

Dekkera e Brettanomyces: Leveduras não Competitivas que Deterioram Vinhos



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

Luiz Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana

Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores-Executivos

Embrapa Uva e Vinho

Alexandre Hoffmann

Chefe-Geral

Lauro Luiz Dorigon

Chefe-Adjunto de Administração

Lucas da Ressurreição Garrido

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

ISSN 1516-8107

Dezembro, 2005

Documentos 41

Dekkera e Brettanomyces: Leveduras não Competitivas que Deterioram Vinhos

Gildo Almeida da Silva

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento 515

Fone: (54) 3455-8000

Fax: (54) 3451-2792

<http://www.cnpuv.embrapa.br/>

Email: sac@cnpuv.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente:

Secretário-Executivo:

Membros:

Supervisor editorial:

Revisor de texto:

Normalização bibliográfica:

Tratamento de ilustrações: Gildo Almeida da Silva

Foto da capa: Daiane Sganzerla

Editoração eletrônica: Gildo Almeida da Silva

1ª edição

1ª impressão (2005): 100

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº9.610).

Ficha catalográfica

©Embrapa 2005

Autores

Gildo Almeida da Silva

Ph.D., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho,
gildo@cnpuv.embrapa.br

Sumário

Introdução	8
Características morfológicas dos gêneros	8
<i>Dekkera</i>	9
<i>Brettanomyces</i>	9
Espécies do gênero <i>Dekkera</i>	9
Espécies do gênero <i>Brettanomyces</i>	19
Distribuição na natureza	20
Ocorrência	22
Austrália	22
Argentina	23
Brasil	23
França	23
Problemas de ordem geral	23
Problemas específicos potenciais e condições para a síntese microbiológica de fenóis	24
Detecção e identificação	29
Detecção por processo microbiológico clássico	29
Isolamento	29
Exame macroscópico	30
Exame microscópico	30
Métodos Convencionais de Detecção e de Identificação de <i>Dek- kera</i> e <i>Brettanomyces</i>	31
Condições	31
Testes bioquímicos	31
Chaves para identificação	36
<i>Brettanomyces</i>	36
<i>Dekkera</i>	36
Dificuldades referentes aos testes bioquímicos	36

Metabólitos específicos - Teste VPR	40
Meios de cultura	40
Dificuldades referentes ao cultivo de <i>Dekkera</i> e <i>Brettanomyces</i> em meio sólido	44
Métodos Cromatográficos para Detecção de <i>Dekkera</i> e <i>Brettanomyces</i>	44
GC/MS - Sniffing	44
HS-SPME- GC/Capilar/FID ou MS	45
HPLC/MS	50
HPLC/UV - GC/DIC	50
Dificuldades referentes à detecção de <i>Dekkera</i> e <i>Brettanomyces</i> por monitoramento analítico de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol	52
Métodos não Convencionais de Detecção e de Identificação de <i>Dekkera</i> e <i>Brettanomyces</i>	52
PCR (Polymerase Chain Reaction) - Reação de Polimerização em Cadeia	52
A rejeição contra <i>Dekkera</i> e <i>Brettanomyces</i> é unânime?	53
Controle e precauções	55
SO ₂	55
Dimetil dicarbonato-DMDC	56
Ozônio (O ₃)	57
Filtração	59
Temperatura e pH	60
Procedimentos de controle	60
Referências bibliográficas	61

Dekkera e Brettanomyces: Leveduras não Competitivas que Deterioram Vinhos

Gildo Almeida da Silva

Introdução

Leveduras estão presentes em vários ambientes. As uvas usadas para a elaboração de vinhos trazem consigo, além de *Saccharomyces cerevisiae*, diversos outros gêneros e espécies de leveduras. Entre as leveduras de interesse enológico, embora não sejam da flora normalmente encontrada na uva, destacam-se os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*. Sua importância enológica repousa no potencial que possuem as espécies representantes destes gêneros em deteriorar vinhos já elaborados. Possuem características metabólicas diferentes daquelas apresentadas por *Sacch. cerevisiae*, contribuindo para seu comportamento não competitivo, durante o processo de fermentação, mas bastante oportunista. Por ser oportunista e por apresentar um caráter não competitivo, estes gêneros permitem que as demais leveduras atuem no processo fermentativo. Após esta fase, entram lenta e progressivamente em atividade, causando sérios danos ao vinho.

Devido ao metabolismo, estes microrganismos podem provocar aumento da acidez volátil e a formação do 4-etil-fenol no vinho, levando à depreciação o produto final. A ação deteriorante dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* é de efeito retardado.

O presente trabalho se propõe a apresentar suas características morfológicas, mostrar suas habilidades e deficiências sob ponto de vista nutricional, abordar formas convencionais de detecção, descrever a ação destes microrganismos deteriorantes e, por fim, revelar as formas de se evitar a presença destes microrganismos nos vinhos.

Características morfológicas dos gêneros

O gênero *Brettanomyces* já era conhecido, segundo Smith et al. (1990), desde 1904, quando Claussen, conseguiu isolar esta levedura a partir de cerveja inglesa no final da fermentação. O nome *Brettanomyces* é uma alusão ao termo "British" devido ao uso de espécies deste gênero na elaboração de cerveja de aroma forte (Franson, 2001). Segundo Smith et al. (1990), só em 1940 Custer revelou os detalhes desta levedura e descreveu sua morfologia e fisiologia. O vigor na formação de ácido acético, o crescimento lento em ágar malte ou extrato de malte, o curto período de sobrevivência, a frequência de células ovais e a ausência de ascósporos, permitiram agrupar os integrantes deste gênero em quatro espécies e duas variedades (linhagens). Van der Walt & van Kerken (1958), ao estudar a ocorrência de *Brettanomyces*, citam a presença

de outros gêneros de leveduras menos a presença de *Dekkera*. Isto se deve ao fato de, naquela época, se pensar que o gênero *Brettanomyces* não possuía a forma perfeita, ou seja, não formava ascosporos. No entanto, Van der Walt & van Kerken (1960), citados por Van der Walt (1964), mostraram a formação destas estruturas (ascosporos) em algumas leveduras classificadas como *Brettanomyces*. Van der Walt (1964), com esta descoberta, transferiu as linhagens ascosporógenas para o gênero teleomórfico *Dekkera*, criando assim outro gênero.

Dekkera

Este gênero apresenta, ao microscópio, células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais. Células ogivais são aquelas que mostram uma estrutura semelhante à chama de uma vela nas extremidades. Podem também ser cilíndricas ou alongadas. A reprodução vegetativa se dá por brotamento e exibe pseudomicélio. As Figuras 1 a 4 mostram algumas das características da reprodução vegetativa descritas.

Na reprodução sexuada, os ascos são evanescentes e possuem um a quatro ascosporos. Os ascosporos apresentam um formato de chapéu ou esférico com uma borda tangencial. Quando liberados, os esporos tendem a se agrupar. Como características gerais, além das citadas, podem ainda ser listados seu lento crescimento, curta duração de vida em placas, aroma característico, forte produção de ácido acético a partir de glicose, estímulo da fermentação pelo oxigênio molecular e exigência de fonte externa de vitaminas. As Figuras 5 e 6 mostram algumas das características descritas.

Brettanomyces

Este gênero não forma asco, ou seja, se trata da forma imperfeita do gênero *Dekkera*. Apresentam-se como células esferoidais, subglobosas a elipsoidais, ogivais, cilíndricas e alongadas. Sua reprodução se dá por brotamento. Por se tratar da forma imperfeita do gênero *Dekkera*, não possui fase sexuada e, portanto, não forma ascosporos. Pode formar pseudomicélio e micélio ramificado dando uma visão unicelular por não apresentar septos e nem invaginações. Esta estrutura é denominada de blastese, é uma característica de *Brettanomyces anomalus*. As células, a exemplo do gênero *Dekkera*, também apresentam, em geral, crescimento lento e possuem tempo de vida curto. As demais características são as mesmas definidas para o gênero *Dekkera*. As Figuras 7 a 10 mostram as características gerais deste gênero.

Espécies do gênero Dekkera

Como pode ser observado na Tabela 1, as espécies deste gênero não são definidas de forma consensual. Segundo van der Walt (1984a), com base na morfologia e fisiologia, Campbell (1973), por análise numérica e Clark-Walker (1987), citado por Smith et al. (1990), por análise de DNA mitocondrial, este gênero possui apenas duas espécies. Smith et al. (1990), por comparação eletroforética de enzimas e por homologia DNA-DNA, concluíram se tratar de três espécies. Barnett et al. (1990), com base em estudos morfológicos e fisiológicos, e Molina et al. (1993), por meio de análise de restrição de genes que codificam o rRNA, consideram como quatro o número de espécies deste gênero.



Fig. 1. Células alongadas de *Dekkera naardenensis* (Fonte: Barnett et al., 1990).

Tabela 1. Espécies de *Dekkera* segundo diferentes autores.

	Campbell (1973) Análise numérica	Van der Walt (1984a) Morfologia / Fisiologia	Clark- Walker (1987) Análise de mtDNA	Smith (1990) Homologia / Enzima	Barnet et al. (1990) Morfologia / Fisiologia	Molina et al. (1993) Análise de rRNA
<i>D. anomala</i>	-	-	-	+	+	+
<i>D. bruxellensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>D. intermedia</i>	+	+	+	+	-	-
<i>D. custersiana</i>	-	-	-	-	+	+
<i>D. naardenensis</i>	-	-	-	-	+	+



Fig. 2. Células alongadas e esferoidais de *Dekkera bruxellensis* (Fonte: Barnett et al., 1990).



Fig. 3. Células esferoidais de *Dekkera bruxellensis* (Fonte: Barnett et al., 1990).

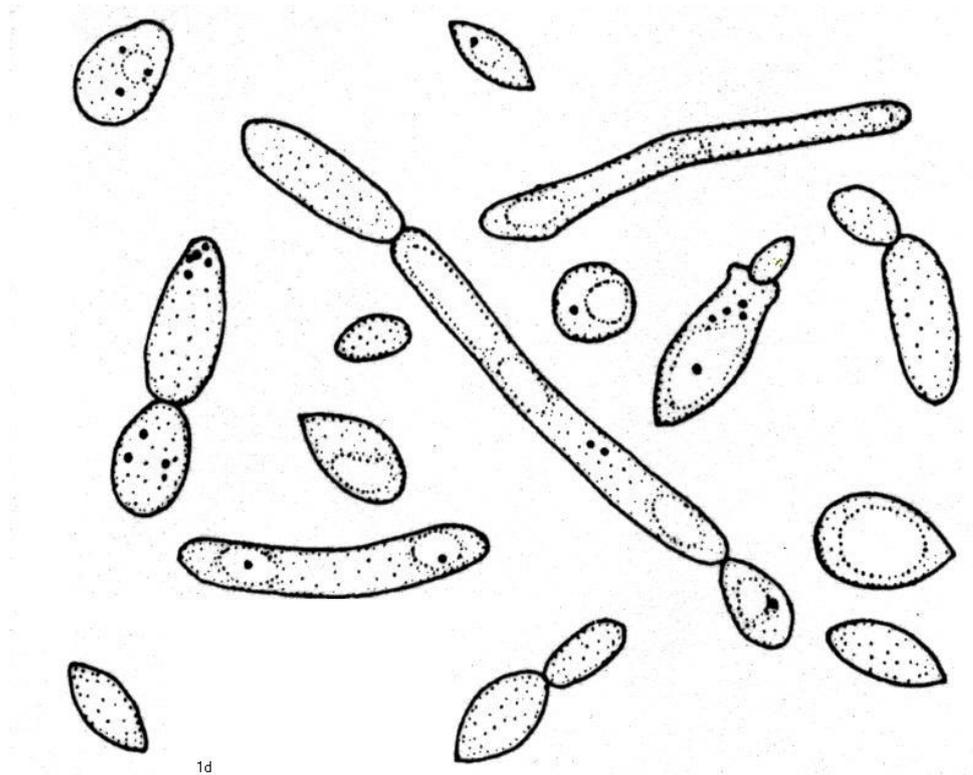
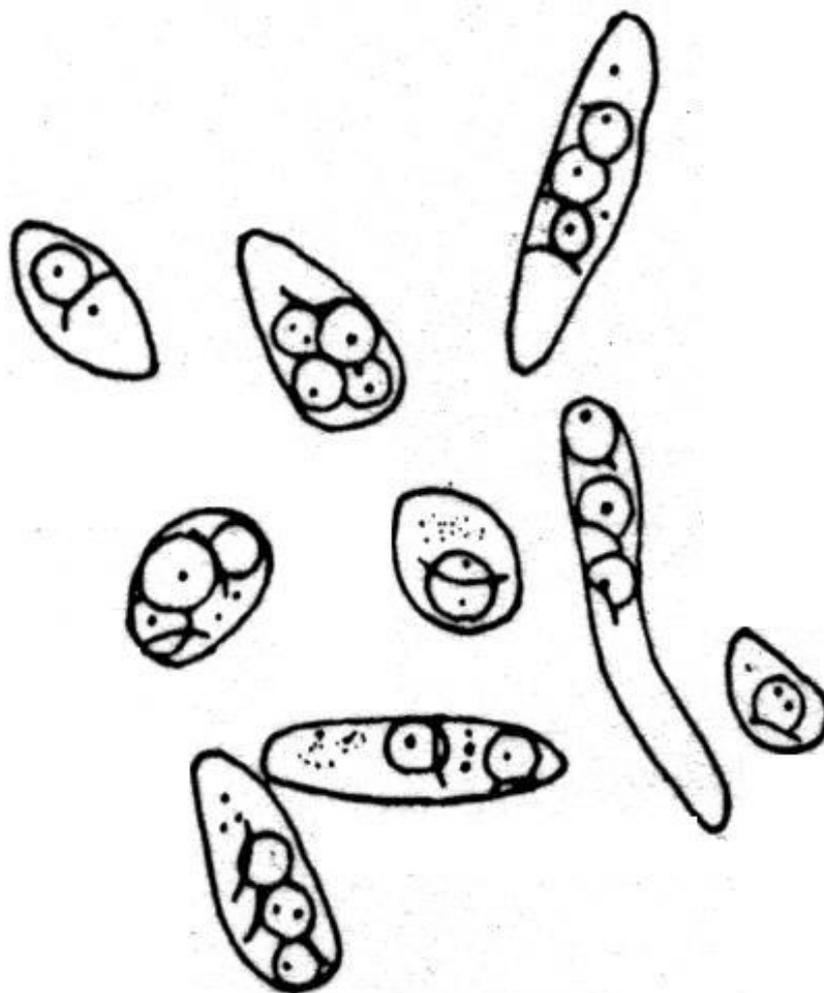


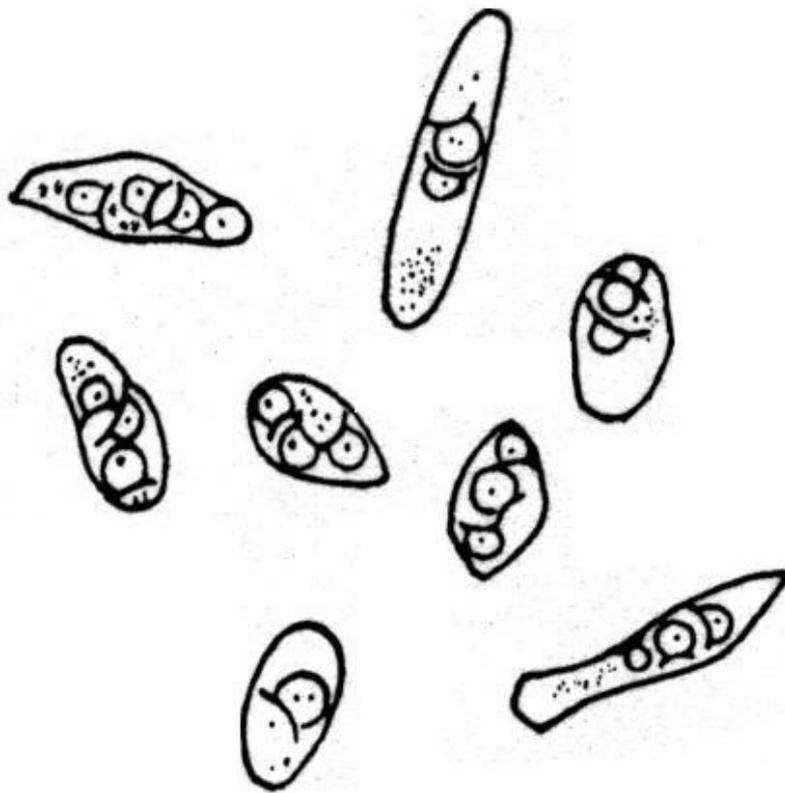
Fig. 4. Células alongadas, esferoidais e ogivais de *Dekkera bruxellensis* (meio extrato de malte) (Fonte: Van der Walt, 1984a)

Para van der Walt (1984a), *D. bruxellensis* representa a espécie típica deste gênero. A classificação apresentada por este autor é mais simples mas nem por isso menos problemática. A discrepância não está apenas no número de espécies. As espécies *Dekkera custersiana* e *Dekkera naardenensis*, segundo a descrição de Barnett et al. (1990), não apresentam reprodução sexuada. Assim, estas duas espécies deveriam ser consideradas como pertencentes à *Deuteromycotina* da família das *Cryptococcaceae* e do gênero *Brettanomyces*. De fato, van der Walt (1984b) apresenta estas duas espécies como *Brettanomyces*, ou seja, *Brettanomyces custersianus* e *Brettanomyces naardenensis*. Convém salientar que o nome da primeira espécie difere daquela citada por Barnett et al. (1990). Assim, considerando as informações de van der Walt (1984a) e de Barnett et al. (1990), o número de espécies para o gênero *Dekkera* mostrada por Barnett et al. (1990) se resume a *D. bruxellensis*. O gênero *Dekkera*, segundo van der Walt (1984a), como já citado anteriormente, apresenta apenas duas espécies. A assimilação de galactose e de celobiose é uma característica bioquímica importante para diferenciar *D. bruxellensis* da espécie *D. intermedia* porque apenas esta última assimila estes dois açúcares (van der Walt, 1984a). É de se esperar que, com o refino na composição química dos meios de cultura aliado às condições de cultivo, outras espécies de *Brettanomyces* sejam incluídas no gênero *Dekkera*. Jong & Lee (1986) obtiveram a forma perfeita da espécie *Br. naardenensis* e a denominaram de *D. naardenensis*. Lee & Jong (1986a) observaram que *Br. custersianus* também exibia a forma perfeita e a nova espécie foi denominada *Dekkera custersiana*. O mesmo aconteceu com *Brettanomyces abstinens*. Esta espécie formou ascosporos e a nova espécie foi chamada *Dekkera abstinens* (Lee & Yong, 1986b).



