na vinificação em tinto e durante a fase inicial de envelhecimento, assim como investigar a capacidade deste microrganismo (*Br. custersianus*) em inibir a atividade metabólica de *Sacch. cerevisiae*. Foram realizadas vinificações com 4 inoculações diferentes. O tratamento 1 (T1) foi inoculado com a linhagem neutra *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97, T2-*Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 *killer*, T3-EMBRAPA 1vvt/97 e *Br. custersianus*, T4-EMBRAPA 91B/84 *killer* e *Br. custersianus* e T5-*Br. custersianus*. Também foram realizados, testes de velocidade fermentação, inibição ou estímulo do metabolismo e tolerância ao SO<sub>2</sub>. Durante a fase tumultuosa realizaram-se análises de açúcares redutores totais e etanol. Observou-se que durante todo o período da fermentação, o consumo de substrato de T1 e T2 foi mais rápido, do que em T3 e T4. A velocidade de fermentação da *Br. custersianus* (T5) foi muito inferior às demais linhagens. Mesmo com uma velocidade de crescimento baixa, a linhagem contaminante quando inoculada juntamente com *Sacch. cerevisiae* retarda a fermentação tumultuosa, podendo comprometer o processo de vinificação. *Br. custersianus* (T5) não teve sua atividade metabólica afetada na presença de 125 mg/L de SO<sub>2</sub>, logo conclui-se que as concentrações normalmente utilizadas no processo de vinificação, 30 a 70 mg/L, não seriam suficientes para impedir sua atividade.

---

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (129 p.) Março, 2009.

## CAPACITY STRAINS OF *Saccharomyces cerevisiae* TO INHIBIT THE ACTIVITY *Brettanomyces custersianus* DURING THE WINEMAKING

Author: Carolina Madalozzo Poletto  
Advisor: Dr. Patrícia Valente da Silva  
Co-advisor: Dr. Gildo Almeida da Silva

### <sup>2</sup>ABSTRACT

*Dekkera/Brettanomyces* yeasts cause serious problems to the wine, affecting the sensorial properties of the final product. The objective of this work was to investigate the capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* in inhibiting the activity of *Brettanomyces custersianus* in the vinification in red wine and during the early stage of aging of the wine, as well as to investigate the ability of this microorganism (*Br. custersianus*) to inhibit metabolic activity of *Saccharomyces cerevisiae*. Vinifications were performed with 4 different inoculations. Treatment 1 (T1) was inoculated with the neutral strain *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97, T2-killer *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84, T3-EMBRAPA 1vvt/97 and *Br. custersianus*, T4-EMBRAPA 91B/84 and *Br. custersianus* and T5-*Br. custersianus*. There were also carried out tests of speed fermentation, inhibition or stimulation of metabolism and tolerance to SO<sub>2</sub>. During the tumultuous phase analysis was performed of total reducing sugars and ethanol. It was observed that throughout the period of fermentation, the substrate consumption in T1 and T2 was faster than in T3 and T4. The speed of fermentation of *Br. custersianus* (T5) was much lower than the other strains. Even with a low rate of growth, the strain contaminant when inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. delays the tumultuous fermentation, being able to compromise the vinification process. *Br. custersianus* (T5) did not have its metabolic activity affected in the presence of 125 mg/L of SO<sub>2</sub>, then it was concluded that the concentrations normally used in the vinification process, 30 to 70 mg/L, would not be enough to prevent their activity.

---

2 Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Basic Health Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (129 p.) March, 2009.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| AGRADECIMENTOS .....   | ii |
| SUMÁRIO .....  | vi |
| RELAÇÃO DE TABELAS .....   | ix |
| RELAÇÃO DE FIGURAS .....   | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | xi |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 5  |
| 2.1 Contaminantes do vinho .....   | 5  |
| 2.2 Características dos gêneros <i>Dekkera/Brettanomyces</i> .....                                   | 6  |
| 2.2.1 <i>Brettanomyces custersianus</i> .....  | 8  |
| 2.3 Ocorrência e distribuição .....  | 11 |
| 2.4 Metabólitos produzidos por <i>Dekkera/Brettanomyces</i> com repercussão sensorial negativa ..... | 13 |
| 2.4.1 Ácidos graxos voláteis .....   | 13 |
| 2.4.2 Tetrahidropiridinas .....  | 14 |
| 2.4.3 Fenóis voláteis.....   | 14 |
| 2.5 Fatores que afetam a formação de compostos voláteis por <i>Dekkera/Brettanomyces</i> .....       | 17 |
| 2.6 Degradação de antocianas.....  | 19 |
| 2.7 Contaminação da madeira e tratamento dos barris .....  | 20 |
| 2.8 Detecção de <i>Dekkera/Brettanomyces</i> em vinhos .....   | 22 |
| 2.9 Controle de <i>Dekkera/Brettanomyces</i> em vinhos.....  | 22 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 33 |
| 3.1 Obtenção das culturas.....   | 33 |
| 3.2 Manutenção das culturas.....   | 33 |
| 3.3 Crescimento de <i>Brettanomyces custersianus</i> NRRL Y-6653.....                                | 34 |
| 3.4 Tratamentos.....   | 34 |
| 3.5 Preparo do inóculo e vinificação .....   | 35 |

|   |    |
|---|----|
| 3.5.1 Inóculo .....   | 35 |
| 3.5.2 Vinificação .....   | 35 |
| 3.6 Análises químicas de avaliação quantitativa.....  | 36 |
| 3.6.1 Teor alcoólico .....  | 36 |
| 3.6.2 Açúcares redutores totais (ART).....  | 37 |
| 3.6.3 Acidez total .....  | 37 |
| 3.6.4 Acidez volátil.....   | 37 |
| 3.6.5 pH.....   | 38 |
| 3.6.6 Anidrido sulfuroso total (SO <sub>2</sub> total).....   | 38 |
| 3.6.7 Anidrido sulfuroso livre (SO <sub>2</sub> livre) .....  | 38 |
| 3.6.8 Extrato seco total .....  | 38 |
| 3.6.9 Extrato seco reduzido .....   | 39 |
| 3.6.10 Monitoramento da fermentação malolática.....   | 39 |
| 3.7 Análises químicas de avaliação qualitativa.....   | 39 |
| 3.7.1 Cor.....  | 39 |
| 3.7.2 Taninos totais .....  | 39 |
| 3.7.3 Antocianas totais .....   | 40 |
| 3.7.4 Polifenóis .....  | 40 |
| 3.7.5 Antioxidantes .....   | 41 |
| 3.8 Vinificação <i>in vitro</i> .....   | 41 |
| 3.8.1 Teste de velocidade de fermentação.....   | 41 |
| 3.8.2 Inibição ou estímulo do metabolismo.....  | 42 |
| 3.9 Teste de tolerância ao dióxido de enxofre .....   | 43 |
| 3.10 Análises instrumentais.....  | 43 |
| 3.10.1 Cromatografia gasosa .....   | 43 |
| 3.11 Análise estatística.....   | 44 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 45 |
| 4.1 Seleção do meio de cultura para o crescimento de <i>Brettanomyces custersianus</i> NRRL Y-6653..... | 45 |
| 4.2 Análises químicas de avaliação quantitativa da fase tumultuosa da fermentação .....                 | 50 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.2.1 Açúcares redutores totais (ART) e teor alcoólico.....   | 50  |
| 4.2.2 pH.....   | 57  |
| 4.2.3 Compostos voláteis .....  | 58  |
| 4.3 Monitoramento da fermentação malolática.....  | 71  |
| 4.4 Análises químicas de avaliação quantitativa da fase lenta da fermentação .....                                  | 72  |
| 4.4.1 Acidez volátil.....   | 72  |
| 4.4.2 Anidrido sulfuroso livre .....  | 74  |
| 4.5 Análises químicas de avaliação quantitativa e qualitativa após a fase de estabilização .....                    | 75  |
| 4.5.1 Açúcares redutores totais (ART) e teor alcoólico.....   | 75  |
| 4.5.2 Acidez total, acidez volátil e acidez fixa .....  | 78  |
| 4.5.3 SO <sub>2</sub> total, SO <sub>2</sub> livre, SO <sub>2</sub> molecular, SO <sub>2</sub> combinado e pH ..... | 80  |
| 4.5.4 Extrato seco total e extrato seco reduzido .....  | 82  |
| 4.5.5 Cor.....  | 83  |
| 4.5.6 Polifenóis e antioxidantes .....  | 85  |
| 4.5.7 Antocianinas totais e taninos totais .....  | 87  |
| 4.6 Vinificação “ <i>in vitro</i> ” .....   | 88  |
| 4.6.1 Teste de fermentação.....   | 88  |
| 4.6.2 Inibição ou estímulo do metabolismo.....  | 91  |
| 4.7 Tolerância ao dióxido de enxofre.....   | 99  |
| 5 CONCLUSÕES.....   | 104 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 106 |
| 7 APÊNDICES .....   | 119 |
| 8 VITA.....   | 126 |

## RELAÇÃO DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1: Fermentação e assimilação de açúcares pela espécie <i>Brettanomyces custersianus</i> .....  | 9  |
| TABELA 2. Métodos opcionais para o controle de <i>Dekkera/Brettanomyces</i> em vinhos.....  | 23 |
| TABELA 3: Volumes de 4-etilfenol, ácido acético e ELNC adicionadas ao mosto de Cabernet Sauvignon. ....   | 42 |
| TABELA 4: Tempos de retenção dos compostos analisados por cromatografia gasosa .....  | 44 |
| TABELA 5: Equações exponenciais dos meios de cultura M, G7 e G7-100 com relação à DO em 600 nm. ....  | 46 |
| TABELA 6: Equações exponenciais dos meios de cultura M, G7 e G7-100 com relação à acidez volátil.....   | 50 |
| TABELA 7: Equações exponenciais dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação ao consumo de ART entre o 1º e o 6º dia de fermentação tumultuosa .....                        | 52 |
| TABELA 8: Equações logarítmicas dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de etanol entre o 1º e o 6º dia de fermentação tumultuosa .....                     | 53 |
| TABELA 9: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de metanol ao longo da fermentação tumultuosa .....                                     | 64 |
| TABELA 10: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de propanol-1 ao longo da fermentação tumultuosa ...                                   | 66 |
| TABELA 11: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de 2-metil-1-butanol ao longo da fermentação tumultuosa .....                          | 68 |
| TABELA 12: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de 3-metil-1-butanol ao longo da fermentação tumultuosa .....                          | 69 |
| TABELA 13: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de 2-metil-1-propanol ao longo da fermentação tumultuosa .....                         | 70 |
| TABELA 14: Valores de acidez volátil (mEq/L) do mosto submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fermentação tumultuosa e ao final da fermentação malolática. .... | 73 |

|   |    |
|---|----|
| TABELA 15: Concentração de açúcares redutores totais (g/L) e teor alcoólico (°GL) dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos.....  | 77 |
| TABELA 16: Concentração de acidez total (mEq/L), acidez volátil (mEq/L) e acidez fixa (mEq/L) dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos. ....                                   | 78 |
| TABELA 17: Concentração de SO <sub>2</sub> total (mg/L), SO <sub>2</sub> livre (mg/L) e pH dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos. ....                                      | 81 |
| TABELA 18: Concentração de extrato seco total (g/L), extrato seco reduzido (g/L) e relação álcool em peso/extrato seco reduzido dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos. .... | 82 |
| TABELA 19: Índices de cor dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos, em comprimento de onda de 420, 520 e 620 nm. ....  | 84 |
| TABELA 20: Concentração de polifenóis (mg/L) e antioxidantes (µM) dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos. ....   | 86 |
| TABELA 21: Concentração de taninos totais (g/L) e antocianinas totais (mg/L) do mosto submetido aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos. ....   | 88 |
| TABELA 22: Equações exponenciais dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 com relação à produção de CO <sub>2</sub> entre o 4 <sup>o</sup> e o 9 <sup>o</sup> dia .....  | 91 |

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1. Comportamento de *Brettanomyces custersianus* após 10 dias em corn meal agar. .... 10
- FIGURA 2. Formação de etilfenóis a partir de seus precursores hidroxicinâmicos ..... 15
- FIGURA 3. Medidas de densidade óptica (600nm) de células de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 durante 32 horas de inoculação em condições aeróbicas em diferentes meios de cultura, onde (■) G7, (◆) G7-100 e (▼) M. .... 46
- FIGURA 4. Valores de acidez volátil (g/L) dos meios de cultura contendo *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653, durante 32 horas de inoculação em condições aeróbicas à 23-24°C, onde (■) G7, (◆) G7-100 e (▼) M. .... 49
- FIGURA 5. Concentração de açúcares redutores totais ART (g/L) dos mostos submetidos aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fase da fermentação tumultuosa à 25°C. .... 51
- FIGURA 6. Concentração de etanol (oGL) dos mostos submetidos aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante os 6 dias da fermentação tumultuosa. .... 53
- FIGURA 7. Concentração de acetaldeído do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa. .... 60
- FIGURA 8. Concentração de acetato de etila do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa ..... 62
- FIGURA 9. Concentração de metanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa. .... 63
- FIGURA 10. Concentração de propanol-1 do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa 66
- FIGURA 11. Concentração de 2-metil-1-butanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa ..... 67
- FIGURA 12. Concentração de 3-metil-1-butanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa. .... 69

- FIGURA 13. Concentração de 2-metil-1-propanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa ..... 70
- FIGURA 14. Produção de CO<sub>2</sub> de culturas puras e mistas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 à 25°C, onde T1(■), T2(◆), T3(▼), T4(▲), T5(▶)..... 90
- FIGURA 15. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de uma solução de 1 g/L 4-etilfenol, onde (■) 19,60 µg/mL, (◆) 14,77 µg/mL, (▼) 9,90 µg/mL, (▲) 4,97 µg/mL, (▶) 0 µg/mL. .... 92
- FIGURA 16. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de uma solução de 1 g/L 4-etilfenol, onde (■) 19,60 µg/mL, (◆) 14,77 µg/mL, (▼) 9,90 µg/mL, (▲) 4,97 µg/mL, (▶) 0 µg/mL. .... 92
- FIGURA 17. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 47,6 µL/mL, (◆) 38,4 µL/mL, (▼) 29,1 µL/mL, (▲) 19,6 µL/mL, (▶) 9,9 µL/mL e (◀) 0 µL/mL ..... 93
- FIGURA 18. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 47,6 µL/mL, (◆) 38,4 µL/mL, (▼) 29,1 µL/mL, (▲) 19,6 µL/mL, (▶) 9,9 µL/mL e (◀) 0 µL/mL. .... 94
- FIGURA 19. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 7,4 µL/mL, (◆) 4,9 µL/mL, (▼) 2,4 µL/mL e (▲) 0 µL/mL..... 95
- FIGURA 20. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 7,4 µL/mL, (◆) 4,9 µL/mL, (▼) 2,4 µL/mL e (▲) 0 µL/mL..... 95
- FIGURA 21. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 na presença de diferentes concentrações de ELNC, onde (■) 9,9 µL/mL, (◆) 7,4 µL/mL, (▼) 4,9 µL/mL, (▲) 2,4 µL/mL e (▶) 0 µL/mL..... 98
- FIGURA 22. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 na presença de diferentes concentrações de ELNC, onde (■) 90,9 µL/mL, (◆) 69,7 µL/mL, (▼) 47,6 µL/mL, (▲) 24,3 µL/mL e (▶) 0 µL/mL. .... 99
- FIGURA 23. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>, onde (■) 0mg/L, (◆) 25mg/L, (▼) 50mg/L, (▲) 75mg/L, (▶) 100mg/L e (◀) 125mg/L. ....100

FIGURA 24. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>, onde (■) 0mg/L, (◆) 25mg/L, (▼) 50mg/L, (▲) 75mg/L, (►) 100mg/L e (◄) 125mg/L. ....101

FIGURA 25. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 na presença de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>, onde (■) 0mg/L, (◆) 25mg/L, (▼) 50mg/L, (▲) 75mg/L, (►) 100mg/L e (◄) 125mg/L.....102

## LISTA DE ABREVIATURAS

- °GL:** Graus Gay-Lussac  
**DMDc:** Dimetil carbonato  
**DNA:** Ácido desoxirribonucléico  
**DPPH:** Difenilpicril hidrazil  
**ELNC:** Extrato de levedura não comercial  
**HPLC:** Cromatografia líquida de alta performance (High performance liquid chromatography)  
**mEq:** Miliequivalente  
**MPa:** Milipascal  
**MPB:** Metabissulfito de potássio  
**N:** Normalidade  
**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado  
**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
**NCT:** Número de células totais  
**nm:** Nanômetros  
**P:** Probabilidade  
**pH:** Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio em uma solução.  
**RNA:** Ácido ribonucléico  
**rpm:** Rotações por minuto  
**UFC:** Unidade formadora de colônia  
**UFRGS:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
**URI:** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim  
**v/v:** Volume por volume

## 1 INTRODUÇÃO

Para obtenção de vinhos de qualidade, faz-se necessário, além da escolha de métodos enológicos específicos, utilizar uvas maduras e sadias, assim como empregar linhagens de leveduras adequadas. Neste sentido os microrganismos exercem um papel importante na obtenção de um produto de qualidade, uma vez que são eles os principais agentes de transformação do mosto em vinho. A formação ou a não formação de uma série de produtos de relevância organoléptica depende dos microrganismos responsáveis pela fermentação ou de contaminantes que estejam presentes no processo.

As uvas usadas para a elaboração de vinhos trazem consigo, além de *Saccharomyces cerevisiae*, diversos outros gêneros e espécies de microrganismos. Devido ao alto conteúdo de açúcar, baixo pH, condições anaeróbicas de fermentação e às altas concentrações de álcool no fim do processo fermentativo, somente poucas leveduras e bactérias são capazes de sobreviver a essa forte pressão seletiva (Du Toit & Pretorius, 2000). Entre esses microrganismos, destacam-se as leveduras do gênero



*Dekkera/Brettanomyces*, que embora possuam um comportamento não competitivo durante o processo de fermentação, passam a atuar lenta e progressivamente após a vinificação, causando sérios problemas ao vinho (Silva, 2003a). Uma das principais características deste gênero está relacionada com o metabolismo de carboidratos. As condições estritamente anaeróbicas inibem a fermentação e este fenômeno é conhecido como Efeito Custer (Scheffers, 1966). Este comportamento foi observado em todas espécies deste gênero, exceto em *Brettanomyces custersianus* (Scheffers & Wikén, 1969). Sabe-se que *Br. custersianus*\* é mais comumente encontrada em cervejas (Verachtert & Dawoud, 1984.), mas Querol *et al.* (1990) reportou a presença desta espécie em fermentação de mosto.

Um dos problemas causados por tais leveduras contaminantes está associado com a formação de elevadas concentrações de ácido acético e aromas desagradáveis, como “odor de rato”, estábulo, plástico queimado, suor de cavalo, couro molhado, “Band-Aid” e animal molhado. Os principais responsáveis por esses aromas são o 4-etilfenol e o 4-etilguaicol.

Se a atividade metabólica desses microrganismos contaminantes não for controlada antes, durante e depois da fermentação, eles podem afetar negativamente as propriedades sensoriais do vinho, devido a alterações na composição química do mesmo. O microrganismo se comporta como um indivíduo oportunista. Quando não existe mais antagonismo no ambiente ou competição microbiológica, a ação de *Dekkera/Brettanomyces* inicia. Essas leveduras utilizam os açúcares residuais dos vinhos mesmo em baixas

---

\* As abreviaturas dos gêneros de microrganismos seguem a nomenclatura proposta por Kreger van Rij (1984).

concentrações, como 300 mg/L, e conseguem formar etilfenóis em quantidade suficiente para torná-los perceptíveis (Silva, 2003a).

O perigo deste microrganismo para o vinho tinto reside no fato de ele se fazer presente mais freqüentemente quando o vinho está pronto, ou seja, quando as fermentações alcoólica e malolática já foram efetuadas (Silva, 2003a). Essas leveduras são raramente encontradas durante a fermentação alcoólica do mosto (Querol *et al.*, 1990). Estudos têm reportado a presença de *Brettanomyces* em uva (Gilis *et al.*, 2008), em cantinas e mais frequentemente em barris, bombas e equipamentos de difícil esterilização (Fugelsang, 1998).

O mosto em fermentação é um ecossistema microbiano complexo, onde várias linhagens de leveduras crescem e morrem de acordo com sua capacidade de adaptação ao meio. Nos estádios iniciais da fermentação, em fermentações não estéreis, a competição entre os diversos microrganismos é um fato comum. A supremacia de um microrganismo se estabelece mais facilmente quando este microrganismo sintetiza um inibidor específico. Linhagens que sintetizam etanol, SO<sub>2</sub>, fator *killer* ou outro metabólito inibidor em velocidade mais elevada podem exercer uma ação seletiva mais forte que as linhagens de metabolismo mais lento. *Br. intermedius* cultivada em aerobiose, mostrou que o fenômeno de adaptação é tempo dependente. Este microrganismo precisou de 7 a 8 horas para se adaptar às condições anaeróbicas (Wijsman *et al.*, 1984). Nestas condições, leveduras com velocidade mais baixa de crescimento e de fermentação podem não resistir à pressão e se tornar inviáveis.

Como linhagens distintas possuem características diferentes com relação à síntese de metabólitos, muitos deles inibidores, os objetivos deste trabalho foram:

- Selecionar um meio de cultura líquido para crescimento de *Br. custersianus*.
- Investigar a capacidade de duas linhagens de *Sacch. cerevisiae* em inibir a atividade de *Brettanomyces custersianus*, uma espécie Custer negativa, na vinificação em tinto e durante a fase inicial de envelhecimento do vinho
- Investigar a capacidade deste microrganismo (*Br. custersianus*) em inibir a atividade metabólica de *Sacch. cerevisiae*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Contaminantes do vinho

O conceito de levedura contaminante tem um significado mais complexo para alimentos ou bebidas fermentados, do que para alimentos não-fermentados. No primeiro caso, a atividade das leveduras é essencial durante o processo fermentativo, por isso torna-se complicado diferenciar uma atividade benéfica de uma atividade prejudicial (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Existem três estádios em que os microrganismos podem entrar no processo de vinificação e interferir na qualidade do produto final. O primeiro estágio envolve o material *in natura*. As uvas são as primeiras fontes de leveduras que entram no ambiente da vinícola. Conseqüentemente, as interações microbiológicas que ocorrem nas uvas contribuirão para a diversidade de espécies encontradas no ambiente de vinificação.

Devido ao alto conteúdo inicial de açúcar, baixo pH, condições anaeróbicas e altas concentrações de etanol no final da fermentação, poucas

leveduras e bactérias, capazes de contaminar o vinho, podem sobreviver a pressões seletivas tão fortes (Du Toit e Pretorius, 2000). Bactérias e fungos filamentosos também são microrganismos que deterioram o vinho. A ação de bactérias acéticas e lácticas pode levar a um aumento na acidez do vinho, enquanto que fungos filamentosos podem se instalar em rolhas e afetar o sistema de vedação das mesmas. Dessa forma ambos podem desvirtuar completamente a qualidade do produto final. Segundo Silva (2003a), as espécies de leveduras que mais comumente afetam o vinho pertencem aos gêneros:

- *Candida*;
- *Pichia*;
- *Hansenula*;
- *Brettanomyces* (forma assexuada da levedura *Dekkera*);
- *Dekkera* (forma sexuada da levedura *Brettanomyces*);
- *Debaryomyces*.

De todos os gêneros de leveduras citadas, talvez os mais deteriogênicos pertençam aos gêneros *Dekkera/Brettanomyces*, porque, teoricamente, todos os vinhos, especialmente os tintos, estão sujeitos ao ataque destas leveduras. Vinhos com teor alcoólico mais elevado, maceração mais longa e ricos em extrato seco são os que apresentam maior potencial para este tipo de deteriorização (Silva, 2003a).

## **2.2 Características dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces***

O gênero *Brettanomyces* foi isolado, em 1904, de cerveja inglesa. Naquela época pensava-se que *Brettanomyces* não possuía a forma perfeita,

ou seja, não formava ascosporos. No entanto, em 1964, Van der Walt mostrou a formação destas estruturas em algumas leveduras classificadas como *Brettanomyces*. Com esta descoberta, as linhagens que formavam ascosporos passaram a ser classificadas como pertencentes ao novo gênero *Dekkera*.

Ao microscópio, apresentam células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais (estrutura semelhante à chama de uma vela nas extremidades), cilíndricas ou alongadas. A reprodução vegetativa de ambas se dá por brotamento e exibe pseudomicélio. Na reprodução sexuada, os ascos possuem formato de chapéu ou esférico com uma borda tangencial. Cada asco contém de um a quatro ascosporos. A forma de reprodução assexuada se dá por brotamento multilateral (Barnett *et al.* 1990).

Em geral *Dekkera/Brettanomyces* possuem crescimento lento, aroma característico e forte produção de ácido acético. Segundo Fugelsang & Edward (1997), *Dekkera/Brettanomyces* são únicas quanto à utilização de carboidratos. Por meio da via glicolítica, produzem etanol a partir de acetaldeído e NADH, e este ao se oxidar, será novamente reduzido para a conversão de gliceraldeído-3-fosfato a ácido 1,3-difosfoglicérico. O metabolismo destas leveduras também permite que o etanol seja convertido a ácido acético. Dessa forma, a produção de ácido acético, causa um acúmulo de NADH dentro da célula, que deve ser reoxidado para manter o balanço de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Em condições aeróbicas, o oxigênio recebe por meio da lançadeira e dos elementos da fosforilação oxidativa, os elétrons do NADH, formando  $\text{NAD}^+$ , ATP e água (Conn & Stumpf, 1975). Este mecanismo mantém assim a disponibilidade de  $\text{NAD}^+$  na célula. Por este motivo, a maioria das

leveduras pertencentes a esse gênero, por não possuir receptores de elétrons opcionais, apresentam, em determinados meios de cultura, a fermentação inibida sob condições anaeróbicas. *Sacch. cerevisiae* tem como receptores finais de elétrons o acetaldeído para formar etanol e recuperar o NAD oxidado, com formação bruta de 4 moléculas de ATP por molécula de glicose metabolizada. O oxigênio pode ser substituído por outras moléculas, como acetoína, que agem como receptoras de elétrons, para *Dekkera/Brettanomyces* (Scheffers, 1966). Isso explica o desenvolvimento de *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos onde a concentração de oxigênio é quase nula (Fugelsang & Edward, 1997). Aquelas espécies que apresentam a característica de ter o processo fermentativo estimulado pela aeração, foram chamadas de leveduras com Efeito Custer positivo por Custer (1940). Este efeito foi encontrado em todas as espécies de *Brettanomyces*, exceto em *Br. custersianus* (Scheffers & Wikén, 1969). Parece que de algum modo, as leveduras que mostram esse efeito, são incapazes de realizar o balanço de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  por meio da produção de glicerol ou outros compostos altamente reduzidos (Ciani & Ferraro, 1997, Gerós *et al.*, 2000).

Nos demais gêneros de leveduras, o Efeito Custer não foi observado (Scheffers & Wikén, 1969). Assim, a observação desse efeito tem alta significância taxonômica no diagnóstico do gênero *Brettanomyces*.

### **2.2.1 *Brettanomyces custersianus***

A TABELA 1 mostra a capacidade de *Br. custersianus* em fermentar e assimilar diferentes tipos de açúcar.

TABELA 1: Fermentação e assimilação de açúcares pela espécie *Brettanomyces custersianus*.

|           | Fermentação | Assimilação |
|-----------|-------------|-------------|
| Glicose   | +L          |             |
| Galactose | -           | -/+f        |
| Sacarose  | -           | +f          |
| Maltose   | -           | -/+f        |
| Lactose   | -           | -           |
| Rafinose  | -           | -           |

(-):negativo; (+):positivo rápido; (+f):positivo fraco; (v):variado; (+L): positivo lento; (-/+f):negativo ou positivo fraco  
 Fonte: Van der Walt, 1984.

Van der Walt (1984) descreveu o comportamento desta espécie em diferentes meios de cultura:

a) Crescimento em extrato de malte: Após 5 dias em 28°C as células são elipsoidais, frequentemente ogivais, cilíndricas a alongadas, (1,5-3,5 x 2,0-18,0 µm). Reprodução por brotamento. Ocorre individualmente, em pares ou em cadeias curtas, às vezes pouco ramificadas. Produzem muito pseudomicélio. Uma película fina e fosca é formada sobre o meio. Frequentemente um anel incompleto pode estar presente. Ocasionalmente a película pode ser bastante espessa. O sedimento é de flocoso a um pouco mucóide. Há uma produção muito suave de um aroma característico.

b)Crescimento em agar malte: Após 6 dias em temperatura ambiente a cultura em estria apresenta-se elevada, de cor creme a marrom claro, de brilhante a fosca, raramente lisa, geralmente verrucosa e crespá. A margem é ondulada a loboforme.

c)Crescimento em agar malte 2% de carbonato de cálcio: Após 6 semanas em temperatura ambiente a cultura em estria apresenta-se elevada, de cor creme a



marrom claro, brilhante a fosca, verrucosa a crespa. A margem é ondulada a loboforme. A produção de ácido é fraca.

d) Cultivo em placa de Dalmau em “corn meal agar”: Pseudomicélio é abundantemente produzido. Consiste de células filamentosas com nenhum ou poucos blastosporos. Sob condições anaeróbicas as células filamentosas podem formar blastosporos mais abundantemente. Os blastosporos podem ser arranjados em cadeias curtas ou verticilos fracamente ramificados como mostra a FIGURA 1.

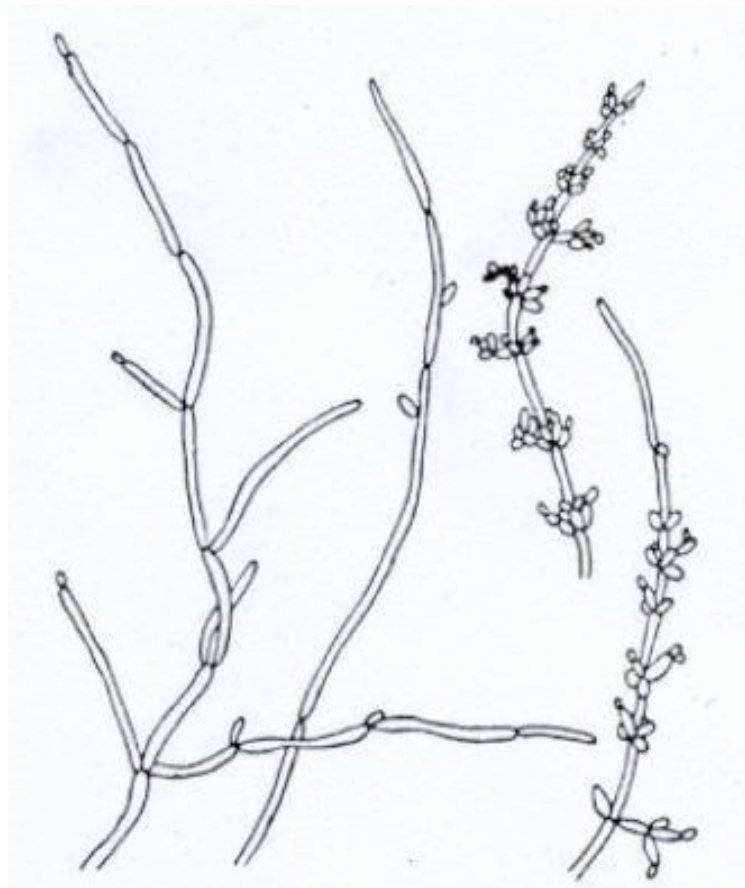


FIGURA 1 Comportamento de *Brettanomyces custersianus* após 10 dias em corn meal agar.