2a

Fig. 5. Ascus de *Dekkera bruxellensis* com 1 a 4 ascos com ordas tangenciais (meio Ym com vitaminas)(Fonte: Van der Walt, 1984a)



2b

Fig. 6. Ascospores of *Dekkera intermedia* with 1 to 4 ascospores with hat shape (meio YM with vitamins) (Source: Van der Walt, 1984a).

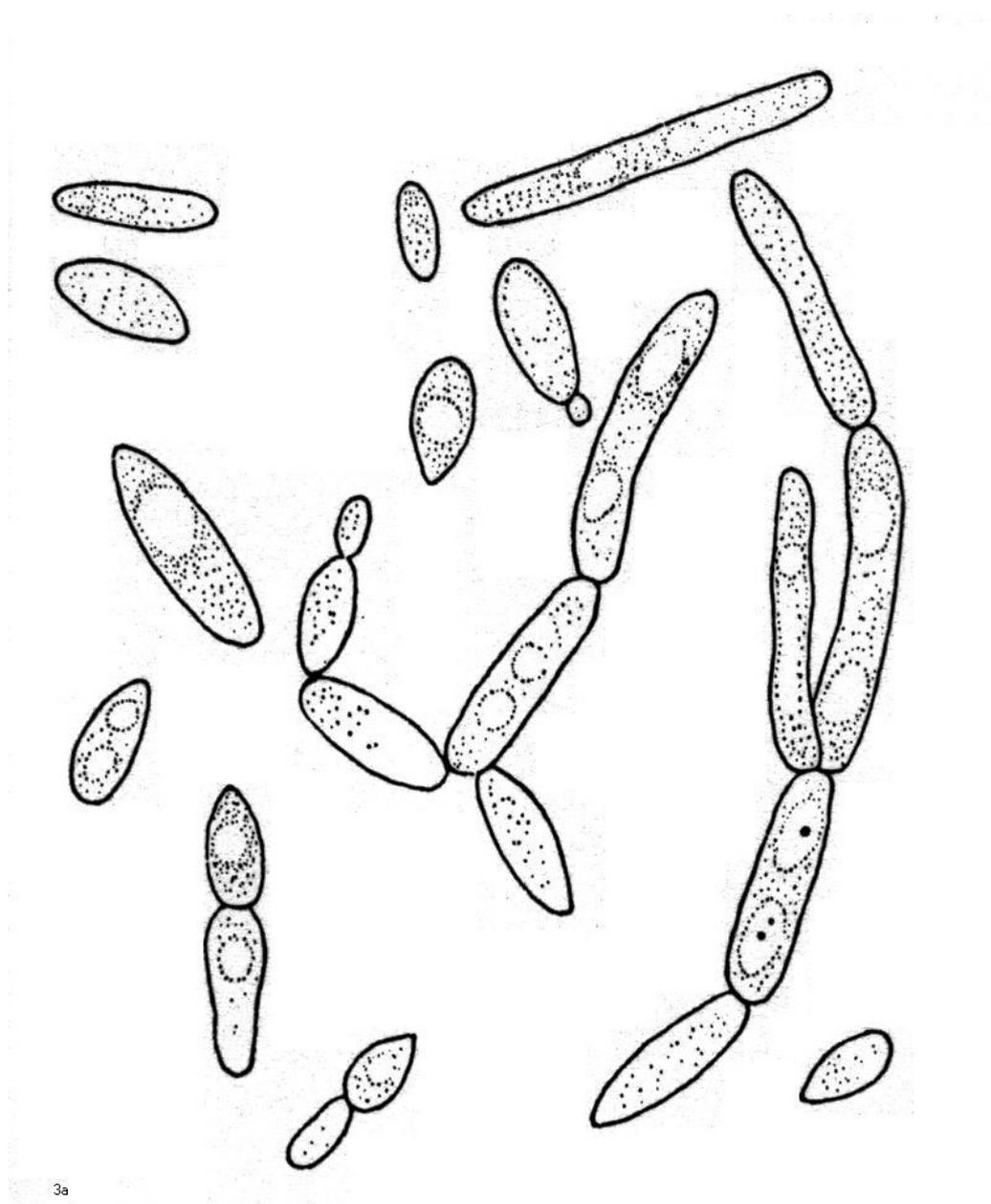


Fig. 7. Células de *Brettanomyces bruxellensis* em brotamento com pequenas cadeias(meio extrato de malte. Fonte: Van der Walt, 1984b).

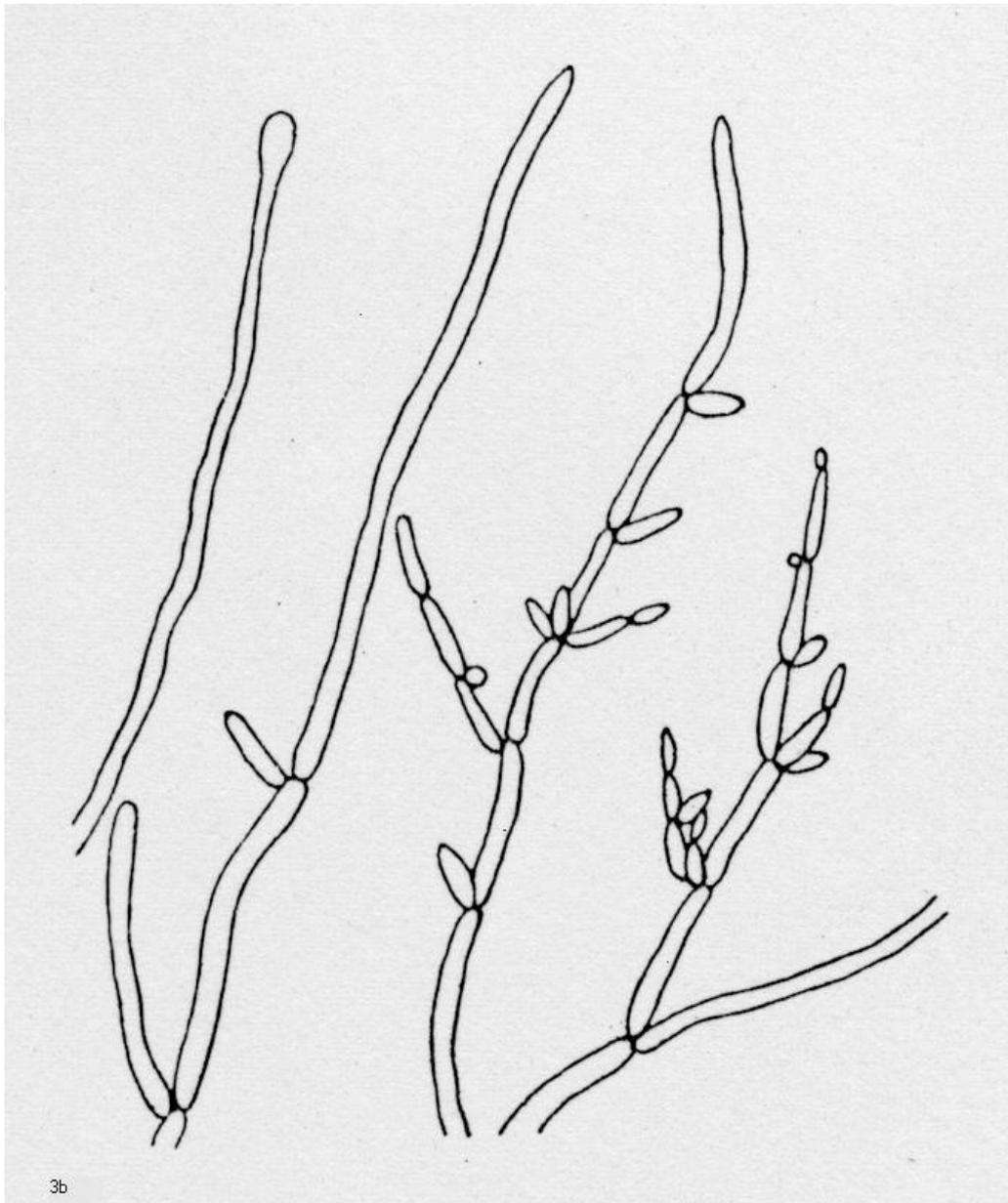


Fig. 8. Pseudomicélio de *Brettanomyces bruxellensis* com e sem blastosporos (meio- "corneal agar". Fonte: Van der walt, 1984b).

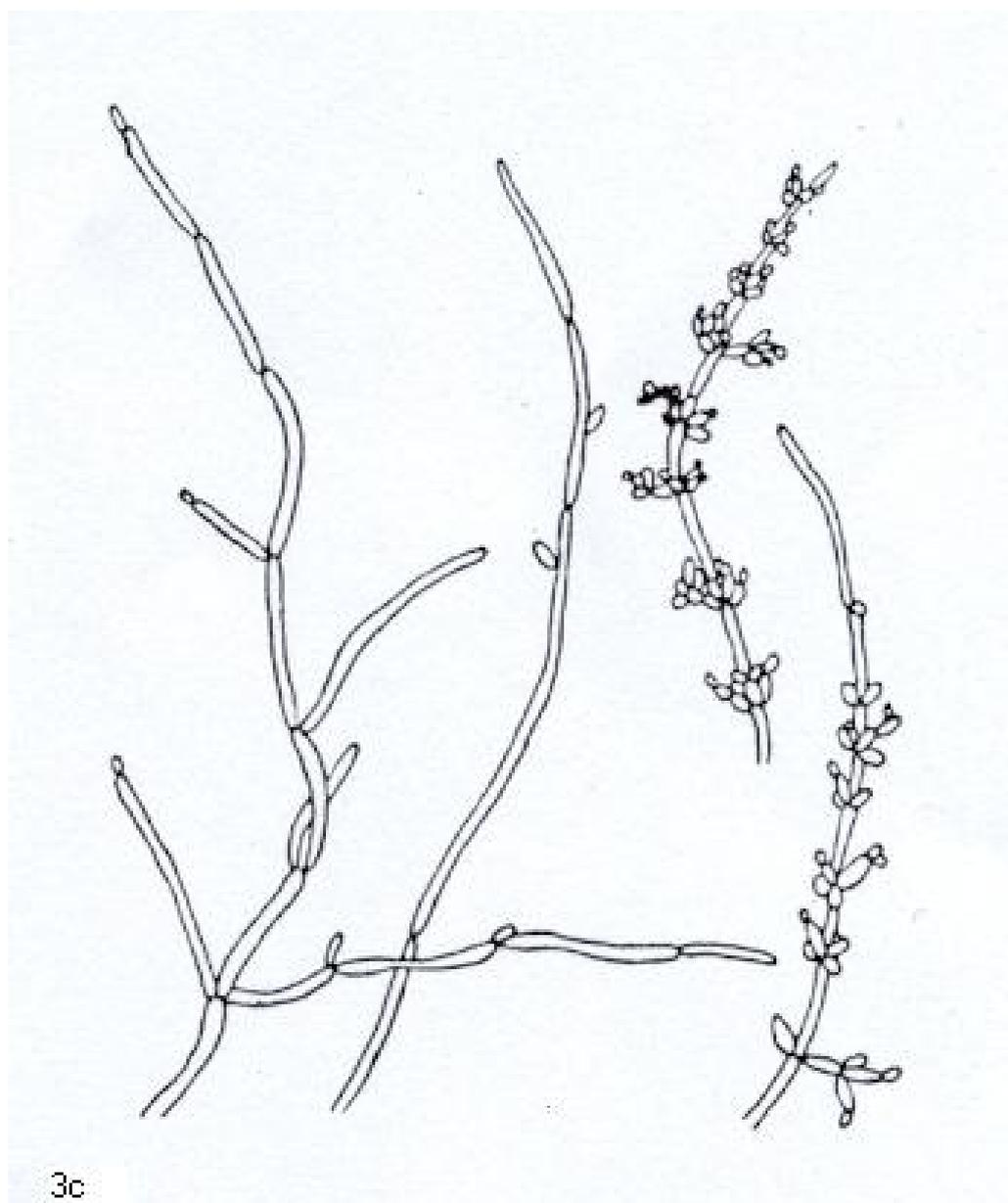


Fig. 9. Pseudomicélio de *Brettanomyces custersianus* com ou sem blastosporos. Podem-se observar blastosporos em cadeias curtas ou em verticílios ramificados (meio- "corn meal agar"Fonte: Van der Walt, 1984b).

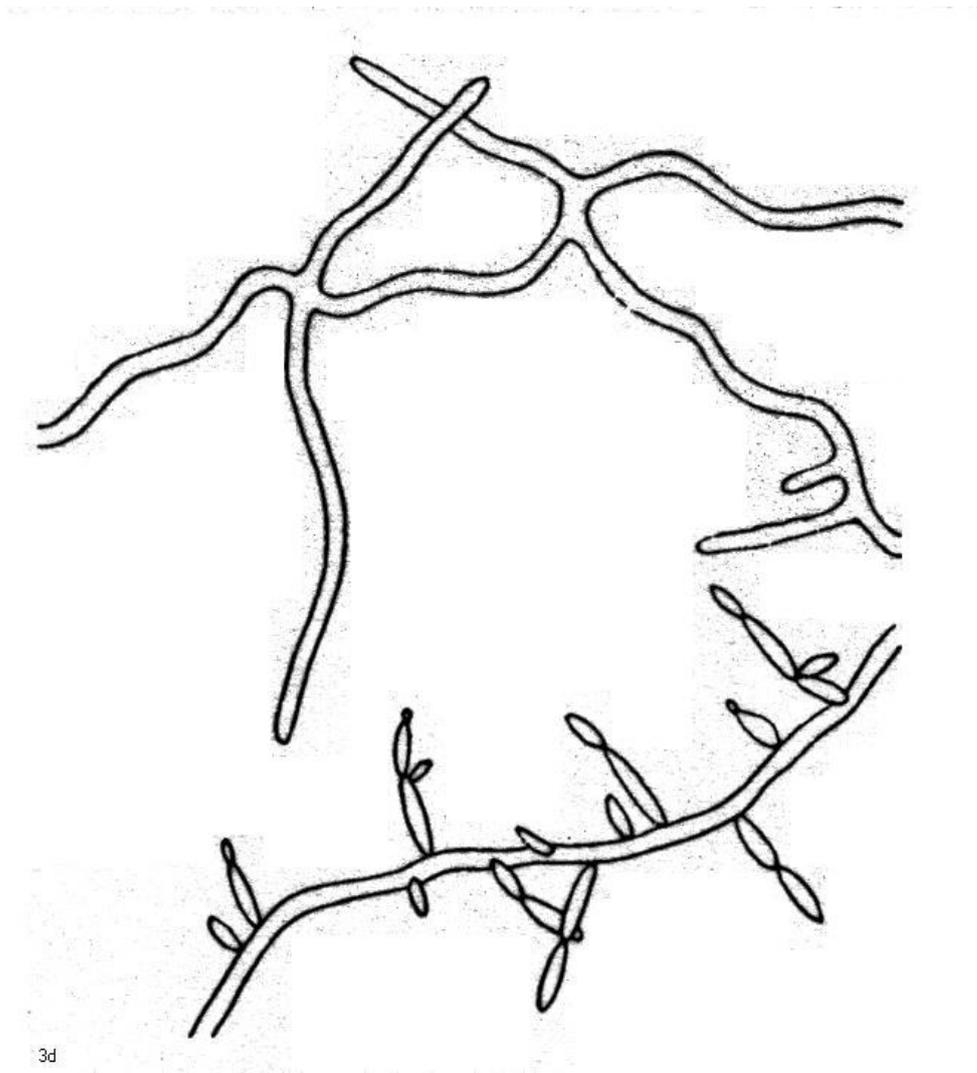


Fig. 10. *Brettanomyces anomalous* mostrando blastese. Células filamentosas longas sem septos e sem invaginações com ou sem blastosporos. Podem-se observar blastosporos ao longo do micélio mas nunca em cadeias curtas e nem em verticílios (meio- "corn meal agar"Fonte: Van der Walt, 1984a).

Tabela 2. Espécies de *Brettanomyces* definidas por diferentes métodos e por diferentes autores.

	Campbell (1973) Análise numérica	Van der Walt (1984a) Morfologia / Fisiologia	Clark-Walker (1987) Análise de mtDNA	Smith (1990) Homologia / Enzima	Barnet et al. (1990) Morfologia / Fisiologia
<i>Br. abstinens</i>	+	+	+	+	-
<i>Br. anomalus</i>	+	+	+	+	+
<i>Br. bruxellensis</i>	+	+	-	+	+
<i>Br. clausenii</i>	+	+	+	+	-
<i>Br. custersianus</i>	+	+	+	+	+
<i>Br. custersii</i>	+	+	+	+	-
<i>Br. intermedius</i>	+	+	-	+	-
<i>Br. lambicus</i>	+	+	+	+	-
<i>Br. naardenensis</i>	+	+	+	+	+

Espécies do gênero *Brettanomyces*

Enquanto o gênero *Dekkera* apresenta apenas duas espécies (van der Walt 1984a), o gênero *Brettanomyces* possui nove espécies (van der Walt 1984b) (Tabela 2). Para Barnett et al. (1990) e Molina et al. (1993), o gênero *Brettanomyces* possui apenas quatro espécies (Tabela 2). Barnett et al. (1990) consideram quatro das espécies definidas por van der Walt (1984b), marcadas com dois asteriscos (**), como sinônimos de *Brettanomyces bruxellensis*(**). A espécie *Brettanomyces clausenii*, marcada com um asterisco (*), é tida como sinônimo de *Br. anomalus*(*).

É interessante observar que todas as espécies que Barnett et al. (1990) consideram como sinônimo, podem ser distinguidas da espécie referência. Neste caso há duas espécies referência, ou seja, *Br. bruxellensis* com quatro outras espécies como sinônimo e *Br. anomalus* com apenas uma espécie como sinônimo. As espécies *Br. abstinens* e *Br. bruxellensis*, que para Barnett et al. (1990) são o mesmo microrganismo, diferem entre si no que diz respeito à fermentação e assimilação de alguns açúcares. A sacarose e a maltose, por exemplo, não são assimiladas e nem fermentadas por *Br. abstinens* mas são assimiladas e fermentadas pela espécie referência *Br. bruxellensis*. A espécie *Brettanomyces custersii* difere da espécie referência *Br. bruxellensis* porque a celobiose e a lactose não são assimiladas por esta última mas são pela *Brettanomyces custersii*. A espécie *Brettanomyces intermedius* pode ser distinguida da espécie referência *Br. bruxellensis* pela fermentação e assimilação da galactose. Este açúcar não é utilizado pela espécie *Br. bruxellensis* mas o é pela *Brettanomyces intermedius*. A espécie *Brettanomyces lambicus* pode ser diferenciada da espécie referência *Br. bruxellensis* em virtude da capacidade de assimilação da rafinose. Apenas a primeira não assimila este açúcar. Além disso, a galactose, que não é assimilada pela *Br. bruxellensis*, é assimilada pela *Brettanomyces lambicus*.

Com relação à espécie referência *Br. anomalus* e à espécie *Br. clausenii*, é, de fato, praticamente impossível, pela utilização dos açúcares, se determinar a diferença entre elas. No entanto, morfológicamente, as duas espécies são distintas. Enquanto *Br. anomalus* apresenta abundante formação de , em *Br. clausenii* esta característica não é

encontrada. Desta forma, todas as espécies que são consideradas sinônimo da espécie referência apresentam formas de diferenciação. Quando não são discernidas por meios bioquímicos, distinguem-se por aspectos morfológicos. A discrepância entre estes autores na diferenciação das espécies de *Brettanomyces* está no critério de interpretação dos resultados relacionados com a fermentação, assimilação de açúcares e ainda com a morfologia. Para Barnett et al. (1990), a espécie *Br. anomalus* pode ou não fermentar a . Para van der Walt (1984b), a espécie que não fermentar este açúcar não pode ser considerada *Br. anomalus*.

Há ainda um outro microrganismo, o gênero *Eeniella*, muito discutido quanto ao seu parentesco com os gêneros *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* e *Kloeckera* . Considerando o brotamento, observa-se que *Dekkera* e *Brettanomyces* são gêneros que apresentam brotamento multipolar enquanto *Hanseniaspora* e *Kloeckera* são microrganismos que exibem brotamento bipolar . O gênero *Eeniella* mostra brotamento bipolar como *Hanseniaspora* e *Kloeckera*. Para Smith et al. (1990), *Eeniella* divide características enzimáticas e fenotípicas com estes quatro gêneros. Boekhout et al. (1994), no entanto, pela seqüência de nucleotídeos do DNA ribossomal 26S, verificaram, apesar do brotamento bilateral, se tratar de um gênero relacionado com *Brettanomyces* e não com *Hanseniaspora* e nem com *Kloeckera*. Algumas características importantes que *Dekkera* e *Brettanomyces* exibem, também são observadas em *Eeniella*. Entre elas estão a formação de ácido acético, a presença do efeito **Custer**, também chamado de efeito **Pasteur negativo** (Scheffers, 1966; Smith et al., 1981), a coenzima Q com nove unidades de isopreno (Q-9) (Yamada, 1980) e a similaridade do DNA mitocondrial (Hoeben et al., 1986; Hoeben et al., 1993). Como *Eeniella* apresenta brotamento bipolar semelhante às espécies *Hanseniaspora* e *Kloeckera*, este microrganismo é classificado como um gênero aparte (Smith et al., 1981; Smith et al., 1990). Tendo similaridade genética e fisiológica com o gênero *Brettanomyces*, a levedura *Eeniella* pode, muito provavelmente, também estar relacionada com deterioração de vinho. O termo "**Efeito Pasteur Negativo**" não é apropriado para o fenômeno **Custer** (Scheffers, 1966; Scheffers & Wikén, 1969). O termo "**Efeito Custer**" é utilizado para definir a inibição da fermentação em condições anaeróbicas. Em determinadas situações, algumas linhagens de *Sacch. cerevisiae* também apresentam efeito Custer (Wikén & Richard, 1954), além disso, nem todas as espécies de *Brettanomyces* mostram tal efeito, como é o caso da espécie *Br. custersianus* (Scheffers & Wikén, 1969). A taxa de fermentação em condições aeróbicas de *Br. clausenii* depende também da concentração de determinados íons como potássio e sódio . A fermentação em condições anaeróbicas desta espécie é estimulada por substâncias formadas por *Sacch. cerevisiae* durante a fermentação da glicose *Sacch. cerevisiae*. Ou seja, o O₂ pode ser substituído, no efeito **Custer** , por moléculas formadas durante a fermentação da glicose (Scheffers, 1961). Isto explica o desenvolvimento de *Dekkera* e *Brettanomyces* em vinhos onde a concentração de O₂ é praticamente nula. Se o metabolismo da levedura dependesse apenas do O₂, sua atividade estacionaria no momento em que o O₂ fosse completamente utilizado. Observa-se que em garrafas de vidro, onde a troca de oxigênio entre o vinho e o ambiente se restringe à rolha, a fermentação ocorre de forma persistente com acúmulo de CO₂ no espaço livre da garrafa.

Distribuição na natureza

Os dois gêneros ocorrem em diversos ambientes na natureza. O vinho é, sem dúvida, um dos ambientes nos quais se encontram. Geralmente, células de microrganismos morrem

durante a maturação do vinho. No entanto, há leveduras que resistem ao processo de maturação e permanecem viáveis por longo tempo. Van der Walt & van Kerken (1958) relatam a presença de células de leveduras viáveis em vinhos Château Lafitte com idade de 72 e 88 anos. Mesmo com células viáveis de microrganismos nestes vinhos, poucos foram os que se achavam deteriorados e mesmo assim, a deterioração estava relacionada apenas com a idade dos mesmos. Embora esta situação tenha sido observada em vinhos renomados extremamente velhos e os problemas de deterioração não tenham sido de origem microbiológica, não é raro haver problemas em vinhos de qualquer tipo envolvendo microrganismos. Quando isto ocorre, invariavelmente, a qualidade do vinho é afetada. O vinho fica turvo ou forma sedimentos, podendo ocorrer estes dois problemas ao mesmo tempo. Outros microrganismos também podem efetuar estas alterações. Isto não é uma prerrogativa dos gêneros *Dekkera* ou *Brettanomyces*. Espécies de *Zygosaccharomyces* podem causar turbidez em vinhos. Em levantamento efetuado em um vinho tinto e 59 brancos da África do sul, os gêneros mais freqüentemente encontrados foram *Brettanomyces*, *Saccharomyces* e *Pichia* (van der Walt & van Kerken, 1958) com uma incidência, respectiva, de 50%, 53% e 13%. Isto significa que *Brettanomyces* foi encontrado em 50% dos vinhos analisados e que, praticamente, está na mesma proporção do principal gênero, *Saccharomyces*, responsável pela transformação do mosto em vinho. No vinho tinto, *Brettanomyces* foi o único gênero detectado.

Como características gerais, todas as linhagens de *Brettanomyces* isoladas nestes vinhos apresentaram crescimento lento, formaram pseudomicélio, as células se apresentaram em forma de ogivas e produziram uma marcante quantidade de ácido acético em condições anaeróbicas (van der Walt & van Kerken, 1958). No meio, preconizado por van der Walt & van Kerken (1958), pequenas colônias se formaram entre 5 e 6 dias. As células se apresentaram em forma de ogivas e não foi observada, aos 3 dias de cultivo, a formação de pseudomicélio. As colônias se mantiveram pequenas, mostrando um desenvolvimento realmente lento.

As espécies de *Brettanomyces* ou de *Dekkera* associadas com o vinho têm sido, quase que exclusivamente, isoladas de vinhos prontos ou em fermentação. Estas leveduras devem ter uma distribuição na natureza bem mais ampla do que até agora descrita. O estudo desta distribuição é importante para que esforços sejam despendidos no sentido de exercer um maior controle e assim prevenir problemas de deterioração. Embora extensivos estudos tenham fracassado em mostrar que *Brettanomyces* ou *Dekkera* sejam microrganismos da flora normal da fermentação primária, há casos citados por van der Walt & van Kerken (1961) onde duas das oitenta amostras de mosto tinto da Gironde possuíam *Brettanomyces* mas em nenhuma das trinta amostras de mosto branco este gênero foi detectado. Portanto, isto indica que esta levedura, dependendo das condições, pode estar presente na fermentação primária. Como os vinhos da África do Sul possuem trinta vezes mais incidência de *Brettanomyces* que os da Gironde, van der Walt & van Kerken (1961) se propuseram a investigar a presença desta levedura no mosto e nos equipamentos das cantinas. A presença de *Brettanomyces* foi pesquisada apenas em mosto branco uma vez que eram os vinhos destes mostos os mais acometidos. Numa primeira tentativa nenhum mosto branco possuía *Brettanomyces*. Do mesmo modo, os utensílios da cantina deram resultado negativo para a presença de *Brettanomyces*. Isto não significa dizer que este gênero não estivesse presente nos ambientes pesquisados. As técnicas e os meios de isolamento detectavam apenas espécies de *Saccharomyces*,

Saccharomyces, *Pichia* e *Candida*, ou seja, as técnicas utilizadas estavam detectando apenas gêneros de crescimento rápido, como os descritos acima.

O antibiótico actidione (cicloeximida) inibe a síntese protéica de eucariotos mas não de procariotos. A inibição da síntese protéica em eucariotos não é um fenômeno universal. Há gêneros que são resistentes. *Dekkera* e *Brettanomyces* são exemplo de gêneros resistentes a este antibiótico. Van der Walt & van Kerken (1961) confirmaram a resistência da levedura *Brettanomyces* isolada de vinho ao actidione (cicloeximida) e ao ácido sórbico descrita por Beech & Carr (1955, 1958). Isto facilitou a recuperação de *Brettanomyces*. Embora não se consiga inibição de todas as outras leveduras, pelo menos as que interferem no crescimento de *Brettanomyces* parecem ser eliminadas. Mesmo assim, representantes de dois outros gêneros estavam prejudicando o isolamento (*Candida boidinii* e *Oospora lactis*). Alterando a fonte de carbono do meio de cultura, os autores se livraram deste incômodo. Tomados estes cuidados, *Brettanomyces* foi detectada em 13 das 50 amostras analisadas de cantinas (pisos, paredes, drenos) e de utensílios de cantina (tubos de madeira, vasos, equipamento para esmagar uva e tanques). De dez amostras de mosto, apenas uma apresentou *Brettanomyces*. Na superfície das uvas, os autores não conseguiram detectar a levedura. Pelo exposto, parece que *Brettanomyces* ou *Dekkera* são leveduras que têm uma relação mais estreita com a cantina e com os utensílios que com a própria uva. De acordo com os resultados de van der Walt & van Kerken (1961), esta levedura não faz parte da flora normal da uva madura, mas pode participar da fermentação primária devido a sua presença nos equipamentos utilizados na vinificação. De fato, a levedura *Brettanomyces* foi encontrada no equipamento que esmaga a uva, o que reforça a hipótese de sua presença nos estádios iniciais da fermentação primária se dever à contaminação do mosto com o microrganismo da cantina. Parece que ela necessita de vinho ou resíduo de vinho para que o ambiente lhe fique favorável.

Como agentes que deterioram o vinho, além de espécies fermentativas dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*, podem ser encontradas leveduras oxidativas como *Pichia* e *Candida* e espécies fermentativas dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* (Fleet, 1999). Silva, em 2002, dados não publicados, observou a presença de *Schizosaccharomyces japonicus* em vinhos elaborados na região de Bento Gonçalves (RS). *Brettanomyces* é um gênero que tem sido encontrado não apenas em vinho mas também em cerveja, fermentado de maçã e mosto de uva.

Ocorrência

Entre os países onde a presença de *Dekkera* e *Brettanomyces* têm sido reportada, estão Alemanha, França, África do Sul, Espanha, Portugal, Uzbequistão, Nova Zelândia, Inglaterra Austrália, Estados Unidos e Brasil (Licker et al., 1998).

Austrália

Os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* estão presentes em regiões vinícolas. Na Austrália, até 1991 aproximadamente, a presença destes dois gêneros era tida como ocasional. Esta raridade não era devido à ausência de *Dekkera* e *Brettanomyces* mas se devia às

técnicas de detecção. Passou-se a empregar métodos de determinação de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol e relacioná-los com a ação direta destes microrganismos. O "Australian Wine Research Institute"(AWRI) acredita que as contaminações estejam aumentando no país. O Instituto instrui os vinicultores sobre a ameaça dos referidos gêneros de levedura. Mesmo com toda a informação disponível, poucos são os vinicultores australianos que instituíram monitoramento intensivo para minimizar a ameaça (Franson, 2001).

Argentina

Recentemente foi detectada, na Argentina, a presença de *Dekkera* e *Brettanomyces* mosto aos dez dias de fermentação e antes do engarrafamento, sem evidenciar prejuízos organolépticos (Roccatto et al., 2001). Segundo os autores, este foi o primeiro relato da ocorrência destes dois gêneros neste país.

Brasil

Análises microbiológicas realizadas em alguns vinhos comerciais brasileiros revelaram a presença de células típicas de *Dekkera* com ascosporos característicos. Se fosse realizado um levantamento mais detalhado do problema, teríamos muito provavelmente a mesma surpresa que os australianos tiveram há cerca de uma década atrás. Se a Austrália e outros países não monitoram adequadamente a contaminação por *Dekkera* e *Brettanomyces*, o risco de o vinho se tornar de baixa qualidade é elevado. O Brasil, efetuando tal monitoramento, estará dando um passo importante em busca da qualidade.

França

Licker et al. (1998) afirmam ter sido, em Jura, em 1955, pela primeira vez que foi detectada a levedura *Brettanomyces* na França. Posteriormente, foi encontrada em outras regiões como Midi e Gironde (Bordeaux). Análises efetuadas em vinhos engarrafados de safras diferentes (de 1979 a 1990), provenientes de diversas cantinas de Bordeaux, revelaram níveis de etil-fenóis acima do limiar de percepção (426 µg/L) em 36% dos vinhos (Chatonnet et al., 1992).