Fonte: Van der Walt (1984).

### 2.3 Ocorrência e distribuição

Existem várias hipóteses contraditórias quanto à distribuição de *Dekkera/Brettanomyces* na natureza. Muitos autores têm focado a detecção dessas leveduras em vinho, mas também são descritas na literatura como parte da microbiota de outras bebidas alcoólicas incluindo cerveja, cidra e kombucha (fungus-tea) (Licker *et al.*, 1998; Teoh, *et al.*, 2004). As espécies primariamente associadas com vinificação são *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) (Egli & Henick-Kling, 2001; Stender *et al.*, 2001; Cocolin *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2003a), embora *Br. anomalus* (*D. anomala*) (Esteve-Zaroso *et al.*, 2001) e *Br. custersianus* (Querol *et al.*, 2001) tenham sido isoladas de fermentação de mostos.

Há relatos da presença de *Dekkera/Brettanomyces* na entrada das cantinas especialmente se aos arredores existirem restos de uva estocados a céu aberto. O vento e insetos voadores, como *Drosophila*, se encarregam do transporte do microrganismo desta fonte de inóculo para a cantina (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Silva, 2003a). A presença dessas leveduras é comum nas áreas de produção da vinícola, em que esses insetos são frequentemente encontrados, visto que leveduras e outros microrganismos fazem parte da dieta normal e podem se aderir ao corpo desses insetos (Licker *et al.*, 1998). A falta de higiene, considerada por muito tempo como a única fonte de contaminação, ainda é a maior causa da manutenção desses microrganismos contaminantes ao longo da cadeia de produção. Mesmo reforçando os cuidados para melhorar as condições higiênicas, como alto conteúdo alcoólico, altos níveis de dióxido de enxofre (Du Toit *et al.*, 2005), o desenvolvimento de *Dekkera/Brettanomyces*

no vinho ainda não havia sido contido. *Br. bruxellensis* foi encontrada em barris, amostras de ar no momento do esmagamento das uvas, tanques e linhas de engarrafamento (Connell *et al.*, 2002). Este fato indica que a contaminação ocorre possivelmente antes do esmagamento das uvas e início do processo de vinificação.

Trabalhos mais recentes têm buscado esclarecer a origem dessas leveduras contaminantes. Sabe-se que as leveduras que habitam as bagas das uvas podem ser influenciadas por vários fatores, como adesão a superfície, tolerância a estresses ambientais (temperatura, luz do sol, dessecação, entre outros fatores), aplicação de defensivos químicos e suas interações com outros microrganismos. Renouf & Lonvaud-Funel (2007) elaboraram um meio de cultura para detecção de *Dekkera/Brettanomyces* na superfície das bagas de uva. Com este meio, foi possível detectar a presença de *Br. bruxellensis* após 10 dias de incubação. Gilis *et al.* (2008) isolaram *Brettanomyces* em bagas de uvas danificadas, em vinhedos da França, Argentina e América do Sul. Os autores salientaram que a presença deste gênero mostrou estar diretamente relacionada com a integridade física da uva. A dificuldade de detecção de *Dekkera/Brettanomyces* nas bagas das uvas deve-se, provavelmente, ao fato de existirem em pequena quantidade, já que a população de leveduras na superfície das bagas é muito mais diversificada do que no vinho e por serem microrganismos fastidiosos (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007).

## **2.4 Metabólitos produzidos por *Dekkera/Brettanomyces* com repercussão sensorial negativa**

Entre os metabólitos produzidos por *Dekkera/Brettanomyces* existem três subprodutos que causam impacto sensorial negativo nos vinhos. Esses subprodutos são ácidos graxos voláteis, tetrahidropiridinas e fenóis voláteis. Cada um deles afeta de maneira específica o aroma do vinho.

### **2.4.1 Ácidos graxos voláteis**

Os ácidos graxos voláteis produzidos por *Dekkera/Brettanomyces* são diversos. O mais conhecido na indústria de vinhos é o ácido acético (Freer, *et al.*, 2003). Além do crescimento, o oxigênio também estimula a produção de ácido acético, por meio da oxidação do acetaldeído, podendo levar à formação de acetato de etila, conferindo um aroma semelhante ao de acetona (Freer, 2002). De acordo com Freer (2002), linhagens de *Dekkera/Brettanomyces* spp. foram capazes de produzir ácido acético quando glicose (100 g/L) ou etanol (35 g/L) foram usados aerobicamente como fonte de carbono e energia. As linhagens que mais produziram ácido acético foram *D. intermedia*, *Br. intermedium*, *D. bruxellensis* e *D. anomala*. Todas essas linhagens fermentaram eficientemente e produziram mais de 24 g/L de ácido acético a partir de glicose e etanol. Sob condições de anaerobiose, a produção de ácido acético por essas linhagens foi muito baixa ou quase nula.

Outros ácidos graxos voláteis produzidos por *Dekkera/Brettanomyces* são os ácidos isovalérico, isobutírico e 2-metil-butírico, que também podem causar impacto na qualidade do vinho. Embora *Dekkera/Brettanomyces* possam produzir esses compostos ao contaminar o

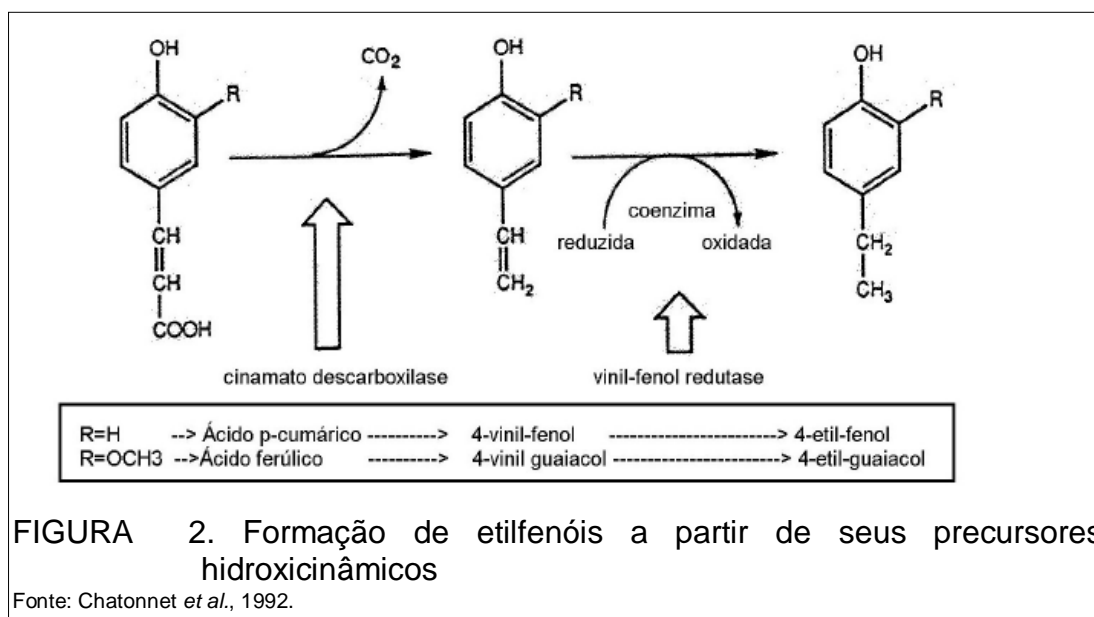
vinho, é possível que eles sejam formados pela ação de bactérias lácticas e acéticas (Chatonnet, 1992).

#### **2.4.2 Tetrahidropiridinas**

As tetrahidropiridinas são responsáveis pelo aroma de rato frequentemente associado com a contaminação por *Dekkera/Brettanomyces*. O aroma das tetrahidropiridinas é amplamente afetado pela sua concentração no vinho (Heresztyn, 1986). Um vinho com baixas concentrações desse composto pode apresentar aroma de pipoca, pão ou bolacha. Mas, em altas concentrações, pode conferir aroma de rato ou cavalo molhado. A ocorrência de aroma de rato não necessariamente indica a contaminação por *Dekkera/Brettanomyces*, pois as tetrahidropiridinas também são sintetizadas por lactobacilos heterofermentativos, como *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus hilgardii*. Os substratos voláteis requeridos para síntese desses compostos são a lisina, o etanol ou o propeno (Heresztyn, 1986; Chatonnet *et al.*, 1992).

#### **2.4.3 Fenóis voláteis**

A origem dos fenóis voláteis envolve a ação sequencial de duas enzimas sobre os ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, *p*-cumárico ou ácido caféico). Primeiro, a enzima hidroxicinamato descarboxilase converte esse ácido hidroxicinâmico em hidroxiestirenos (vinilfenóis), os quais são então reduzidos a derivados etil pela enzima vinilfenol redutase (Edlin *et al.*, 1995). A FIGURA 2 apresenta as reações referentes à formação de etilfenóis a partir de seus precursores hidroxicinâmicos.



Chatonnet *et al.* (1992) mostraram em estudos realizados com as espécies de leveduras *Br. intermedius* e *Br. anomalus*, a capacidade de ambas em descarboxilar ácidos hidroxicinâmicos e subseqüentemente reduzi-los a seus derivados com grupo etil. Em um estudo de Edlin *et al.* (1995), buscando analisar a bioquímica e a fisiologia do metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos e outros fenóis simples por *Br. anomalus*, mostraram que há diferenças na especificidade da enzima hidroxicinamato descarboxilase de cada espécie, e que são essas diferenças que dão origem às distintas características entre as espécies com relação ao seu metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos. A produção desses compostos foi acompanhada por meio da análise dos cromatogramas de HPLC. Observou-se a conversão do ácido p-cumárico em vinilfenol, que então foi convertido a etilfenol. Isso foi observado quando, após 53 horas de fermentação, o composto vinilfenol ter diminuído enquanto a quantidade de etilfenol foi aumentando.

Os fenóis voláteis são especificamente produzidos por *Dekkera/Brettanomyces*. A enzima que facilita a descarboxilação está presente em um grande número de bactérias, fungos e leveduras, mas o passo da redução é realizado principalmente por *Dekkera/Brettanomyces* (Chatonnet *et al.*, 1995; Edlin *et al.*, 1995; Chatonnet *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 2003). A enzima específica de *Dekkera/Brettanomyces*, vinilfenol redutase, está envolvida com um possível benefício metabólico, a reoxidação do NADH (FIGURA 2). Sob condições de baixos níveis de oxigênio, como as encontradas em vinhos, a disponibilidade de NAD<sup>+</sup>, por ser limitada, deveria inibir o metabolismo de carboidratos direcionado à fermentação, denominado Efeito Custer. A redução de vinilfenóis a etilfenóis permitiria a célula, aumentar a disponibilidade de NAD<sup>+</sup> e assim manter as funções metabólicas (Fugelsang & Edward, 1997). Os vinilfenóis diminuem de certa forma, a deficiência do Efeito Custer.

As moléculas mais importantes nesta classe são os precursores 4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol e os produtos 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, respectivamente (Chatonnet *et al.*, 1992). Elevadas concentrações destes compostos em vinhos tintos estão associadas com odor desagradável. Licker *et al.* (1998) apresentaram várias descrições para o aroma apresentado pelo vinho devido à ação de *Dekkera/Brettanomyces*. Entre estas estão estábulo, plástico queimado, suor de cavalo, couro molhado, “Band-Aid” e animal molhado. Há outras descrições como tempero forte, fumaça, cravo da Índia, fenol e remédio. Na forma pura, enquanto o 4-etilfenol exibe um aroma de “Band-Aid”, o 4-etilguaiacol apresenta aroma de madeira queimada, sendo, a

presença destes dois componentes fortes indicadores da presença de *Dekkera/Brettanomyces* (Ostler, 2002).

Inicialmente, a presença de etilfenóis em vinho foi atribuída às bactérias lácticas. De fato, as bactérias lácticas são capazes de produzir quantidades significativas de vinilfenóis. Sob condições enológicas, no entanto, são produzidas somente pequenas quantidades (Dias et al, 2003a).

O limiar de percepção (LP) sensorial do 4-etilfenol é 230 µg/L, portanto pequenas quantidades deste composto são percebidas no vinho (Chatonnet *et al.*, 1990). A variedade da uva usada também afeta a percepção sensorial de etilfenóis. De acordo com o trabalho de Physter & Mills (2004), o LP é alto em vinhos monovarietais como Cabernet Sauvignon e baixo em vinhos Tempranillo.

## **2.5 Fatores que afetam a formação de compostos voláteis por *Dekkera/Brettanomyces***

A formação de fenóis voláteis em vinhos depende da presença de precursores, sendo proporcional a população de *Dekkera/Brettanomyces*. Segundo estudos realizados por Gerbeaux *et al.*, (2000), diferentes linhagens de *Br. bruxellensis* variam em sua capacidade de produzir fenóis voláteis. A produção é sempre maior em concentrações menores de álcool (maior produção em 12% v/v do que em 14% v/v) e em temperaturas mais elevadas que em temperaturas baixas (maior produção em 18°C do que em 13°C).

O crescimento de *Dekkera/Brettanomyces* em meio sintético contendo células de *Sacch. cerevisiae* autolisadas foi estudado por Guilloux-Benatier *et al.* (2001). Sob essas condições foi observado que essas leveduras



contaminantes crescem facilmente, mas a quantidade de etilfenóis formados foi menor do que o esperado, provavelmente por causa da adsorção dos compostos fenólicos por fragmentos da parede celular das células de *Sacch. cerevisiae* autolisadas. Estudos recentes têm mostrado a alta capacidade da parede celular das leveduras em adsorver compostos fenólicos (Morata *et al.*, 2003).

O isolamento de leveduras *Dekkera/Brettanomyces* em vinho é difícil devido ao seu crescimento lento e à presença reduzida (Fugelsang, 1997). Rodrigues *et al.* (2001) desenvolveram o meio seletivo *Dekkera* and/or *Brettanomyces* differential medium (DBDM), que pode ser usado para isolar *Dekkera* spp. a partir de vinhos nos quais elas estão presentes em menos de 1% da microbiota total. Esse meio contém etanol como única fonte de carbono (inibidor de *Hanseniaspora*), cicloheximida (inibidor de *Sacch. cerevisiae*), ácido p-cumárico para revelar a presença de compostos fenólicos de odor desagradável e bromocresol para revelar a produção de ácido acético.

Dias *et al.* (2003a) estudaram a capacidade de algumas leveduras presentes na microbiota do vinho para produzir 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico. Conversões molares de 90% foram apresentadas por *D. bruxellensis*, *D. anomala* e *P. Guillermondii*.

O efeito da fonte de carbono e energia na produção de 4-etilfenol foi estudado por Dias *et al.* (2003b). Quando glicose foi utilizada como única fonte de carbono e energia em meio sintético, a razão de conversão obtida foi de 92,5% e a produção máxima de 4-etilfenol foi de 68,9 mg/L. O início de produção ocorreu na fase de crescimento exponencial e o término de produção

no início da fase estacionária. Quando a única fonte de carbono e energia utilizada foi o etanol, a razão de conversão passou para 83,5%, com produção de 62,2 mg/L de 4-etilfenol. Na presença de trealose e ácido acético, a razão de conversão obtida foi menor que 10% e a produção de 4-etilfenol foi de 4,7 mg/L e 1,8 mg/L, respectivamente.

## **2.6 Degradação de antocianinas**

Sabe-se que a cor do vinho é determinada por vários pigmentos antociânicos derivados da uva. Entre eles estão as piranoantocianinas, que não estão presentes nas uvas, mas são formadas a partir das antocianinas durante a fermentação do mosto e, em seguida, durante a maturação e envelhecimento dos vinhos tintos, via reações de condensação. Malvidina-3-O-glicosídeo representa de 50% a 80% do total das antocianinas encontradas no vinho, e é a principal antociana envolvida em reações de condensação (Guerra, 1998). Vitisinias, adutores vinilfenólicos e piranoantocianinas flavanóis, são os três principais tipos de pigmentos piranoantocianinas. O primeiro é produto da condensação entre antocianinas e os metabólitos glicolíticos acetaldeído e ácido pirúvico, que são liberados por leveduras durante a fermentação. Os adutores vinilfenólicos são formados via condensação entre as antocianinas (malvidina-3-O-glicosídeo) e vinilfenóis. O último tipo são os pigmentos piranoantocianinas flavanóis, formados pela reação entre antociana-piruvato e adutores vinilflavanóis (Morata *et al.*, 2007). As mais interessantes propriedades das piranoantocianinas são a resistência parcial à descoloração através do SO<sub>2</sub> e a maior resistência do que a malvidina-3-O-glicosídeo às modificações de cor pelo pH (Morata *et al.*, 2006). O papel das leveduras neste processo foi

explicado por Morata *et al.* (2007). A fermentação realizada por linhagens *Sacch. cerevisiae* que possuem atividade hidroxicinamato descarboxilase, favorece a formação de adutores vinilfenólicos. Além de *Sacch. cerevisiae*, outros microrganismos do vinho, como *Dekkera/Brettanomyces* possuem esta atividade e portanto são capazes de produzir vinilfenóis (Chatonnet *et al.*, 1992). Dessa forma, vinhos contaminados com *Dekkera/Brettanomyces* possuem uma cor indesejável, porque os vinilfenóis disponíveis são reduzidos para a formação de derivados etil pela enzima vinilfenol redutase (Edlin *et al.*, 1995), influenciando a formação de piranoantocianinas vinilfenólicas (Oelofse *et al.*, 2008).

Outra possível hipótese para perda de cor do vinho causada por leveduras *Dekkera/Brettanomyces*, deve-se ao fato de a maior parte da concentração glicosídica total das uvas compreender antocianinas monoglicosiladas, como, por exemplo, malvidina-O-glicosídeo (Somers *et al.*, 1988). A hidrólise da glicose normalmente resulta na formação de uma antociana correspondente que pode ser convertida a uma pseudobase incolor, conseqüentemente afetando de forma negativa a cor do vinho (Mansfield *et al.*, 2002).

## **2.7 Contaminação da madeira e tratamento dos barris**

*Dekkera/Brettanomyces* têm sido encontradas na madeira dos barris utilizados para estocagem e envelhecimento de vinhos. Essas leveduras sobrevivem a tratamentos onde o contato com SO<sub>2</sub> é limitado, como nas fissuras da madeira. A idade do barril tem grande influência no crescimento de populações de *Dekkera/Brettanomyces* durante o período do envelhecimento

dos vinhos tintos. Barris muito antigos favorecem a contaminação por *Brettanomyces*. A madeira do carvalho é extremamente porosa e quanto maior a profundidade onde se encontra a levedura, maior será a dificuldade de eliminação. Segundo alguns autores, os barris novos também podem favorecer a manutenção de grandes populações de *Brettanomyces*. Como *Brettanomyces* spp. produzem enzima  $\beta$ -glicosidase, essa enzima cliva o dissacarídeo celobiose para formar moléculas de glicose, as quais são utilizadas para crescimento (Ostler, 2002).

Coggan (2003) estudou a sanitização dos barris com ozônio e obteve bons resultados. O procedimento envolve a lavagem com água fria em alta pressão seguida por jatos de água quente (70°C). O barril é então enxaguado por 2-3 min até toda a matéria orgânica ter sido removida. Após o resfriamento, é realizado o tratamento com água ozonizada (2-2,5 mg/L). O método apresentou uma redução de 99,99% na população de *Brettanomyces* utilizando este tratamento.

Segundo Ugarte *et al.* (2005), os etilfenóis aparecem no vinho após a contaminação com *Brettanomyces*, mas sua concentração pode ser reduzida por osmose reversa e adsorção. Por meio dessas técnicas, os autores conseguiram reduzir 77% da concentração inicial de 900  $\mu$ L/L de 4-etilfenol e 4-etil-guaiacol, após um tratamento de 3 horas envolvendo osmose reversa, usando uma membrana apropriada com um equipamento de filtração em fluxo tangencial e uma resina adsorvente hidrofóbica. Nenhuma redução significativa na cor, taninos, corpo e etanol do vinho foi observada. Mas, observou-se uma

redução nos compostos aromáticos, especialmente metil e etil vanilato e outros esteres.

### **2.8 Detecção de *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos**

Características morfológicas ou métodos clássicos de identificação de microrganismos não são adequados para o trabalho de rotina microbiológica em enologia, especialmente durante o processo de vinificação onde o período de aproximadamente uma semana é crucial (Millet & Lonvaud-Funel, 2000; Oelofse *et al.*, 2008). Portanto, várias tentativas têm sido feitas para desenvolver técnicas baseadas em detecção molecular, que permitam uma identificação rápida e confiável dessas espécies (Loureiro & Querol, 1999).

A microscopia de fluorescência pode detectar rapidamente e com exatidão espécies de *Dekkera/Brettanomyces*, utilizando um marcador fluorescente designado para encontrar um fragmento de RNA ribossomal 26S (hibridização RNA-FISH), sem requerer extração de DNA. Esta técnica tem apresentado alta especificidade, a qual usa células de *D. bruxellensis* do vinho centrifugado (Stender *et al.*, 2001).

Técnicas moleculares como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) são rápidas, muito sensíveis e específicas. Geralmente, esses métodos têm foco na amplificação de fragmentos específicos do DNA cromossomal ou RNA ribossomal (Cocolin *et al.*, 2004; Egli & Henick-Kling, 2001).

### **2.9 Controle de *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos**

Existem alguns métodos básicos para prevenção do crescimento de *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos, mas a maioria tem efeitos prejudiciais na qualidade do vinho.

A TABELA 2 apresenta vários métodos para o controle preventivo ou curativo de *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos.

TABELA 2. Métodos opcionais para o controle de *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos.

| Tratamento   | Resultados   | Desvantagem   |
|--|--|---|
| Variáveis físico-químicas:<br>-Temperatura de envelhecimento baixa<br>-pH baixo<br>-Redução do conteúdo de oxigênio<br>-Evitar micro-oxigenação<br>-Alto nível de álcool | Estabelece condições físico-químicas que reduzem a viabilidade celular                   | Essas variáveis podem ser difíceis de modificar em vinhos e podem ser incompatíveis com envelhecimento do vinho |
| Redução da concentração de precursores:<br>-Temperatura de maceração baixa<br>-Evitar atividade de enzimas pectolíticas e enzimas com atividade cinamoil esterase        | Impede a solubilização de ácidos hidroxicinâmicos (precursores de fenóis voláteis)       | Pode causar a perda da cor e aroma  |
| Aditivos:<br>-SO <sub>2</sub><br>-DMDC<br>-Quitosana<br>-Ácido sórbico<br>-Ácido benzóico<br>-Ácido fumárico<br>-Ácido ascórbico<br>-Ácido eritórbico                    | Inibe o crescimento celular e impede as condições que favorecem a formação de etilfenóis | Alguns desses produtos não são autorizados para o uso em vinhos e ainda estão em experimentação                 |
| Técnicas biológicas:<br>-Bacteriocinas<br>-Enzimas bacteriológicas<br>-Zimocinas   | Inibe o crescimento celular  | O uso dessas técnicas em vinho está em experimentação   |
| Engenharia genética:<br>-Leveduras transgênicas  | Leveduras geneticamente modificadas para impedir o crescimento celular de contaminantes  | Atualmente não é permitido na vinificação   |

Fonte: Suarez *et al.* (2007).

Existem vários métodos que podem ser usados para impedir a contaminação do vinho por leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces*. Entre

estes estão a adição de  $\text{SO}_2$ , filtração e uso de temperaturas baixas. Estes procedimentos muitas vezes não são apropriados, pois interferem no desenvolvimento do corpo e das propriedades sensoriais do vinho, conseqüentemente prejudicam a qualidade do produto final (Comitini, 2004).

De acordo com Gerbeaux *et al.* (2000), o controle das variáveis que impedem o crescimento de *Dekkera/Brettanomyces* também é de grande valia, como manter o pH e os níveis de oxigênio tão baixos quanto possível, assegurar que a temperatura de estocagem do vinho seja baixa ( $13^\circ\text{C}$  ao invés de  $18^\circ\text{C}$ ) e impedir macerações muito intensas. Evitar a extração dos precursores de etilfenóis das cascas das uvas, também ajuda a impedir a produção de aromas indesejáveis por essas leveduras. Mas essas precauções vão contra as tendências da vinificação, pois macerações intensas dão corpo, estrutura, cor e aroma ao vinho, além de aumentar os teores de antioxidantes (Gerbeaux *et al.*, 2002).

Certos aditivos podem inibir o crescimento de *Dekkera/Brettanomyces*, sendo o mais comum deles o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ). Em solução, o dióxido de enxofre existe em equilíbrio, dependente do pH, entre a forma de  $\text{SO}_2$  molecular ( $\text{SO}_2 \bullet \text{H}_2\text{O}$ ), bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) e sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). Acredita-se que o  $\text{SO}_2$  molecular é a forma que possui ação antimicrobiana. Por não ter cargas, o  $\text{SO}_2$  molecular passa para o interior da célula rapidamente, por difusão através da membrana plasmática, e sofre dissociação formando íons bissulfito e sulfito, causando uma queda no pH citoplasmático (Fugelsang & Edward, 1997). Nestas condições, os processos de transporte através de membranas, são conseqüentemente inibidos

(Stratford, 2006). Segundo Fugelsang & Edward (1997), a forma mais comum de adicionar SO<sub>2</sub> em vinhos, é o metabissulfito de potássio (MBP). Sabe-se que MBP, rende aproximadamente 57,6% de SO<sub>2</sub> livre. Sabendo-se a quantidade de SO<sub>2</sub> livre e o pH do meio, é possível calcular a quantidade de SO<sub>2</sub> molecular presente, através da Equação 1:

$$[\text{SO}_2 \text{ molecular}] = \frac{[\text{SO}_2 \text{ livre}]}{[1+10^{\text{pH}-1,8}]} \quad (1)$$

Mas é difícil manter sua concentração estável por períodos prolongados de envelhecimento, principalmente em ambientes como os barris, onde o meio é levemente oxidativo. Vinhos tintos com pH 3,65 e doses iniciais de SO<sub>2</sub> livre de 15, 25, 30 e 35 mg/L, após quatro meses de envelhecimento em barris apresentam valores de SO<sub>2</sub> livre de 6, 11, 10 e 15 mg/L, respectivamente (Chatonnet, *et al.*, 1993). A contaminação pode ser evitada, impedindo o crescimento de leveduras indesejáveis, como *Dekkera/Brettanomyces* por meio do uso efetivo de SO<sub>2</sub> e pela redução do oxigênio disponível durante o processo de vinificação, especialmente quando o vinho é transferido de um barril para outro durante o envelhecimento (du Toit *et al.*, 2005). *Dekkera/Brettanomyces* são sensíveis ao dióxido de enxofre. Fugelsang & Edward, (1997) reportaram que aproximadamente 0,8 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular, são necessários para reduzir em 24 horas, 10<sup>4</sup> UFC/mL de vários microrganismos contaminantes. Du Toit *et al.* (2005) investigaram os efeitos do SO<sub>2</sub> em sua forma molecular livre e na forma ligada, e os efeitos do oxigênio na viabilidade e cultivo de uma linhagem de *Acetobacter pasteurianus* A8 e uma linhagem de *Br. bruxellensis* B3a, selecionadas de um vinho



comercial. *Br. bruxellensis* B3a apresentou maior sensibilidade ao SO<sub>2</sub> molecular do que *A. pasteurianus*. A concentração de 0,25 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular impediu seu crescimento e reduziu drasticamente sua viabilidade. A ação do SO<sub>2</sub> em *Brettanomyces* foi rápida, onde as células tiveram sua viabilidade reduzida e sua viabilidade de cultivo completamente perdida em 330 minutos de exposição. Também foi demonstrado que a adição de O<sub>2</sub> ao vinho que contém baixas concentrações de SO<sub>2</sub>, pode levar à sobrevivência e ao crescimento de *Brettanomyces*. Assim, quando se suspeita que o vinho esteja contaminado por *Brettanomyces*, deve-se evitar a exposição excessiva ao O<sub>2</sub> e as concentrações de SO<sub>2</sub> molecular devem ser checadas e ajustadas para 25-35 mg/L de SO<sub>2</sub> livre. Em concentrações excessivas, o SO<sub>2</sub> pode afetar o aroma e a cor do vinho tinto; a reação do SO<sub>2</sub> com a forma vermelha das antocianinas leva ao clareamento da cor do vinho tinto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). A manutenção de valores de pH baixos no vinho é de importância crítica na vinificação, pelo fato de que, nestes baixos valores uma maior porcentagem de SO<sub>2</sub> livre molecular está presente.

Um inibidor alternativo é o dimetil dicarbonato (DMDC). Embora sua efetividade tenha sido comprovada, um estudo recente mostrou que uma dose de 400 mg/L não inibe completamente o crescimento de *Br. anomalus*; podendo apenas reduzir sua população. Em contraste, outras leveduras fermentativas são inibidas por dosagens de 250 a 400 mg/L (Delfini *et al.*, 2002).

A quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina, tem um efeito seletivo sobre *Brettanomyces*, causando um atraso em sua fase de latência em

cultura mista com *Sacch. cerevisiae* (Gómez-Rivas *et al.*, 2004). Outros trabalhos reportaram que *Br. bruxellensis* e *Br. intermedius* não crescem na presença de 3-6 g/L de quitosana, enquanto estes valores não afetam o desenvolvimento de *Sacch. cerevisiae* (Kiskó *et al.*, 2005).

Certos ácidos fracos, como ácido sórbico, ácido benzóico e ácido fumárico têm atividade antifúngica e podem ser usados contra *Dekkera/Brettanomyces*, mas sua ação não é seletiva e não são autorizados para o uso em vinificação. A característica de ação desses ácidos não é matar os microrganismos e sim inibir seu crescimento, devido à extensão da fase lag. Antioxidantes como ácido ascórbico e ácidos eritrórbicos podem ser usados para reduzir a presença de oxigênio durante a maturação, impedindo a formação de etilfenóis (Delfini *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2007).

Os taninos, substâncias biologicamente ativas presentes na uva são quelantes, precipitam proteínas, agem como antioxidantes e atuam sobre bactérias lácticas, pois afetam a constituição lipídica do microrganismo. Atuam sobre determinadas enzimas tanto da membrana como da parede celular. Segundo Chatonnet *et al.* (1997), quando a bactéria *Lactobacillus plantarum* é inoculada com adição de um composto fenólico natural da uva chamado procianidina, a síntese de compostos fenólicos voláteis de odor desagradável efetuada pela bactéria diminui sensivelmente. O maior decréscimo obtido na síntese de 4-etilfenol foi obtido com a adição de 1g/L de taninos do grupo das procianidinas. Este fenol é formado por bactérias lácticas quando o teor de taninos no vinho é menor que 3 g/L, mostrando assim, a interferência de

substâncias orgânicas sobre a síntese microbiológica de compostos indesejáveis.

A competição entre microrganismos é um fenômeno biológico comum. Alguns competem por metais, outros por compostos orgânicos e ainda formam produtos como o próprio etanol, ácido acético e ácido lático, que agem como inibidores do metabolismo. À medida que o processo fermentativo avança, as condições vão se tornando cada vez mais seletivas. Com a mudança gradativa, alguns microrganismos podem ir se adaptando às novas condições, outros vão sendo eliminados do processo ou inibidos. Alguns trabalhos têm mostrado que leveduras e bactérias lácticas se inibem mutuamente e que as substâncias que são liberadas durante a lise celular de leveduras estimulam a atividade de bactérias lácticas (Silva, 2003b). Silva & Ficagna (2003) realizaram um trabalho com a linhagem *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 constatando que ela é produtora de SO<sub>2</sub>, apresentando potencial inibidor de bactérias lácticas durante a fermentação alcoólica. Esta linhagem foi isolada de uvas provenientes da região do Vale dos Vinhedos no ano de 1997 e foi caracterizada por produzir vinhos com baixa acidez volátil (menor que 3 mEq/L) e teor alcoólico acima de 11°GL. Tem capacidade de consumir o açúcar do mosto até concentrações de açúcar residual abaixo de 3 g/L, sendo resistente ao emprego de altas concentrações de SO<sub>2</sub> (125 mg/L) (Silva et al, 2005a).