Problemas de ordem geral

Alguns problemas causados por leveduras são de fácil detecção quando o vinho está pronto. Entre estes estão:

- Turbidez e formação de névoa - as leveduras selvagens, além de causar turvação, podem formar sedimentos
- Formação de filme ou película - na presença de ar, algumas leveduras podem formar película sobre a superfície do vinho. Outras podem até mesmo ascender pelas paredes da garrafa.
- Atenuação - Leveduras selvagens podem crescer às custas de fontes de carbono que normalmente *Sacch. cerevisiae* não utiliza. Nestes casos, o teor de etanol pode aumentar e formar aromas indesejáveis.

Problemas específicos potenciais e condições para a síntese microbiológica de fenóis

Substâncias fenólicas são componentes clássicos do aroma de vinhos. Entre estes estão os vinil-fenóis, nos vinhos brancos, e os etil-fenóis, nos tintos (Dubois et al., 1971; Etiévant, 1981; Boidron et al., 1988). Análises efetuadas em vinhos brancos revelaram que apenas determinados vinhos continham vinil-fenóis (Chatonnet et al., 1993). O 4-vinil-guaiacol, além de ser mais agradável, pois contribui para a intensidade aromática do vinho, conferindo-lhe nota floral, é mais facilmente percebido em vinhos que o 4-vinil-fenol. Mesmo em concentrações abaixo do limiar de percepção, este último mascara a nota frutada do vinho branco (Chatonnet et al., 1993).

Vinhos contaminados com *Dekkera* ou *Brettanomyces* apresentam elevadas concentrações de ácido acético e se tornam túrbidos. Nos casos mais graves, há formação de derivados do tipo 2-acetil-2-etil-tetraidro-piridina e acetil-pirolina, resultando em forte cheiro conhecido como "odor de rato" (Chatonnet et al., 1999). *Lactobacillus* ou *Pediococcus* também formam tais moléculas mas não são capazes de formar quantidades suficientes para provocar um odor perceptível (Chatonnet et al., 1997). Outros componentes de odor desagradável também são encontrados neste tipo de deterioração. Entre estes componentes estão os que apresentam odores fenólicos e animais, lembrando "couro" ou "urina de cavalo" em vinhos tintos. Licker et al. (1998) apresentam várias descrições para o aroma exalado pelo vinho devido à ação de *Dekkera* e *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-etil-fenol exibe um aroma de Band-Aid, o 4-etil-guaiacol exala aroma de madeira queimada, sendo, a presença destes dois componentes, fortes indicadores da presença de *Dekkera* e *Brettanomyces* (Olsen, 2002).

Vinhos com estes atributos são considerados "Bretty". Este tipo de defeito tem sido qualificado como simplesmente de caráter fenólico dos vinhos tintos. Chatonnet et al. (1990) verificaram que este caráter era diretamente proporcional à quantidade de etil-fenóis presentes nos vinhos tintos. Entre estes estão o 4-etil-fenol () e 4-etil-guaiacol (). Vinhos com concentrações mais elevadas destes componentes podem exibir odor desagradável de "estábulo" (Etiévant et al., 1989; Chatonnet et al., 1990). Em cerveja, o gosto fenólico também pode ser encontrado. Nestes casos, há presença de considerável quantidade de 4-vinil-guaiacol. Embora não seja o único componente a dar gosto estranho à cerveja, sua produção é um sintoma da inaptidão da linhagem destinada ao processo de fermentação (Thurston & Tubb, 1981) ou sintoma de contaminação com linhagens de levedura que não pertencem à espécie *Sacch. cerevisiae*.

Os limiares de percepção (LP) dos compostos 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol dependem da composição química do meio onde se encontram (Etiévant, 1991) e se alteram de acordo com a interação entre eles. Chatonnet et al. (1992) mostram o resultado destas alterações considerando a água, a solução hidroalcoólica e o vinho (Tabela 3). Como em vinhos brancos são mais comumente encontrados 4-vinil-guaiacol e 4-vinil-fenol na proporção de 1:1, Chatonnet et al. (1993) mostraram ser de 725 µg/L (Tabela 3) o LP nesta proporção.

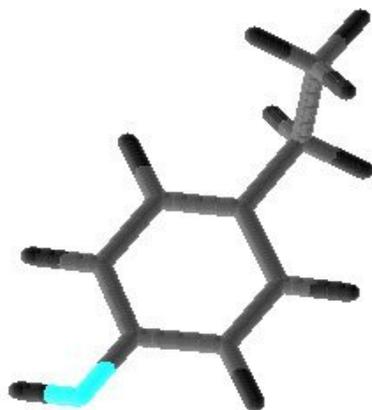


Fig. 11. Estrutura do 4-etil-fenol



Fig. 12. Estrutura do 4-etil-guaiacol

Tabela 3. Limiares de percepção do 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol em vinhos tintos e de 4-vinil-guaiacol e 4-vinil-fenol em vinhos brancos. (Fontes: Chatonnet et al., 1992; Chatonnet et al., 1993).

Compostos voláteis	H ₂ O	Solução Hidroalcoólica Modelo	LP ($\mu\text{g/L}$)
Vinho tinto			
4-etil-fenol	130	440	620
4-etil-guaiacol	25	47	140
4-etil-fenol + 4-etil-guaiacol (10:1)	426
Vinho branco			
4-vinil-guaiacol	32	130	570
4-vinil-fenol	85	180	0
4-vinil-guaiacol + 4-vinil-fenol (1:1)	725

Etiévant (1989), ao analisar a origem do odor de "couro", observou que a fermentação maloláctica conduzia a este odor, ou seja, bactérias lácticas também possuem potencial para provocar este tipo de defeito no vinho. No caso de bactérias lácticas, a formação de tais componentes está diretamente relacionada com o microrganismo e com a composição química do vinho. Chatonnet et al. (1997) observaram que entre as bactérias *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc oenos*, apenas o *Lactobacillus plantarum* formava uma quantidade apreciável de 4-etil-fenol, um fenol que, como já definido, confere ao vinho odor desagradável e descrito por estes autores como odor de "cavalo molhado". Mas a quantidade produzida por esta espécie de bactéria láctica era sempre muito mais baixa que aquela formada por *Br. bruxellensis*. Quando a bactéria era inoculada e determinados compostos fenólicos naturais da uva, como procianidina, eram adicionados, a síntese, pela bactéria, de compostos fenólicos voláteis de odor desagradável era sensivelmente diminuída. O maior decréscimo na síntese de 4-etil-fenol foi conseguido quando 1 g/L de taninos do grupo das procianidinas foi adicionado. A ação inibitória das procianidinas e de outros polifenóis do vinho tinto sobre a formação de 4-etil-fenol só é efetiva no metabolismo de bactérias. Daí a importância da composição química do vinho tinto diante da fermentação maloláctica. Vinhos com teores de compostos fenólicos naturais muito baixos podem apresentar um aumento no teor de 4-etil-fenol e 4-vinil-fenol. A qualidade do vinho pode não ser prejudicada porque a quantidade formada por estas bactérias fica abaixo da concentração necessária para ser percebida (426 $\mu\text{g/L}$) mas pode contribuir para a baixa qualidade do produto final se for considerada a soma da quantidade de 4-etil-fenol formada por *Sacch. cerevisiae* e, em especial, *Brettanomyces*. Este fenol é formado por bactérias lácticas quando o teor de taninos no vinho é menor que 3 g/L (Chatonnet et al., 1997). Não apenas as bactérias lácticas podem afetar a qualidade do vinho quando a quantidade de compostos fenólicos naturais (catequinas e procianidinas) da uva são baixos, mas também *Sacch. cerevisiae*, agente da principal fermentação do mosto, pode ter seu metabolismo afetado de forma a aumentar a quantidade 4-vinil-fenol do vinho e assim comprometer a qualidade do produto final. Na presença de (+)-catequina e procianidinas, *Sacch. cerevisiae* teve sua capacidade de formar 4-vinil-fenol reduzida em, respectivamente, 42% e 99%. O metabolismo de *Br. bruxellensis*, com relação à síntese de 4-vinil-fenol e de 4-etil-fenol, não se altera de forma significativa com a suplementação de 1 g/L de catequina ou

procianidinas (Chatonnet et al., 1997).

Os taninos são substâncias biologicamente ativas. Apresentam potencial quelante, precipitam proteínas e agem como antioxidante. Sobre as bactérias lácticas, sabe-se que os taninos inibem o crescimento desses microrganismos possivelmente por afetar a constituição lipídica do microrganismo. Neste sentido, o efeito dos taninos é mais forte que a do próprio etanol. Os taninos atuam sobre determinadas enzimas tanto da membrana como da parede celular, inibindo-as. Se algumas das enzimas que participam da formação de 4-etil-fenol e 4-vinil-fenol em bactérias estiverem situadas na membrana celular, uma inibição destas enzimas se reflete imediatamente na produção destes compostos. A cinamato descarboxilase (CD) está, de fato, ligada à membrana celular do *Lactobacillus plantarum*. A redução na atividade desta enzima leva, sem dúvida, a uma diminuição na formação de 4-etil-fenol e 4-vinil-fenol no vinho. Em *Sacch. cerevisiae*, esta mesma enzima está dentro da célula e, portanto, a inibição direta dos taninos sobre esta enzima é mais difícil de ocorrer. Pode haver, no entanto, uma ação indireta. Sabe-se que a atividade desta enzima envolvida no processo de formação de vinil-fenóis é constitutiva, se expressa apenas durante a fermentação alcoólica e que é inibida pelos taninos catéquicos. Desta forma, entende-se porque os vinhos tinto e rosé apresentam baixos níveis de destes compostos (4-vinil-fenol e 4-vinil-guaiacol), embora possuam níveis de precursores mais elevados (Chatonnet et al., 1993). Além disso, os autores mostraram uma influência direta de linhagens de *Sacch. cerevisiae* na síntese destes compostos. Os taninos podem estar envolvidos com a permeabilidade da membrana celular de *Sacch. cerevisiae*, dificultando a passagem de substâncias através da membrana. Estudos efetuados com frações fenólicas (Chatonnet et al., 1993) mostraram ser as catequinas e as procianidinas mais ou menos condensadas, com um peso molecular menor ou igual a 3000 daltons, as frações fenólicas inibidoras. As altamente condensadas são inativas. Infelizmente, a síntese de 4-etil-fenol e de 4-vinil-fenol por *Brettanomyces* não é afetada pelos taninos, sugerindo uma relação de distância virtual entre a célula desta levedura e os taninos. Assim, *Br. bruxellensis* difere das bactérias lácticas e de *Sacch. cerevisiae* com relação à interferência dos taninos no processo de síntese de componentes fenólicos indesejáveis.

A concentração da fonte de carbono pode exercer importante papel na formação de compostos fenólicos por microrganismos. Concentrações baixas de açúcares fermentescíveis, como glicose e trealose, induzem à síntese de fenóis, atingindo porcentagens de transformação do ácido trans-p-cumárico superiores a 42% (Chatonnet et al., 1997). No vinho fino seco, o baixo teor de açúcares fermentescíveis é um fato normal e desejável. Logo, isto favorece o aparecimento de componentes de odores indesejáveis em concentrações mais elevadas. Chatonnet et al. (1997) obtiveram, em quatro semanas, 4.225 $\mu\text{L/L}$ de fenóis, formados por *Br. bruxellensis*, quando o teor de açúcar fermentescível era de 2 g/L.

Sabe-se que os ácidos fenólicos do mosto podem ser descarboxilados por *Sacch. cerevisiae*, dando origem aos vinilfenóis. Algumas bactérias lácticas, como *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus*, também são capazes de descarboxilar o ácido trans-p-cumárico e formar 4-vinil-fenol de modo tão ativo como o faz *Sacch. cerevisiae* (Chatonnet et al., 1995). Estas bactérias formaram também quantidades apreciáveis de 4-vinil-fenol a partir de ácido trans-ferúlico, chegando a superar *Sacch. cerevisiae*. Enquanto *Sacch. cerevisiae* formou 1.185 $\mu\text{g/L}$ de 4-vinil-fenol, *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus* produziram, respectivamente, 1.909 $\mu\text{g/L}$ e 2.063 $\mu\text{g/L}$. Com

exceção da *Lactobacillus plantarum*, que, como vimos, produz 4-etil-fenol, nenhuma outra bactéria láctica formou concentrações significativas de etil-fenol. *D. intermedia* chegou a produzir, a partir do ácido trans-p-cumárico, 2.915 $\mu\text{g/L}$ de 4-etil-fenol e 3.947 $\mu\text{g/L}$ de 4-etil-guaiacol. A partir do ácido trans-ferúlico, no entanto, a quantidade de 4-vinil-guaiacol e 4-vinil-fenol produzida por esta levedura foi muito modesta, 25 $\mu\text{g/L}$ e 15 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Chatonnet et al., 1995). Convém salientar que os ensaios efetuados por estes autores foram realizados em meio artificial. Portanto, neste meio não havia catequina e nem procianidina para inibir a formação destes fenóis por parte das bactérias lácticas e *Sacch. cerevisiae*.

É evidente que estas leveduras não formam apenas 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol. Embora o 4-etil-fenol seja o mais importante, outros produtos do metabolismo são liberados para o meio. Entre estes produtos estão os ácidos graxos voláteis, como ácido acético, e o acetato de etila, dando aroma de acetona (Olsen, 2002). Além disso, há formação de outros ácidos graxos voláteis como isovalérico (Franson, 2001; Olsen, 2002), isobutírico, 2-metil-butírico que podem causar impacto sobre a qualidade do vinho (Olsen, 2002). O limiar de percepção (LP), para o ácido isovalérico é de 1,2 mg/L (Franson, 2001).

As tetraidropiridinas, como já mencionadas, são responsáveis pelo aroma de rato ou cavalo, mas isto depende da concentração que está presente no vinho. Em baixas concentrações podem apresentar aroma de pão, pipoca, biscoito cracker (Olsen, 2002). Mas nem sempre estes aromas estão relacionados com a atividade metabólica de *Dekkera* e *Brettanomyces*, uma vez que as tetraidropiridinas podem também ser formadas por bactérias lácticas heterofermentativas como *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus hilgardii*. O substrato usado para a síntese destes compostos voláteis são lisina, etanol ou propenol (Olsen, 2002).

No vinho pode haver mais de 1000 mg/L de açúcares, como glicose, sacarose, trealose, galactose e frutose. Dependendo da idade do vinho, a trealose pode chegar a mais de 200 mg/L. Quando *Brettanomyces* ou *Dekkera* atuam, os teores de açúcares residuais diminuem, especialmente os de trealose. Dos açúcares acima apresentados, quase todas as espécies de *Brettanomyces* e todas as espécies de *Dekkera* utilizam a glicose, trealose e frutose. A galactose só não é metabolizada pela espécie *Br. bruxellensis* e a trealose só não é utilizada por *Br. abstinens*. Segundo van der Walt (1984b), esta espécie só metaboliza três açúcares, ou seja, a glicose, galactose e celobiose. Apenas duas espécies de *Brettanomyces* não assimilam o nitrato, as espécies *Br. custersianus* e *Br. naardenensis*. A sacarose só não é utilizada por *Br. abstinens* e *Br. naardenensis*. A quantidade de açúcares fermentescíveis de 275 mg/L é suficiente para que a concentração de etil-fenóis atinja a cifra limiar, a partir da qual o vinho adquire características desagradáveis, que está estipulada em 426 $\mu\text{g/L}$ (Chatonnet et al., 1990). Chatonnet et al. (1995) consideram uma assimilação de 300 mg/L de açúcares fermentescíveis o suficiente para atingir 3×10^3 células/mL e formar quantidade de 4-etil-fenol suficiente para ultrapassar o limiar de percepção (600 mg/L). *Br. clausenii* apresenta atividade histidina descarboxilase (Hernández, 1996), característica esta que pode ser usada na diferenciação. Esta atividade eleva os níveis de histamina dos vinhos. A histamina atua sobre os receptores H1, provocando a constrição da musculatura lisa e de vasos sangüíneos, podendo estar relacionada com dores de cabeça. Age também sobre os receptores H2, induzindo a secreção de HCl pelo estômago, contribuindo assim para a formação de úlcera estomacal.

Detecção e identificação

Detecção por processo microbiológico clássico

Uma forma de se detectar problemas causados por *Dekkera* e *Brettanomyces* se baseia no isolamento das espécies envolvidas. Embora pareça óbvia esta forma de detecção, não é a maneira mais simples, rápida e segura. Isto se deve a uma série de problemas relacionados com a característica fisiológica dessas leveduras. As dificuldades de identificação das espécies já se iniciam no momento do isolamento. As espécies pertencentes a estes dois gêneros mostram, de um modo geral, exigências nutricionais importantes. Além disso, apresentam crescimento lento e, dependendo do meio de cultivo, possuem um curto período de vida. O aparecimento de colônias pode levar 30 dias. Zimogramas, devido a seu efeito **Custer**, podem conduzir a resultados dúbios, quando não negativos, e assim mascarar a capacidade de fermentação das diferentes espécies. Este fato dificulta ainda mais a identificação das espécies. Aliado a isto, deve-se considerar a condição de cultivo para os exames macro e microscópico. Os meios de cultura para identificação devem ser aqueles estabelecidos pelos taxonomistas. Há meios específicos para cada tipo de investigação, seja ela macroscópica ou microscópica. Dependendo das características que se procuram observar, os meios podem ser de diferentes composições químicas. São meios geralmente caros porque exigem certa pureza. A não obediência destes requisitos pode levar à não formação de determinadas estruturas celulares ou mostrar habilidades fisiológicas que de fato não existem. O processo clássico de identificação exige, além de tudo, microscópios com baixo limite de resolução e recursos humanos com uma prática razoável em microbiologia para identificar as estruturas que caracterizam o indivíduo. À primeira vista, parece ser a forma mais indicada para detectar o agente causal do problema de deterioração provocada por *Dekkera* e *Brettanomyces*, mas talvez seja a maneira mais lenta, dispendiosa e penosa de se identificar o problema.