Outros inibidores que podem ser citados são os ácidos orgânicos, que atuam alterando as funções da membrana celular. Esses ácidos interferem na estabilidade e manutenção do gradiente funcional da membrana. Em

bactérias, o ácido acético age como desacoplador. Quando a concentração de ácidos não dissociados é elevada, há um colapso do gradiente de pH através da membrana, resultando em inibição total do metabolismo celular (Pampulha & Loureiro, 1989). Sendo produtoras de elevadas concentrações deste ácido, leveduras deterioradoras, como *Dekkera/Brettanomyces*, podem comprometer não apenas a fermentação maloláctica, fermentação esta efetuada por bactérias lácticas autóctones, mas também afetar a velocidade de crescimento da *Sacch. cerevisiae*. Abbott *et al.* (2005) verificaram que *Brettanomyces* cresce mais rapidamente que *Sacch. cerevisiae* quando a concentração de ácido acético é elevada.

Outro agente inibidor considerável é o etanol. Causa alterações na permeabilidade da membrana plasmática das leveduras promovendo o vazamento de constituintes intracelulares ou a entrada de substâncias tóxicas extracelulares, alterando a composição do citoplasma. Os distúrbios causados pelo etanol induzem a acidificação intracelular devido à entrada de prótons ( $H^+$ ) na célula. Trabalho desenvolvido por Quintas *et al.* (2000) avaliou o efeito do etanol sobre leveduras deteriorantes e constatou que ao inocular essas leveduras em um meio com altas concentrações de etanol e à temperatura de 30°C, a integridade da célula fica comprometida, perdendo a viabilidade celular. A concentração de 13% (v/v) de etanol inibiu completamente o crescimento de *D. bruxellensis* ISA 1791 e a produção de etilfenóis de acordo com o estudo realizado por Dias *et al.* (2003).

Existe entre as leveduras, um grupo de inibidores potentes e específicos que atuam diretamente e especialmente sobre leveduras

geralmente da mesma espécie. Este grupo é caracterizado por apresentar fator *killer* (Jacobs e Van Vuuren, 1991; Silva, 1996; Silva, 1999a; Silva, 1999b; Silva, 2003b). A ação deve-se a uma proteína secretada, que mata ou inibe células de leveduras sensíveis. A linhagem *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 foi isolada de vinhedos da região de Bento Gonçalves/RS em 1984 e trata-se de uma levedura que sintetiza fator *killer*, e possui forte capacidade de matar linhagens sensíveis, com estabilidade e com amplo espectro de ação (Silva, 1996). O fenótipo *killer* foi primeiramente descrito em *Sacch. cerevisiae* em 1963 por Makover e Bevan. Esse fenômeno não é restrito ao gênero *Saccharomyces*, também pode ser encontrado entre muitos outros gêneros de leveduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (Young e Yagiu, 1978; Hodgson *et al.*, 1995; Bostian *et al.*, 1980). As leveduras podem apresentar fenótipo *killer*, matando células sensíveis; fenótipo sensível, que apresenta sensibilidade à toxina *killer*; e fenótipo neutro, que não mata células sensíveis nem apresenta sensibilidade às células *killer* (Silva, 2003). As linhagens *killer* são imunes ao seu próprio fator *killer*, mas permanecem susceptíveis às toxinas secretadas por outras leveduras *killer* (Young e Yagiu, 1978; Schmitt e Breinig, 2002; Silva, 2003). A ação de matar não depende do contato entre as células, porque a toxina *killer* é secretada para o meio. Isso foi confirmado em um trabalho realizado por Comitini *et al.* (2004), onde duas linhagens de levedura, *Pichia anomala* (DBVPG 3003) e *Kluyveromyces wickerhamii* (DBVPG 6077), foram semeadas em meios líquidos e os sobrenadantes foram testados para a habilidade de

matar *D. bruxellensis*, por meio de um ensaio do teste de poço. Este teste confirmou que a ação de matar se dá devido a fatores extracelulares e as toxinas mostraram um efeito fungicida estável contra *D. bruxellensis* em vinho por no mínimo 10 dias. Dois plasmídeos de RNA de fita dupla (dsRNA) com funções e tamanho molecular diferentes estão envolvidos com a produção das toxinas *killer* de *Sacch. cerevisiae* (Schmitt e Tipper, 1990). Esses plasmídeos são chamados L-dsRNA (large), que codifica uma RNA polimerase e proteínas do capsídeo, e M-dsRNA (medium), que codifica para produção da toxina e confere imunidade celular (Young e Yagiu, 1978).

A competição microbiológica no ambiente do vinho também é bastante estudada e pode estar envolvida no controle de *Dekkera/Brettanomyces*. No trabalho realizado por Renouf *et al.* (2006), as interações que ocorrem entre as diferentes populações de leveduras encontradas no mosto de uva durante os estádios iniciais da vinificação foram estudadas. Dois grupos podem ser distinguidos, o grupo *Saccharomyces* e o grupo não-*Saccharomyces* (NS). No início da fermentação alcoólica, a levedura NS que mais se adaptou foi *Br. bruxellensis*, mostrando maior resistência às condições de limitação de açúcar e aumento de álcool no fim da fermentação alcoólica do que a própria *Sacch. cerevisiae*.

Dias *et al.* (2003) realizou o cultivo de *D. bruxellensis* ISA 1791 em cultura mista com *Sacch. cerevisiae*, em meio sintético, e mostrou que o número de células de *D. bruxellensis* aumentou de  $10^4$  UFC/mL para  $5 \times 10^9$  UFC/mL. Os autores também realizaram microvinificações com mosto de uva branca e uva tinta, inoculadas com menos de 10 UFC/mL de *D. bruxellensis* e

$10^7$  células/mL de *Sacch. cerevisiae* e obtiveram cerca de  $5 \times 10^8$  UFC/mL de *D. bruxellensis*. Além disso, a produção de 4-etilfenol foi observada somente após o fim da fermentação do mosto.

Linhagens de *Sacch. cerevisiae* apresentam metabolismo secundário distinto. Além disso, determinadas linhagens formam produtos do metabolismo em velocidades diferentes. Linhagens que sintetizam etanol,  $SO_2$ , fator *killer* ou outro metabólito inibidor em velocidade mais elevada podem exercer uma ação seletiva mais forte que as linhagens de metabolismo mais lento. *Br. intermedius* cultivada em aerobiose precisou de 7 a 8 horas para se adaptar às condições anaeróbicas (Wijsman *et al.*, 1984). Além disso, *Brettanomyces* apresenta, em condições normais, crescimento mais lento que *Sacch. cerevisiae* (Abbott e Ingledew, 2005). Sabe-se que a levedura *Sacch. cerevisiae* 1vvt/97, uma das linhagens empregadas neste trabalho, é capaz de formar 10 °GL de etanol em quatro dias, com um rápido consumo de açúcares (Silva *et al.* 2005b). Nestas condições, leveduras com velocidade mais baixa de crescimento e de fermentação podem não resistir à pressão e se tornar inviáveis.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das culturas

As duas linhagens de *Sacch. cerevisiae* pertencem a coleção de culturas da EMBRAPA UVA e Vinho – CNPUV – Bento Gonçalves/RS. A linhagem neutra EMBRAPA 1vvt/97 foi isolada de vinhedos da região do Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves/RS por Silva em 1997. A linhagem *killer* *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 foi isolada de vinhedos da região de Bento Gonçalves/RS por Silva em 1984.

A linhagem *Br. custersianus* NRRL Y-6653 é a cepa tipo da espécie *Br. custersianus*, gentilmente cedida pelo Dr. Cletus Kurtzman dos EUA.

#### 3.2 Manutenção das culturas

As culturas *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97, *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 e *Br. custersianus* NRRL Y-6653 foram mantidas em meio de cultivo Ms (Mosto sólido - 10 g/L extrato de levedura (Bacto™ Yeast



Extract), 20g/L de agar (Bacto™ Agar) e 25% de mosto de uva) inclinado à temperatura de 18°C.

### 3.3 Crescimento de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653

Foram preparados frascos de Fernbach contendo 600mL dos meios G7 (com 10 g/L de sacarose) (Silva & Almeida, 2006), G7-100 (G7 com modificações, contendo 100 g/L de sacarose) e meio M (Mosto líquido - 10 g/L extrato de levedura (Bacto™ Yeast Extract) e 25% de mosto de uva). Em cada meio de cultura foram inoculados células de *Br. custersianus* NRRL Y-6653, perfazendo um total de 100 mL. Os inóculos foram incubados em agitador giratório (New Brunswick Scientific CO, Inc-PsychroTherm™, USA) a 24°C e com rotação de 150 rpm, durante 16 horas. O inóculo foi adicionado ao restante do meio de cultura, que recebeu sistema de aeração com fluxo de ar de 14,5 cm<sup>3</sup>/s a 23-24°C. Ao longo de 32 horas, o crescimento foi avaliado em espectrofotômetro (PerKin Elmer Lambda Bio - USA) pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm (Pringle & Mor, 1975) e a acidez volátil foi monitorada conforme item 3.5.4.

### 3.4 Tratamentos

Foram utilizadas três inoculações individuais e duas mistas, sendo elas:

- (Tratamento 1 - T1): A linhagem neutra *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 (10% v/v, 10<sup>7</sup> cel/mL)
- (T2): A linhagem *killer Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 (10% v/v, 10<sup>7</sup> cel/mL)

- (T3): EMBRAPA 1vvt/97 (5% v/v,  $10^7$  cel/mL) e *Br. custersianus* (NRRL Y-6653) (5% v/v,  $10^7$  cel/mL)
- (T4): EMBRAPA 91B/84 (5% v/v,  $10^7$  cel/mL) e *Br. custersianus* (NRRL Y-6653) (5% v/v,  $10^7$  cel/mL)
- (T5) *Br. custersianus* (NRRL Y-6653) (10% v/v,  $10^7$  cel/mL).

### **3.5 Preparo do inóculo e vinificação**

#### **3.5.1 Inóculo**

As células foram inoculadas em frascos de Fernbach de 2.800 mL, contendo 1 L de meio M. Foram utilizados dois frascos para cada cultura. As culturas de *Sacch. cerevisiae* e *Br. custersianus* NRRL Y-6653 foram incubadas em agitador giratório (New Brunswick Scientific CO, Inc-PsychroTherm™, USA) a 25°C e com rotação de 150 rpm por 16 horas. As culturas foram transferidas para recipientes de vidro de 20 L, com sistema de aeração (fluxo de ar de 56,8 cm<sup>3</sup>/s) contendo 10 L de meio M. O crescimento foi monitorado por contagem de células em câmara de Neubauer melhorada (Superior-Germany). Ainda na fase exponencial de crescimento, o sistema de aeração foi desligado. Nestas condições, o microrganismo permaneceu 24 horas. As células foram centrifugadas em centrífuga contínua CEPA (New Brunswick – Germany a 20.000 x g. A biomassa foi utilizada como inóculo para vinificação.

#### **3.5.2 Vinificação**

A vinificação foi realizada com os tratamentos T1, T2, T3 e T4. A fermentação seguiu o processo tradicional de vinificação em tinto (Apêndice 2) com modificações, compreendendo: desengaçamento, esmagamento das

uvas, não-chaptalização, não-adição de SO<sub>2</sub>, inoculação, fermentação alcoólica com maceração de 6 dias, remontagens (duas vezes ao dia com imersão do chapéu), descuba, trasfegas, atestos, monitoramento da fermentação maloláctica, estabilização, engarrafamento e armazenagem. Para cada 17 litros de mosto Cabernet Sauvignon foi utilizado 10% de suspensão de células contendo 10<sup>7</sup> células/mL para tratamentos individuais e no caso dos tratamentos mistos utilizou-se 5% da linhagem de *Sacch. cerevisiae* e 5% da linhagem *Br. custersianus* NRRL Y-6653 na mesma concentração. Em cada recipiente foi colocada uma válvula de Müller. Os recipientes permaneceram em temperatura de 24-25°C.

### **3.6 Análises químicas de avaliação quantitativa**

Durante a fase tumultuosa da fermentação, foram realizadas análises de teor alcoólico, açúcares redutores totais (ART), pH e compostos voláteis. Na fase lenta da fermentação, semanalmente foi efetuado o monitoramento da fermentação maloláctica, e ao término da mesma, as análises de acidez volátil e anidrido sulfuroso livre (SO<sub>2</sub> livre) foram realizadas.

Após o período de estabilização, que corresponde a 6 meses, foram realizadas análises de teor alcoólico, açúcares redutores totais, acidez total, acidez volátil, pH, anidrido sulfuroso total (SO<sub>2</sub> total), anidrido sulfuroso livre (SO<sub>2</sub> livre), extrato seco total, extrato seco reduzido, antocianas totais, taninos totais, análises de cor, polifenóis e antioxidantes.

#### **3.6.1 Teor alcoólico**

A análise de teor alcoólico foi feita primeiramente pela alcalinização e destilação da amostra em aparelho Destilador Eletrônico Enoquímico

Gibertini (Itália) e em seguida foi medido o grau alcoólico por densimetria utilizando o Densímetro Digital Anton Paar DM45 com módulo SP2 (Áustria), equipado com sistema de refrigeração HAAKE G e com controle de temperatura HAAKE D3 (Alemanha), de acordo com Ribéreau-Gayon *et al.* (1982).

### **3.6.2 Açúcares redutores totais (ART)**

Para realização da análise de teor de açúcares redutores totais, a amostra reagiu com uma solução cupro-alcalina, onde os íons cúpricos em excesso foram determinados por iodometria segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (1982). A quantidade de açúcares redutores totais foi expressa em g/L.

### **3.6.3 Acidez total**

Para a análise de acidez total foi realizada a titulação química utilizando-se o azul de bromotimol como indicador do final da reação, até aparecimento da cor azul. O titulante usado foi hidróxido de sódio 0,1 N. A acidez total é expressa em mEq/L.

### **3.6.4 Acidez volátil**

Para a análise de acidez volátil foi utilizado o aparelho Cazenave-Ferre equipado com uma coluna de refrigeração de 40 cm seguido de titulação química, utilizando fenolftaleína como indicador final da reação até aparecimento da cor rosa. O titulante foi hidróxido de sódio 0,1 N. A acidez volátil foi expressa em mEq/L.

### 3.6.5 pH

A medida do pH foi realizada através de um potenciômetro (PA 200 - Marconi), efetuando-se a medida da diferença de potencial entre dois eletrodos mergulhados na amostra.

### 3.6.6 Anidrido sulfuroso total (SO<sub>2</sub> total)

O anidrido sulfuroso total foi analisado pelo método proposto por Ribéreau-Gayon *et al.* (1982). O anidrido sulfuroso é liberado de suas combinações num meio alcalino e titulado diretamente pelo iodo tendo o amido como indicador. A quantidade de anidrido sulfuroso total foi expressa em mg/L.

### 3.6.7 Anidrido sulfuroso livre (SO<sub>2</sub> livre)

O anidrido sulfuroso livre foi analisado pelo método proposto por Ribéreau-Gayon *et al.* (1982). Foi realizada uma acidificação enérgica, onde o SO<sub>2</sub> é oxidado diretamente pelo iodo até alcançar coloração azulada, utilizando o amido como indicador. A quantidade de anidrido sulfuroso livre foi expressa em mg/L.

### 3.6.8 Extrato seco total

O extrato seco foi calculado indiretamente através de densimetria, onde a densidade do resíduo sem álcool ( $d_r$ ) é calculada utilizando a fórmula de Tabarié abaixo:

$$d_r = d_v - d_a + 1,000 \quad (2)$$

onde,

$d_v$ : densidade do vinho à 20°C em relação à densidade da água a 20°C.

$d_a$ : densidade à 20°C da mistura hidroalcoólica em relação com a densidade da água a 20°C.

A densidade foi determinada por meio do densímetro digital Anton Paar DMA45 (Áustria). O extrato seco total foi quantificado em g/L por meio da tabela de Ackermann (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

### **3.6.9 Extrato seco reduzido**

O extrato seco reduzido corresponde ao extrato seco total descontando os açúcares totais excedentes de 1 grama (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

### **3.6.10 Monitoramento da fermentação malolática**

O monitoramento da fermentação malolática foi realizado por meio da cromatografia de papel ascendente. Os principais ácidos orgânicos do vinho (tartárico, málico, láctico e succínico) migram em velocidades diferentes, o que permite sua identificação qualitativa. A solução utilizada para revelação foi preparada misturando 50 mL de butanol com azul de bromotimol e 20 mL de ácido acético a 50% segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (1982).

## **3.7 Análises químicas de avaliação qualitativa**

### **3.7.1 Cor**

Para realização da análise de cor foi realizada a leitura em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio (USA), utilizando comprimento de onda de 420, 520 e 620 nm segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2000). Os comprimentos de onda 420, 520 e 620 nm medem, respectivamente, a cor amarela/marrom, vermelha e violeta/azul dos vinhos.

### **3.7.2 Taninos totais**

Para a análise de taninos foi utilizada a metodologia empregada por Ribéreau-Gayon *et al.* (2000), onde foram preparadas duas baterias de tubos de

ensaio (A e B). Os tubos de ensaio da bateria A sofreram hidrólise ácida, enquanto os tubos da bateria B ficaram em repouso durante o mesmo período. A leitura foi realizada em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio (USA) com comprimento de onda de 550 nm. A quantidade de taninos foi expressa em g/L, por meio da diferença entre as duas baterias.

### **3.7.3 Antocianas totais**

Para análise de antocianas foram preparadas duas baterias de tubos de ensaio com tampa rosqueada (A e B). Na bateria A, adicionaram-se 1 mL de vinho, 1 mL de etanol 0,1% em HCl e 10 mL de ácido clorídrico 2%. Na bateria B, adicionaram-se 1 mL de vinho, 1 mL de etanol 0,1% em HCl e 10 mL de solução tampão (pH 3,5). A leitura das duas baterias foi realizada em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio (USA) com comprimento de onda de 520 nm. A quantidade de antocianinas foi expressa em mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

### **3.7.4 Polifenóis**

A análise de compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme Klenar *et al.*, (2004) e Teszlák *et al.*, (2005) com modificações sugeridas por Silva *et al.* (2007). Para a curva padrão, foi feita uma solução com água destilada, ácido gálico (como padrão), reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de cálcio (como solução tampão). Após duas horas de repouso em estufa à 25°C, foi realizada a leitura em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio (USA) a 765nm. Os valores obtidos foram submetidos à análise de regressão para determinação do coeficiente angular, do interceptor e do coeficiente de determinação. Em seguida, repetiu-se este

procedimento substituindo o ácido gálico pelas amostras (diluídas em água na proporção de 0,1:2 mL). Os valores obtidos nesta leitura foram calculados por meio da equação linear obtida pela análise de regressão. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (mg/L).

### **3.7.5 Antioxidantes**

A análise de compostos antioxidantes foi realizada utilizando o método proposto por Brand–Williams *et al.* (1995) com modificações sugeridas por Silva *et al.* (2007). A curva padrão foi determinada com uma solução de Trolox como padrão (Vitamina E) e solução de Difenilpicril hidrazil (DPPH). Após quinze minutos de repouso em estufa à 25°C, foi realizada a leitura em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio (USA) a 515 nm. Os valores obtidos foram submetidos à análise de regressão para determinação do coeficiente angular, do interceptor e do coeficiente de determinação. Em seguida, se repetiu este procedimento substituindo o Trolox pelas amostras (diluídas em água na proporção de 0,1:2 mL). Os valores obtidos nesta leitura foram calculados por meio da equação linear obtida pela análise de regressão. Os resultados foram expressos em equivalente de Trolox ( $\mu\text{M}$ ).

## **3.8 Vinificação *in vitro***

### **3.8.1 Teste de velocidade de fermentação**

Para acompanhar a curva de fermentação dos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, a produção de  $\text{CO}_2$  foi observada através da pesagem diária (Ciani e Ferraro, 1996; Giudici e Zambonelli, 1992), durante 18 dias consecutivos, de tubos de ensaio contendo 9 mL de mosto Cabernet Sauvignon estéril (121°C/30 min) inoculado com 1 mL de suspensão de células



( $10^7$  células/mL) à 25°C, de acordo com os tratamentos descritos no item 3.3. A diferença de peso ao longo do tempo corresponde as moléculas de CO<sub>2</sub> (em gramas) produzidas e liberadas pelos microrganismos durante a fermentação.

### 3.8.2 Inibição ou estímulo do metabolismo

Os tratamentos T1, T2 e T5 foram submetidos ao teste de velocidade de fermentação (item 3.7.1) com modificações. Ao mosto foram adicionados diferentes volumes de uma solução de 1g/L de 4-etilfenol (Fluka) e ácido acético glacial 100% (Merck), separadamente, para T1 e T2, e extrato de levedura não comercial (ELNC) (Silva e Almeida, 2006) para T5 (TABELA 3). A solução de 4-etilfenol e o ácido acético glacial foram esterilizados em unidade filtrante descartável Millex (0,22 µm de diâmetro de poro) (Millipore), e o ELNC foi autoclavado por 30 min/121°C. As pesagens foram realizadas por 5 dias.

TABELA 3: Volumes de 4-etilfenol, ácido acético e ELNC adicionadas ao mosto de Cabernet Sauvignon.

| 4-etil-fenol (1g/L)  | Ácido acético 100%   | ELNC                 |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Concentração (µg/mL) | Concentração (µL/mL) | Concentração (µL/mL) |
| 19,60                | 47,62                | 90,91                |
| 14,77                | 38,46                | 69,77                |
| 9,90                 | 29,12                | 47,62                |
| 4,97                 | 19,60                | 24,39                |
| 0,00                 | 9,90                 | 9,9                  |
|                      | 7,44                 | 7,44                 |
|                      | 4,97                 | 4,98                 |
|                      | 2,49                 | 2,49                 |
|                      | 0,00                 | 0,00                 |

### **3.9 Teste de tolerância ao dióxido de enxofre**

Os tratamentos T1, T2 e T5 foram submetidos ao teste de velocidade de fermentação com modificações (item 3.7.1). Ao mosto foram adicionadas diferentes concentrações de uma solução de dióxido de enxofre 6%, sendo elas 25, 50, 75, 100 e 125 mg/L. As pesagens foram realizadas por 5 dias.

### **3.10 Análises instrumentais**

#### **3.10.1 Cromatografia gasosa**

A quantificação de compostos voláteis, como acetaldeído, acetato de etila, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, foi realizada por meio de cromatógrafo de gás Perkin Elmer AutoSystem XL equipado com: detector de ionização de chama a 260°C; coluna capilar Chrompack Capillary Column, modelo CP-Wax 57 CB (comprimento de 50 m, diâmetro externo de 0,25 mm e diâmetro interno de 0,2 µm). Como padrão interno (PI) foi utilizada uma solução de 4-metil-2-pentanal (810 µg/mL). Foram adicionados 100 µL do PI a 1 mL da amostra e após homogeneização, 1 µL foi utilizado para injeção, de acordo com as condições descritas abaixo:

- Temperatura inicial: 40°C por 5 minutos
- Rampa de aquecimento: 2°C/min por 10 minutos até atingir 60°C
- Rampa de aquecimento: 15°C/min por 17,5 minutos até atingir 220°C.

Os tempos de retenção estão expostos na TABELA 4.

TABELA 4: Tempos de retenção dos compostos analisados por cromatografia gasosa

| Compostos          | Tempos de retenção (min) |
|--------------------|--------------------------|
| acetaldeído        | 3,702                    |
| acetato de etila   | 5,492                    |
| Metanol            | 5,964                    |
| propanol-1         | 10,615                   |
| 2-metil-1-propanol | 13,483                   |
| 2-metil-1-butanol  | 18,824                   |
| 3-metil-1-butanol  | 18,915                   |

A concentração final de cada componente é obtida pela equação 3:

$$C = A \cdot F \cdot F_{pi} \cdot F_{vol} \quad (3)$$

Onde:

A: área do composto no cromatograma.

F: fator do composto que corresponde ao coeficiente angular obtido através da curva padrão.

F<sub>pi</sub>: fator do padrão interno, que é a área teórica a ser obtida pelo PI dividida pela área do PI obtida no cromatograma.

F<sub>vol</sub>: é o fator de correção do volume.

### 3.11 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância a comparação das médias e análise de regressão. A programação para as análises de variância e comparação de médias foi efetuada utilizando o programa anvarkey (Apêndice 1), gentilmente cedido por Gildo Almeida da Silva. As análises acima citadas e as análises de regressão foram realizadas utilizando o R Program (Venables *et al.*, 2004).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção do meio de cultura para o crescimento de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653

*Dekkera/Brettanomyces* possuem crescimento lento, frequentemente são requeridos vários dias para que as colônias apareçam em meios de cultura sólidos (Fugelsang & Edwards, 1997). Em meios de cultura líquidos, este fato também foi observado, uma vez que a fase estacionária de crescimento foi obtida em 28 horas, para os meios M e G7-100, e 32 horas para o meio G7 (FIGURA 3); tempo superior ao requerido por *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84, que em meio complexo (25 g/L de sacarose, 2 g/L de extrato de levedura, 6 g/L de  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ , 5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) é de aproximadamente 8 horas (Silva, 1996).

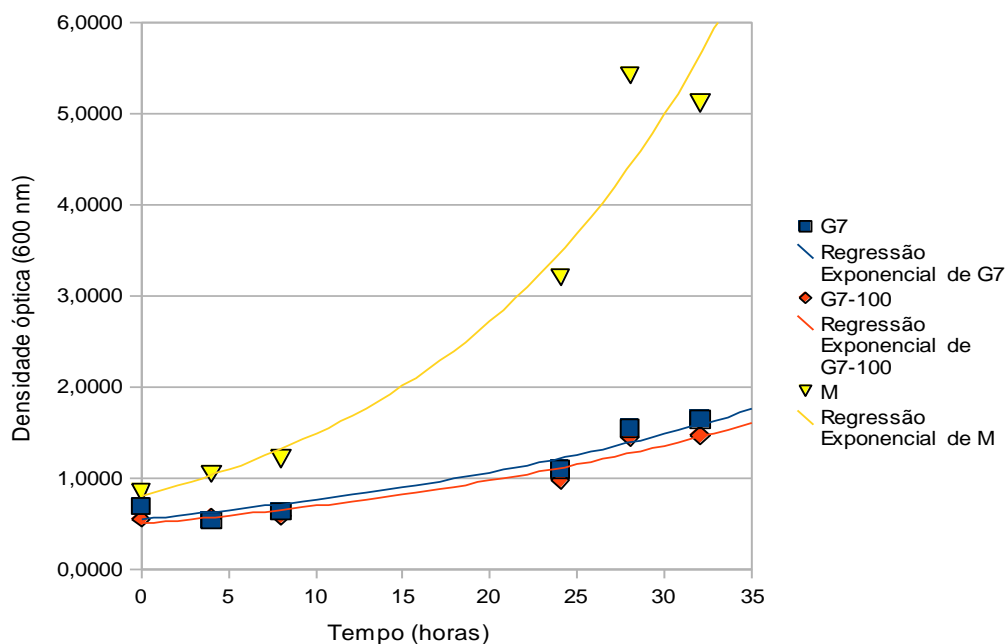


FIGURA 3 Medidas de densidade óptica (600nm) de células de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 durante 32 horas de inoculação em condições aeróbicas em diferentes meios de cultura, onde (■) G7, (◆) G7-100 e (▼) M.

O comportamento da densidade óptica (DO) ao longo do tempo apresentou uma fase exponencial que é expressa pelas equações referenciadas na TABELA 5.

TABELA 5: Equações exponenciais dos meios de cultura M, G7 e G7-100 com relação à DO em 600 nm.

| Meio de cultura | Equação exponencial | $r^2$  |
|-----------------|---------------------|--------|
| M               | $0,791e^{0,063t}$   | 0,98   |
| G7              | $0,452e^{0,041t}$   | 0,977  |
| G7-100          | $0,4530e^{0,0372t}$ | 0,9378 |

Como pode ser visto, a taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{max}$ ) foi para este microrganismo em meio M de 0,063/h. Isto significa que o tempo de geração do microrganismo neste meio foi de 11 horas. Enquanto o

tempo de geração para o meio G7 e G7-100 foi de 16,9 e 18,7 horas, respectivamente. Em outros estudos realizados com a linhagem *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 taxa de crescimento apresentada foi de 0,428/h (Silva, 1996). Abbot *et al.* (2005) também verificaram que as taxas de crescimento de *Brettanomyces* eram menores do que as de *Sacch. cerevisiae*.

Embora os meios de cultura G7, G7-100 e M sejam complexos, melhores condições de crescimento foram oferecidas pelo meio M, possivelmente por apresentar mosto de uva em sua composição. Leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* são exigentes nutricionalmente, preferem ambientes ricos em etanol e açúcares fermentescíveis, quantidades adequadas de biotina e tiamina, e também habitam locais onde se desenvolvem microrganismos formadores e doadores de vitaminas (Silva, 2003c). As uvas consistem primeiramente de glicose e frutose, com quantidades menores de sacarose. Esse dissacarídeo é fermentescível porque *Saccharomyces* produz uma enzima extracelular chamada invertase, que promove a hidrólise da sacarose em glicose e frutose (Dickinson & Kruckeberg, 2006). Mas nem todas as leveduras são capazes de metabolizar sacarose, presumivelmente devido à ausência de expressão da invertase, como por exemplo algumas espécies de *Candida* (Ahearn, et al, 1977) e *Metschnikowia* (Lachance *et al.*, 2001). O meio G7-100 continha em sua composição 100 g/L de sacarose, e apesar de fornecer quantidade de sacarose superior, apresentou a menor taxa de crescimento durante todo o período de incubação. É possível que a alta concentração de sacarose possa ter fornecido condições de alta osmolaridade externa, de modo a dificultar a entrada de substrato na célula. Outra

possibilidade está relacionada com a incapacidade ou uma possível deficiência de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 em sintetizar a enzima invertase, interferindo desta forma, no crescimento do microrganismo nos meios G7 e G7-100. Van der Walt (1984) reportou a incapacidade de *Br. custersianus* em fermentar galactose, maltose, lactose, rafinose e sacarose, sendo positiva apenas para glicose. Já a capacidade de assimilação para sacarose foi positiva fraca. Outros autores (Lee & Jong, 1986; Barnet, 1990) descreveram a fermentação de *Br. custersianus* como sendo positiva apenas para glicose e trealose, enquanto a assimilação foi fraca para glicose, trealose e sacarose. Trinta e cinco linhagens de *Br. bruxellensis* foram avaliadas quanto as características fisiológicas por Coterno *et al.* (2006). Todas elas apresentaram capacidade de utilização de sacarose em meio de cultura como única fonte de carbono. Sabe-se que existem diferenças metabólicas dentro de um mesmo gênero ou espécie. No caso de *Sacch. cerevisiae* e sua relação com as características do vinho, ocorrem variações na produção de glicerol, ácido acético ou sulfito de hidrogênio dependendo da linhagem utilizada (Henschke, 1997).

A presença de fenóis voláteis e acidez volátil está relacionada com defeitos do vinho causados pela contaminação de *Dekkera/Brettanomyces* (Heresztyn, 1986; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Freer, *et al.*, 2002; Freer, *et al.*, 2003). O ácido acético é o maior componente do vinho que está associado com acidez volátil. Freer (2002) reportou que a espécie *Br. custersianus* NRRL Y-6653, ao utilizar glicose como fonte de carbono e energia, em condições aeróbicas, não produziu ácido acético. Os resultados aqui obtidos não concordam com o trabalho de Freer (2002), visto que durante

o crescimento de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 no meio M, em condições de aerobiose, ocorreu a formação de 17 mEq/L ou 1,02 g/L de ácidos voláteis a partir do mosto de uva, sendo este valor considerado bastante elevado para vinhos (FIGURA 4).

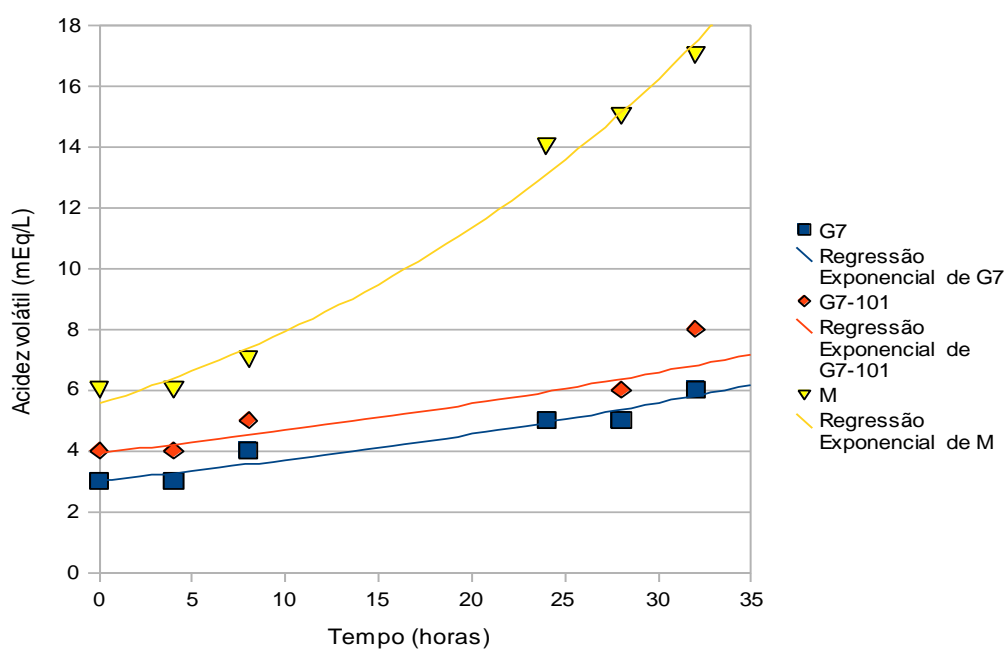


FIGURA 4 Valores de acidez volátil (g/L) dos meios de cultura contendo *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653, durante 32 horas de inoculação em condições aeróbicas à 23-24°C, onde (■) G7, (◆) G7-100 e (▼) M.

A relação entre acidez volátil e o tempo, está referenciada nas equações abaixo (TABELA 6).



TABELA 6: Equações exponenciais dos meios de cultura M, G7 e G7-100 com relação à acidez volátil.

| Meio de cultura | Equação exponencial        | r <sup>2</sup> |
|-----------------|----------------------------|----------------|
| M               | 0,3122e <sup>0,038t</sup>  | 0,9922         |
| G7              | 0,1819e <sup>0,0202t</sup> | 0,9029         |
| G7-100          | 0,2325e <sup>0,017t</sup>  | 0,7314         |

Segundo Abbot *et al.* (2005), a baixa produção de ácido acético, na presença de altas concentrações de glicose, ocorre devido à repressão catabólica e/ou diminuição do número de células de *Brettanomyces*. Os resultados aqui obtidos concordam com os apresentados por Abbot *et al.* (2005).

A relação entre a acidez volátil (AV) e o crescimento expresso em DO do meio M, está referenciada na equação logarítmica (4) a seguir:

$$AV = 5,52 \cdot \ln(DO) + 6,34 \quad (r^2 = 0,97) \quad (4)$$

Por apresentar uma taxa de crescimento superior, o meio M foi selecionado para realizar o crescimento de *Br. custersianus* NRRL Y-6653, para posterior inoculação em mosto de Cabernet Sauvignon, no início do processo de vinificação.

## 4.2 Análises químicas de avaliação quantitativa da fase tumultuosa da fermentação

### 4.2.1 Açúcares redutores totais (ART) e teor alcoólico

O mosto Cabernet Sauvignon contendo 230 g/L de ART foi inoculado com *Sacch. cerevisiae* e *Brettanomyces*, de acordo com os tratamentos T1, T2, T3 e T4 (item 3.3). Os resultados das análises de ART dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 durante a fermentação tumultuosa estão dispostos na FIGURA 5.

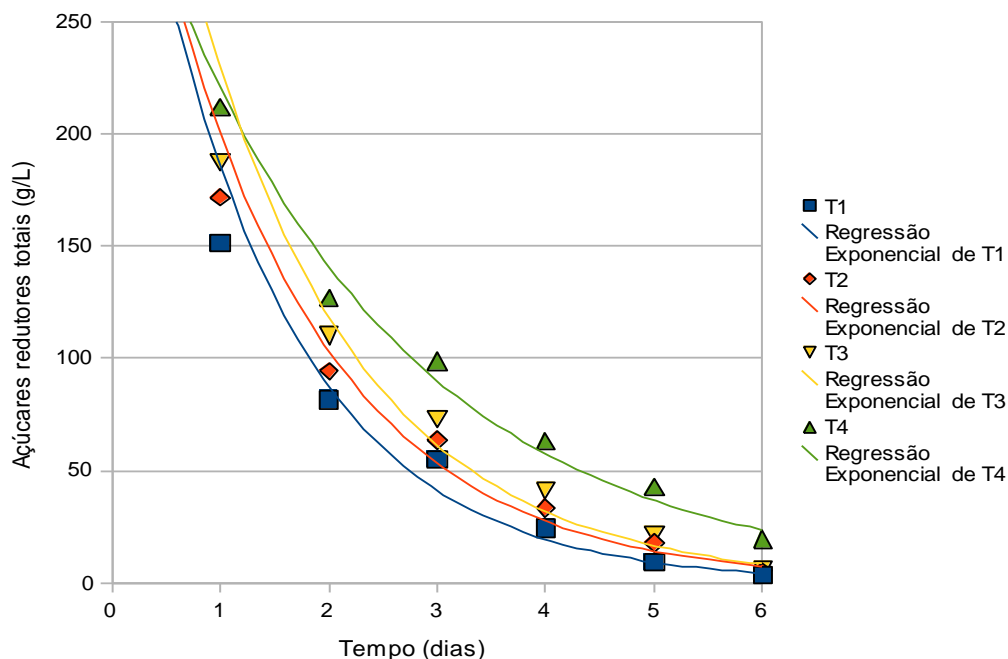


FIGURA 5 Concentração de açúcares redutores totais ART (g/L) dos mostos submetidos aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fase da fermentação tumultuosa à 25°C.

Os resultados obtidos no período de 24 horas indicam ter havido uma inibição da linhagem contaminante sobre as duas outras de *Sacch. cerevisiae* (T3 e T4). O consumo de ART neste período foi de 78,7; 58,5; 42,7 e 18,5 g/L em T1, T2, T3 e T4, respectivamente. Em 6 dias, os teores de ART residuais dos tratamentos T1, T2 e T3 se igualaram, assim como a concentração de etanol (FIGURA 6). As velocidades de queda dos valores de ART residual tiveram um comportamento exponencial, como mostram as equações na TABELA 7.

TABELA 7: Equações exponenciais dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação ao consumo de ART entre o 1º e o 6º dia de fermentação tumultuosa

| Tratamento | Equação exponencial    | r <sup>2</sup> |
|------------|------------------------|----------------|
| T1         | $393,3461e^{-0,7522t}$ | 0,9775         |
| T2         | $387,8583e^{-0,6621t}$ | 0,9657         |
| T3         | $442,8185e^{-0,6588t}$ | 0,9518         |
| T4         | $344,9019e^{-0,4480t}$ | 0,9755         |

A linhagem EMBRAPA 1vvt/97 (T1) mostrou um consumo de açúcar acelerado, produzindo 10,23°GL em apenas 4 dias de fermentação. Silva *et al.* (2005b), em trabalhos anteriores, mostraram que a levedura *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 é capaz de formar 10°GL de etanol em quatro dias, com uma velocidade importante de consumo de açúcares à 24-25°C. Os resultados aqui obtidos foram semelhantes ao encontrado por Silva *et al.* (2005b), com relação ao desempenho da linhagem EMBRAPA 1vvt/97 quando inoculada individualmente. Este desempenho foi afetado pela presença da levedura *Br. custersianus* NRRL Y-6653 (T3), visto que no mesmo período (4 dias), apenas 9,38°GL foram produzidos. No final da fermentação tumultuosa, o vinho T4, foi o tratamento que atingiu a menor graduação alcoólica, 10,68°GL, valor que está ligeiramente acima do limite mínimo admitido pela legislação do Ministério da Agricultura, que é 10°GL (Brasil, 1988). Se o teor alcoólico de um vinho não atingir o mínimo estabelecido, o mesmo não poderá ser comercializado.

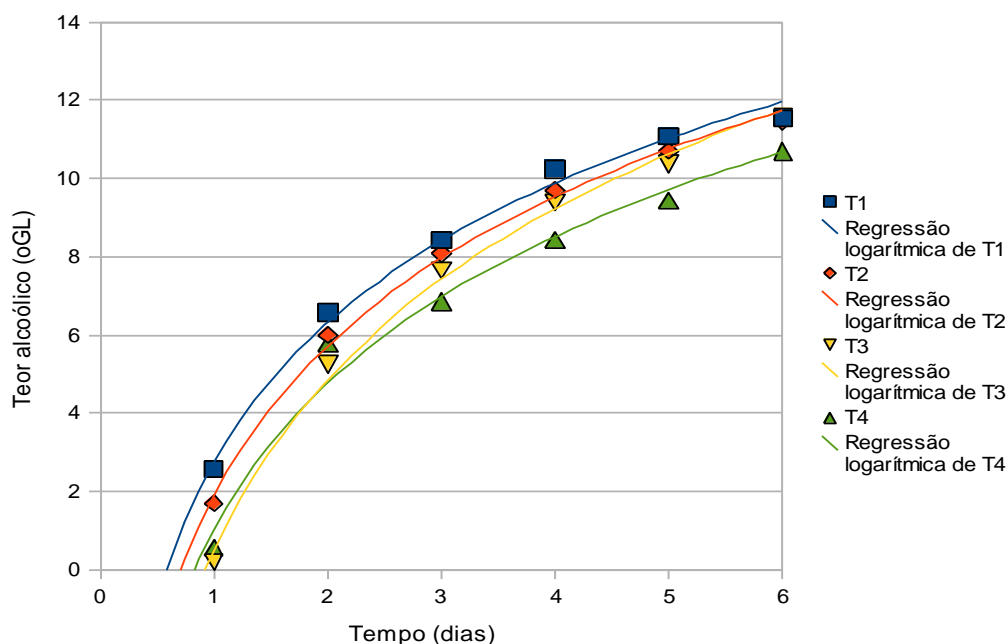


FIGURA 6. Concentração de etanol (oGL) dos mostos submetidos aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante os 6 dias da fermentação tumultuosa.

A partir do primeiro dia de fermentação tumultuosa, a produção de etanol apresentou um comportamento logarítmico em relação ao tempo conforme mostram as equações da TABELA 8.

TABELA 8: Equações logarítmicas dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de etanol entre o 1º e o 6º dia de fermentação tumultuosa

| Tratamento | Equação exponencial   | $r^2$  |
|------------|-----------------------|--------|
| T1         | $5,1087\ln(x)+2,7965$ | 0,993  |
| T2         | $5,4585\ln(x)+1,9528$ | 0,9958 |
| T3         | $6,2656\ln(x)+0,5278$ | 0,9952 |
| T4         | $5,3646\ln(x)+1,0692$ | 0,9791 |

A produção de etanol por *Sacch. cerevisiae* é considerada o maior fator limitante para o crescimento e a influência de espécies de não-

*Saccharomyces* durante a fermentação. Kalathenos *et al.* (1995) mostrou que *Sacch. cerevisiae* foi capaz de crescer em 12% (v/v) de etanol no qual outras leveduras não-*Saccharomyces* não foram capazes. Geralmente, as espécies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia* encontradas em mosto de uva não são tolerantes a concentrações de etanol entre 5 e 7%, uma vez que promove declínio e morte no decorrer da fermentação (Heard & Fleet, 1988; Gao & Fleet, 1988). Este fato pode ser comprovado pelo trabalho apresentado por Renouf *et al.* (2006), ao realizar uma fermentação mista de *Sacch. cerevisiae*, *Br. bruxellensis*, *Candida cantarelli*, *Debaryomyces hansenii* e *Hanseniaspora uvarum*, a levedura não-*Saccharomyces* mais adaptada do início ao fim da fermentação alcoólica (10,8% de etanol) foi *Br. bruxellensis*, as demais não foram detectadas. Medawar *et al.* (2003) mostraram que *Br. bruxellensis* cresce em meio sintético contendo concentrações de até 12% de etanol. É possível que *Br. custersianus* NRRL Y-6653 tenha permanecido no vinho após a fermentação alcoólica, visto que os teores alcoólicos aqui obtidos variaram de 10,68 a 11,55 °GL, muito próximo aos valores apresentados por Renouf *et al.* (2006) e Medawar *et al.* (2003).

Foi possível observar que a presença da linhagem contaminante *Br. custersianus* NRRL Y-6653 comprometeu, de certa forma, o desempenho de ambas linhagens de *Sacch. cerevisiae*. Os resultados aqui obtidos sugerem maior sensibilidade da linhagem EMBRAPA 91B/84, apesar de apresentar Fator *killer*, aos produtos do metabolismo de *Br. custersianus* NRRL Y-6653. Sabe-se que *Sacch. cerevisiae* produz quatro tipos principais de toxinas *killer*,

K1, K2, K3 e K28 (Young e Yagiu, 1978; Schmitt e Tipper, 1990). O sistema *killer* mais conhecido é o da K1. Seu modo de ação envolve dois passos. O primeiro, independente de energia, requer a ligação da toxina ao receptor primário da parede celular da célula sensível alvo. O segundo passo, dependente de energia, envolve a translocação até a membrana plasmática e a interação com um receptor secundário. Após alcançar a membrana plasmática, a toxina exerce um efeito letal, através da formação de poros na membrana, que causam o aumento da permeabilidade para íons H<sup>+</sup>, levando a um colapso do gradiente de prótons. Devido ao efluxo dos íons K<sup>+</sup> e liberação de ATP, ocorre morte celular (Hutchins e Bussey, 1983). Em testes laboratoriais a linhagem *killer* EMBRAPA 91B/84 não inibiu as células de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 (dados não mostrados). É provável que durante a fermentação este comportamento tenha se repetido, visto que houve redução no consumo de açúcar e na produção de etanol pela linhagem EMBRAPA 91B/84, quando *Br. custersianus* estava presente. A resistência de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 à toxina *killer* de *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 está associado à grande diversidade biológica existente entre leveduras, que está diretamente relacionada com os componentes da parede celular e da membrana plasmática. Embora pouco conhecidas, estas diferenças permitem que uma determinada linhagem apresente os receptores primários e secundários necessários para a ligação da toxina K1 e K2, mas não contenha os receptores adequados para a ligação da K28, por exemplo. Possivelmente, *Br. custersianus* NRRL Y-6653 não possui receptores primários e secundários compatíveis com os requeridos pela toxina da linhagem de *Saccharomyces*

aqui estudada. Devido a esse fato e aos diferentes modos de ação dessas toxinas, algumas linhagens apresentam sensibilidade ao fator *killer* de uma levedura ao mesmo tempo em que são resistentes ao fator *killer* de outra. Leveduras com esta característica foram encontradas por Silva (1999a). O autor observou que a linhagem de *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1B/84 exerceu ação *killer* sobre a linhagem sensível *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 26B/84, mostrou-se resistente à linhagem *Sacch. cerevisiae* K-1 (Lallemand) e apresentou sensibilidade à linhagem EMBRAPA 91B/84. Leveduras que exibem um fenótipo *killer*/sensível não são raras de serem encontradas. Sangorrin *et al.* (2001) mostraram que das 135 leveduras isoladas de mosto da variedade Merlot e Malbec da região Northwester Patagonia (Argentina), 42% demonstraram atividade *killer*, sendo que todas apresentaram sensibilidade a algumas linhagens *killer* de referência. Novamente este comportamento foi verificado por Sangorrin *et al.* (2007), com relação a linhagens de leveduras selvagens associadas com a superfície das cantinas da região da Patagônia.

Sabe-se que leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* formam quantidades apreciáveis de ácido acético (Freer, 2002). O mecanismo de ação do ácido acético envolve difusão rápida de moléculas não-dissociadas através da membrana plasmática até atingir o citoplasma. Em seguida o ácido acético se dissocia rapidamente em prótons  $H^+$  e íons acetato, causando a acidificação do citoplasma devido a diminuição do pH interno (Lambert & Stratford, 1999; Stratford, 2006). A acidificação intracelular pode levar a inibição de vários processos metabólicos (Krebs *et al.*, 1983). Kalathenos *et al.* (1995) mostraram que *Sacch. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailli* foram as leveduras que

toleraram quantidades muito altas de ácidos orgânicos fracos, como ácido acético, málico, láctico, tartárico e cítrico. Sabe-se que existem linhagens resistentes à ação inibitória desses ácidos fracos devido à presença de um sistema de extrusão de ácidos presentes na membrana citoplasmática, denominado Pdr12, onde os ânions são bombeados para fora do citosol (Piper *et al.*, 2001). O fato de T3 atingir valores de ART e etanol semelhantes àqueles obtidos em T1 e T2 pode estar relacionado com a capacidade de adaptação da membrana citoplasmática da linhagem EMBRAPA 1vvt/97 aos ácidos fracos formados pelo metabolismo da linhagem contaminante. Este processo de extrusão de ácidos requer um dispêndio considerável de energia metabólica (Piper *et al.*, 2001).

#### 4.2.2 pH

Os valores de pH obtidos durante os 6 dias da fermentação tumultuosa não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

Segundo Pampulha & Loureiro (1989) a forma tóxica do ácido acético está na forma não-dissociada, e a concentração desta forma não-dissociada aumenta em valores de pH em torno de 3,5. Estes autores também mostraram que o ácido acético torna-se mais tóxico na presença de 10% de etanol. O mosto Cabernet Sauvignon apresentou inicialmente pH de 3,46. Após submetido aos tratamentos durante os 6 dias da fermentação tumultuosa, esse valor aumentou em média para 3,55 para os vinhos T1 e T2, e 3,57 para T3 e T4, valores muito próximos ao indicado por Pampulha & Loureiro (1989). Este fato pode ter, juntamente com a concentração de etanol dos vinhos, contribuído



para a queda no metabolismo fermentativo das linhagens de *Sacch. cerevisiae* (T3 e T4).

A atividade e a estabilidade das proteínas *killer* dependem do pH, temperatura (usualmente ativas e estáveis em pH entre 3,5 e 5,0 e temperatura entre 20 e 25°C) e presença de vários íons (Heard & Fleet, 1987; Kurzweilová & Sigler, 1993). Conseqüentemente, o pH do ambiente não deve ter comprometido a ação *killer* da linhagem EMBRAPA 91B/84 no tratamento 4, uma vez que os valores de pH ficaram dentro da faixa acima citada.

#### **4.2.3 Compostos voláteis**

Os resultados das análises de compostos voláteis dos tratamentos T1 e T4 referentes ao segundo dia da fermentação tumultuosa não foram efetuadas devido a alguns imprevistos ocorridos durante a manipulação das amostras.

Juntamente com etanol e CO<sub>2</sub>, subprodutos como glicerol, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, acetaldeído e outras substâncias voláteis e não-voláteis são formadas por leveduras durante a fermentação, em menores concentrações. A qualidade sensorial do vinho está estritamente relacionada com concentrações equilibradas desses subprodutos. Individualmente ou coletivamente, esses compostos desempenham um papel importante nas características sensoriais do vinho (Rankine, 1967).

Os aldeídos são um dos produtos encontrados em vinhos. Eles podem resultar da ação das leveduras durante estádios preliminares do processo fermentativo. O principal é o acetaldeído, um metabólito produzido por leveduras pela oxidação do etanol, que fornece ao vinho um caráter

oxidado (Ribéreau-Gayon, 2006). Sabe-se que leveduras *Dekkera/Brettanomyces* são grandes produtoras de ácido acético, cujo precursor é o acetaldeído (Freer, 2002). Os tratamentos T3 e T4, contendo *Br. custersianus* NRRL Y-6653 apresentaram um aumento na concentração de acetaldeído no quinto dia de fermentação (FIGURA 7). Neste ponto, os tratamentos individuais (T1 e T2) apresentaram concentrações diferentes significativamente ( $P < 0,01$ ), em relação aos tratamentos mistos (T3 e T4).

Rojas *et al.* (2003) também encontrou concentrações superiores de acetaldeído em vinhos produzidos por culturas mistas de *Saccharomyces cerevisiae* 1894 (T<sub>73</sub>) e não-*Saccharomyces* (*Pichia anomala* 10590 e *Hanseniaspora guilliermondii* 11104), do que em vinhos inoculados com as culturas puras.

Por ser precursor do ácido acético, o acetaldeído tende a desaparecer no final do processo fermentativo. Houve uma queda na concentração de acetaldeído no sexto dia de fermentação, de 151,96 para 59,87 mg/L no T3 e de 171,48 para 82,66 mg/L no T4. Provavelmente pela conversão à ácido acético (FIGURA 7).

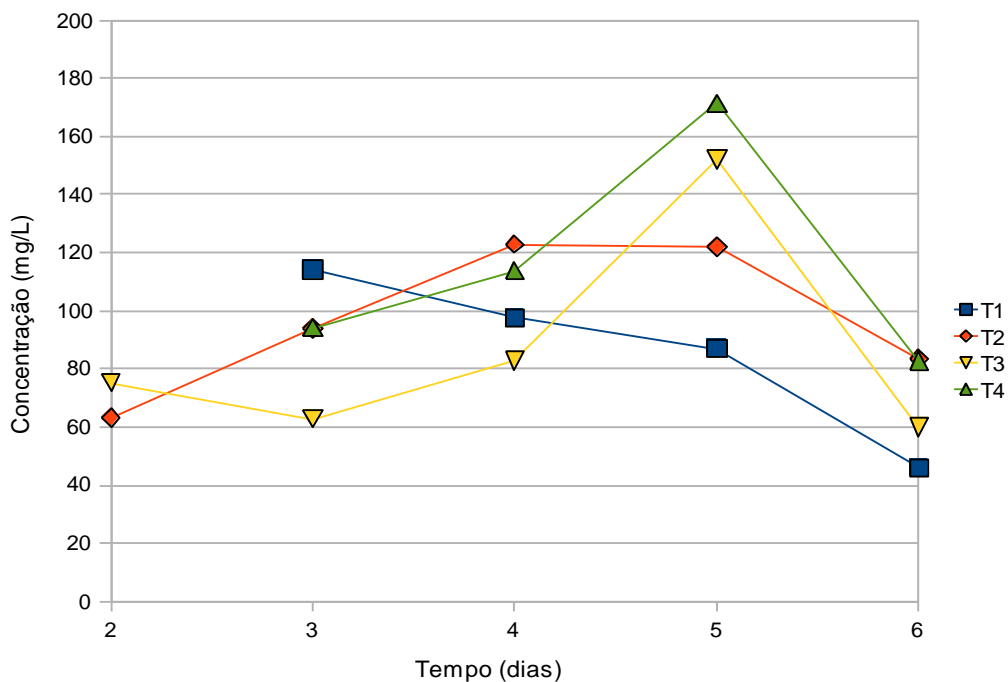


FIGURA 7. Concentração de acetaldeído do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa.

A queda observada entre o 5<sup>o</sup> e o 6<sup>o</sup> dia corresponde a uma inclinação negativa de 0,9314 e 0,7297 para T3 e T4, respectivamente.

O acetaldeído possui alta reatividade devido às extensas afinidades químicas do radical CHO. Apresenta também uma rápida combinação com dióxido de enxofre em baixas temperaturas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Observou-se uma queda progressiva na concentração de acetaldeído do T1, no decorrer da fermentação tumultuosa. É provável que a linhagem *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 ao produzir SO<sub>2</sub>, promoveu a combinação do mesmo com o acetaldeído presente no vinho. Outra possível explicação pode estar relacionada com a maior concentração de etanol do T1, visto que o acetaldeído é precursor do etanol juntamente com NADH.

Ésteres também são subprodutos encontrados em vinhos. São formados quando um álcool reage com um ácido eliminando uma molécula de água. Existe uma grande diversidade de moléculas de álcoois e ácidos presentes no vinho, assim a variedade de ésteres a ser formada também é grande. O principal éster encontrado no vinho é o acetato de etila. Isto se deve à maior quantidade de etanol presente no mesmo. Em quantidades de 50 a 80 mg/L, o acetato de etila contribui com a complexidade olfatória do vinho. No entanto, em acima de 120 mg/L, confere a bebida um sabor indesejável e enjoativo, reforçando a impressão de amargor (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), conferindo ao vinho um “caráter volátil” ou “odor acético”. Pode estar presente em vinhos, em concentrações menores que 10 mg/L e maiores que 1200 mg/L (Fugelsang & Edward, 1997). A maior concentração de acetato de etila foi observado no quinto dia de fermentação pelo tratamento T3, com 34,52 mg/L, valor que está abaixo do estabelecido como indesejável no vinho (FIGURA 8).

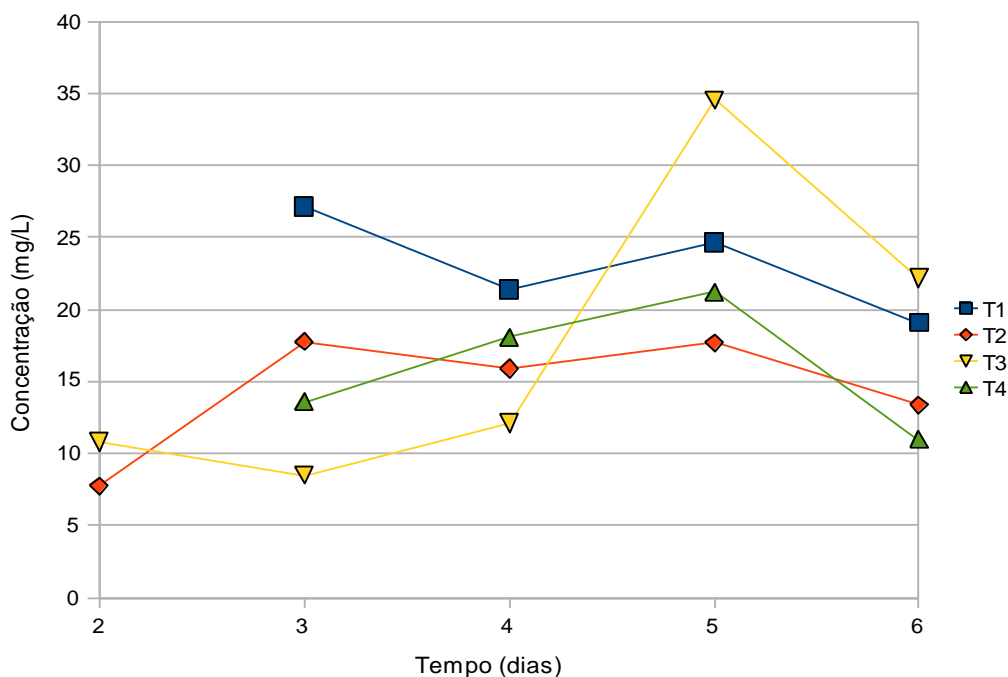


FIGURA 8. Concentração de acetato de etila do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa

O metanol está sempre presente em vinhos em pequenas quantidades, entre 30 e 35 mg/L, sendo 350 mg/L o valor máximo permitido pela legislação (Brasil, 1988). Não tem impacto organoléptico, mas a sua toxicidade é bem conhecida. Normalmente vinhos elaborados dentro das práticas enológicas adequadas não contêm metanol em níveis perigosos ( $DL_{50}=350$  mg/kg). O metanol resulta exclusivamente da hidrólise enzimática dos grupos metóxila das pectinas da própria uva. As uvas têm uma quantidade relativamente baixa de pectina, portanto o vinho é uma bebida fermentada com baixas concentrações de metanol. Vinhos tintos têm uma concentração superior (152 mg/L) aos vinhos roses (91 mg/L). Os vinhos brancos têm os valores mais baixos (63 mg/L) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). As concentrações

de metanol obtidas ao fim da fermentação tumultuosa, para os vinhos T1, T2, T3 e T4 foram superiores às normalmente encontradas em vinho tinto, 251,17; 193; 257,49 e 219,75 mg/L, respectivamente, e não apresentaram diferença significativa ( $P>0,05$ ). Observou-se um aumento progressivo desse composto durante a fermentação. Os valores superiores observados podem estar relacionados com uma atividade pectinolítica mais efetiva das linhagens empregadas (FIGURA 9).

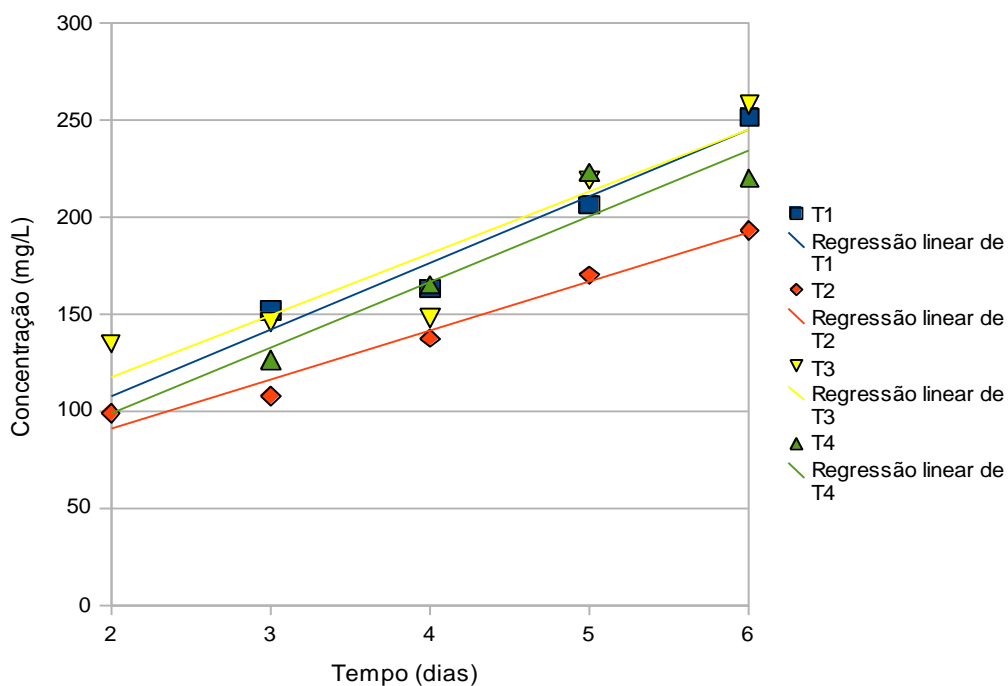


FIGURA 9. Concentração de metanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa.

A produção de metanol segue as equações calculadas (TABELA 9).