Isolamento

O isolamento dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* é o passo mais importante no processo de identificação do agente causal. Já foram anteriormente discutidas, com base nos relatos de Van der Walt & van Kerken (1961), as dificuldades que muitos pesquisadores enfrentaram na tentativa de isolar estes dois gêneros em mosto de uva. Essas dificuldades levavam a crer que *Dekkera* e *Brettanomyces* não pertenciam à flora normal da fermentação primária. Hoje se sabe que estes dois gêneros podem estar presente durante o processo de vinificação, pois há relatos da presença de *Dekkera* e *Brettanomyces* em mosto tinto. É importante ressaltar que a não detecção de um microrganismo num determinado ambiente não é prova de sua ausência. A não detecção se deve muitas vezes às características do microrganismo e às exigências nutricionais que exibem. As técnicas de isolamento de uma população heterogênea muitas vezes permitem apenas o aparecimento dos microrganismos predominantes. Entre estes microrganismos estão as bactérias (lactobacilos e bactérias acéticas) e as diversas espécies de *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*. Como estes microrganismos possuem taxas específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) várias vezes maiores que as de *Dekkera* e de *Brettanomyces*, parece óbvio que aqueles meios

de cultura que permitem o desenvolvimento mais rápido de microrganismo sejam inadequados para o isolamento destes dois gêneros.

Uma descoberta interessante reativou a esperança de superar a dificuldade de competição entre *Dekkera* e *Brettanomyces* e as outras leveduras. Beech & Carr (1955, 1958) verificaram que, ao contrário das outras leveduras, *Brettanomyces* apresentava resistência à actidione (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ao ácido sórbico (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A adição destes dois compostos, embora não tenha acarretado inibição completa de todas as outras leveduras, possibilitou seu isolamento de uma maneira mais segura. Espécies de *Candida* e algumas bactérias podem ainda ser um obstáculo no processo de isolamento. Os problemas com *Candida* podem ser resolvidos escolhendo fontes de carbono adequadas (sacarose e maltose). No entanto, como será visto adiante, nem todas as espécies de *Candida* são incapazes de fermentar e/ou assimilar a sacarose e a maltose. Portanto, a dificuldade de se obter um meio diferencial para *Dekkera* e *Brettanomyces* ainda existe. Bactérias lácticas e acéticas podem ser rechaçadas com o uso de aureomicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a adição de actinomicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) atua sobre as bactérias lácticas. O uso destes dois antibióticos inibe de forma mais eficiente tanto bactérias lácticas como acéticas (Beech & Carr, 1958). As bactérias acéticas também são afetadas pelo ácido sórbico (Beech & Carr, 1958). No isolamento de *Dekkera* e *Brettanomyces*, têm sido empregados os meios W.L.D. (Difco), D.H.S.A (Chatonnet et al., 1992) e W.L.D.S. (Chatonnet et al., 1999).

Exame macroscópico

Depois do processo de isolamento e purificação, o exame macroscópico deve ser efetuado em meio líquido e em meio sólido. Em meio líquido, levam-se em consideração a formação de anel, a presença de película, ilhota, sedimento (flocoso, com mucosidade, empoeirado, aderente) e o tipo de aroma. Em meio sólido, levam-se em conta a cor (creme, marrom clara, salmão), o formato (liso, crespo, elevado, com cratera, ondulado, acolchoado), o brilho, o tipo de borda (lisa, ondulada, lobuloso) que a colônia apresenta.

D. bruxellensis, em meio líquido, forma ocasionalmente um anel fino ou ilhotas ou ainda uma delgada película. O sedimento formado após dez dias de cultivo em temperatura ambiente é flocoso a mucoso. Em meio sólido, quando cultivadas em ágar malte, as colônias desta espécie são restritas, de cor que vai do creme ao marrom claro e algumas vezes apresentam coloração salmão. São, em geral, colônias lustrosas e elevadas, mas também podem se apresentar tanto lisas como crespas com margens onduladas. As margens podem ser tanto inteiras como onduladas ou lobulosas. Quando carbonato de cálcio é adicionado ao ágar malte, as colônias se apresentam com crateras. As margens podem ser inteiras ou onduladas a lobosas, como anteriormente descritas, e ocasionalmente ornadas com franjas. Observa-se ainda a formação de ácido.

Exame microscópico

O exame microscópico é fundamental no processo de identificação. É preferível usar um microscópio de contraste de fase. Este microscópio transforma, por meio de seu sistema óptico, diferenças de fase dos raios luminosos em diferenças de intensidade. O olho humano não é sensível às diferenças de fase e sim às diferenças de intensidade. As diferentes fases na luz emergente são geradas pela diversidade de densidade das

estruturas celulares. Quanto maior a densidade da estrutura menor será o movimento da luz no interior desta estrutura. Como na célula há diversas estruturas com densidades distintas, haverá também diferentes fases na luz emergente. Por interferência, as fases são transformadas em diferenças de amplitude originando intensidade luminosa distinta para cada estrutura. Este tipo de microscópio é importante para observar células vivas, estruturas celulares como ascos de um ascosporo, as formas que estes ascos apresentam, estudar as diferentes formas de micélio como pseudomicélio, micélio verdadeiro e blastese e distinguir os diferentes tipos de blastosporos.

O exame microscópico das células é de fundamental importância porque consegue separar gêneros pertencentes aos ascomicetos e deuteromicetos. Com esta técnica, é possível distinguir os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* bastando para tal evidenciar a formação ou não de ascosporos, respectivamente, o formato e o tamanho das células (diâmetro, comprimento e largura). Células de *Br. anomalus* possui, por exemplo, uma medida de 2,0-5,5 X 3,0-19,0 μm enquanto que os valores obtidos para células de *Br. bruxellensis* e de *D. bruxellensis* são de 2,0-6,5 X 4,0-22,0 μm . Por estas medidas pode-se perceber que as células podem ser esféricas, cilíndricas a alongadas e que muito pouco pode-se extrair desta informação para se chegar a diferenciar gêneros e muito menos espécies.

Métodos Convencionais de Detecção e de Identificação de *Dekkera* e *Brettanomyces*

Condições

Os testes bioquímicos levam em consideração o zimograma e o auxonograma de açúcares, clivagem das substâncias químicas, assimilação de nitrato, assimilação de nitrito, capacidade de crescer em condições de alta concentração de açúcares, relação GC, entre outros. Nestes testes, pressupõe-se, como condição básica, pureza tanto do microrganismo quanto das substâncias que serão testadas. Cuidados especiais também deverão ser tomados no preparo do meio de cultura. Dependendo da forma de preparo, substâncias mais complexas poderão ser decompostas e a identificação ficará definitivamente comprometida. Por este motivo, os meios utilizados na identificação de microrganismos são caros e todo o processo de identificação exige experiência nesta área. Assim por exemplo, quando se deseja saber qual a capacidade de a levedura fermentar a sacarose, esta deverá ser pura e a esterilização não poderá ser efetuada pelo uso do calor. Usando o calor, há a possibilidade de, no lugar da sacarose, se estar testando a capacidade de a levedura fermentar a glicose e a frutose.

Testes bioquímicos

A Tabela 4 4 (incluir) mostra a capacidade que possuem as duas espécies de *Dekkera* e as demais espécies de *Brettanomyces* de fermentar açúcares, segundo van der Walt (1984a).

Esta tabela é especialmente importante se um kit comercial de açúcares for utilizado. Há, no mercado, vários kits disponíveis destinados à identificação de leveduras. Entre estes estão:

1. Albicans ID (BioMerieux) (Krajewska-Kulak et al., 1999)
2. API 20C (Analytab Products, Plainview, New York) (Control Calidad Seimc, 1999; Meis et al., 1999; Moghaddas et al., 1999; Verweij et al., 1999)
3. API 50 CHL (H.L.S. Scientific Pty. Ltd., South Australia) (Heresztyn, 1986)
4. API Candida (Verweij et al., 1999)
5. API ID 32C (bioMérieux) (Control Calidad Seimc, 1999; Verweij et al., 1999)
6. Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur) (Control Calidad Seimc, 1999; Krajewska-Kulak et al., 1999; Meis et al., 1999; Verweij et al., 1999; Romney et al., 2000)
7. Candifast (Oxoid) (Control Calidad Seimc, 1999)
8. Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur) (Krajewska-Kulak et al., 1999)
9. Microscan (Dade) (Control Calidad Seimc, 1999)
10. RapID Yeast Plus System (Innovative Diagnostic) (Control Calidad Seimc, 1999; Moghaddas et al., 1999; Verweij et al., 1999)-
11. Uni-Yeast-Tek System (Remel, Lenexa, Kansas)(Moghaddas et al., 1999)
12. Vitek System (BioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Missouri),(Control Calidad Seimc, 1999; Moghaddas et al., 1999; Verweij et al., 1999)
13. Yeast Star (Verweij et al., 1999)

Segundo relatório Control Calidad Seimc (1999) entre os kits, o API 20C é um dos mais utilizados. Romney et al. (2000) observaram que, com relação ao método convencional, o Auxacolor System teve um acerto de 94% na identificação de leveduras. Os erros foram cometidos com *Candida albicans* (de 15 linhagens apenas uma não foi corretamente identificada), *Candida kefyr* (de sete linhagens apenas duas não puderam ser identificadas), *Candida parapsilosis* (de 17 apenas uma não foi identificada) e *Sacch. cerevisiae* (de três uma não pode ser identificada). Entre os kits Vitek, Api ID 32C, Api 20C AUX, Yeast Star, Auxacolor, RapID Yeast Plus system, and Api Candida, a porcentagem de acerto variou de 59,6% a 80,8%. Os kits que mais proporcionou acerto foram Api Candida com 78,8% e Auxacolor com 80,8% (Verweij et al., 1999).

A Figura 13 mostra o kit auxacolor na identificação de *Candida glabrata*. Esta levedura é patogênica, pois causa vulvovaginite, e responde ineficientemente à ação dos azóis, como fluconazol, e da nistatina (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Cada poço do kit possui diferentes açúcares. A levedura é transferida para cada poço e seu crescimento é visualizado pela alteração da cor que passa de púrpura para amarelo. Neste caso, a levedura testada (Figura 13) só assimila a glicose e a trealose. Observe que nem todos os açúcares mostrados na Tabela 5 5 estão contemplados no auxacolor. Não há poços com a ramanose e nem com a eritrose, por exemplo. Também, nem todos os 16 poços possuem açúcares. Enumerando os poços de 1 a 16, onde na fileira mais acima estão os

Tabela 4. Fermentação de açúcares pelos gêneros *Dekkera* (van der Walt, 1984a) e *Brettanomyces* (van der Walt, 1984b).

Leveduras	Gli*	Gal	Sac	Mal	Lac	Raf
<i>D. bruxellensis</i>	+	-	+	+	-	-
<i>D. intermedia</i>	+	+L	+L	+	-	V
<i>Br. abstinens</i>	+	+L	-	-	-	-
<i>Br. anomalus</i>	+	+	+	V	+	+
<i>Br. bruxellensis</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Br. claussenii</i>	+	+	+	+F	+	V
<i>Br. custersianus</i>	+L	-	-	-	-	-
<i>Br. custersii</i>	+	+L	+	+	-	+L
<i>Br. intermedius</i>	+	+L	+	+L	-	-/+F
<i>Br. lambicus</i>	+	-/+F	+	+	-	-
<i>Br. naardenensis</i>	+L	-/+F	-	-	-	-

*Gli= glicose; Gal= galactose; Sac= sacarose; Mal= maltose; Lac= lactose; Raf= rafinose; (-) = negativo; (+)= positivo rápido; (+F)= positivo fraco; (V)= variado; (+L)= positivo lento; (-/+F)= negativo ou positivo fraco.



Fig. 13. Identificação de leveduras pelo kit auxacolor. C.Neg- Controle negativo; CEL- Celobiose; GLU- Glicose; TRE- Trealose; MAL- Maltose; ADO- Adonitol (Ribitol); SAC- Sacarose; MEL- Melezitose; GAL- Galactose; XYL- Xilose; LAC- Lactose; ARA- Arabinose; RAF- Rafinose; ACT- Actidione (cicloeximida); INO- Inositol; POX- Atividade fenol oxidásica. Os poços positivos alteram sua cor de púrpura para amarelo (Sanofi Diagnostics Pasteur).

poços 1 a 8 e na segunda fila os poços 9 a 16, os poços 15 e 16 contêm respectivamente, actidione (ACT) (cicloeximida) e reativo para detectar atividade fenoloxidásica (POX) .

As condições necessárias para que seja efetuado o teste de assimilação de açúcares, em soluções preparadas em laboratório, são dadas a seguir:

1. Usar sempre produtos de qualidade garantida.
2. Usar produtos livres de qualquer contaminação química. Por exemplo, para a assimilação da maltose, esta não deve possuir traços de glicose ou outra fonte de carbono.
3. Garantir a não degradação de polissacarídeos, quando estes estiverem sendo utilizados como substrato para a identificação.
4. A levedura precisa ser pura. Isolar a levedura por meio de diluições em série e efetuar o isolamento em meio sólido.
5. A levedura a ser testada deve apresentar crescimento ativo. Para que isto ocorra:
 - multiplicar a levedura, devidamente isolada, em meio YM a 28 °C
 - repetir a operação, transferindo uma alíquota da suspensão de levedura do YM para um novo YM após 2 a 3 dias de crescimento. As células, assim preparadas, estarão prontas para ser transferidas para os poços do kit de identificação. Alternativamente, a levedura pode ser removida do meio sólido e diluída em 3 mL de H₂O estéril ou em meio "yeast nitrogen base" num tubo de 16 mm de diâmetro.
6. A solução de levedura a ser transferida para o kit deverá ser diluída em H₂O estéril de modo que quatro ou cinco linhas pretas com ¾ mm de largura traçadas em cartão branco sejam vistas através da solução como bandas turvas. Quando se tratar de detecção de *Dekkera* ou *Brettanomyces*, no lugar da água deve-se utilizar uma solução de vitaminas para se efetuar a diluição.
7. A solução de leveduras assim preparadas será transferida para cada poço do kit de identificação segundo informações do fabricante.
8. A placa diagnóstico deverá ser incubada a 28 °C por 24, 48 e 72 horas.
9. Se a levedura for retirada diretamente do meio sólido e inoculada nos poços, cuidados deverão ser tomados para que ágar e outros produtos prontamente assimiláveis não sejam transferidos junto com a levedura.

Além destes testes, estes dois gêneros mostram variação na assimilação do nitrato, não crescem em meios sem vitaminas, não crescem a 50% de glicose, crescem a 37 °C e produzem ácido. Deve ser considerado ainda que a fermentação é estimulada pelo oxigênio molecular, ou seja, apresenta **efeito Custer**. Outra característica destes gêneros são a presença do sistema coenzima Q-9 (van der Walt, 1984a; van der Walt, 1984b). A coenzima Q-9 difere da coenzima Q-10, mais comum em mamíferos, por possuir nove unidades de isoprenóides (C₅H₈)₉-H) em sua cadeia lateral. Ambas estão envolvidas no

Tabela 5. Assimilação de açúcares pelas espécies *Dekkera* (van der Walt, 1984a) e *Brettanomyces* (van der Walt, 1984b).