TABELA 9: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de metanol ao longo da fermentação tumultuosa

| Tratamento | Equação linear | $r^2$ |
|------------|----------------|-------|
| T1         | $34,22x+73,16$ | 0,95  |
| T2         | $25,08x+66,07$ | 0,97  |
| T3         | $31,91x+85,08$ | 0,86  |
| T4         | $33,82x+64,96$ | 0,88  |

Álcoois que contêm mais de 2 carbonos são conhecidos como álcoois superiores. Propanol-1, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol são exemplos de álcoois superiores produzidos durante o processo fermentativo. A formação de álcoois superiores nas leveduras ocorre com base no desvio do metabolismo de aminoácidos, como por exemplo leucina e isoleucina, ocasião em que o cetoácido (intermediários da biossíntese de aminoácidos) envolvido é descarboxilado a aldeído, com posterior redução a álcool superior conforme esquematizado por Webb & Ingraham (1963). Com o aumento do número de carbonos, o aroma modifica-se substancialmente e os álcoois tornam-se oleosos (óleo fúsel).

Esses álcoois desempenham papel importante no aroma dos vinhos. Em concentrações abaixo de 300 mg/L, causam impacto positivo. Alguns deles lembram fortemente aroma de flores, contribuindo para complexidade aromática do vinho. Valores superiores podem ter um efeito depreciativo, diminuindo o valor comercial e qualidade do produto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A produção de álcoois superiores normalmente alcança 150-550 mg/L em vinhos, segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (1982), e de 140 a 420 mg/L, segundo Rankine (1967). As concentrações de álcoois superiores totais foram muito expressivas em todos tratamentos. Ao final da fermentação alcoólica,

obtiveram-se 763,82; 917,65; 709,28 e 837,93 mg/L, para os tratamentos T1, T2, T3 e T4 respectivamente. A análise estatística revelou que o T2 difere significativamente ( $P < 0,01$ ) de T1 e T3, assim como T3 difere de T4 ( $P < 0,01$ ). Uma possível explicação para esses resultados pode estar associada com a alta concentração de açúcar do meio, inicialmente o mosto Cabernet Sauvignon continha 23% de açúcar. Gutierrez (1993) reportou que o aumento da concentração de açúcar no meio de 8% para 16% conduziu a elevação da produção de alguns álcoois superiores de 194,0 para 350,3 mg/L de álcool isoamílico (3-metil-1-butanol). Este fato deve-se a deficiência de nitrogênio induzida pelas maiores concentrações de açúcar, provocando assim, aumento na produção de álcoois superiores ao invés de aminoácidos. O excesso de álcoois superiores presentes em todos os tratamentos, pode mascarar a fineza aromática desejável nos vinhos.

A cultivar de uva utilizada é fator de grande influência sobre a produção de álcoois superiores nos vinhos (Lee & Cooley, 1981; Aragon *et al.*, 1998). A linhagem de levedura também exerce papel importante, assim como o pH e a temperatura empregada no processo (Rankine, 1967). A distinção na produção de álcoois superiores por diferentes espécies de levedura também foi observada por Aragon *et al.* (1998). A habilidade de produzir álcoois superiores não foi similar para *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 e *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84. Pode-se observar que os tratamentos que continham a linhagem EMBRAPA 1vvt/97 produziram maiores quantidades de propanol-1 durante todo o período de fermentação. Os tratamentos T1 e T3 apresentaram



diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre si e com relação à T2 e T4 (FIGURA 10).

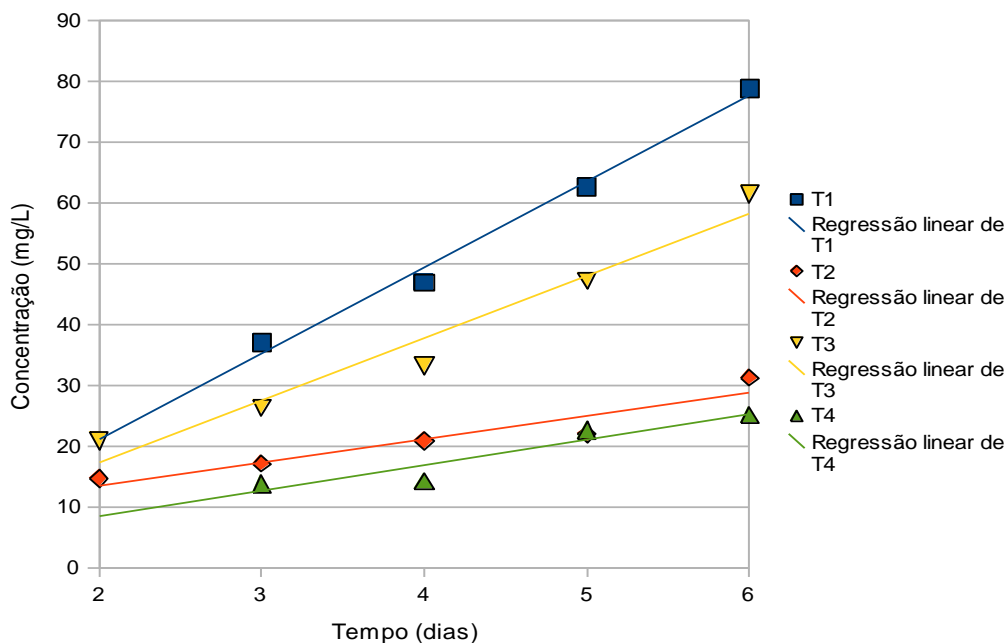


FIGURA 10. Concentração de propanol-1 do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa

A produção de propanol-1 segue as equações demonstradas na

TABELA 10.

TABELA 10: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de propanol-1 ao longo da fermentação tumultuosa

| Tratamento | Equação linear | $r^2$ |
|------------|----------------|-------|
| T1         | $14,13x+6,83$  | 0,99  |
| T2         | $10,21x+7,1$   | 0,96  |
| T3         | $3,81x+9,68$   | 0,89  |
| T4         | $4,21x+4,15$   | 0,89  |

O tratamento 2 contendo a linhagem EMBRAPA 91B/84 produziu quantidade superior de 2-metil-1-butanol (FIGURA 11) e 3-metil-1-butanol (FIGURA 12). Os tratamentos T2 e T4 apresentaram diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre si e com relação à T1 e T3 para produção de 2-metil-1-butanol. Com relação à produção de 3-metil-1-butanol, foi possível distinguir as linhagens de *Sacch. cerevisiae* empregadas, visto que T1 e T3 apresentaram diferença altamente significativa com relação a T2 e T4, os valores foram superiores neste último caso. Fica evidente que a produção de álcoois superiores se deve principalmente pela ação da *Saccharomyces*, com pouca ou nenhuma colaboração de *Brettanomyces*, visto que os tratamentos mistos não apresentaram concentrações superiores às exibidas pelos tratamentos individuais.

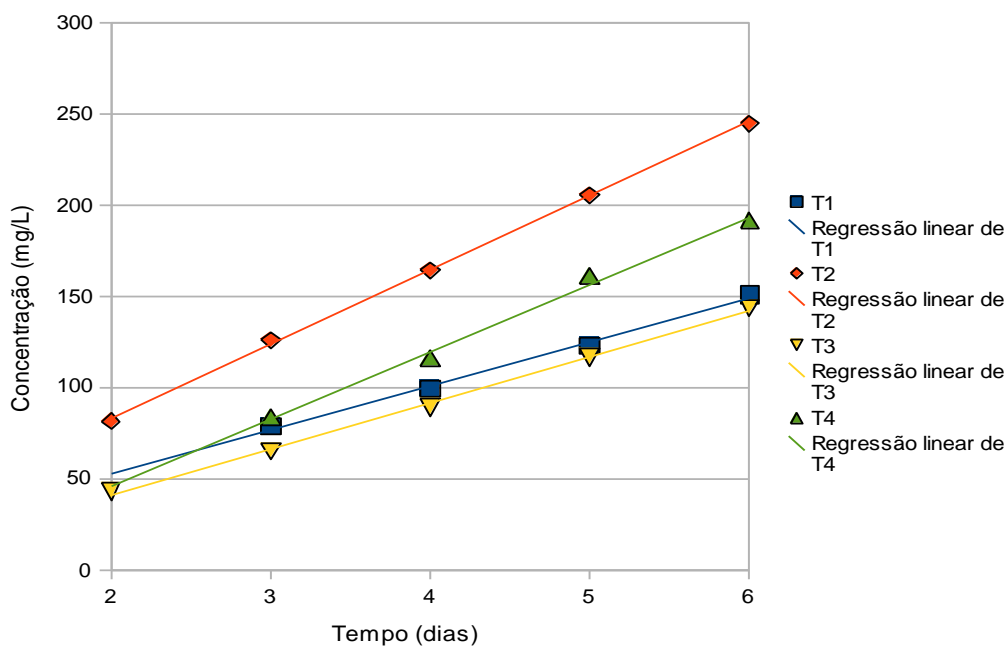


FIGURA 11. Concentração de 2-metil-1-butanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa

A produção de 2-metil-1-butanol segue as equações calculadas (TABELA 11).

TABELA 11: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de 2-metil-1-butanol ao longo da fermentação tumultuosa

| Tratamento | Equação linear | $r^2$ |
|------------|----------------|-------|
| T1         | $23,97x+29,0$  | 0,99  |
| T2         | $40,53x+42,62$ | 0,99  |
| T3         | $25,15x+15,87$ | 0,99  |
| T4         | $36,74x+9,31$  | 0,99  |

A maior porcentagem de álcoois superiores, para todos os tratamentos, pertence ao 3-metil-1-butanol (FIGURA 12). Durante todo o período de fermentação, este composto apareceu em maior quantidade do que os demais. Com média de 59,96; 62,73; 60,81 e 66,57%, para T1, T2, T3 e T4, respectivamente, com relação à soma dos álcoois superiores aqui analisados.

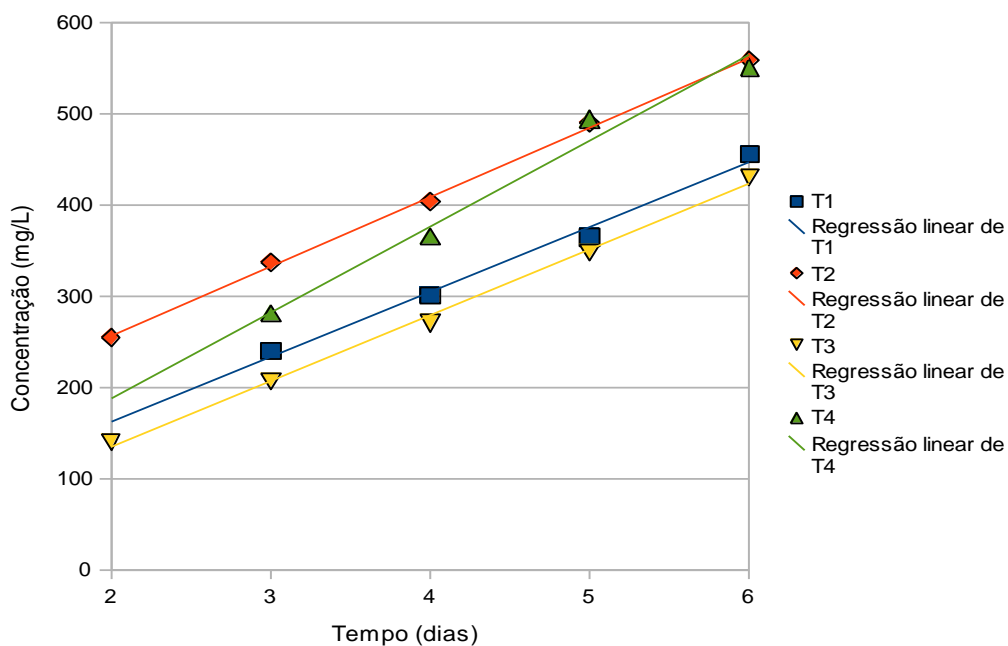


FIGURA 12. Concentração de 3-metil-1-butanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa.

A produção de 3-metil-1-butanol segue as equações demonstradas na TABELA 12.

TABELA 12: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de 3-metil-1-butanol ao longo da fermentação tumultuosa

| Tratamento | Equação linear  | $r^2$ |
|------------|-----------------|-------|
| T1         | $71,06x+91,21$  | 0,98  |
| T2         | $76,12x+179,99$ | 0,99  |
| T3         | $71,93x+62,66$  | 0,99  |
| T4         | $93,7x+94,62$   | 0,98  |

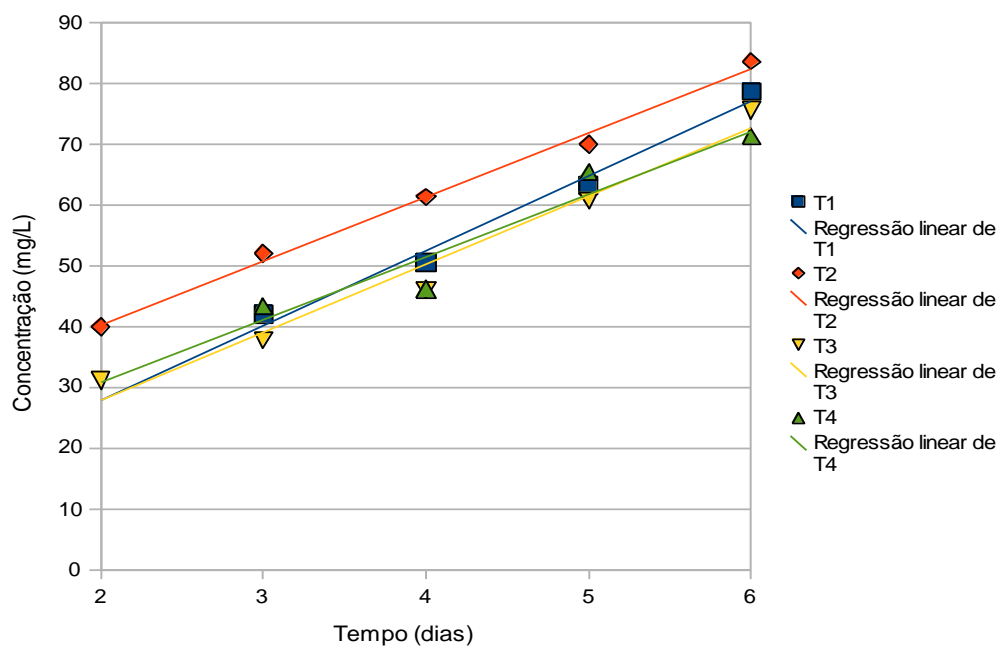


FIGURA 13. Concentração de 2-metil-1-propanol do mosto submetido aos tratamentos T1(■), T2(◆), T3(▼) e T4(▲) durante a fermentação tumultuosa

A análise estatística revelou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre T2 e T4 no último dia de fermentação. A produção de 2-metil-1-propanol obedece às equações demonstradas na TABELA 13.

TABELA 13: Equações lineares dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 em relação à produção de 2-metil-1-propanol ao longo da fermentação tumultuosa

| Tratamento | Equação linear   | $r^2$ |
|------------|------------------|-------|
| T1         | $12,23x + 15,73$ | 0,98  |
| T2         | $10,51x + 29,79$ | 0,99  |
| T3         | $11,18x + 16,62$ | 0,97  |
| T4         | $10,33x + 20,34$ | 0,92  |

Alguns autores acreditam que o aroma do vinho é basicamente determinado pelo metabolismo de *Sacch. cerevisiae* (Riberéau-Gayon *et al.*,

1982), enquanto outros atribuem um papel significativo às leveduras não-*Saccharomyces*, as quais têm sido descritas como produtoras de álcoois superiores, ácido acético, glicerol, acetaldeído, acetoína e ésteres de acetato. Entre as leveduras não-*Saccharomyces* reportadas, destacam-se *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Romano *et al.*, 1992; Romano & Suzzi, 1993; Romano *et al.*, 1993; Romano *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2001). A produção de álcoois superiores por leveduras dos gêneros *Dekkera/Brettanomyces* tem sido pouco reportada até o momento. Ciani & Ferraro (1997) mostraram que as concentrações de acetaldeído e álcoois superiores formadas por *Brettanomyces* spp., 14,6 e 78,9 mg/L, respectivamente, foram menores do que as formadas por *Sacch. cerevisiae*, 36,6 e 120,2 mg/L, em condições anaeróbicas. *Br. custersianus* NRRL Y-6653 parece não ter participado de forma significativa para a formação de álcoois superiores nas condições de fermentação estabelecidas neste trabalho.

#### **4.3 Monitoramento da fermentação malolática**

A fermentação malolática é um fenômeno natural que ocorre nos vinhos tintos pela ação das bactérias lácticas. Esses microrganismos são capazes de promover a descarboxilação espontânea do ácido málico (dicarboxílico), transformando-o em ácido láctico (monocarboxílico), promovendo assim, uma diminuição na acidez total de vinhos jovens. *Sacch. cerevisiae* não são especializadas em degradar o ácido málico de forma eficiente, pois mesmo entrando na célula por difusão facilitada, esta espécie não possui um

transportador de membrana específico e a sua enzima málica possui uma baixa atividade (Volschenk *et al.*, 1997).

Terminada a fermentação tumultuosa, iniciou-se o monitoramento da fermentação malolática semanalmente durante a fase lenta da vinificação. O término da fermentação malolática ocorreu em tempos distintos para os diferentes tratamentos. O primeiro tratamento a findar foi o T4 com 24 dias após o fim da fermentação tumultuosa, seguido dos tratamentos T1 e T2 com 32 dias e por último com aproximadamente 4 meses, o tratamento T3. A possível razão para uma fermentação malolática prolongada deve-se às baixas temperaturas que foram registradas durante o período em que a fermentação malolática do T3 estava em andamento. Nos meses de maio e junho, a temperatura encontrou-se em torno de 10°C e 7,7°C, respectivamente (Meteorologia, 2008). Este fato pode ter comprometido o metabolismo das bactérias lácticas, pois segundo Rizzon & Manfroi (2006), a temperatura indicada para a realização da fermentação malolática é de 15°C a 18°C, o que evita a evolução da acidez volátil e a evaporação do vinho. Uma vez iniciada a fermentação malolática, ela continuará, mesmo se a temperatura for inferior a 15°C. Mas abaixo de 12°C, a fermentação torna-se demorada e corre até mesmo o risco de ser interrompida.

#### **4.4 Análises químicas de avaliação quantitativa da fase lenta da fermentação**

##### **4.4.1 Acidez volátil**

Os valores de acidez volátil dos vinhos produzidos neste trabalho são apresentados na TABELA 14. O tratamento T1 apresentou diferença

significativa ( $P < 0,05$ ) em relação à T2 e T3 ao término da fermentação tumultuosa, e T2 e T3 após a fermentação malolática. É possível fazer uma distinção entre os vinhos inoculados com as linhagens EMBRAPA 1vvt/97 e EMBRAPA 91B/84, onde as maiores e as menores concentrações, respectivamente, podem ser verificadas.

TABELA 14: Valores de acidez volátil (mEq/L) do mosto submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fermentação tumultuosa e ao final da fermentação malolática.

| Tratamentos | Após FT | Após FM** |
|-------------|---------|-----------|
| T1          | 4,67b   | 6,67ab    |
| T2          | 2,67a   | 4,67a     |
| T3          | 4,67b   | 10,00b    |
| T4          | 3,67ab  | 6,33ab    |

\*Letras minúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

\*\*Os tratamentos findaram a fermentação malolática em tempos diferentes.

OBS: FT: fermentação tumultuosa; FM: fermentação malolática

Como era de se esperar, ocorreu um aumento na acidez volátil, de todos os tratamentos, após a fermentação malolática. Este fato também tem sido relatado por Silva (2003a), Rizzon & Manfroi (2006) e Silva & Muratore (2006). É possível que, com a diminuição da atividade da *Saccharomyces, Br. custersianus* presente em T3 e T4, e/ou as bactérias lácticas heterofermentativas, atuantes na fermentação malolática (Fugelsang & Edward, 1997), tenham sintetizado ácido acético e contribuído com esse aumento. O T3 exibiu aumento mais considerável. Provavelmente pela fermentação malolática ter sido mais demorada. Durante aproximadamente 16 semanas, os recipientes foram abertos semanalmente para coleta de amostra. Esse fato levou a um maior período de exposição ao oxigênio. Sabe-se que além do crescimento, o



oxigênio também estimula a produção de ácido acético, através da oxidação do etanol (Freer, 2002). No entanto, apesar do aumento, as concentrações de acidez volátil não excederam o limite máximo de 20 mEq/L, estabelecidos pela legislação (Brasil, 1988).

Pampulha & Loureiro (1989) mostraram que o ácido acético torna-se mais tóxico na presença de etanol. Kalathenos *et al.* (1995) mostraram que altas concentrações de etanol reduzem a resistência de *Sacch. cerevisiae* aos ácidos. A maior resistência da linhagem EMBRAPA 1vvt/97 aos ácidos pode novamente ser verificada, visto que ao final da fermentação tumultuosa, os maiores valores de acidez volátil e teor alcoólico foram obtidos para T3, 4,67 mEq/L e 11,56°GL, respectivamente.

#### **4.4.2 Anidrido sulfuroso livre**

O resultado reportado por Silva *et al.* (2005) foi validado neste trabalho. A linhagem EMBRAPA 1vvt/97 produziu, ao final da fermentação tumultuosa, 29,57 mg/L de SO<sub>2</sub> livre. Em cultura mista, a mesma linhagem sintetizou maior quantidade, 31,87 mg/L. A linhagem EMBRAPA 91B/84, além de sintetizar fator *killer* (Silva, 1996), trata-se de uma levedura que também produz SO<sub>2</sub>. Entre os tratamentos, as concentrações de dióxido de enxofre livre, após a fermentação tumultuosa e ao final da fermentação malolática não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

O principal conservante utilizado na indústria de vinhos é o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). O SO<sub>2</sub> possui capacidade anti-séptica e antioxidante. Sua atividade antimicrobiana em populações de leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* é contraditória no que se refere à concentração

utilizada nos processos enológicos. O trabalho de Du Toit *et al.* (2005) recomenda o uso de 25-35 mg/L de SO<sub>2</sub> livre para impedir o crescimento de *Br. bruxellensis*. Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) recomendaram 30 mg/L de SO<sub>2</sub> livre em pH 3,4-3,5 para eliminar células de *D. bruxellensis* viáveis. Barata *et al.* (2008) demonstraram o uso de 40 mg/L de SO<sub>2</sub> livre no controle de populações de *D. bruxellensis* em vinho tinto seco com 12% de etanol (v/v) e pH 3,5. A quantidade de SO<sub>2</sub> livre produzida pelas linhagens EMBRAPA 1vvt/97 e EMBRAPA 91B/84 no fim da fermentação são adequadas para inibir ou no mínimo dificultar o crescimento de *Br. custersianus* NRRL Y-6653.

Em todos os tratamentos, observou-se uma diminuição na concentração de SO<sub>2</sub> durante a fermentação malolática. Uma possível explicação para este fato está relacionada com a capacidade de combinação do dióxido de enxofre com os demais constituintes do vinho, como acetaldeído e antocianas.

#### **4.5 Análises químicas de avaliação quantitativa e qualitativa após a fase de estabilização**

##### **4.5.1 Açúcares redutores totais (ART) e teor alcoólico**

A TABELA 15 apresenta os valores obtidos para açúcares redutores totais (ART) e teor alcoólico (°GL) após a fase de estabilização dos vinhos. As diferenças entre os valores de etanol não foram suficientes para serem estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Houve diferença altamente significativa entre o teor de ART do tratamento 2 e tratamentos 3 e 4. A ação de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 prejudicou o desempenho de *Sacch. cerevisiae*

EMBRAPA 91B/84, visto que o T4 mostrou maior quantidade de açúcar residual.

*Dekkera/Brettanomyces* parecem estar mais adaptadas a sobreviver no vinho do que *Saccharomyces*, um ambiente impróprio para a maioria dos microrganismos com quantidades residuais baixas de açúcar e altos níveis de etanol. As concentrações de açúcar residual presentes nos vinhos, entre 0,1 e 0,2% podem facilmente estimular o crescimento da levedura contaminante no vinho engarrafado durante a fase de estabilização. Gerós *et al.* (2000) reportaram o crescimento de *D. anomala* IGC 5153 em concentrações de glicose de 0,1% a 20%. Segundo Silva (2003b), mesmo em concentrações muito inferiores de açúcar, como 0,03%, essas leveduras conseguem formar etil-fenóis em quantidade suficiente para torná-los perceptíveis.

O fator de conversão do açúcar em álcool é de 0,511. O fator de conversão para T1, T2, T3 e T4 foi 0,3876; 0,3919; 0,3996; 0,4173. Os tratamentos mistos apresentaram fator de conversão superiores aos tratamentos individuais, este fato deve-se provavelmente pela presença de *Br. custersianus* NRRL Y-6653. Ao produzir acetaldeído para formação de ácido acético, *Brettanomyces* possibilita a ligação do mesmo com o SO<sub>2</sub> produzido pela *Saccharomyces*. Logo a via glicolítica de *Saccharomyces* fica livre para formação de etanol. Observa-se que T1 apresentou menor fator de conversão, possivelmente a linhagem *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 tenha utilizado o açúcar para formação de outros compostos do vinho, como por exemplo glicerol e outros compostos aromáticos. Leveduras que apresentam este comportamento são de grande importância em vinificação, principalmente na

diferenciação do produto final, pois conferem ao vinho características organolépticas próprias.

TABELA 15: Concentração de açúcares redutores totais (g/L) e teor alcoólico (°GL) dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos.

| Tratamentos | ART    | Teor alcoólico |
|-------------|--------|----------------|
| T1          | 1,65ab | 11,22a         |
| T2          | 1,34aA | 11,36a         |
| T3          | 1,79bB | 11,56a         |
| T4          | 2,00bB | 12,06a         |

\*Letras minúsculas e maiúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) e altamente significativas ( $P < 0,01$ ), respectivamente.

O etanol representa a principal fonte de estresse para as células de leveduras durante a fermentação. O etanol afeta a composição lipídica da membrana plasmática, assim como os processos de transporte. Isto leva à inibição da captação da glicose, à diminuição da velocidade de crescimento, e da formação de produtos (Carlsen *et al.*, 1991). A resistência de *Saccharomyces* ao etanol é bastante enfatizada na literatura. Gaos & Fleet (1988) reportaram nenhuma perda da viabilidade celular de *Sacch. cerevisiae* quando incubadas por 12 dias na presença de 15% de etanol. Barata *et al.* (2008) demonstraram que *Sacch. cerevisiae* foi relativamente mais tolerante ao etanol, chegando a crescer em 16% (v/v). A resistência de *Dekkera/Brettanomyces* também foi bastante estudada. As linhagens mais resistentes de *D. bruxellensis* cresceram sob 15% (v/v) e a linhagem *Br. anomalus* apresentou maior sensibilidade ao álcool, sendo inibida na presença de concentrações acima de 8% (Barata *et al.*, 2008). *Br. lambicus* mostrou

crescimento muito lento na presença de 10% de etanol (Kalathenos *et al.*, 1995). Silva *et al.* (2004) mostrou a capacidade de *Br. bruxellensis* ISA 1791 e *D. bruxellensis* IGC 5153 em crescer, embora lentamente, na presença de etanol como única fonte de carbono em meio sintético com 9% (v/v) de etanol. Dessa forma, é possível que as concentrações de etanol acima de 10<sup>o</sup>GL obtidas em todos os tratamentos tenham causado alterações no metabolismo da linhagem *Br. custersianus* NRRL Y-6653.

#### 4.5.2 Acidez total, acidez volátil e acidez fixa

Os valores de acidez total, acidez volátil e acidez fixa dos vinhos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 estão apresentados na TABELA 16. A acidez fixa ajuda a diferenciar certos tipos de vinho. Vinhos de mesa secos como os produzidos com a variedade Cabernet Sauvignon, de alta acidez fixa, possuem sabor tártaro e enquanto vinhos com baixa acidez fixa, possuem aroma insípido. Vinhos com acidez fixa muito baixa são considerados defeituosos (Amerine & Joslyn, 1970). Os valores de acidez total aqui obtidos variaram de 78 a 90 mEq/L, estando dentro dos limites estabelecidos pela legislação, que variam de 55 a 130 mEq/L (Brasil, 1988).

TABELA 16: Concentração de acidez total (mEq/L), acidez volátil (mEq/L) e acidez fixa (mEq/L) dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos.

| Tratamentos | Acidez total | Acidez volátil | Acidez fixa |
|-------------|--------------|----------------|-------------|
| T1          | 87,33ab      | 10,33a         | 77,00cbB    |
| T2          | 90,00a       | 10,67a         | 79,33bB     |
| T3          | 78,67b       | 10,33a         | 68,33aA     |
| T4          | 82,67ab      | 10,00a         | 72,67caA    |

\*Letras minúsculas e maiúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas (P<0,05) e altamente significativas (P<0,01), respectivamente.

Para acidez volátil o valor máximo tolerado é de 20 mEq/L. Os tratamentos encontram-se de acordo com a legislação (Brasil, 1988). Valores de acidez volátil muito altos em um vinho e aroma de vinagre estão frequentemente associados com a atividade de bactérias acéticas como *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* ou bactérias lácticas produtoras de ácido acético (Silva, 2003b). Como já mencionado, este composto é um ácido graxo volátil que também é produzido por *Dekkera/Brettanomyces* (Freer *et al.*, 2002; Freer *et al.*, 2003). A presença de acidez volátil nos tratamentos T1 e T2, pode estar associada à ação de bactérias lácticas, visto que a adição de SO<sub>2</sub> não foi efetuada, e a produção do mesmo pelas linhagens de *Saccharomyces* não foi suficiente para impedir a atividade das bactérias lácticas.

As condições de aeração têm grande efeito sobre o metabolismo de carboidratos de *Dekkera/Brettanomyces*. Ciani & Ferraro (1997) observaram que a concentração de oxigênio exerceu uma forte influência tanto no crescimento como na produção de ácido acético por *Dekkera/Brettanomyces*. Segundo os autores, condições de aerobiose levaram a uma grande produção de ácido acético, causando o bloqueio da atividade metabólica. Condições semi-aeróbicas resultaram em melhores condições para produção de etanol em combinação com ácido acético. E em anaerobiose, a fermentação alcoólica ocorreu muito lentamente e não mostrou uma grande produção de ácido acético, variando de 0,61-0,97 g/L que correspondem a 10,17-16,17 mEq/L. De acordo com Freer (2002) as linhagens que mais produziram ácido acético, acima de 29 g/L que correspondem a 483,33 mEq/L, a partir de glicose foram

*D. intermedia*, *Br. intermedium*, *D. bruxellensis* e *D. anomala*. Sob condições de anaerobiose, a produção de ácido acético por essas linhagens foi muito baixa ou quase nula. Isso ocorre porque o oxigênio ajuda a manter a disponibilidade de NAD<sup>+</sup> no interior da célula, caso contrário a falta de NAD<sup>+</sup> sob condições anaeróbicas compromete a via glicolítica (Efeito Custer). *Br. custersianus* não apresenta esta limitação, uma vez que é Efeito Custer negativa. A análise estatística não revelou diferença significativa entre T1, T2, T3 e T4 com relação à acidez volátil. Possivelmente, a presença de *Sacch. cerevisiae* esteja exercendo um controle sobre *Brettanomyces*. Apesar desta aparente igualdade, a principal ação de *Dekkera/Brettanomyces* está no envelhecimento do vinho, quando *Saccharomyces* não mais está presente.