Leveduras	Gal*	Sac	Mal	Cel	Tre	Lac	Raf	Amisol	Dxilo
<i>D. bruxellensis</i>	-	+	+	-	+	-	+F	-	-
<i>D. intermedia</i>	+	+L	+L	+	+	-	V	-	-
<i>Br. abstinens</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Br. anomalus</i>	+	+	+	+	+	+	+L	-	-
<i>Br. bruxellensis</i>	-	+	+	-	+	-	+F	-	-
<i>Br. claussenii</i>	-	+	+	+	+	+	+F	-	-
<i>Br. custersianus</i>	-/+F	+F	-/+F	-	+	-	-	-	-
<i>Br. custersii</i>	+	+	+	+	+	+L	+L	-	-
<i>Br. intermedius</i>	+	+	+	+	+	-	V	-	-
<i>Br. lambicus</i>	+L	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Br. naardenensis</i>	+L	-	+	+	+	-	-	+L	+
Leveduras	Larab	Dribo	Rama	Eritr	Ribi	Dmani	Succ	Citr	Inosi
<i>D. bruxellensis</i>	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>D. intermedia</i>	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>Br. abstinens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Br. anomalus</i>	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>Br. bruxellensis</i>	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>Br. claussenii</i>	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>Br. custersianus</i>	-	V	-	-	V	-	+	-	-
<i>Br. custersii</i>	-	+L	-	-	V	-	+L	-	-
<i>Br. intermedius</i>	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>Br. lambicus</i>	-	-	+L	-	-	-	V	-	-
<i>Br. naardenensis</i>	-	-	V	-	V	+	+	-	-

* Gal= galactose; Sac= sacarose; Mal= maltose; Cel= celobiose; Tre= trealose; Lac= lactose; Raf= rafinose; Amisol= Amido solúvel; Dxilo= D-xilose; Larab= L-arabinose; Dribo= D-ribose; Rama= ramanose; Eritr= eritritol; Ribi= Ribitol; Dmani= D-manitol; Succ= ácido succínico; Citr= ácido cítrico; Inosi= inositol; (-) = negativo; (+)= positivo rápido; (+F)= positivo fraco; (V)= variado; (+L)= positivo lento; (-/+F)= negativo ou positivo fraco.

processo de transporte de elétrons. Linhagens de *Metschnikowia koreensis* sp. nov também possuem ubiquinona Q9 e Q8 (Hong et al., 2001). Coenzima Q existe nas diversas formas de vida, desde bactérias a mamíferos. As coenzimas Q-6, Q-7 e Q-8 são mais comuns em leveduras e bactérias. A coenzima Q-9 é mais comumente encontrada em ratos (Tran et al., 2001).

Chaves para identificação

Brettanomyces

A chave indicada para a identificação das espécies do gênero *Brettanomyces* estabelecida por van der Walt (1984a) segue a rotina: (entrar com o diagrama)

Dekkera

A chave para as espécies de um determinado gênero serve para facilitar o trabalho e orientar os passos no processo de identificação. A complexidade da chave depende da quantidade de espécies que possui o gênero. Assim, poderá haver diferentes chaves de acordo com os diferentes critérios de agrupamento das espécies no gênero *Dekkera* (Tabelas 1 e 2). Para este gênero, a chave mais simples corresponde àquela determinada por van der Walt (1984a):

Como Molina et al. (1993) e Barnett et al. (1990) consideram quatro espécies para o gênero *Dekkera* (*D. bruxellensis*, *D. anomala*, *D. naardenensis* e *D. custersiana*), a chave sugerida para as espécies é mais complexa. Molina et al. (1993) estabeleceram a seguinte rotina para a identificação:

Dificuldades referentes aos testes bioquímicos

Considerando apenas as provas bioquímicas, seriam estes os testes mais simples para se caracterizar as espécies dos gêneros *Dekkera* e de *Brettanomyces*. No entanto, alguns inconvenientes podem surgir especialmente com aquelas espécies que se mostram fraco positivo (+f) e, pior ainda, os casos variáveis (v) e nos casos "negativo, podendo ser fraco positivo" (-/+f). Ainda assim, há diferença de interpretação dos resultados entre os divulgados por van der Walt (1984b) e Barnett et al. (1990). Por exemplo, *Br. naardenensis*, segundo Barnett et al. (1990), não fermenta a galactose. Para van der Walt (1984b), esta espécie pode apresentar resposta negativa ou positiva fraca (-/+F). Os testes bioquímicos devem ser acompanhados das características macroscópicas e especialmente microscópicas. Este acompanhamento deverá ser realizado por pessoas experimentadas e com conhecimento de estruturas celulares. Além disso, são necessários microscópios e pessoal treinado para operar e reconhecer as características fundamentais que levem à complementação da identificação. Mesmo demorados, Mitrakul et al. (1999) ressaltam ser os testes fisiológicos úteis mas que, para diversas linhagens, é uma técnica que dá resultados ambíguos. A prática mostra e os relatos confirmam ser o trabalho e o tempo gasto em obter os resultados e a ambigüidade de características fisiológicas observadas, as maiores desvantagens deste método de identificação de levedura.

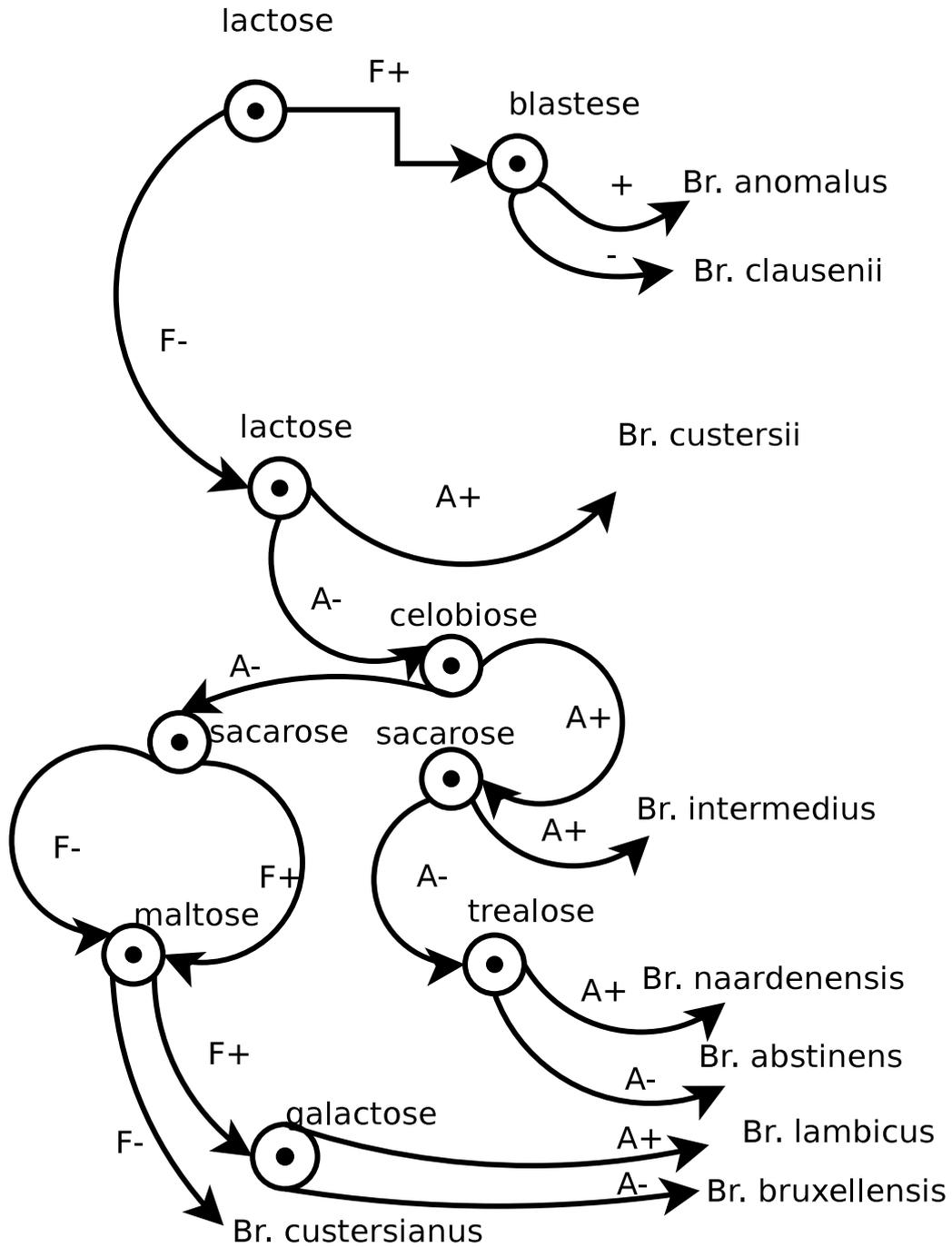


Fig. 14. Identificação de *Brettanomyces*. F+, fermentação positiva; F-, fermentação negativa; A+, assimilação positiva; A-, assimilação negativa .

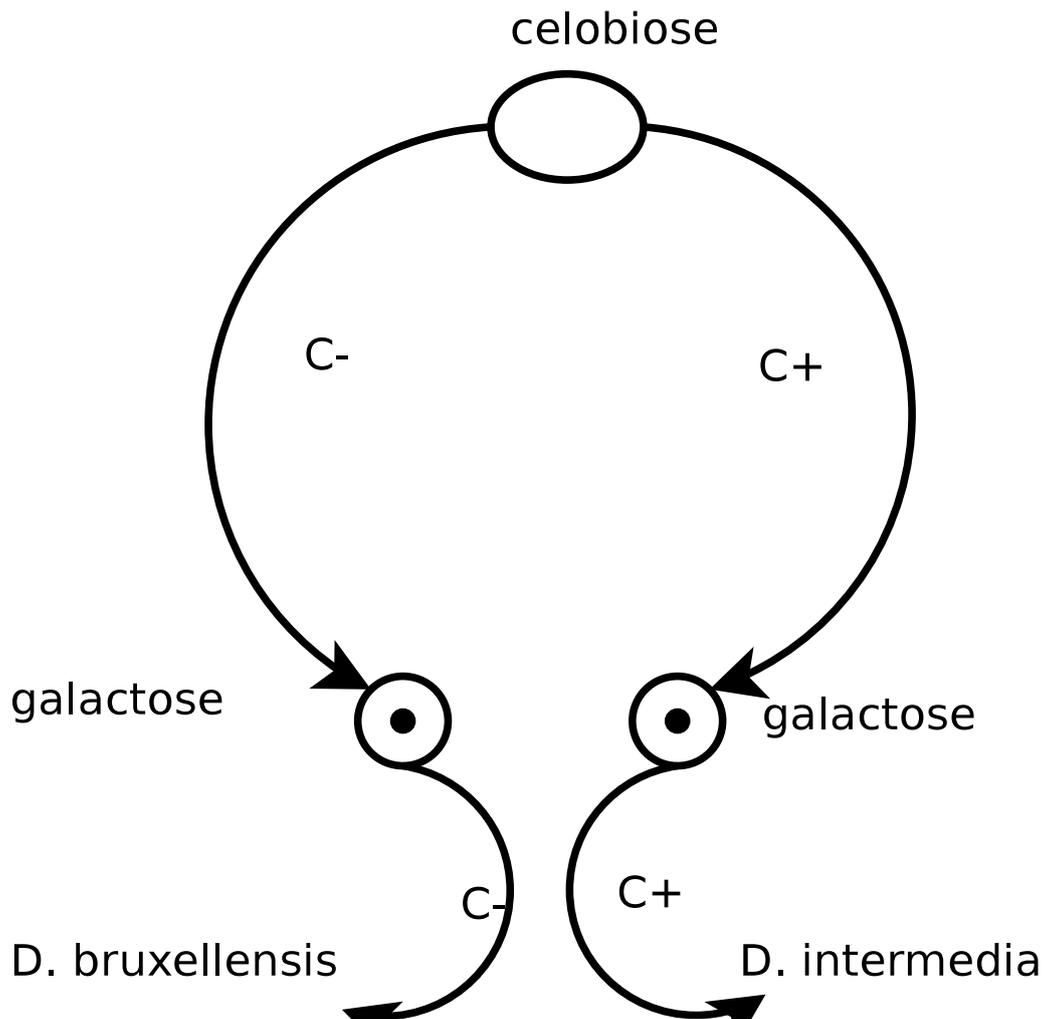


Fig. 15. Identificação de *Dekkera* segundo van der Walt (1984a). C+, crescimento; C-, não crescimento

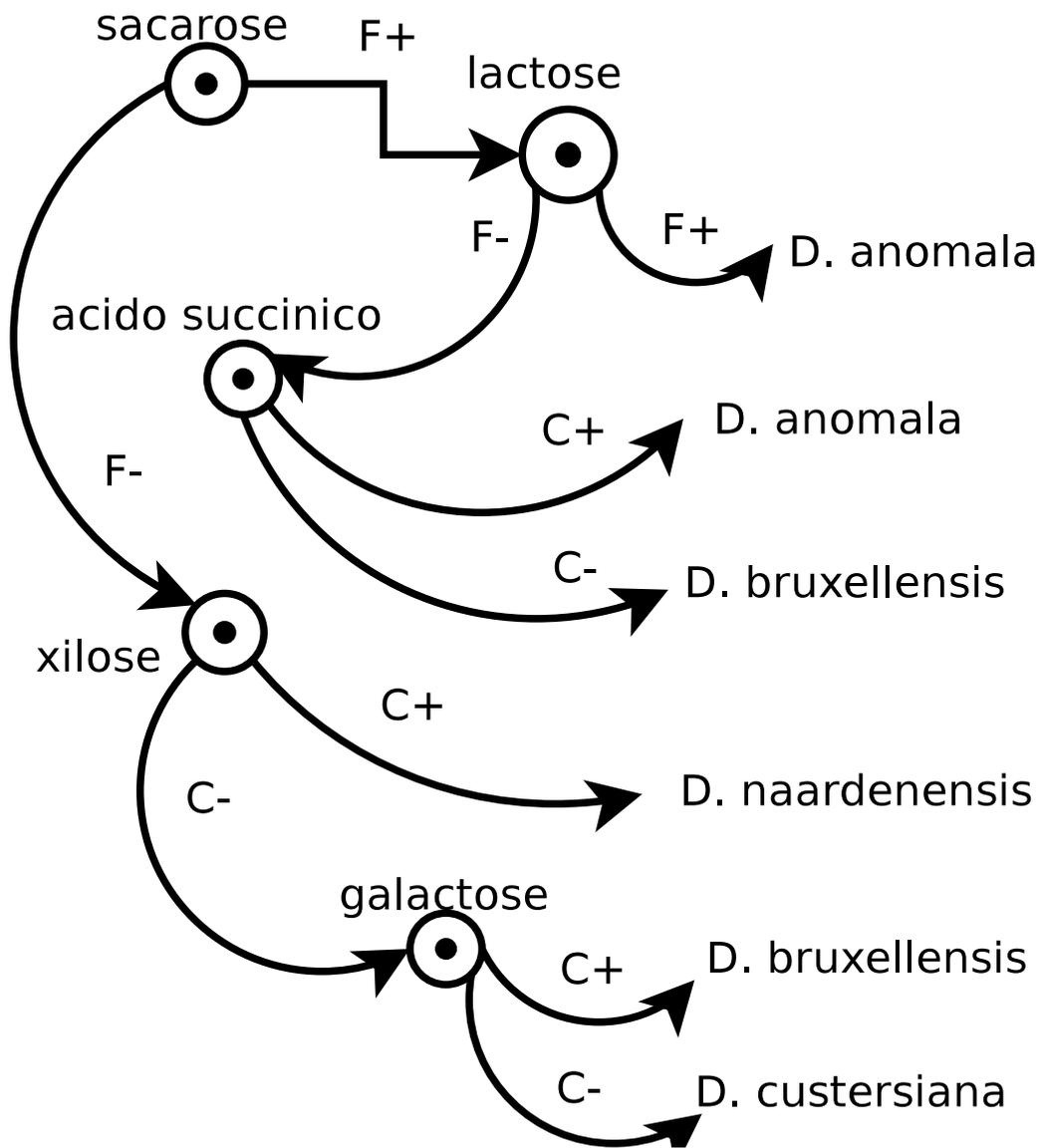


Fig. 16. Identificação de espécies do gênero *Dekkera*. F+, fermentação positiva; F-, fermentação negativa; C+, crescimento; C-, não crescimento

Metabólitos específicos - Teste VPR

A capacidade de uma cultura de levedura de formar etil-fenóis a partir de ácido p-cumárico é uma característica dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* e se deve à atividade da enzima vinil-fenol redutase (VPR) (Chatonnet et al., 1999). A formação de 4-etil-fenol por uma determinada colônia de leveduras se dá em 24 horas e pode ser detectada por cromatografia gasosa. Este teste permite confirmar a presença de células viáveis destes dois gêneros.

Engarrafar vinhos sem células viáveis de *Dekkera* e *Brettanomyces* não é uma tarefa simples. O importante é não permitir que seu número atinja valores que ponham em risco a qualidade do vinho. O número de células que pode estar presente sem que afete significativamente o vinho vai se alterar de vinho para vinho. Acompanhar a evolução mensal de etilfenóis nos vinhos é uma importante medida para avaliar a atividade destes microrganismos e permitir que se tomem decisões para impedir o aumento da concentração deste metabólito. Um aumento nos teores de etil-fenóis é um forte indicativo de que o microrganismo está encontrando condições de aumentar sua população e que, se não forem tomadas as devidas providências, a qualidade do vinho será severamente afetada. Quando houver aumento no teor de etil-fenol, é necessário medir a concentração de SO₂ e corrigi-la se necessário. Chatonnet et al. (1999) mostraram que, dependendo da concentração de etil-fenol, é suficiente corrigir a quantidade de SO₂ livre para se deter o avanço na formação de etil-fenol. Um vinho armazenado em barricas iniciou um ligeiro aumento no teor de etil-fenóis. O teor de etil-fenóis, neste vinho, passou, em um mês, de quase zero para 100 µg/L. Ao mesmo tempo, a concentração de SO₂ neste vinho era de 15 mg/L. A correção para 25 mg/L foi suficiente para parar o aumento na formação de etil-fenol. Um outro vinho apresentou um forte aumento na concentração de etil-fenol. Dentro de um mês, a concentração de etil-fenóis passou de aproximadamente 100 µg/L para 430 µg/L. A concentração de SO₂ neste vinho era de 12 mg/L. Neste caso, além de aumentar o teor de SO₂ para 30 mg/L, outros tratamentos foram efetuados, entre os quais a desinfecção da barrica. Dois meses após, a concentração de etil-fenol tinha se estabilizado em 430 µg/L. O mesmo vinho tinha permanecido na barrica sem sofrer intervenção. No mesmo período, este vinho atingiu a concentração de etil-fenóis de 1.780 µg/L e mostrou uma alteração profunda em seu perfil aromático.