Segundo Freer (2002) as linhagens de *Dekkera/Brettanomyces* spp. foram capazes de produzir ácido acético quando glicose (100 g/L) ou etanol (35 g/L) foram usados como fonte de carbono e energia, aerobicamente. Segundo o autor, *Br. custersianus* NRRL Y-6653, foi uma das linhagens que mais produziu ácido acético a partir de etanol, 28 g/L. Este fato a torna mais perigosa do que as demais espécies, pois a ausência de Efeito Custer torna a levedura mais versátil. A formação de ácido acético a partir de etanol, quando o vinho está pronto e estabilizando dentro de grandes recipientes ou dentro da garrafa, em condições de anaerobiose pode comprometer de fato a qualidade do produto final.

#### **4.5.3 SO<sub>2</sub> total, SO<sub>2</sub> livre, SO<sub>2</sub> molecular, SO<sub>2</sub> combinado e pH**

Os resultados obtidos para as concentrações de SO<sub>2</sub> total, SO<sub>2</sub> livre, SO<sub>2</sub> molecular, SO<sub>2</sub> combinado e pH dos vinhos pertencentes aos tratamentos

T1, T2, T3 e T4 são apresentados na TABELA 17. Os valores de SO<sub>2</sub> total aqui obtidos variaram de 40 a 60 mg/L, bem abaixo do valor estabelecido pela legislação, que é de 350 mg/L (Brasil, 1988).

Fugelsang & Edward (1997) sugerem a manutenção de 0,4 a 0,6 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular para controlar *Brettanomyces* e outros microrganismos contaminantes durante o envelhecimento do vinho. Conhecendo-se a concentração de SO<sub>2</sub> livre e o valor do pH, é possível calcular a quantidade de SO<sub>2</sub> molecular presente, visto que existe uma dependência de pH. Sendo assim, as concentrações presentes nos vinhos de acordo com o pH de cada tratamento foram 0,29; 0,30; 0,28 e 0,38 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente. A análise estatística desses resultados não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). O único tratamento que se aproximou ligeiramente do mínimo determinado por Fugelsang & Edward (1997) foi o T4, logo observa-se que somente o uso de linhagens selecionadas produtoras de SO<sub>2</sub> não garante o controle de leveduras contaminantes.

TABELA 17: Concentração de SO<sub>2</sub> total (mg/L), SO<sub>2</sub> livre (mg/L) e pH dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos.

| Tratamentos | SO <sub>2</sub> total | SO <sub>2</sub> livre | pH    |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-------|
| T1          | 40,79aA               | 26,71a                | 3,75a |
| T2          | 53,21abA              | 32,00a                | 3,81a |
| T3          | 44,89aA               | 27,09a                | 3,78a |
| T4          | 60,03bB               | 38,36a                | 3,79a |

\*Letras minúsculas e maiúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) e altamente significativas ( $P < 0,01$ ), respectivamente.



A diferença entre o SO<sub>2</sub> total e o SO<sub>2</sub> livre é equivalente a concentração de SO<sub>2</sub> na forma ligada, ou seja combinada com outros compostos do vinho. Essas concentrações foram, respectivamente, 14,08; 21,21 17,8 e 21,67 mg/L, para T1, T2, T3 e T4. A análise estatística desses resultados não apresentou diferença significativa (P>0,05).

#### 4.5.4 Extrato seco total e extrato seco reduzido

Os resultados obtidos para as concentrações de extrato seco total, extrato seco reduzido e a relação álcool em peso/extrato seco reduzido dos tratamentos T1, T2, T3, e T4 são apresentados na TABELA 18.

TABELA 18: Concentração de extrato seco total (g/L), extrato seco reduzido (g/L) e relação álcool em peso/extrato seco reduzido dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos.

| Tratamentos | Extrato seco total | Extrato seco reduzido | Álcool em peso/extrato seco reduzido |
|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| T1          | 26,67ab            | 26,02ab               | 3,4ab                                |
| T2          | 27,03ab            | 26,70ab               | 3,36a                                |
| T3          | 26,23a             | 25,44a                | 3,58b                                |
| T4          | 28,47b             | 27,47b                | 3,47ab                               |

\*Letras minúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas (P<0,05).

O extrato seco representa a soma das substâncias que em determinadas condições físicas não se volatilizam. Sob o ponto de vista organoléptico, o extrato seco total está relacionado com a estrutura e o corpo do vinho. Entre os principais grupos que compõem o extrato seco total encontram-se os ácidos totais, sais orgânicos e minerais, poliálcoois, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, açúcares e polissacarídeos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982). Foram observadas diferenças significativas nas

concentrações de extrato seco total e de extrato seco reduzido entre os tratamentos T3 e T4 ( $P < 0,05$ ). O T4 foi o tratamento que apresentou maior concentração de extrato seco total, provavelmente devido às maiores concentrações de polifenóis, antioxidantes e glicerol presentes. É possível que o  $\text{SO}_2$  presente em maior quantidade neste tratamento tenha se combinado com acetaldeído produzido por *Brettanomyces* e estimulado a formação de glicerol, devido ao bloqueio da via que leva a formação de etanol (Conn & Stumpf, 1975).

Os valores variaram de 26,23 a 28,47 g/L para o extrato seco total nos 4 tratamentos realizados, enquanto que Rizzon & Miele (1996) obtiveram em média 24,2 g/L de extrato seco total em vinhos brasileiros analisados pelo mesmo método indireto utilizado neste trabalho.

A legislação brasileira não estabelece um valor mínimo para o teor de extrato seco total para os vinhos de mesa. No entanto, determina valores máximos para a relação álcool em peso/extrato seco reduzido, cujo valor máximo legal dessa relação para vinhos finos tintos é 5,2 (Brasil, 1988). Nas condições de vinificação empregadas, *Br. custersianus* NRRL Y-6653 não interferiu nos valores correspondentes a essa relação, pois todos os tratamentos apresentaram valores abaixo do máximo permitido.

#### **4.5.5 Cor**

Os resultados referentes as análises de cor dos vinhos T1, T2, T3 e T4 são apresentados na TABELA 19. Maiores quantidades de taninos aumentam a absorbância em 420 nm. Maiores quantidades de antocianinas aumentam a absorbância em 520 nm, enquanto que maiores absorbâncias no

comprimento de onda 620 nm indicam a presença de produtos da condensação entre catequinas e antocianinas. Estes pigmentos polimerizados apresentam maior estabilidade frente às mudanças de pH e a presença de SO<sub>2</sub>. (Iland *et al.* 2000). O SO<sub>2</sub> quando presente, liga-se ao carbono 4 da molécula de antociana, causando perda da cor. Se esta posição for ocupada por outros flavonóides ou glicosídeos, ocorre um aumento da estabilidade da cor do vinho (Jackson *et al.*, 1978; Ribéreau-Gayon, 2000).

TABELA 19: Índices de cor dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos, em comprimento de onda de 420, 520 e 620 nm.

| Tratamentos | 420  | 520  | 620  | Intensidade | 420 %   | 520 %  | 620 %  |
|-------------|------|------|------|-------------|---------|--------|--------|
| T1          | 0,44 | 0,53 | 0,10 | 1,0671a     | 40,86bB | 49,66a | 9,48a  |
| T2          | 0,45 | 0,63 | 0,12 | 1,1954a     | 37,30aA | 52,79a | 9,90a  |
| T3          | 0,51 | 0,57 | 0,13 | 1,2109a     | 41,89bB | 47,38a | 10,73a |
| T4          | 0,48 | 0,67 | 0,15 | 1,3064a     | 37,18aA | 51,36a | 11,45a |

\*Letras minúsculas e maiúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) e altamente significativas ( $P < 0,01$ ), respectivamente.

A cor dos vinhos T1, T2, T3 e T4 após 6 meses de estabilização foi composta principalmente por moléculas absorvidas em 520 nm e em menor concentração os compostos absorvidos em 620 nm (TABELA 19). Estes resultados procedem, pois vinhos jovens possuem quantidades mais elevadas de antocianinas e vinhos envelhecidos apresentam concentrações mais altas de pigmentos polimerizados por condensação formados durante a fermentação e o envelhecimento (Silva & Muratore, 2006).

A intensidade de cor corresponde à soma dos valores das absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda 420, 520 e 620 nm. Variam

de acordo com a variedade da uva, normalmente os valores encontrados estão entre 0,3 e 1,8 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Presume-se que a linhagem *Br. custersianus* NRRL Y-6653 não teve influência sobre a cor dos vinhos, visto que os tratamentos não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Tanto a produção de  $\text{SO}_2$  pelas linhagens de *Sacch. cerevisiae* quanto a formação de grandes quantidades de acetaldeído por *Brettanomyces* podem ter contribuído com este resultado, pois o acetaldeído primeiramente liga-se ao  $\text{SO}_2$ , e num segundo momento por apresentar maior afinidade combina-se com as antocianinas, formando assim compostos mais estáveis. Morata *et al.* (2007) reportou capacidade do acetaldeído em se condensar com antocianinas para formar pigmentos mais estáveis, chamados piranoantocianinas (Morata *et al.*, 2007).

#### **4.5.6 Polifenóis e antioxidantes**

Os compostos fenólicos são importantes componentes do vinho, pois contribuem com suas características sensoriais de cor, aroma, adstringência e “corpo”, diretamente ou por meio de interações com proteínas, polissacarídeos, ou outros compostos fenólicos. São também importantes na conservação de alimentos devido a seu efeito bactericida, além disso possuem propriedades antioxidantes que aparentemente protegem os consumidores de doenças cardiovasculares (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). São encontrados no vinho em teores que variam de 2 a 7 g/L (Guerra, 1998). Os resultados aqui obtidos mostram que o teor de polifenóis dos vinhos pertencentes aos tratamentos T1 e T3 ficaram abaixo dos valores citados acima (TABELA 20).

Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006) os compostos fenólicos das uvas podem ser classificados em flavonóides e não-flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte os flavanóis, flavonóis e antocianinas, e ao segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. É possível que o vinho do tratamento T4 tenha apresentado maior dano organoléptico, decorrente da ação de *Br. custersianus* NRRL Y-6653, visto que maiores concentrações de polifenóis podem significar grandes quantidades disponíveis de ácidos hidroxicinâmicos para formação dos etilfenóis (TABELA 20).

TABELA 20: Concentração de polifenóis (mg/L) e antioxidantes ( $\mu\text{M}$ ) dos mostos submetidos aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos.

| Tratamentos | Polifenóis (mg/L <sup>**</sup> ) | Antioxidantes ( $\mu\text{M}$ <sup>***</sup> ) |
|-------------|----------------------------------|--|
| T1          | 1773,9aA                         | 5808,81aA                                      |
| T2          | 2089,54ab                        | 6850,06ab                                      |
| T3          | 1970,76ab                        | 5900,46aA                                      |
| T4          | 2292,97bB                        | 8008,41bB                                      |

\*Letras minúsculas e maiúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) e altamente significativas ( $P < 0,01$ ), respectivamente.

\*\*Concentração dada em equivalente de ácido gálico em mg/L

\*\*\*Concentração dada em equivalente de Trolox em  $\mu\text{M}$ .

O tratamento 4, que contém a linhagem EMBRAPA 91B/84 apresentou diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ) em relação aos vinhos contendo a linhagem EMBRAPA 1vvt/97 (T1 e T3) com relação à concentração de antioxidantes. É possível distinguir os vinhos elaborados com as diferentes linhagens de *Sacch. cerevisiae* através da concentração de antioxidantes. Caridi *et al.* (2004) mostraram correlações interessantes entre a linhagem de levedura usada para vinificação e a composição fenólica do vinho. Segundo os

autores, o comportamento da linhagem pode modificar o perfil fenólico e o poder antioxidante do vinho.

Os tratamentos T1 e T4 apresentaram diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ) em relação as concentrações de polifenóis. Essas diferenças podem ser atribuídas à linhagem de *Brettanomyces* empregada, pois segundo Silva *et al.* (1995), vinhos inoculados com diferentes linhagens de *D. bruxellensis* apresentaram altas concentrações de ácido gálico, representando 33% do total de compostos fenólicos identificados. A presença desse ou de outros compostos não flavonóides pode ter contribuído para valores superiores de polifenóis e antioxidantes no vinho T4. Chatonnet *et al.* (1992) reportou a incapacidade de *Saccharomyces* e *Brettanomyces* em transformar ácidos benzóicos, como por exemplo ácido gálico. Este fato induz ao acúmulo do mesmo no vinho, e conseqüente aumento do conteúdo de polifenóis.

#### **4.5.7 Antocianas totais e taninos totais**

As antocianas são flavonóides extraídos da casca de uvas tintas durante a maceração, tornando-se responsável pela coloração roxo-avermelhado de vinhos novos. A cor do vinho varia com a concentração total e com a composição das antocianinas no vinho, as quais contribuem com as características organolépticas e químicas devido às interações com outros compostos fenólicos assim como com proteínas e polissacarídeos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

As concentrações de antocianas totais obtidas para T1, T2, T3 e T4 variaram de 138,7 a 235,4 mg/L, como demonstrado na TABELA 21.

TABELA 21: Concentração de taninos totais (g/L) e antocianinas totais (mg/L) do mosto submetido aos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após a fase de estabilização dos vinhos.

| Tratamentos | Taninos totais (g/L) | Antocianinas totais (mg/L) |
|-------------|----------------------|----------------------------|
| T1          | 2,2223a              | 142,2796a                  |
| T2          | 2,4523a              | 235,3867a                  |
| T3          | 2,2223a              | 138,6971a                  |
| T4          | 2,4472a              | 214,9261a                  |

\*Letras minúsculas diferentes, nas colunas, denotam médias com diferenças significativas (P<0,05).

Um conteúdo representativo de antocianinas está em torno de 400 mg/L em vinho tinto com menos de 6 meses de envelhecimento (Dell'Agli *et al.*, 2004). Guerra (1998) reportou que no vinho tinto recém elaborado podem ser encontrados valores superiores, entre 400 e 1500 mg/L de antocianinas. Valentão *et al.* (2007) inocularam vinhos tintos da região de Dão, com 9 diferentes linhagens de *D. bruxellensis*, e verificaram que a composição antociânica do vinho não foi afetada pelas diferentes linhagens inoculadas, e apresentaram concentrações entre 235-290 mg/L de antocianinas totais. Os resultados aqui obtidos concordam com Valentão *et al.* (2007). Não houve uma queda significativa na composição antociânica dos vinhos inoculados com *Br. custersianus* NRRL Y-6653 (T3 e T4). Provavelmente, a atividade de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 não foi suficiente para comprometer a concentração de antocianinas dos tratamentos mistos, assim como a concentração de taninos, visto que ambos não apresentaram diferença significativa (P>0,05).

#### 4.6 Vinificação “*in vitro*”

##### 4.6.1 Teste de fermentação

A consistente incapacidade de *Brettanomyces* em competir com *Saccharomyces* em relação à atividade metabólica, foi verificada por Abbot *et*

*al.* (2005), visto que *Brettanomyces* apresenta, em condições normais, crescimento mais lento que *Sacch. cerevisiae* (Abbott & Ingledew, 2005). Observou-se que mesmo com uma atividade metabólica inferior às demais linhagens, *Br. custersianus* NRRL Y-6653 quando inoculada juntamente com *Sacch. cerevisiae* comprometeu o desempenho fermentativo da mesma (FIGURA 14). Este resultado está de acordo com os apresentados por Ciani & Ferraro (1997), onde verificaram que as linhagens de *Brettanomyces* mostraram velocidade de fermentação menores que *Sacch. cerevisiae*, em condições aeróbicas, anaeróbicas e semi aeróbicas.

Por ser Efeito Custer negativa, *Br. custersianus* comporta-se sob este ponto de vista, como *Sacch. cerevisiae*. Por este motivo, a evolução de CO<sub>2</sub> obtida nos tratamentos mistos, deveria ser a mesma dos tratamentos individuais, se a atividade dos dois gêneros fossem iguais e se não houvesse inibição. Possivelmente esta levedura transforma os açúcares do mosto em outras substâncias, que não o etanol. A produção de ácido acético por *Dekkera/Brettanomyces* é citada como o mecanismo mais provável de competição com as leveduras *Saccharomyces* em fermentação para a produção de álcool (Abbot *et al.*, 2005). Segundo Gerós *et al.* (2000), durante a fermentação alcoólica, grandes quantidades de ácido acético podem ter efeitos negativos no crescimento de linhagens de *Sacch. cerevisiae*.



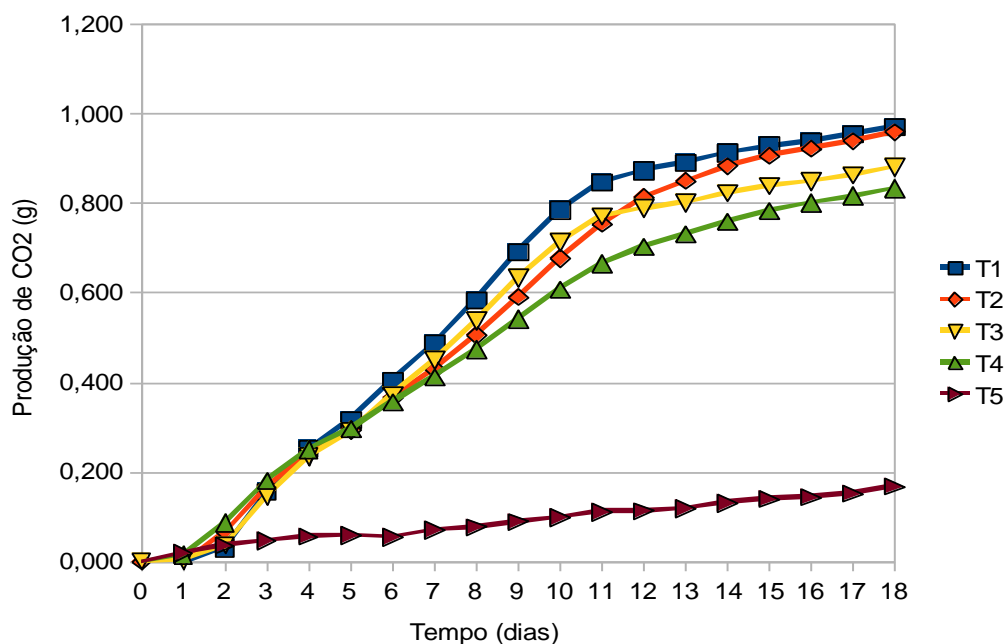


FIGURA 14. Produção de CO<sub>2</sub> de culturas puras e mistas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 à 25°C, onde T1(■), T2(◆), T3(▼), T4(▲), T5(►).

Rojas *et al.* (2003) mostraram que vinhos produzidos por culturas mistas de *Sacch. cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces* apresentam velocidade de fermentação alcoólica similar àquela produzida pela mesma *Sacch. cerevisiae* em cultura pura. Os resultados aqui obtidos mostram que tanto as culturas puras (T1 e T2) quanto as mistas (T3 e T4), envolvendo *Sacch. cerevisiae*, apresentaram uma fase exponencial de produção de CO<sub>2</sub> com coeficientes de determinação elevados (TABELA 22). A atividade metabólica, expressa em velocidade relativa de evolução de CO<sub>2</sub> das culturas puras tende ser mais elevada que as obtidas com as culturas mistas.

TABELA 22: Equações exponenciais dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 com relação à produção de CO<sub>2</sub> entre o 4<sup>o</sup> e o 9<sup>o</sup> dia

| Tratamento | Equação exponencial  | r <sup>2</sup> |
|------------|----------------------|----------------|
| T1         | $0,1158e^{0,202t}$   | 0,9944         |
| T2         | $0,121e^{0,1778t}$   | 0,9961         |
| T3         | $0,1082e^{0,19998t}$ | 0,9944         |
| T4         | $0,1381e^{0,154t}$   | 0,996          |

Uma queda mais acentuada ocorreu na velocidade metabólica da linhagem EMBRAPA 91B/84, confirmando assim a superioridade da linhagem neutra EMBRAPA 1vvt/97. É possível que o sistema de extrusão de ácidos Pdr12 (Piper *et al.*, 2001), já mencionado, e a maior velocidade de fermentação sejam os principais responsáveis por este comportamento.

#### 4.6.2 Inibição ou estímulo do metabolismo

Sabe-se que o ácido acético e o 4-etilfenol são metabólitos sintetizados por *Dekkera/Brettanomyces*. Estes dois compostos foram testados quanto à capacidade de inibição do metabolismo de *Saccharomyces*. A FIGURA 15 e a FIGURA 16 apresentam as curvas de produção de CO<sub>2</sub> das linhagens de *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 e EMBRAPA 91B/84, respectivamente, na presença de diferentes concentrações de 4-etilfenol.

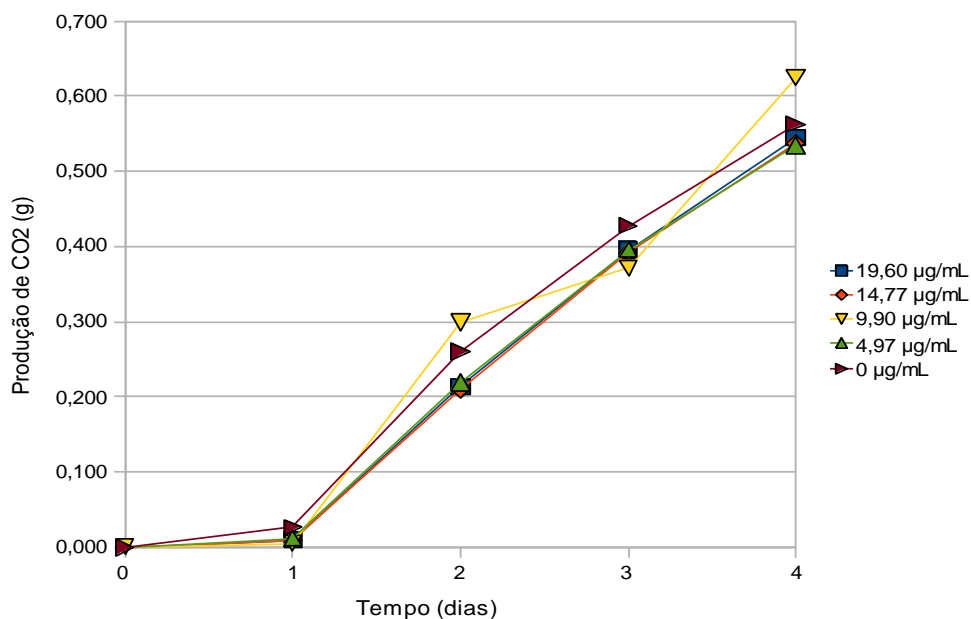


FIGURA 15. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de uma solução de 1 g/L 4-etilfenol, onde (■) 19,60 µg/mL, (◆) 14,77 µg/mL, (▼) 9,90 µg/mL, (▲) 4,97 µg/mL, (►) 0 µg/mL.

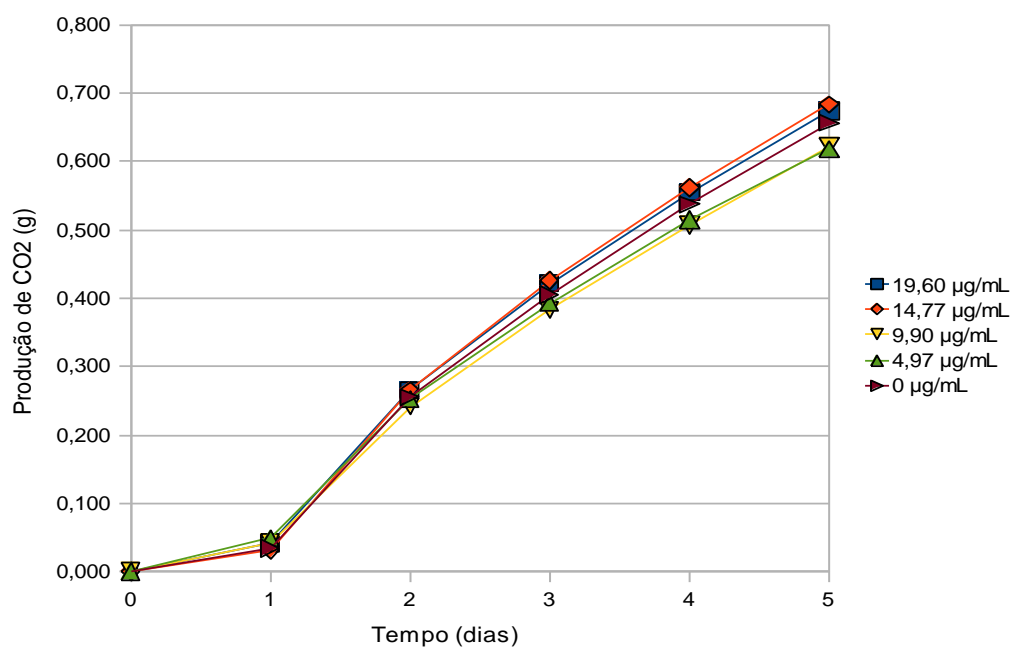


FIGURA 16. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de uma solução de 1 g/L 4-etilfenol, onde (■) 19,60 µg/mL, (◆) 14,77 µg/mL, (▼) 9,90 µg/mL, (▲) 4,97 µg/mL, (►) 0 µg/mL.

Chatonnet *et al.* (1997) obtiveram concentrações de 4,225  $\mu\text{L/mL}$  de fenóis produzidos por *Br. bruxellensis* em vinho. A concentração máxima de 4-etilfenol aqui testada, de 19,6  $\mu\text{g/mL}$ , não alterou o metabolismo de ambas linhagens de *Sacch. cerevisiae* aqui empregadas. Logo, este metabólito formado por *Dekkera/Brettanomyces* não tem atuação sobre o metabolismo de *Sacch. cerevisiae*.

A FIGURA 17 e FIGURA 18 apresentam as curvas de produção de  $\text{CO}_2$  das linhagens de *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 e EMBRAPA 91B/84, respectivamente, na presença de diferentes concentrações de ácido acético (100%).

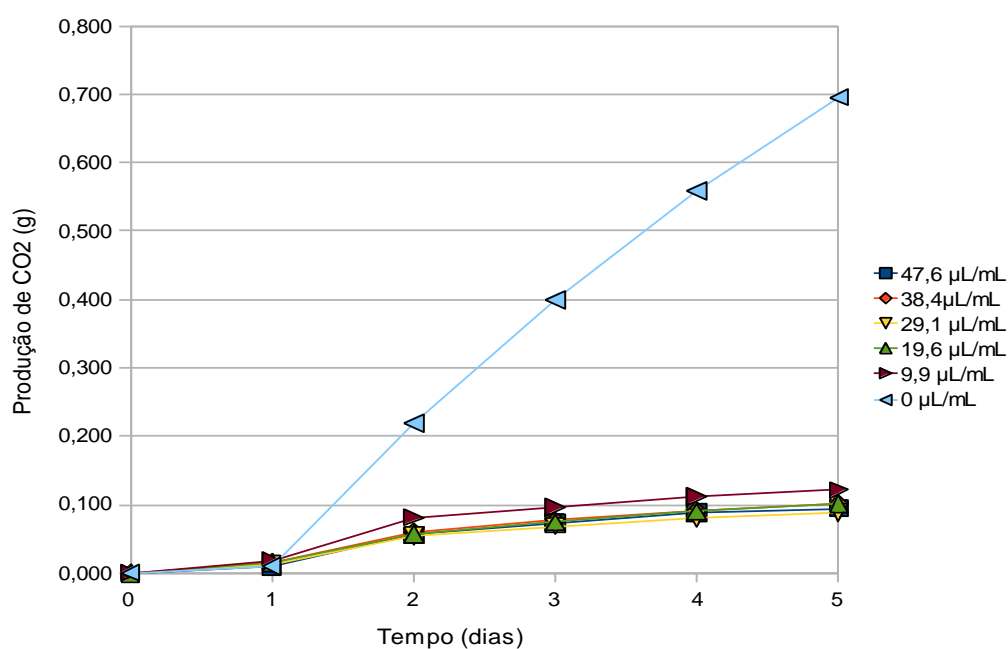


FIGURA 17. Produção do  $\text{CO}_2$  da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 47,6  $\mu\text{L/mL}$ , (◆) 38,4  $\mu\text{L/mL}$ , (▼) 29,1  $\mu\text{L/mL}$ , (▲) 19,6  $\mu\text{L/mL}$ , (►) 9,9  $\mu\text{L/mL}$  e (◄) 0  $\mu\text{L/mL}$

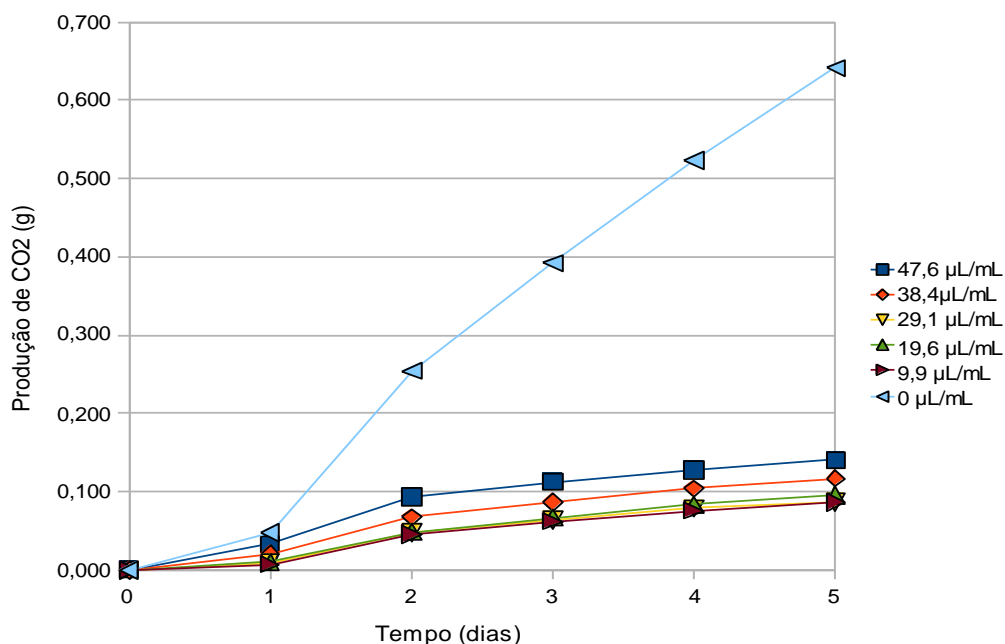


FIGURA 18. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 47,6 µL/mL, (◆) 38,4 µL/mL, (▼) 29,1 µL/mL, (▲) 19,6 µL/mL, (►) 9,9 µL/mL e (◄) 0 µL/mL.

Observa-se que o metabolismo de ambas linhagens foi fortemente afetado por todas as concentrações de ácido acético fornecidas. Das concentrações de 9,9 µL/mL (0,99% v/v) a 47,62 µL/mL (4,76 % v/v), as curvas de produção de CO<sub>2</sub> sofreram uma queda pela inibição do ácido acético. Os resultados aqui obtidos confirmam os dados de Abbot *et al.* (2005). Os autores constataram que concentrações excedentes a 0,45% (p/v) de ácido acético inibem completamente a atividade metabólica de *Sacch. cerevisiae*. O crescimento de leveduras *Brettanomyces* foi retardado. Como as concentrações utilizadas no presente trabalho ultrapassaram o valor de 0,45% citado por Abbot *et al.* (2005), concentrações mais baixas foram posteriormente testadas, como ilustrado nas FIGURA 19 e FIGURA 20.

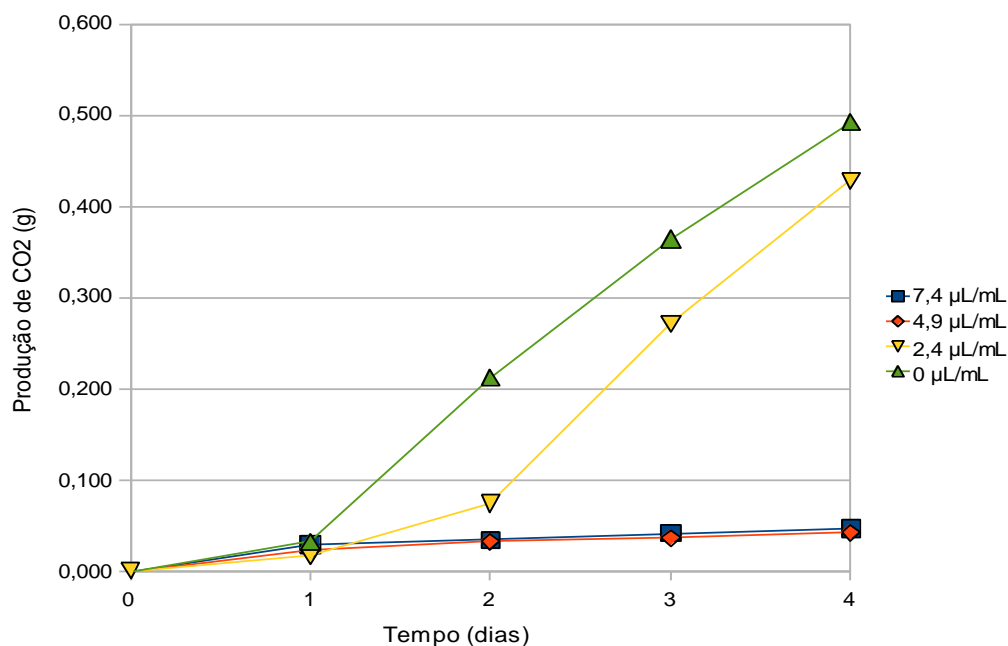


FIGURA 19. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 7,4 µL/mL, (♦) 4,9 µL/mL, (▼) 2,4 µL/mL e (▲) 0 µL/mL.

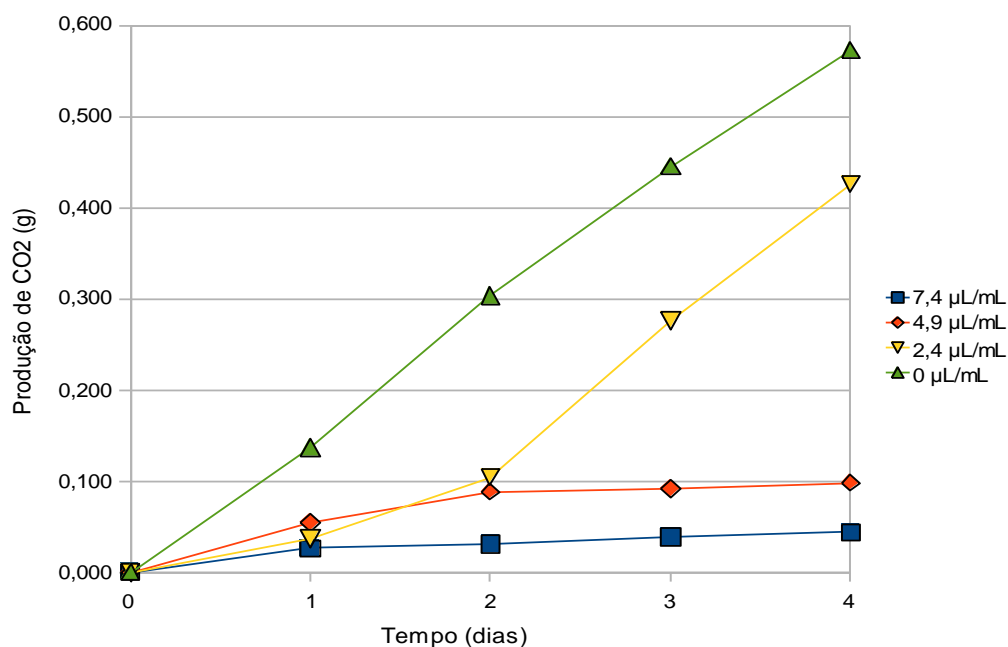


FIGURA 20. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de ácido acético, onde (■) 7,4 µL/mL, (♦) 4,9 µL/mL, (▼) 2,4 µL/mL e (▲) 0 µL/mL.

A linhagem EMBRAPA 1vvt/97 apresentou sensibilidade a ácido acético na concentração de 7,4  $\mu\text{L/mL}$  (0,74% v/v) e 4,9  $\mu\text{L/mL}$  (0,49% v/v). A linhagem EMBRAPA 91B/84 exibiu um comportamento diferente com relação à concentração de 4,9  $\mu\text{L/mL}$  (0,49% v/v). Apesar do metabolismo ter sido claramente afetado pelo ácido acético, uma produção de  $\text{CO}_2$ , embora baixa, ainda pode ser observada, demonstrando assim uma maior resistência desta linhagem ao ácido acético, em condições laboratoriais. Diferentemente a linhagem EMBRAPA 1vvt/97 foi mais resistente em condições de vinificação, como observado no item 4.2.1 (FIGURA 5 e 6). Segundo Barata *et al.* (2008), as células em condições de vinificação estão melhor adaptadas ao estresse do ambiente. Os resultados indicam que a linhagem EMBRAPA 1vvt/97 se adapta melhor a pressão seletiva exercida pelas condições adversas do mosto e do vinho do que a linhagem EMBRAPA 91B/84.

Ao comparar as curvas de 0  $\mu\text{L/mL}$  e 2,4  $\mu\text{L/mL}$  (0,24% v/v) de ácido acético, observamos que não houve inibição do metabolismo de ambas linhagens, mas apenas um atraso na produção de  $\text{CO}_2$ . Caracteristicamente, os ácidos orgânicos fracos, como o ácido acético, não levam a morte dos microrganismos, e sim conduzem a uma fase lag bastante extensa (Lambert & Stratford, 1999).

Disponibilidade ou limitação de nutrientes são alguns dos fatores que determinam a ecologia das leveduras durante a fermentação. Uma espécie ou linhagem pode utilizar ou produzir nutrientes relevantes para outras. A autólise desses microrganismos após a fermentação alcoólica pode ser uma fonte

significante de micronutrientes para o crescimento de leveduras contaminantes (Amerine & Joslyn, 1970; Charpentier & Feuillat, 1993, Hernawan & Fleet, 1995).

Como já comentado, as leveduras pertencentes ao gênero *Dekkera/Brettanomyces*, com exceção de *Br. custersianus*, são caracterizadas por possuir Efeito Custer. O oxigênio necessário para manter o balanço de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  na célula pode ser substituído por outras moléculas que agem como aceptoras de elétrons. A abolição do efeito Custer explica o desenvolvimento de *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos onde a concentração de oxigênio é quase nula. Fugelsang & Edward (1997) também compartilham com esta explicação. As moléculas receptoras de elétrons procedem de células autolisadas de *Saccharomyces* ou do próprio mosto. Guilloux-Benatier *et al.*, (2001) reportaram o crescimento de *Dekkera/Brettanomyces* em meio sintético contendo células de *Sacch. cerevisiae* autolisadas. Ciani & Ferraro (1997) obtiveram maiores concentrações de ácido acético formados por *Brettanomyces* spp. do que por *Saccharomyces*, em meio contendo suco de uva natural da variedade Trebbiano do que em meio contendo suco de uva sintético.

O extrato de levedura não comercial (ELNC), provavelmente, contém inúmeras substâncias receptoras de elétrons, que auxiliariam no desenvolvimento de *Dekkera/Brettanomyces*. Foi observado que neste caso a adição de quantidades crescentes de 0 a 9,9  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de ELNC ao mosto não apresentou uma resposta positiva e progressiva em relação ao metabolismo de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 (FIGURA 21).



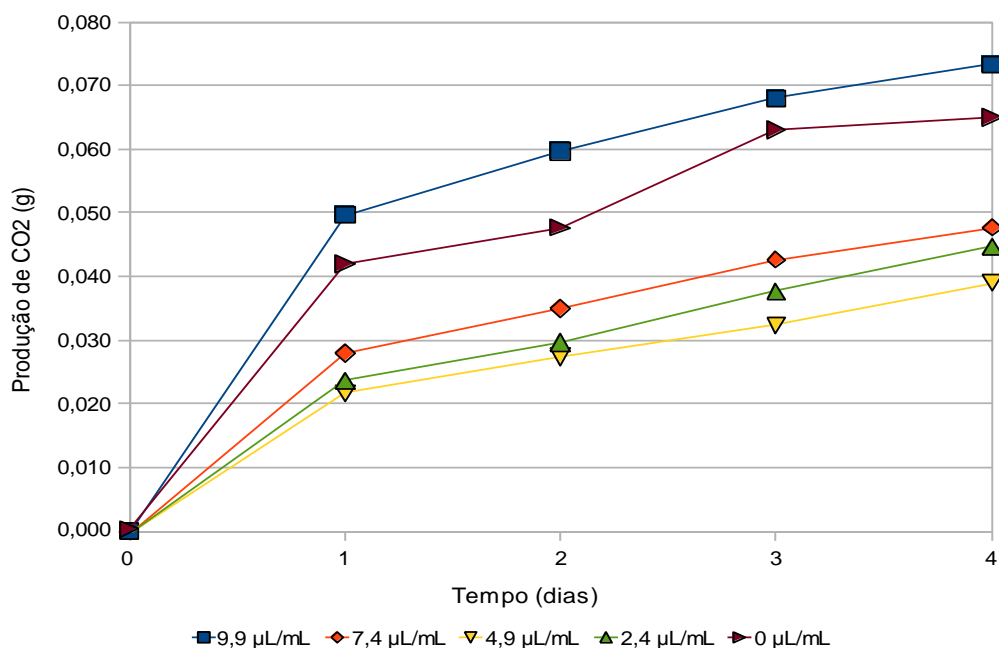


FIGURA 21. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 na presença de diferentes concentrações de ELNC, onde (■) 9,9 µL/mL, (◆) 7,4 µL/mL, (▼) 4,9 µL/mL, (▲) 2,4 µL/mL e (►) 0 µL/mL.

Cogitou-se na possibilidade de terem sido muito baixas as quantidades de ELNC adicionadas, então concentrações superiores foram testadas (FIGURA 22). Os resultados apresentados foram semelhantes, não houve uma correlação entre as quantidades adicionadas e a produção de CO<sub>2</sub>.

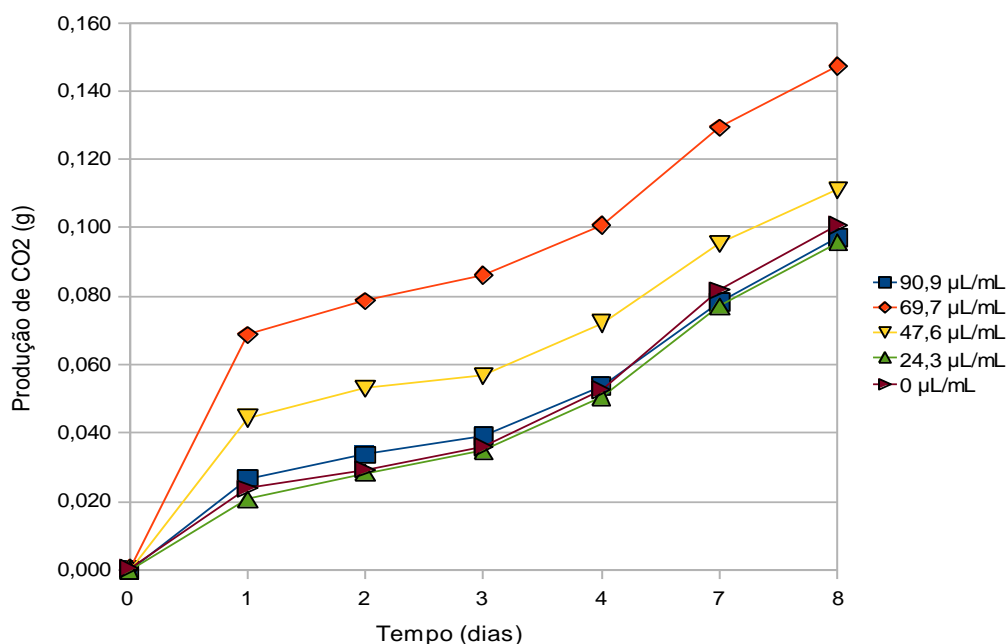


FIGURA 22. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 na presença de diferentes concentrações de ELNC, onde (■) 90,9 µL/mL, (◆) 69,7 µL/mL, (▼) 47,6 µL/mL, (▲) 24,3 µL/mL e (►) 0 µL/mL.

A falta de correspondência entre a produção de CO<sub>2</sub> de *Br. custersianus* NRRL Y-6653 deve-se provavelmente, ao fato de esta espécie não necessitar desses receptores de elétrons, visto que é Custer negativa (Scheffers e Wikén, 1969).

#### 4.7 Tolerância ao dióxido de enxofre

O uso de conservantes químicos no processo de vinificação diminui a contaminação microbiana, mas os microrganismos variam consideravelmente quanto a sua sensibilidade ao SO<sub>2</sub>. As duas linhagens de *Sacch. cerevisiae* (T1 e T2) apresentaram resistência a todas as concentrações de SO<sub>2</sub> empregadas (FIGURA 23 e FIGURA 24). Esse resultado está de acordo com aquele obtido por Silva *et al.* (2005). Os autores verificaram que a linhagem EMBRAPA

1vvt/97 é resistente a concentrações de  $\text{SO}_2$  (125 mg/L). Barata *et al.* (2008) mostraram que ao adicionar metabissulfito de potássio (MBP) em diferentes concentrações no meio de cultura, *Sacch. cerevisiae* cresceu na presença de 200 mg/L (115,2 mg/L de  $\text{SO}_2$  livre).

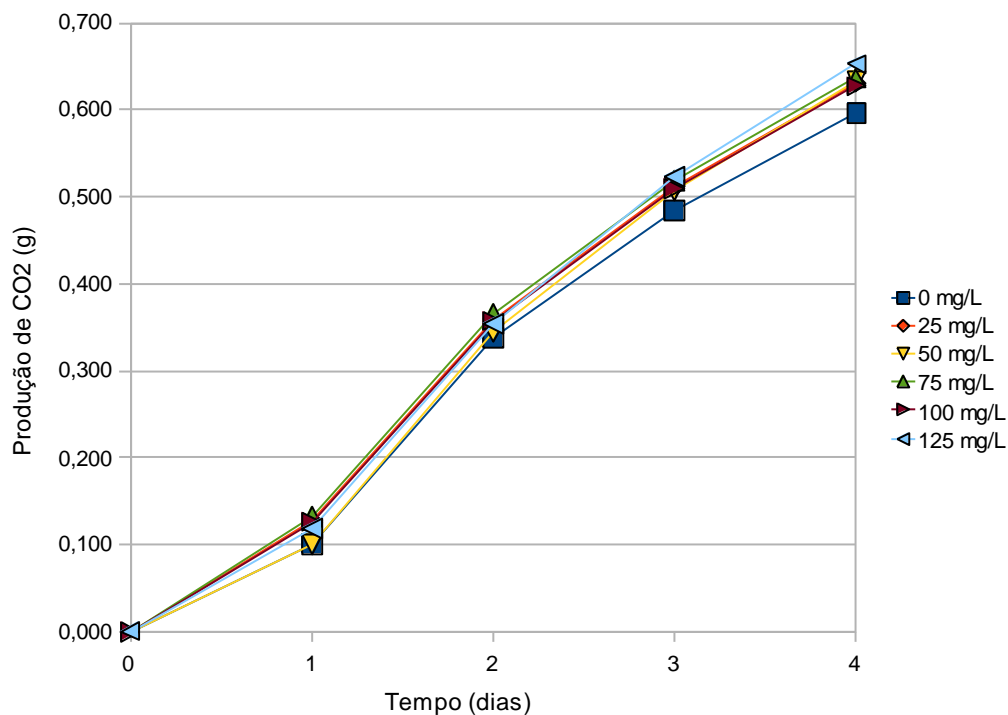


FIGURA 23. Produção do  $\text{CO}_2$  da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 na presença de diferentes concentrações de  $\text{SO}_2$ , onde (■) 0mg/L, (◆) 25mg/L, (▼) 50mg/L, (▲) 75mg/L, (►) 100mg/L e (◄) 125mg/L.

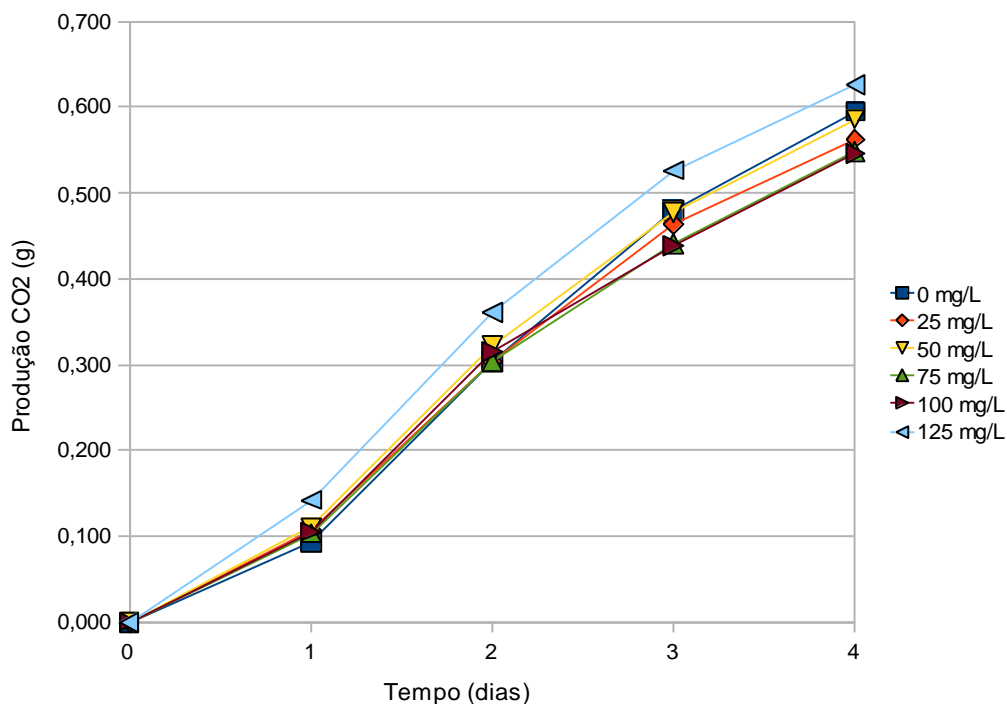


FIGURA 24. Produção do CO<sub>2</sub> da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 na presença de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>, onde (■) 0mg/L, (◊) 25mg/L, (▼) 50mg/L, (▲) 75mg/L, (►) 100mg/L e (◄) 125mg/L.

*Br. custersianus* NRRL Y-6653 apresentou atividade metabólica significativamente mais baixa que *Sacch. cerevisiae*. Apesar de apresentar uma produção de CO<sub>2</sub> muito baixa, observou-se que nenhuma das concentrações de SO<sub>2</sub> empregadas, foi capaz de inibir efetivamente seu metabolismo (FIGURA 25). A análise de variância das concentrações de SO<sub>2</sub> empregadas no último dia de fermentação não revelou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Barata *et al.* (2008) mostraram que 17 linhagens de *D. bruxellensis* cresceram na faixa de 60 a 90 mg/L de MBP (aproximadamente 34 a 52 mg/L de SO<sub>2</sub> livre), e *Br. anomalus* foi capaz de crescer na presença de 90 mg/L. Isto mostra que *Br. custersianus* NRRL Y-6653 foi mais resistente ao SO<sub>2</sub> do que as linhagens acima citadas. O SO<sub>2</sub> reage com moléculas receptoras de

elétrons (como o acetaldeído) as quais precisam estar disponíveis para que a via glicolítica de *Dekkera/Brettanomyces* (exceto *Br. custersianus*) não seja bloqueada. É provável que *Br. custersianus* restabeleça o balanço de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  de modo eficiente, como faz *Saccharomyces*. Quando o  $\text{SO}_2$  se combina com o acetaldeído, o  $\text{NAD}^+$  é recuperado por meio da produção de glicerol a partir de fosfato diidroxacetona.

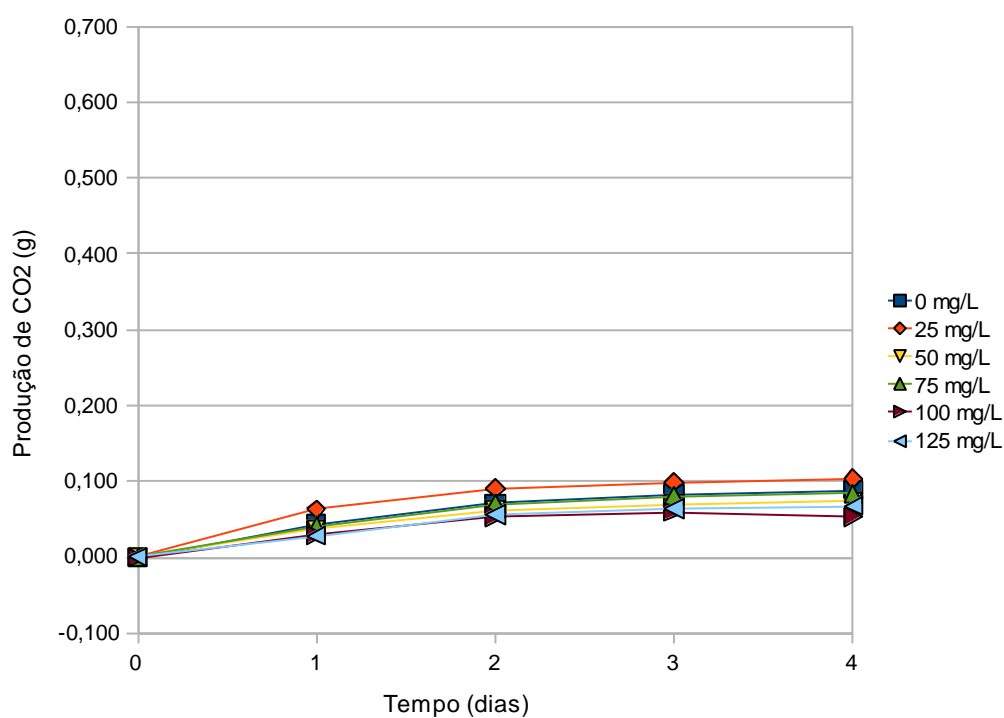


FIGURA 25. Produção do  $\text{CO}_2$  da linhagem de *Brettanomyces custersianus* NRRL Y-6653 na presença de diferentes concentrações de  $\text{SO}_2$ , onde (■) 0mg/L, (◆) 25mg/L, (▼) 50mg/L, (▲) 75mg/L, (►) 100mg/L e (◄) 125 mg/L.

*Br. custersianus* NRRL Y-6653 não teve sua atividade metabólica afetada na presença de 125 mg/L de  $\text{SO}_2$ , as concentrações normalmente utilizadas no processo de vinificação, entre 30 e 70 mg/L, não seriam

suficientes para impedir sua atividade, muito menos a quantidade de SO<sub>2</sub> produzida somente pelas linhagens de *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 e 91B/84.

## 5 CONCLUSÕES

1) As melhores condições de crescimento para *Br. custersianus* NRRL Y-6653 foram oferecidas pelo meio M (10g/L extrato de levedura (Bacto™ Yeast Extract) e 25% de mosto de uva).

2) O fator *killer* da linhagem *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 não teve ação sobre as células de *Br. custersianus* NRRL Y-6653. Esta linhagem é produtora de SO<sub>2</sub>. O SO<sub>2</sub> produzido pelas linhagens de *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97 e EMBRAPA 91B/84 não foi suficiente para inibir o metabolismo da *Br. custersianus* NRRL Y-6653. A produção de metabólitos como o SO<sub>2</sub> e a presença de atividade *killer* por si só não evitaram a ação da mesma.

3) O metabólito 4-etilfenol formado por *Dekkera/Brettanomyces* não tem atuação sobre o metabolismo de *Sacch. cerevisiae*. Já a produção de ácido acético pela *Brettanomyces*, afetou a atividade metabólica de *Sacch. cerevisiae*

e conseqüentemente prejudicou seu desempenho fermentativo. A linhagem de *Sacch. cerevisiae* neutra EMBRAPA 1vvt/97 foi mais resistente aos metabólitos produzidos por *Br. custersianus* NRRL Y-6653 durante a fermentação do que a linhagem EMBRAPA 91B/84, mostrando melhor adaptação a pressão seletiva exercida pelas condições adversas do mosto e do vinho. Enquanto a linhagem *Sacch. cerevisiae* EMBRAPA 91B/84 é mais resistente ao ácido acético em condições laboratoriais. Apesar do metabolismo das linhagens de *Sacch. cerevisiae* ter sido visivelmente afetado pela presença de ácido acético produzido por *Br. custersianus*, alguns parâmetros associados as propriedades do vinho não foram afetados pela linhagem contaminante. Presumi-se que maiores alterações nas propriedades do vinho tenham sido contidas pela própria atividade metabólica superior de *Sacch. cerevisiae*.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, D. A.; INGLEDEW, W. M. The importance of aeration strategy in fuel alcohol fermentations contaminated with *Dekkera/Brettanomyces yeasts*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.69. p.16 – 21, 2005.

ABBOT, D. A.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces yeasts* hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.66. p.641 – 647, 2005.

AHEARN, D. G., MEYER, S. A., MITCHELL, G., NICHOLSON, M. A., IBRAHIM, A. Sucrose-negative variants of *Candida tropicalis*. **J. Clin. Microbiol.**, [S.I.] v.5, p.494–496, 1977.

AMERINE, M. A., JOSLYN, M. A. **Table wines**. The technology of their production. 2 ed, California: 1970, 997 p.

ARAGON, P., ATIENZA, J., CLIMENT, D. Influence of clarification, yeast type, and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohols of Malvasia and Muscatel wines. **Am. J. Enol. Vitic**, Davis, 49, 211-219,1998.

BARATA, A.; CALDEIRA, J.; BOTELHEIRO, R.; PAGLIARA, D.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 121, p. 201-207, 2008.

BARNETT, J. A., PAYNE, R. W, YARROW, D. (Eds). **Yeasts: characteristics and identification**, 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University, p. 1002, 1990.

BEVAN, E. A.; MAKOVER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. In *Genetics Today. Proceedings of the XI International Congress on Genetics*. **Annals**, 1963, p.202–203.

BOSTIAN, K.A.; STURGEON, J.A.; TIPPER, D.J. Encapsulation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. *J. Bacteriol.* [S.l.], v.143, p.463-470, 1980.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSERT, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Portaria Nº 229, de 25 de outubro de 1988. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3602). Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3602>. Acesso em:15 maio 2008.

CARIDI, A., CUFARI, A., LOVINO, R., PALUMBO, R., TEDESCO, I. Influence of yeast on polyphenol composition of wine. **Food Technol. Biotechnol.**, [S.l.], 42, 37-40, 2004.

CARLSEN, H. N.; DEGN, H.; LLOYD, D. Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast. **J. Gen. Microbiol.**, London, v.137, p.2879-2883, 1991.

CHARPENTIER, C., FEUILLAT, M. Yeast autolysis. In: FLEET, G.H. (Ed.), **Wine Microbiology and Biotechnology.**, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p.225– 242.

CHATONNET, P., DUBORDIEU, D., BOIDRON, J., PONS, M. The origin of etilphenols in wine. **J. sci. food agric.**, London, v.60, p.165-178, 1992.

CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en ethyl-phenols. **Journal International des Sciences de al Vigne et du Vin**, [S.l.], v.27, p.277-298, 1993.

CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J. The influence of *Dekkera/Brettanomyces* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **Am. J. Enol. Vitic**, Davis, v.46, p.463-468, 1995.

CHATONNET, P.; VIALA, C.; DUBOURDIEU, D. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. **American Journal of Oenology and Viticulture**, Davis, USA, v.48, n.4, p.443-448, 1997.

CIANI, M.; FERRARO, L., Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, p.128 -132, 1996.

COCOLIN, L., RANTSIOU, K., IACUMIN, L., ZIRONI, R., COMI, G., Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.70, p.1347-1355, 2004.

COGGAN, M. Ozone in Wineries. **Vineyard & Winery**. Disponível em: [http://www.ciprocess.co.uk/pdfs/Ozone\\_In\\_Wineries.pdf](http://www.ciprocess.co.uk/pdfs/Ozone_In_Wineries.pdf). Acesso em: 16 nov. 2003.

COMITINI, F.; INGENIIS, J. DE; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.238 p.235-240, 2004.

CONN, E. E., STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447 p.

CONNEL, L., STENDER, H., EDWARDS, C.G. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based in peptide nucleic acid analysis. **Am. J. Enol. Vitic.** Davis, v.53, p.24–27, 2002.

CUSTER, M. TH.J., Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*. thesis, Technol. Univ., Delft, 1940.

DELFINI, C., GAIA, P., SCHELLINO, R., STRANO, M., PAGLIARA, A., AMBRO, S. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.50, p.5605-5611, 2002.

DELL'AGLI, M., BUSCIALÁ, A., BOSISIO, E. Vascular effects of wine polyphenols. **Cardiovasc. Res.**, London, v.63, p.593-602, 2004.

DIAS, L., DIAS, S., SANCHO, T., STENDER, H., QUEROL, A., MALFEITO-FERREIRA, M. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiol.**, London, v.20, p.567-574, 2003a.

DIAS, L., PEREIRA-DA-SILVA, S., TAVARES, M., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiol.**, London, v.20, p.377-384, 2003b.

DICKINSON, J. R.; KRUCKEBERG, A. L. Carbohydrate metabolism. In: QUEROL, A.; FLEET, G. H. (Eds.). **The yeast handbook: Yeast in Food and Beverages**. v.2, Berlin, Alemanha: Heidelberg, 2006, p.215-242.

DU TOIT, M., PRETORIUS, I. S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, [S.I.], v.21, p.74-96, 2000.

DU TOIT, W. J., PRETORIUS, I. S., LONVAUD-FUNEL, A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wines. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.98, p.862-871, 2005.

EDLIN, D. A. N., NARBAD, A., KICKINSON, J. R., LLOYD, D. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.125, p.311-316, 1995.

EGLI, C., HENICK-KLING, T. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v.52, p.241-247, 2001.

ESTEVE-ZARZOSO, B., PERIS-TORÁN, M. J., GARCÍA-MAIQUEZ, E., URUBURU, F., QUEROL, A. Yeast population dynamic during the fermentation and biological aging of sherry wines. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, p.2056-2061, 2001.

FIA, G., GIOVANI, G., ROSI, I. Study of b-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.99, p.509-517, 2005.

FREER, S. N. . Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v.18, p.217-275, 2002.

FREER, S. N., DIEN, B., MATSUDA, S. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under condition of constant pH. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v.19, p.101-105, 2003.

FUGELSANG, K. C.; EDWARD, C. G. **Wine microbiology**. Practical applications and procedures. 2 ed.. New York: The Chapman & Hall Enology Library, 1997, 393p.

GAO, C., FLEET, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. **J. Appl. Bacteriol.** Oxford, v.65, p.405– 410.

GAROGLIO, P.G. **Nuovo trattato di enologia**, v.3 Firenze: Ed. Scientifiche, 1953, 1453p.

GERBEAUX, V., JEUDY, S., MONAMY, C. Study of phenol volatiles in Pinot noir wines in Burgundy. **Bulletin de l'OIV**, [S.I.], v.73, p.581-599, 2000.

GERBEAUX, V., VINCENT, B., BERTRAND, A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wine. **Am. J. Enol. Vitic**, Davis, v.53, p.131-137, 2002.