Meios de cultura

A procura por meios diferenciais para detectar *Dekkera* e *Brettanomyces* é uma constante. As exigências nutricionais e as características fisiológicas das espécies pertencentes a estes dois gêneros não são uniformes. Sulfato de amônio acima de 2 g/L inibe o crescimento de *Brettanomyces bruxellensis* e extrato de levedura estimula o crescimento (Uscanga et al., 2000). Os autores mostraram haver até mesmo alteração morfológica das células da referida levedura quando o extrato de levedura era omitido. Rodrigues et al. (2001) avaliaram diversos meios de cultura para a detecção de *Dekkera* e *Brettanomyces* e verificaram que os meios bacteriológicos não permitiam o crescimento das linhagens de *Dekkera* testadas e que a adição de fucsina não proporcionava a diferenciação esperada.

Na verdade, esta levedura parece preferir ambientes ricos em etanol e açúcares fermentescíveis, habitar locais com adequada quantidade de biotina e tiamina ou viver

onde microrganismos formadores e doadores de vitaminas costumam se desenvolver. *Brettanomyces* por exigir determinados ingredientes nutricionais e por apresentar crescimento lento, não deve ser um microrganismo de distribuição na natureza tão abrangente quanto *Saccharomyces* e outros gêneros. Embora van der Walt & van Kerken (1961) tenham tido êxito no isolamento de *Dekkera* e *Brettanomyces*, outros pesquisadores verificaram ser o meio preconizado por van der Walt & van Kerken (1961), contendo actidione (50 µg/mL), sorbato de potássio (500 µg/mL) ou etanol (0-16%), inadequado para o crescimento destes dois gêneros (Wright & Parle, 1974; Licker et al., 1998).

Wright & Parle (1974) desenvolveram um meio de cultura seletivo para o crescimento rápido de espécies *Dekkera* e *Brettanomyces*, conseguindo crescimento de *Brettanomyces intermedius* depois de 1 a 4 semanas. O meio possui a seguinte composição em 100 mL de meio:

- 20 g sacarose
- 0,7 g (NH₄)₂HPO₄
- 0,4 g (NH₄)₂SO₄
- 0,4 g K₂SO₄
- 0,3 g de extrato de levedura
- ajustar o pH para 4,0 com ácido tartárico

Com este meio de cultivo, Wright & Parle (1974) observaram uma porcentagem mais elevada de vinhos tintos de híbridos (14%) com *Dekkera* e *Brettanomyces* que de viníferas (10%). O mesmo ocorreu com vinhos brancos. A porcentagem de vinhos brancos com *Dekkera* e *Brettanomyces* foi maior nos vinhos brancos elaborados com híbridos (22%) que com viníferas (18%). Isto talvez se deva ao maior cuidado que se tem ao elaborar e conservar os vinhos de viníferas.

O tempo para se detectar *Dekkera* e *Brettanomyces* é um dos fatores limitantes no processo de detecção. Wright & Parle (1974) obtiveram colônias depois de 14 dias de incubação. É possível detectar colônias de *Dekkera* e *Brettanomyces* em menos tempo. Com um meio denominado BretII, foi possível observar o aparecimento pequenas colônias de uma espécie de *Brettanomyces* em vinhos brasileiros (dados não publicados, G. A. da Silva Embrapa Uva e Vinho) em três dias. Este meio, que ainda está sendo objeto de estudo, foi incubado a 25 °C.

Quanto à fonte de carbono, Rodrigues et al. (2001) testaram, com o meio mineral definido por van Uden (1967), a glicose (2% p/v) com 10 mg/L de cicloeximida e 250 mg/L de ácido sórbico, a sacarose (2% p/v) com 10 mg/L de cicloeximida e 250 mg/L de ácido sórbico, a maltose (0,5% p/v) com 50 mg/L de cicloeximida e 500 mg/L de ácido sórbico e o etanol (0,6% v/v) com 10 mg/L de cicloeximida. O ácido p-cumárico foi adicionado a todos os meios. O meio mineral independentemente da fonte de carbono não resultou em diferenciação satisfatória. No meio GYP com glicose, etanol e ácido p-cumárico e no meio GYP com apenas etanol em diferentes concentrações (0,6%, 6,0% e 10%) e ácido

p-cumárico, a diferenciação também não foi obtida, embora o etanol, quando utilizado como a única fonte de carbono, tenha inibido um maior número de gêneros não relacionados com *Dekkera*. Muitas espécies de gêneros não relacionados com *Dekkera* suportaram os crescentes aumentos no teor de etanol. A adição de etanol de modo a perfazer 0,6% permitiu o crescimento de todas as espécies de *Dekkera* testadas e também houve crescimento de espécies de outros gêneros como *Candida*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, entre outros. O aumento de 0,6 para 6% de etanol inibiu o crescimento de *Br. naardenensis* sem afetar o crescimento de espécies dos gêneros citados acima. Aumentando para 10% o teor de etanol, além de *Br. naardenensis*, a espécie *Br. anomalus* teve seu crescimento inibido. É interessante observar que o meio com 10% de etanol não afetou o crescimento das mesmas espécies dos gêneros citados acima, ou seja, *Candida*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces*, *Yarrowia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Quanto ao uso dos agentes inibidores cicloeximida e ácido sórbico, Rodrigues et al. (2001) observaram que os agentes inibidores só foram eficientes no meio mineral quando a maltose era a única fonte de carbono. O aumento na concentração de cicloeximida de 10 mg/L para 50 mg/L e a alteração na concentração de ácido sórbico de 250 mg/L para 500 mg/L não melhoraram a seletividade do meio e nem mesmo o uso de ácido sórbico melhorou a seletividade da cicloeximida. Segundo estes autores, o uso do ácido sórbico pode ser omitido. O aumento na concentração de cicloeximida para 1000 mg/L também não melhorou a seletividade. Entre os diversos antibióticos utilizados, a cicloeximida, na concentração de 10 mg/L, apresentou o maior potencial de seletividade. Todas as espécies de *Dekkera* testadas cresceram, mas a cicloeximida não impediu o crescimento de *Candida tropicalis* e de *Kloeckera apiculata*. O meio utilizado por Rodrigues et al. (2001), para testar os antibióticos, foi o GYP, composto de glicose (2%), extrato de levedura (0,5%), peptona (1%) e ágar (2%). A seletividade do meio nem mesmo poderia aumentar se a fonte de carbono fosse a maltose ou a sacarose no lugar da glicose, como sugerida anteriormente. Uma vez que estas duas fontes de carbono não são assimiladas e nem fermentadas por *Brettanomyces abstinentis* (van Der Walt, 1984b), com a modificação, esta espécie não seria detectada. Ao se modificar a fonte de carbono para sacarose ou maltose, como *Br. abstinentis*, apenas a espécie *Kl. apiculata* seria eliminada por não fermentar e nem assimilar estes dois açúcares. A espécie *C. tropicalis* não seria eliminada por apresentar fermentação e assimilação variáveis para a sacarose e totalmente positiva para maltose (Meyer et al., 1984).

Com as informações obtidas e diante de um certo insucesso na definição de um meio diferencial claro para a detecção de *Dekkera* e *Brettanomyces*, Rodrigues et al. (2001) partiram para a técnica de aliar inibição com alteração da cor da cultura, tempo de inoculação, produção de ácido e a formação de 4-etil-fenol. Para isto, utilizaram o meio YNB 6,7 g/L (Yeast Nitrogen Base) (Difco) e adicionaram etanol (6% v/v), cicloeximida (10 mg/L), ácido p-cumárico (100 mg/L), verde de bromo cresol (22 mg/L) e ágar (20 g/L), agora denominado DBDM. Este meio inibiu *Kl. apiculata* e outros gêneros mas permitiu o crescimento de outras espécies de diversos gêneros, incluindo *C. tropicalis*. Os gêneros que foram detectados neste meio, no entanto, além de serem raros contaminantes de vinho, cresceram mais rapidamente (metade do tempo mínimo necessário para se observar crescimento de *Dekkera* e *Brettanomyces* - 8 dias) e não mostraram odor fenólico característico. As colônias de *Dekkera* e *Brettanomyces* se apresentaram com pontos com uma cor creme amarelada, alterando-se para verde com o aumento do tempo de incubação. Com a formação de ácido, a cor do meio mudava de azul para amarelo. O

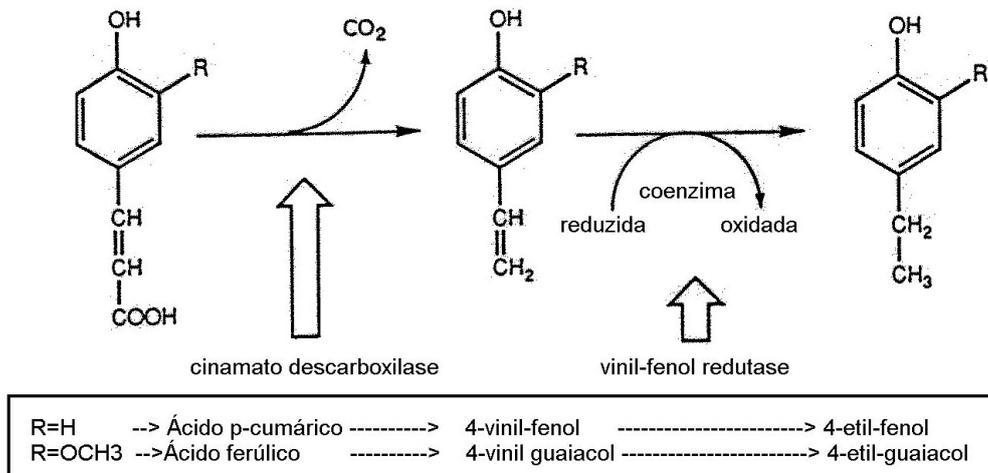


Fig. 17. Síntese de etil-fenóis por *Dekkera* e *Brettanomyces* Fonte: Chatonnet et al. (1992)

meio WLN (Difco), muito utilizado em cantinas para contagem de células, se mostrou, segundo Rodrigues et al. (2001), menos seletivo que o meio DBDM. Mesmo com a melhor seletividade do meio DBDM, há, na prática, linhagens que necessitam de recursos adicionais para ajudar na detecção de *Dekkera* e de *Brettanomyces*. Às vezes é necessário utilizar cromatografia gasosa para verificar a formação de 4-etil-fenol quando se tem dificuldade em sentir o odor conferido por este metabólito. Outra situação de dificuldade no diagnóstico pode ocorrer quando a linhagem apresenta a formação de metabólitos com odor fenólico e cresce rapidamente, descaracterizando o comportamento de crescimento de *Dekkera* e *Brettanomyces*. Nestes casos, tanto a cromatografia como o exame microscópico são duas ferramentas que podem dirimir dúvidas.

A síntese de etil-fenóis se dá em duas etapas (Chatonnet, et al., 1992; Barthelmebs et al., 2001) (Figura 17). Na primeira, a enzima CD, referida anteriormente, transforma determinados ácidos cinâmicos em seus vinil-fenóis correspondentes. Este, por sua vez, sofre a ação das enzimas vinil redutases (VR). Estas enzimas promovem a redução dos vinil-fenóis, convertendo-os em etil-fenóis. *Sacch. cerevisiae* também possui CD mas estas, ao contrário das cinamato descarboxilases de *Dekkera* e *Brettanomyces*, são inibidas pelos compostos fenólicos do vinho tinto (procianidinas e catequinas). Além do mais, a especificidade da enzima de *Sacch. cerevisiae* pelo substrato não é a mesma que a exibida pela CD de *Dekkera* e *Brettanomyces*. Estes dois gêneros são capazes de transformar de 50-60% do substrato (ácido trans-p-cumárico) em 4-etil-fenol. Vinhos secos estáveis quando inoculados com células de *Br. intermedius* apresentaram concentrações de 4-etil-fenol suficientes para depreciar as características organolépticas em apenas 30 dias Chatonnet et al., 1992).

Segundo Chatonnet et al. (1992), o limiar de percepção para uma mistura de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol (10:1) é de 426 µg/L. Para 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, isoladamente, o limiar de percepção (LP) é de 620 µg/L e 140 µg/L, respectivamente. Observar que o LP para o 4-etil-guaiacol é 4,4 vezes menor que o LP para o 4-etil-fenol. O 4-etil-fenol embora seja um potente depreciador organoléptico do vinho tinto, nem sempre este produto é formado. Rodrigues et al. (2001) também não observaram 4-etil-guaiacol nas

amostras de vinhos analisadas. Isto significa que nem sempre este metabólito é formado. Outra informação importante está relacionada com o tempo que leva um vinho para apresentar problemas de odor fenólico. Os autores verificaram que os teores de 4-etil-fenol podiam atingir níveis elevados num período curto de estocagem após terminada a fermentação. Vinhos com apenas quatro meses de estocagem já podiam apresentar mais de 2.000 $\mu\text{g/L}$ de 4-etil-fenol, ou seja, a presença deste metabólito não é uma exclusividade de vinhos estocados por longos períodos. O odor fenólico está quase sempre relacionado com a estocagem do vinho tinto em madeira. No entanto, Rodrigues et al. (2001) encontraram vinhos estocados em concreto ou aço inoxidável com odor fenólico. Boidron et al. (1988) consideram a presença de 4-etil-guaiacole de 4-etil-fenol em vinhos tintos armazenados em madeira como resultado da ação bacteriana e não como substâncias originárias da madeira.

Dificuldades referentes ao cultivo de *Dekkera* e *Brettanomyces* em meio sólido

Uma das dificuldades mais comum é o elevado tempo de incubação. Como estas leveduras não são uniformemente distribuídas nos tanques ou barricas, as amostras retiradas de grandes recipientes podem não ser representativas. As amostras provenientes de vinhos engarrafados não apresentam este inconveniente.

Os testes podem dar falsos positivos porque apresentam características de crescimento semelhantes a tantos outros gêneros. Podem igualmente resultar em falsos negativos por causa da baixa viabilidade celular devido ao SO_2 adicionado ao vinho.

A reologia do meio de cultura pode afetar a capacidade de crescimento. Células de tais leveduras, tendo se adaptado às condições do vinho podem ter sua viabilidade alterada quando removidas deste meio líquido para meio sólido, dando a impressão de ausência de contaminação.

Métodos Cromatográficos para Detecção de *Dekkera* e *Brettanomyces*

GC/MS - Sniffing

Detecção de 4-etil-fenol ou 4-etil-guaiacol formado num determinado ambiente não é por si só uma forma eficiente de detecção de *Dekkera* e *Brettanomyces* pelas razões acima descritas. Mas a evolução do quadro de contaminação pode transformar este método de detecção num processo fundamental para monitorar a atividade destas leveduras no vinho.

Entre os diversos meios de detecção pode-se citar a cromatografia e suas derivações. Desde 1981 que a técnica GC/MS tem sido utilizada com sucesso para determinar compostos fenólico-voláteis em vinho (Etiévant, 1981). A técnica GC/MS foi utilizada com sucesso também por Chatonnet et al. (1992) no modo splitless. Estes autores aliaram a este processo cromatográfico outra técnica, denominada sniffing, para relacionar o tipo de odor que estes componentes poderiam conferir. As condições cromatográficas empregadas por Chatonnet et al. (1992) foram:

- Temperatura - 230 °C (45 - 230 °C numa taxa de 3 °C/min e com final isotérmico por 30 min)
- Volume de injeção - 3 μ L
- Tempo de purga - 30 s
- Taxa de purga - 70
- Coluna capilar Carbowax 20 M (50 m x 0,22mm, 0,25 μ m, He N55, 18 Psi)

A detecção foi efetuada por espectrômetro de massa trabalhando em impacto eletrônico:

- Energia de ionização - 70 eV
- Temperatura - 250 °C
- Aquisição feita:
 - Por varredura (faixa de massa- 30-300 amu, 1,9 espectro/s)
 - Ou por fragmentometria - fragmento previamente selecionado

Os autores compararam os picos obtidos por detecção iônica e, por "sniffing", localizaram os picos responsáveis pelos respectivos odores (Figura 18).