GERÓS, H., AZEVEDO, M-M., CÁSSIO, F. Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. **Food technol. Biotechnol.**, [S.I.], v.38, p.59-62, 2000.

GILIS, J. F.; BARBIN, P.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Presencia de la levadura *Brettanomyces* en las bayas de uva: Influencia de los factores de la viña. **Revista Enología**, [S.I.], v.1, p.1-8, 2008.

GIUDICI, P; ZAMBONELLI, C. Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v.43, p.370-374, 1992.

GÓMEZ-RIVAS, L., ESCUDERO-ABARCA, B. I., AGUILAR-USCANGA, M. G., HAYWARD-JONES, P. M., MENDOZA, P., RAMÍREZ, M. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Hampshire, v.31, p.16-22, 2004.

GUERRA, C. C., Evolução polifenólica: Longevidade e qualidade dos vinhos tintos finos. In: Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura, Enologia e Gastronomia, 1, 1998, Bento Gonçalves. **Anais**, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. 55-65.

GUILLOUX-BENATIER, M., CHASSAGNE, D., ALEXANDRE, H., CHARPENTIER, C., FEUILLAT, M. Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of *Brettanomyces/Dekkera* em wine. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, [S.I.], v.35, p.157-164, 2001.

GUTIERREZ, L. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v.50, p.464-472, 1993.

HEARD, G.M., FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the growth of yeasts during the fermentation of grape juice. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.65, p.23– 28, 1998.

HEARD, G.M., FLEET, G.H. Occurrence and growth of killer yeast during wine fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington v.53, p.2171–2174, 1987.

HENICK-KLING, T.; PARK, Y. H. Considerations for the use of yeast and Bacterial started cultures: SO<sub>2</sub> and timing of inoculation. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v.45, p.464-469, 1994.

HENSCHKE, P. Wine yeast. In: ZIMMERMAN, F.K., ENTIAN, K.D. (Eds.). **Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1997, p.527– 560.

HERESZTYN, T. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v.37, p.127-132, 1986.

HERNAWAN, T., FLEET, G.H. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. **J. Ind. Microbiol.**, Amsterdam, v.14, p.440–450, 1995.

HODGSON, V.J., BUTTON, D. AND WALKER, G.M. Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. **Microbiology**, [S.l.], v.141, p.2003-2012, 1995.

HORWITS, W. (Ed). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 13 ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1980, 1017p.

HUTCHINS, K. AND BUSSEY, J. Cell wall receptor of yeast killer toxin: involvement of 1,6-L-glucan. **J. Bacteriol.**, Washington, v.154, p.161-169, 1983.

ILAND, P.; EWART., A.; SITTERS, J.; MARKIDES, A.; BRUER, N. **Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking**. Australia, 2000, p.96-101

JACKSON, M. G.; TIMBERLAKE, C. F.; BRICLE, P. VALLIS, L. Red wine quality: Correlations between colour, aroma and flavour and pigment and other parameters of young Beaujolais. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.29, p.715-727, 1978.

JACOBS. C. J; VAN VUUREN, H. J. J.; Killer yeasts in the wine industry: A review. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v.43, p.119-128, 1991.

KALATHENOS, P., SUTHERLAND, J. P., ROBERTS, T. A., Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.78, p.245-250, 1995.

KISKÓ, G. L., SHARP, R., ROLLER, S. Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.98, p.872-880, 2005.

KLENAR, I.; BEROVIC, M.; WONDRA, M. Phenolic Compounds from the Fermentation of Cultivars Cabernet Sauvignon and Merlot from the Slovenian Coastal Region. **Food technol. Biotechnol.** [S.l.], v. 42, p.11-17, 2004.

KREBS, H. A., WIGGINS, D., STUBBS, M. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. **Biochem. J.**, [S.l.], v.214, p.657-663, 1983.

KREGGER-VAN RIJ, N. J. W. The yeasts a taxonomic study. Amsterdam: 1984, 1082p.

KURZWEILOVÁ, H.; SIGLER, K. Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to zymocin K1. **Folia Microbiol.**, Delft, v.38 (6), 1993.

LACHANCE, M-A., BOWLES, J. M.; KWON, S.; MARINONI, G.; STARMER, W. T., JANZEN, D. H. *Metschnikowia lochheadii* and *Metschnikowia drosophilae*, two new yeast species isolated from insects associated with flowers. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.47, p.103-109, 2001.

LALLEMAND. Yeast selected from nature. **Lallemand Products**. Disponível em: [http://www.lallemandwine.us/products/yeast\\_strains.php](http://www.lallemandwine.us/products/yeast_strains.php) Acesso em: 22 nov. 2006.

LEE, F-L; JONG, S-C. New species *Dekkera custersiana* and *D. lambica*, teleomorphs of *Brettanomyces*. **Mycotaxon**, Ithaca, v.25, p.455-460, 1986.

LICKER, J. L.; ACREE, T. E.; HENICK-KLING, T. What is "Brett" (*Brettanomyces*) Flavor? A preliminary investigation. In: WATERHOUSE, A. L.; EBELER, S. E. (Eds.), **Chemistry of Wine Flavor**, v.714, American Chemical Society Symposium Series, 1999, p.96-115

LOUREIRO, V., QUEROL, A. The prevalence and control of spoilage yeast in foods and beverages. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v.10, p.356-365, 1999.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v.86, p.23-50, 2003.

MACHEIX, J.-J., FLEURIET, A., BILLOT, J. Phenolic compounds in fruit processing. In: **Fruit phenolics**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p.295-358.

MANSFIELD, A. K., ZOECKLEIN, B. W., WHITON, R. S. Quantification of glucosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v.53, p.303-307, 2002.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, Madrid, v.6, p.271-278, 2002.

MEDAWAR, W., STREHAIANO, P. DELIA, M. L. Yeast growth: lag phase modeling in alcoholic media. **Food Microbiol.**, London, v.20, p.527-532, 2003.

METEOROLOGIA. Dados meteorológicos mensais. **Estação Agroclimática da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 2008**. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/meteorologia/bento-mensais.html>

Acesso em: 07 jan 2009.

MILLET, V., LONVAUD-FUNEL, A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.30, p.136-141, 2000.

MORATA, A., GONZÁLEZ, C., SUÁRES-LEPE, J. A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplement with hydroxycinnamic acids. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.116, p.144-152, 2007.

MORATA, A., GÓMEZ-CORDOVÉZ, M. C., CALDERÓN, F., SUÁREZ, J. A. Effects of pH, temperature and SO<sub>2</sub> on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.106, p.123-129, 2006.

MORATA, A., GÓMEZ-CORDOVÉZ, M. C., SUBERVIOLA, J., BARTOLOMÉ, B., COLOMO, B., SUÁREZ, J. A. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.51, p.4084-4088, 2003.

OELOFSE, A., PRETORIUS, I. S., DU TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. **S. Afr. J. Enol. Vitic.**, [S.l.], v.29, p.128-144, 2008.

OSTLER, E. *Brettanomyces*: occurrence, flavour effects and control. **Amateur Winemakers of Ontario**, 2002. Disponível em: <http://www.makewine.com/makewine/brett.html> Acesso em: 15 nov. 2008.

PAMPULHA, M. E., LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.11, p.269-274, 1989.

PHYSTER, T. G., MILLS, D. A. Novel methods to detect *Brettanomyces* (*Dekkera*) in wine. In Technical abstracts, 55<sup>th</sup> annual meeting, 55, 2004, San Diego, CA **Abstracts**. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture, 2004, 30.

PRINGLE, J. R., MOR, J-R. Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem. **Methods Cell Biol.**, New York, v.11, p. 131-168, 1975.

QUEROL, A. JIMÉNEZ, M., HUERTA, T. Microbiological and Enological Parameters during Fermentation of Musts from Poor and Normal Grape-



Harvests in the Region of Alicante (Spain). **J. Food Sci.**, Chicago, v.55, p.1603-1606, 1990.

QUINTAS, C.; LIMA-COSTA, E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. The effect of ethanol on the plasma membrane permeability of spoilage yeasts. **Food technol. Biotechnol.** [S.l.], v.38, p.47 – 51, 2000.

RANKINE, B. C. Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.18, p.583-589, 1967.

RENOUF, V., FALCOU, M., MIOT-SERTIER, C., PERELLO, M. C., DE REVEL, G., LONVAUD-FUNEL, A. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. **J. Appl. Microbiol.**, London, v.100, p.1208-1219, 2006.

RENOUF, V., LONVAUD-FUNEL, A. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grapes berries. **Microbiol. res.**, Jena, v.162, p.154-167, 2007.

RIBÉREAU – GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments**. 2ed., Chichester: John Wiley, 2006, p.441.

RIBÉREAU – GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology**, v.2. The chemistry of the wine stabilization and treatments. New York: John Wiley & Sons, Ltd., 2000, p.209-253.

RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D., **Traité d'Oenologie**, 2. Chimie du vin, stabilisation et traitements. Dunod, Paris 1998, p.520.

RIBÉREAU-GAYON, J. PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBÉREAU-GAYON, P. **Traité d'Oenologie Sciences et Techniques du Vin**. 2ed. Bordas, Paris: Dunod, 1982, 645p.

RIZZON, L. A., MANFROI, L. Sistema de produção de vinho tinto. **Sistemas de produção**, **12**, **2006** Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto/> Acesso em: 07 jan. 2009.

RIZZON, L. A., MIELE, A. Total dry extract in Brazilian wines: Comparison of analytical methods. **Cienc. rural**, Santa Maria, v.26, p.297-300, 1996.

RODRIGUES, N., GONÇALVES, G., PEREIRA-DA-SILVA, S., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeast of the genera *Dekkera/Brettanomyces* sp. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.90, p.588-599, 2001.

ROMANO, P., SUZZI, G., COMI, G. ZIRONI, R. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.73, p.126-130, 1992.

ROMANO, P., SUZZI, G. Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.75, p.541-545, 1993.

ROMANO, P., SUZZI, G., ZIRONI, R., COMI, G. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, p.1838-1841, 1993.

ROMANO, P., SUZZI, G., COMI, G. ZIRONI, R., MAIFRENI, M. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.82, p.615-618, 1997.

ROJAS, V., GIL, J. V., PIÑAGA, F., MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiol.*, London, v.70, p.283-289, 2001.

SANGORRIN, M. P.; ZAJONSKOVSKY, I. E.; LOPES, C. A.; RODRÍGUEZ, M. E.; VAN BROOCK, M. R. G. de. Killer behavior in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). **J. Basic. Microbiol.**, Berlin, v.41, p.105-113, 2001.

SANGORRIN, M. P.; LOPES, C. A.; GIRAUDO, M. R.; CABALLERO, A. C. Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v.119, p.351-357, 2007.

SCHEFFERS, W. A. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. **Nature**, [S.I.], v.210, p.533-534, 1966.

SCHEFFERS, W. A.; WIKÉN, T. O. The Custer effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.35, supplement: Yeast Symposium, 1969.

SCHMITT, M.J. AND TIPPER, D.J. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, [S.I.], v.10, p.4807-4815, 1990.

SILVA, G. A. DA, LAZZAROTTO, M., BRANDOLT, S. F., CAMARGO, U. A. Quantification of antioxidant capacity with dpph methodology using methanol, ethanol, and acetone as diluents. In: VIII International Symposium of Temperate Zone Fruits the Tropics and Subtropics, 8, 2007. **Annals**. Florianópolis, 2007 57-58.

SILVA, G. A. DA, ALMEIDA, E. A. de. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Braz. Arch. Biol. Technol**, Curitiba, v.49, p.411-419, 2006.

SILVA, G. A. DA; MURATORE, L. The influence of yeast strain on the colour of Cabernet Sauvignon Red Wines. **Braz. Arch. Biol. Technol**, Curitiba. v.49, p.165-171, 2006.

SILVA, G. A. DA; ESTEVES, M. C.; GURAK, P. D.; BORTOLINI, F. Influência da concentração inicial de SO<sub>2</sub> sobre a acidez volátil do vinho tinto. In: XV Simpósio Nacional de Fermentações, 15, 2005, Recife. **Anais**. Recife, 2005, 6.

SILVA, G. A. DA; POLETTO, C. M.; GURAK, P. D.; POLI, J. S. Avaliação de meios de cultura para o isolamento de levedura em vinhos. In: X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia. II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia, 10, 2005a. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005a, 345.

SILVA, G. A. DA; GURAK, P. D.; CASTRO, H. M. DE; FARIAS, D. Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto Cabernet Sauvignon. In: X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia. II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia, 10, 2005b. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005b, 345.

SILVA, P., CARDOSO, H., GERÓS, H. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. **Am. J. Enol. Vitic.**, Davis, v.55, p.65-72, 2004.

SILVA, G. A. DA; FICAGNA, E. Características fermentativas de quatro linhagens de leveduras autóctones e uma linhagem comercial. In: X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 10, 2003, Bento Gonçalves. Seminário Cytel: Influência da tecnologia vitícola e vinícola na cor dos vinhos. **Anais**: Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003, 213-214.

SILVA, G. A. DA; MURATORE, L. Influência da fermentação malolática espontânea sobre a evolução da acidez volátil em vinhos Cabernet Sauvignon. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM, 14, 2003, Florianópolis-SC. **Anais**. Florianópolis-SC, 2003, 1-7.

SILVA, G. A. da. Deterioração microbiológica do vinho e do suco de uva. UVA para processamento pós-colheita, Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves). **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, p.49-63, 2003a.

SILVA, G. A. da. Elaboração de vinho: Aspectos microbiológicos. UVA para processamento pós-colheita, Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves). **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, p.36-48, 2003b.

SILVA, G. A. *Dekkera* e *Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos: características, problemas e identificação. Embrapa Uva e Vinho. **Documento**, v.1, p.1-62, 2003c.

SILVA, G. A. da. Evidência de uma linhagem de levedura com característica *killer*, neutra e sensível. In: 9º Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 9, 1999a, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999a, 169.

SILVA, G. A. da. The occurrence of Killer sensitive and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on Killing behaviour. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Berlin, v.46, p.112-121, 1996.

SILVA, G.A. da. Comportamento de leveduras isoladas no Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves RS, com relação a atividade *killer*. In: 9º Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 9, 199b, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999b, 170.

SOMER, T. C.; EVANS, M. E., Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, "chemical age." **J. Sci. Food Agric.**, London, v.28, p.279-287, 1977.

STENDER, H., FIANDACA, M., HYLDIG-NIELSEN, J. J., COULL, J. PNA for rapid microbiology. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.48, p.1-17, 2002.

STENDER, H., KURTZMAN, C., HYLDIG-NIELSEN, J. J., SORENSEN, D., BROOMER, A., OLIVEIRA, K. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, p.938-941, 2001.

STRATFORD, M. Food and beverages spoilage yeasts. In: QUEROL, A., FLEET, G, H. (Eds.). **The Yeast Handbook Yeasts in food and beverages**, v.2. Germany: Springer, 2006, p.335-379.

SUAREZ, R., SUÁREZ-LEPE, J. A., MORATA, A., CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. **Food Chem.**, London, v.102, p.10-21, 2007.

TEOH, A. L., HEARD, G., COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.95, p.119-126, 2004.

TESZLÁK, P.; GAÁL, K.; NIKFARDJAM, M. S. P. Influence of grapevine flower treatment with gibberellic acid (GA3) on polyphenol content of *Vitis vinifera* L. wine. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.543, p.275-281, 2005.

VALENTÃO, P., SEABRA, R. M., LOPES, G., SILVA, L. R., MARTINS, V., TRUJILLO, M. E., VELÁZQUEZ, E., ANDRADE, P. B. Influence of *Dekkera*

*bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. **Food Chem.**, London, v.100, p.64-70, 2007.

VAN DER WALT, J. P. *Brettanomyces custersianus* nov. spec. **Anton Leew Int J G**, Amsterdam, v., p.332-336, 1961.

VAN DER WALT, J. P. *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.30, p.273-280, 1964.

VAN DER WALT, J. P. Genus 2: *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. In: KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (Ed.). **The yeast a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984, p.562-576.

VENABLES, W. N.; SMITH, D. M.; THE R DEVELOPMENT CORE TEAM. **An introduction to R**. ed. 2.0.1, p.1-90, 2004.

VERACHTERT, H., DAWOUD, E. Microbiology of lambic-type beers. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.57, p.R11-R12, 1984.

VOLSCHEK, G.; VILJOEN, M.; GROBLER, J.; BAUER, F.; LONVAUD-FUNEL, A.; DENAYROLLES, M.; SUBDEN, R. E.; VUUREN, G. J. J. van. Malolactic fermentation in grape musts by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Am. J. Enol. Vitic**, Davis, v.48, p.193-197, 1997.

WEBB, A. D., INGRAHAM, J. L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.5, p.317-353, 1963.

WIJSMAN, M. R., DIJKEN, J. P. VAN, KLEEFF, B. H. A. VAN, SCHEFFERS, A. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic condition (Custer effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.50, p.183 – 192, 1984.

YOUNG, T.W., YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.44, p.59–77, 1978.

## 7 APÊNDICES

### Apêndice 1

#### R Program

R version 2.7.1 (2008-06-23)

Copyright (C) 2008 The R Foundation for Statistical Computing

ISBN 3-900051-07-0

R é um software livre e vem sem GARANTIA ALGUMA.

Você pode redistribuí-lo sob certas circunstâncias.

Digite 'license()' ou 'licence()' para detalhes de distribuição.

R é um projeto colaborativo com muitos contribuidores.

Digite 'contributors()' para obter mais informações e

'citation()' para saber como citar o R ou pacotes do R em publicações.

Digite 'demo()' para demonstrações, 'help()' para o sistema on-line de ajuda,

ou 'help.start()' para abrir o sistema de ajuda em HTML no seu navegador.

Digite 'q()' para sair do R.

**Programa anvirtukey.txt**

Análise de Variância e Comparação das Médias pelo teste de Tukey

Autor: Gildo Almeida da Silva

***Inteiramente Casualizado***

1-digite `g=read.table("arquivo.txt",h=T)`

2-defina quantos tratamentos `nt=`

3-defina quantas repetições `nr=`

4-Digite `g` para ver a tabela

5-Digite `source("anvartukey.txt")`

7-Digite `G=c(g$nome da coluna1, g$nome da coluna2....g$nome da coluna n)`

8-Digite `ict(icavt)` para ver a análise de variância

9-Digite `tuk(t)` para ver os valores do teste de Tukey. O que estiver à direita do 0 zero é significativo

10-Digite `tukg(tg)` para ver o gráfico do teste de Tukey. Os que estiverem à direita da linha vermelha, 0 (zero), são significativos entre si

11-Se não estiver vendo as regras do inteiramente causalizado, mova no cursor para cima para ver estas regras

INTERVALO DE CONFIANÇA De médias de um experimento-GILDO ALMEIDA DA SILVA)

\*\*\*\*\*

DEFINA a média `m1=g$A`

DEFINA `t0=`na tabela de t, levando em conta o GL do Resíduo

DEFINA diga qual o valor do quadrado médio `qm=(Mean Sq Residuals)`

DEFINA o número de repetições `nr=`

Digite `intvc()`

\*\*\*\*\*

INTERVALO DE CONFIANÇA De médias de um experimento-GILDO  
ALMEIDA DA SILVA)

\*\*\*\*\*

DEFINA a média  $m=c(g\$A,g\$B,\dots,g\$n)$

DEFINA  $t_0$  na tabela de t, levando em conta o GL do Resíduo

DEFINA diga qual o valor do quadrado médio  $qm=$  encontrado na tabela de  
variância

DEFINA o número de repetições  $nr=$

Digite `intvc()`

\*\*\*\*\*

***Blocos ao Acaso = bac=function(bacav)***

Crie tabelas em .txt. Cada bloco em uma tabela diferente

1-digite para o primeiro bloco, `g=read.table("arquivo.txt", h=T)`

1-digite para o segundo bloco, `g1=read.table("arquivo.txt", h=T)`

1-digite o terceiro e assim por diante, `g2=read.table("arquivo.txt", h=T)`

2-Digite `G=c(g$nome da coluna1, g$nome da coluna2....g$nome da colunan,  
g1$nome da coluna ...gn$nome da colunan)`

3-defina quantos tratamentos (`nt=`)

5-defina quantas repetições (`nr=`)

6-defina quantos blocos (`nb=`)

7-defina o nome dos tratamentos `labt=c("nome do tratamento1",  
"tratamento2"..."tratamenton")`

8-defina o nome dos blocos `labb=c("nome do bloco1", "bloco2"..."blocon")`



9-defina a quantidade de dados de cada bloco db=

10-Digite g para ver a tabela

11-Digite bac(bacav)para análise de variância de blocos ao acaso sem a interação trat:bloc

12-Digite baci(bacavi)para análise de variância de blocos ao acaso com a interação trat:bloc

13-Digite tukb(tukb)para análise de variância de blocos ao acaso sem a interação trat:bloc

14-Digite tukbi(tukbi)para análise de variância de blocos ao acaso com a interação trat:bloc

Para ver a tabela completa, digite tab()

15-Se não estiver vendo as regras do inteiramente causalizado, mova no cursor para cima para ver estas regras

=====Programa=====

Autor: Gildo Almeida da Silva – (01-08-2008)

## **Apêndice 2**

Processo de vinificação em tinto conforme descrito por Rizzon & Manfroi (2006):

- Desengaçamento: Desengace é a separação do engaço (cabinhos) das bagas, é feito com a finalidade de limitar a adstringência, o amargor e o gosto desagradável de herbáceo e de securo do vinho.
- Esmagamento das uvas: O esmagamento é realizado para liberar o suco contido na polpa e facilitar a dissolução da matéria corante durante a maceração. Não deve ser enérgico para evitar que as parte sólidas da

uva sejam trituradas, o que contribuiria para a formação de borras e aparecimento de sabor herbáceo.

- Chaptalização: Chaptalização é a adição de açúcar no mosto da uva, com o objetivo de corrigir o teor de açúcar, caso este não seja suficiente para obtenção de teor alcoólico final de 12°GL.
- Adição de SO<sub>2</sub>: A sulfitagem é a adição de dióxido de enxofre no mosto. Em enologia é utilizado com antioxidante e bactericida, é uma prática bastante antiga.
- Inoculação: As leveduras são os microrganismos que transformam o açúcar contido no mosto em etanol. São, portanto, os agentes biológicos da vinificação. Na moderna enologia, não se concebe a elaboração de vinho sem o uso de leveduras selecionadas. Existem vários preparados comerciais, compostos por leveduras secas ativas. A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura que melhor se presta à vinificação, pois tem a capacidade de transformar totalmente os açúcares da uva em etanol e outros compostos.
- Fermentação alcoólica: A fermentação alcoólica é a transformação dos açúcares da uva dissolvidos no mosto (glicose e frutose) em etanol e subprodutos (glicerol, acetaldeído, ácido acético, ácido láctico, etc). Na vinificação em tinto, a fermentação alcoólica pode se dividida em duas fases: tumultuosa e lenta. A fermentação tumultuosa caracteriza-se pela grande atividade das leveduras, gerando elevação da temperatura e grande liberação de gás carbônico, que empurra as partes sólidas para a parte superior do recipiente formando o “chapéu”.

- **Maceração:** A maceração é uma das primeiras e mais importantes etapas da vinificação em tinto. Nela ocorre a extração dos compostos contidos nas partes sólidas da uva (película e semente), devido ao contato com o mosto. Nesse período, ocorre a diluição seletiva e a difusão de compostos da película e semente para o mosto. Para produzir vinhos com boa intensidade de cor e com aromas frutados, o período de maceração deve ser curto, de no máximo 6 dias.
- **Remontagens:** São realizadas para extrair os componentes da parte sólida da uva, homogeneizar a massa vínica em fermentação, controlar a temperatura e evitar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis na parte superior da parte sólida da uva.
- **Descuba:** É a separação das fases sólida (bagaço) e líquida (vinho em elaboração).
- **Trasfegas:** Consiste em transferir o vinho de um recipiente para outro, visando separá-los dos sólidos insolúveis que sedimentam ao final da fermentação (borras).
- **Atestos:** São operações que consistem em manter sempre cheios os recipientes de estocagem, evitando o contato do vinho com o ar. Este contato pode ocasionar no vinho oxidação descontrolada e/ou condições para o desenvolvimento de bactérias nocivas à qualidade, principalmente bactérias acéticas. O vinho utilizado no atesto deve ser de mesma qualidade à do vinho atestado. Os atestos devem ser realizados logo após a fermentação maloláctica e repetidos sempre que houver necessidade.

- Monitoramento da fermentação maloláctica: Consiste na transformação do ácido málico em ácido láctico, pela ação de bactérias conhecidas como bactérias lácticas. De maneira geral, os vinhos tintos são beneficiados com esta fermentação ao adquirirem maior complexidade aromática e suavidade gustativa. Normalmente a fermentação maloláctica inicia ao final da fermentação alcoólica, quando a autólise das leveduras se intensifica. Pode ocorrer de forma espontânea ou através da inoculação de bactérias lácticas ao vinho.
- Estabilização: É a fase que sucede as fermentações alcoólica e maloláctica. Nela, diversos elementos originados da uva (polifenóis e peptídeos) são neutralizados e/ou induzidos à sedimentação via métodos químicos ou físicos. Uma vez decantados, são extraídos.
- Engarrafamento
- Armazenagem

## 8 VITA

### **Dados pessoais**

Nome: Carolina Madalozzo Poletto

Nascimento: 13/07/1983, Erechim/RS - Brasil

Filiação: Adalberto Luiz Poletto e Flávia Regina Madalozzo

Endereço residencial: Rua Salgado Filho, 58/203, Bento Gonçalves/RS – Brasil

-CEP:95700-000

Fone: (54) 91471702

E-mail: [carolinapoletto@yahoo.com.br](mailto:carolinapoletto@yahoo.com.br)

### **Formação acadêmica/titulação**

2007-2009 – Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

2001-2006 - Graduação em Engenharia de Alimentos

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

URI-Campus de Erechim.

1998-2000 – Ensino Médio (2º grau)

Instituto Barão do Rio Branco, RS, Brasil.

1990-1997 – Ensino Fundamental (1º grau)

Colégio São José, RS, Brasil.

### **Produção científica, tecnológica e artística/cultural**

#### *Resumos em anais de eventos*

SILVA, G. A. da, POLI, J. S., **POLETTO, C. M.**, VALENTE, P. Composição do meio e sua influência na produção do fator “killer”. – Anais/ I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre/RS, 11 a 12 de dezembro de 2008.

SILVA, G. A. da, **POLETTO, C. M.**, POLI, J. S., VALENTE, P. Tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* e *Brettanomyces custersianus* a diferentes concentrações de dióxido de enxofre. Anais/ I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre/RS, 11 a 12 de dezembro de 2008.

**POLETTO, C. M.**, SILVA, G. A. da, POLI, J. S., BALBINOTTE, J., CARBONERA, A. de S.; BARBOSA, E. dos S., LOCATELLI, C., VALENTE, P. Inibição do metabolismo de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* induzida por *Brettanomyces custersianus* - Anais/6º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 21 a 22 de outubro de 2008.

**POLETTO, C. M.**, SILVA, G. A. da, POLI, J. S. Repicagens sucessivas e sua influência sobre o perfil metabólico de leveduras - Anais/6º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 21 a 22 de outubro de 2008.

POLI, J. S., SILVA, G. A. da, **POLETTO, C. M.**, VALENTE, P. Composição do meio e sua influência na detecção do fator killer em *Saccharomyces cerevisiae* - Anais/6º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 21 a 22 de outubro de 2008.

POLI, J. S., SILVA, G. A. da, **POLETTO, C. M.** Estabilidade do perfil de linhagens killer, sensíveis e neutras - Anais/6º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 21 a 22 de outubro de 2008.

SILVA, G. A. da, **POLETTO, C. M.**, POLI, J. S., BALBINOTTE, J., CARBONERA, A. de S.; BARBOSA, E. dos S., LOCATELLI, C., VALENTE, P. Comportamento de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* na presença da levedura contaminante *Brettanomyces custersianus* durante a fermentação tumultuosa da vinificação em tinto - Anais/XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves/RS, 22 a 24 de setembro de 2008.

SILVA, G. A. da, POLI, J. S., **POLETTO, C. M.**, BALBINOTTE, J., VALENTE, P. Composição do meio e sua relação com a expressão killer - Anais/XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves/RS, 22 a 24 de setembro de 2008.

SILVA, G. A. da, BARBOSA, E. dos S., **POLETTO, C. M.**, POLI, J. S., LOCATELLI, C., LEITE, S. G. F. Potencialidade de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação tumultuosa da cv. Cabernet Sauvignon - Anais/XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves/RS, 22 a 24 de setembro de 2008.

SILVA, G. A. da, BRANDOLT, S. D. F., POLI, J. S., **POLETTO, C. M.**, MELLO, L. M. R. De, ZANUS, M. C., CAMARGO, U. A. Polyphenols and antioxidant content em grape juice. - 31º Congresso Mondiale Della Vigna e Del Vino 6ª Assemblea Generale Dell' O.E.V., realizado em 15 a 20 de junho de 2008 em Verona, Itália.

BERNARDI, T., LANDELL, M., **POLETTO, C. M.**, POLI, J. S., VALENTE, P. Inibição de *Dekkera/Brettanomyces* por leveduras "killer" isoladas de produtos lácteos - 5º Congresso Brasileiro de Micologia, realizado no período de 12 a 16 de novembro de 2007 em Recife, Pernambuco, Brasil.

BERNARDI, T., **POLETTO, C. M.**, POLI, J. S., LONDERO, L., VALENTE, P. Desenvolvimento de meio de cultivo diferencial para o isolamento de leveduras *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos - 5º Congresso Brasileiro de Micologia, realizado no período de 12 a 16 de novembro de 2007 em Recife, Pernambuco, Brasil.

LONDERO, L., BERNARDI, T. L., POLI, J. S., **POLETTO, C. M.** Desenvolvimento de meio de cultura para isolamento de leveduras pertencentes aos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* - XIX Salão de Iniciação Científica, promovido pela Pró-Reitoria de Pesquisa – PROPESQ na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, realizado no período de 22 a 26 de outubro de 2007.

POLI, J. S., SILVA, G. A. da, GURAK, P. D., **POLETTO, C. M.**, WENZEL, G. E. Influência da concentração de levedura na concentração de polifenóis em vinhos tintos Cabernet Sauvignon - XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM 2007. Curitiba – PR, realizado de 29 de julho a 01 de agosto de 2007.

BALBINOTTE, J., SILVA, G. A. da, POLI, J. S., **POLETTO, C. M.** SO<sub>2</sub> e a estabilidade de leveduras K<sup>+</sup>R<sup>+</sup> com relação à capacidade *killer*. Resumos / 4<sup>o</sup> Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves-RS, realizado de 18 a 19 de Outubro de 2006.

SILVA, G. A. da, **POLETTO, C. M.**, GURAK, P. D., POLI, J. S. Avaliação de meios de cultura para o isolamento de leveduras em vinhos - Anais do X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia. Bento Gonçalves-RS, realizado de 07 a 11 de novembro de 2005.

**POLETTO, C. M.**, HASSEMER, D. A., CICHOSKI, A. J. Fermentado de folhas de erva-mate (*Illex paraguariensis*) a 15°C - 6<sup>o</sup> Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: Abrindo Caminhos para o Desenvolvimento Científico, Tecnológico e Industrial. Campinas-SP, realizado de 07 a 10 de Novembro de 2005.

HASSEMER, D. A., **POLETTO, C. M.**, CICHOSKI, A. J., HEPP, L. U., NASCIMENTO, I. Fermentado de sementes de erva-mate - XIX CBCTA Ciência e Tecnologia de Alimentos: Estratégia para o Desenvolvimento. Recife-PE, realizado de 07 a 10 de setembro de 2004.