HS-SPME- GC/Capilar/FID ou MS

O método tem a vantagem de não requerer solventes e nem aparelhagem sofisticada. Além de um detector de ionização de chama (DIC ou FID) poderá ser utilizado um espectrômetro de massa (MS). A técnica tem sido utilizada para detectar 4-etil-fenol, 4-etil-guaiacol e outros componentes voláteis em vinho (ETS Laboratories, 2001; Hartmann et al. 2001; Monje et al., 2001; Pollnitz et al., 2002). Os autores compararam a técnica de extração líquido-líquido com a SPME (solid phase microextraction). A calibração gráfica para ambos compostos ficou, quando foi utilizada a metodologia SPME, entre 5 e 5.000 μ g/L, enquanto com a extração líquido-líquido, a calibração gráfica esteve entre 25 e 10.000 μ g/L. Para baixas concentrações (50 μ g/L), o desvio padrão relativo foi maior para a técnica líquido-líquido, independentemente do composto analisado. A extração líquido-líquido é trabalhosa. Exige três extrações com diferentes quantidades de diclorometano, duas lavagens com bicarbonato de sódio, duas novas extrações com hidróxido de sódio, mais três outras extrações com éter dietila para finalmente o extrato ser concentrado lentamente em evaporador com atmosfera de nitrogênio. SPME tem sido utilizada para analisar aromas dos mais diferentes substratos. Kelling & Otter (2001) obtiveram os componentes voláteis de cama de aviário, carne de porco e pão por este método e os analisaram por GC/MS.

Na realidade, HS-SPME (Head Space - Solid Phase Microextraction) envolve apenas a extração do componente aromático de um substrato por meio de uma exposição de fibra de sílica, revestida por uma capa polimérica não volátil, a uma determinada amostra. Os componentes da amostra são absorvidos por esta fibra e posteriormente liberados no

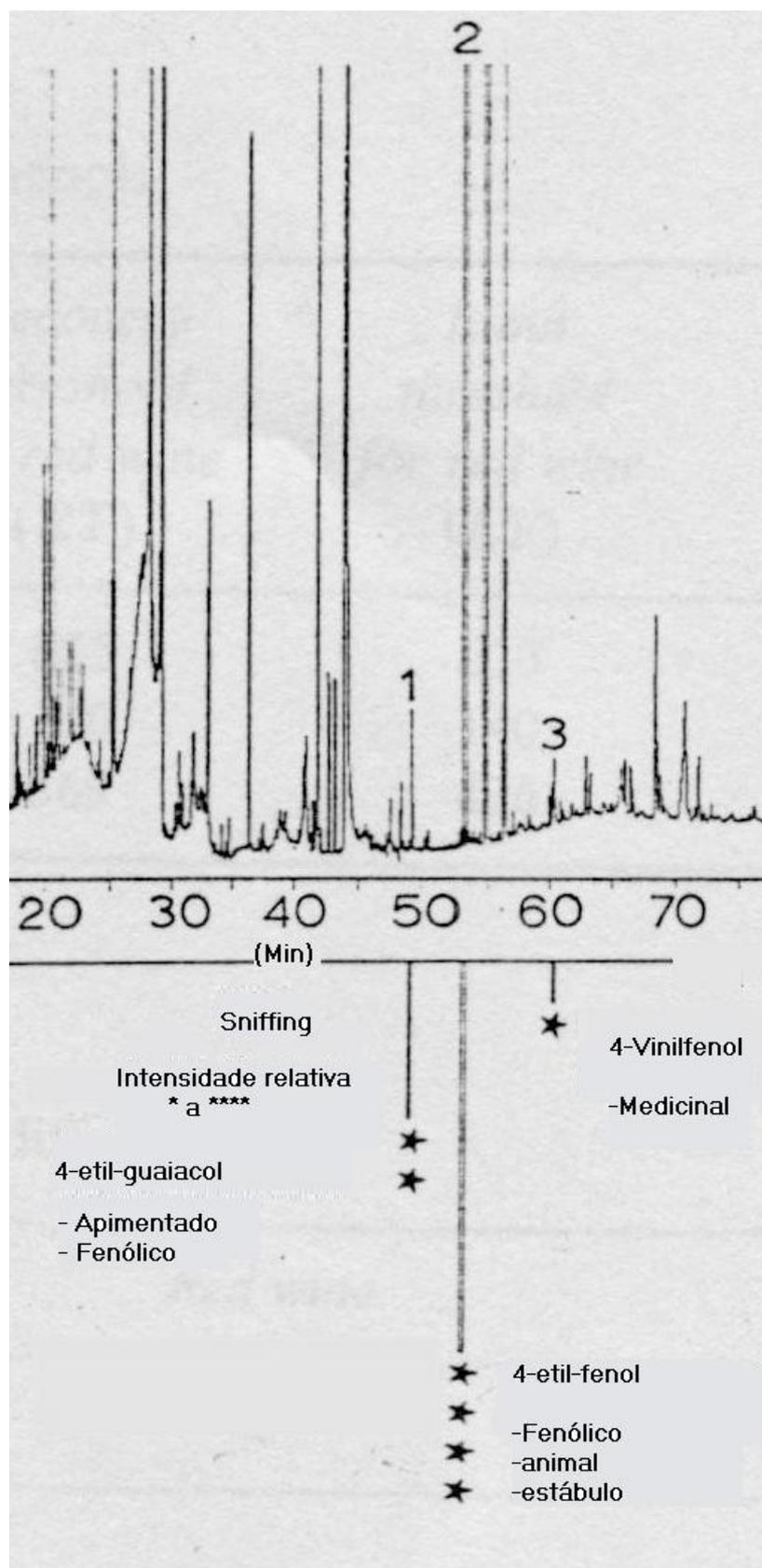
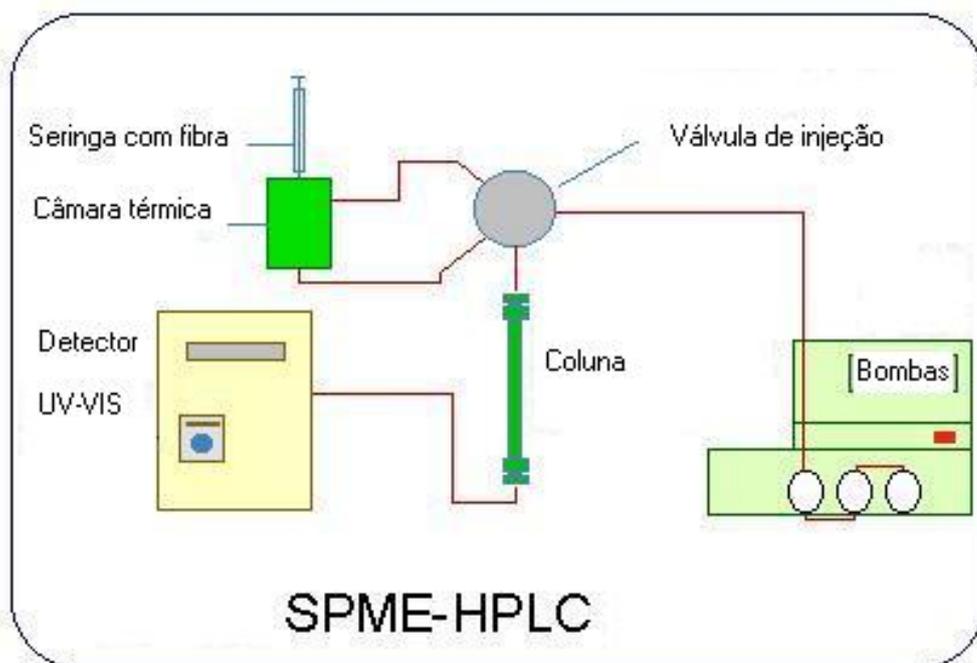


Fig. 18. Os picos 1, 2 e 3 representam o 4-etil-guaiacol, 4-etil-fenol e 4-vinilfenol, respectivamente, presentes em vinho tinto (Chatonnet et al., 1992.)



Fonte: <http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme2.gif>

Fig. 19. Sistema de HPLC com câmara de liberação térmica SPME-HPLC.

Fonte: <http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme2.gif>

injetor do cromatógrafo, devido à temperatura elevada do injetor. A tecnologia está patenteada nos Estados Unidos com o número 5691206, na Europa com o número 523092 e no âmbito internacional com o número #W091/15745 (Universidade de Waterloo). SPME pode ser usada tanto em GC como em HPLC. Neste último, a SPME mais empregada é aquela que usa uma fibra revestida de polimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 60 μm e há a necessidade de se investir na câmara de liberação térmica (Figura 19).

Antes de adquirir a SPME, deve-se saber que tipo de substância se deseja analisar. Para extrair substâncias muito polares de amostras polares, por exemplo, deve-se empregar uma fibra de poliácrlato de 85 μm . O aparato poderá ser reutilizado em outras análises. Há, disponível no mercado, uma gama de opções de SPME. O processo de absorção dos componentes aromáticos por parte da fibra pode se dar por via "espaço livre (headspace-HS-SPME)" ou por imersão da fibra diretamente na amostra (Figura 20).

O cromatógrafo é operado em condições habituais, com os pequenos ajustes que normalmente são necessários. Poderão ser utilizadas as seguintes condições analíticas, definidas por Monje et al. (2001):

- Gás de arraste - N₂ com um fluxo de 1 mL/min
- O injetor split/splitless - no modo splitless numa razão de 1:25
- Temperatura do injetor - 250 °C
- Coluna EC-WAX (30m X 0,32mm X 0,25 μm)

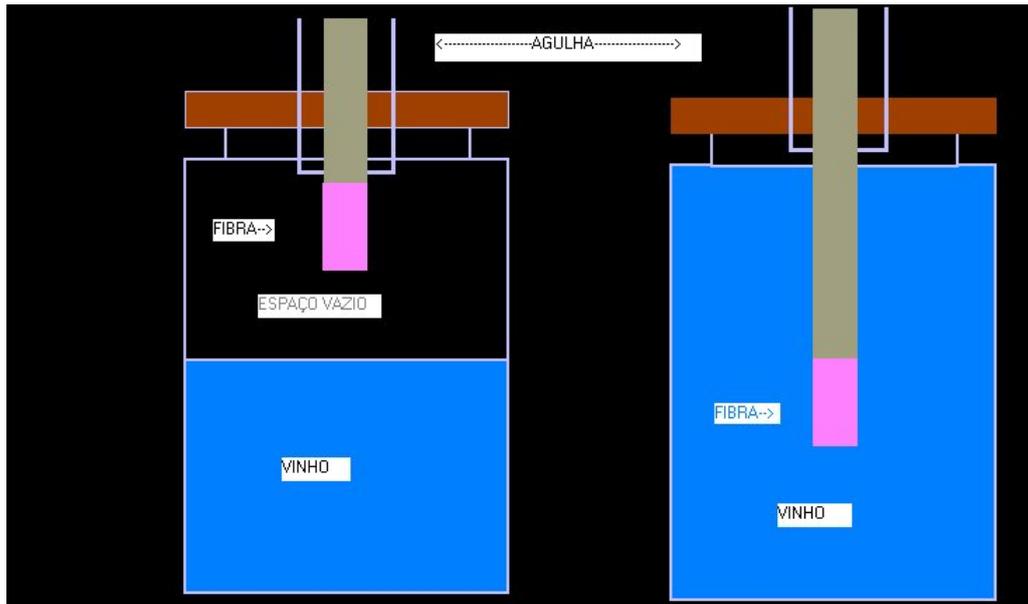


Fig. 20. Diferentes processos de transferência dos componentes voláteis do vinho para a fibra: coleta dos componentes presentes no espaço livre ou por imersão.
 Fonte: <http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme5.gif>

- Temperatura da coluna - (40 - 230 °C)

Programação de temperatura da coluna:

- 40 °C por 1 min
- 40 °C - 180 °C numa taxa de 10 °C/min
- 180 °C por 0,5 min
- 180 °C -205 °C numa taxa de 3 °C/min
- 205 °C por 0,5 min
- 205 °C -230 °C numa taxa de 10 °C/min
- 230 °C 5 min)
- Detector FID (300 °C)

Procedimento para o SPME:

- Tomar Vinho tinto -2 mL
- Adicionar NaCl - 1g
- Agregar 3,4-dimetil-fenol (5mg/L) (Padrão Interno)
- Usar fibra de poliacrilato de 85 μ m colocado no espaço livre do frasco que contém a amostra

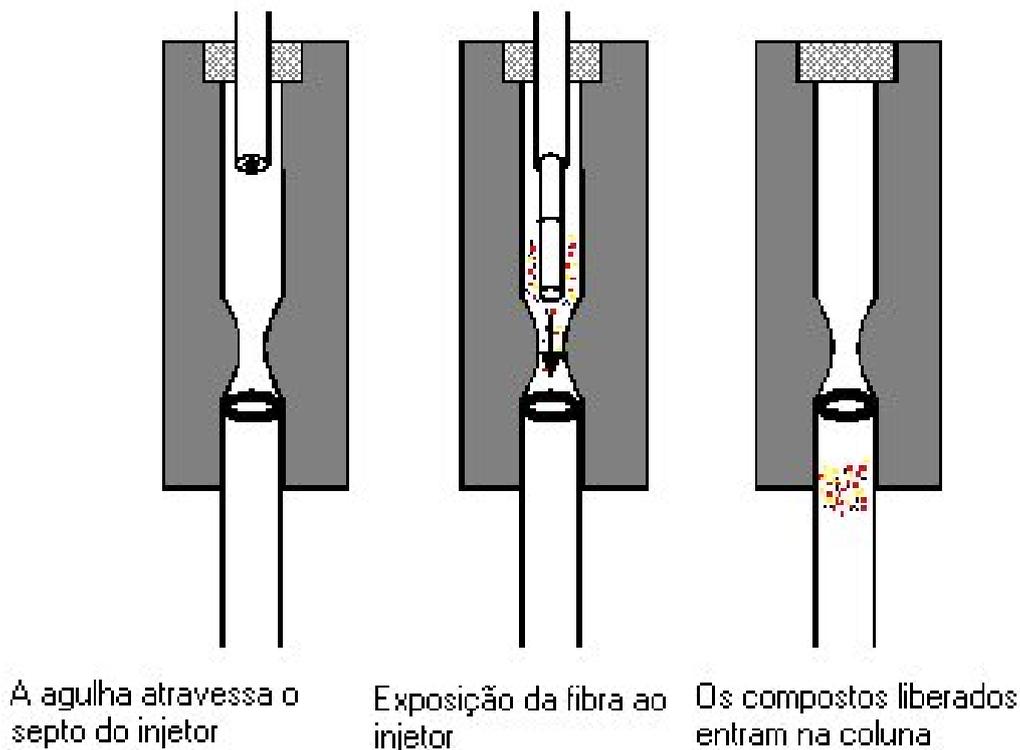


Fig. 21. Passos para a liberação dos compostos dentro do injetor.
 Fonte: <http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme1.gif>

- Aquecer a amostra a 55 °C por 40 min
- Inserir a agulha no septo do injetor
- Pressionar o êmbolo da seringa para que haja inserção da fibra no injetor
- Permitir uma exposição da fibra no injetor por 3 min
- Retrair o êmbolo para que a fibra volte para o interior da agulha
- Remover a agulha do septo do injetor

A Figura 21 mostra o momento no qual as substâncias são liberadas dentro do injetor do cromatógrafo.

Killing & Otter (2001), além do SPME, apresentam duas outras formas de coleta de componentes voláteis para análise em GC/MS. No primeiro processo, os componentes voláteis são sugados para um tubo, contendo 250 mg de tenax pré-lavado, posicionado entre dois conectores com lã de vidro. Os componentes voláteis são lavados em etanol ou hexano (grau HPLC). As amostras são concentradas a 300 μ L por fluxo de ar filtrado em carvão ativado. Esta amostra está pronta para ser analisada. Uma segunda forma de captação de componentes voláteis se baseia na extração direta do produto em 10-30 mL de etanol ou hexano por uma hora. Depois de filtradas, as amostras são concentradas de modo a perfazer um volume total de 0,5-1 mL. O sucesso destes métodos vão depender da concentração de componentes voláteis que estão presentes nas amostras e da sensibilidade do equipamento em detectá-los.

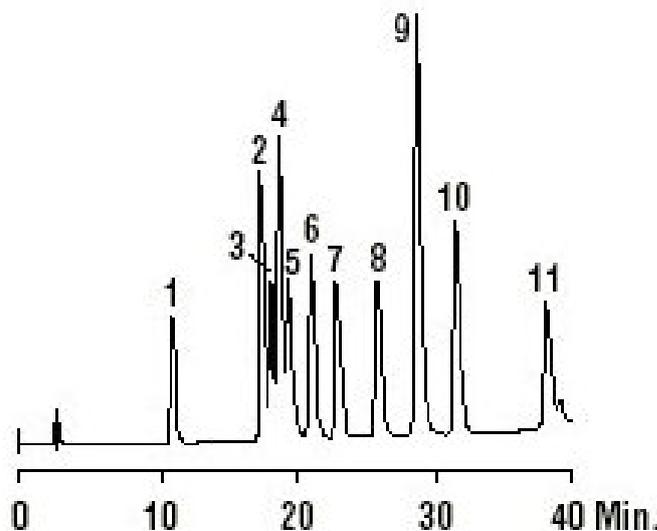


Fig. 22. Cromatograma de compostos fenólicos detectados por HPLC, utilizando detector UV: Coluna - Hypercarb 7 μ m, 100 X 4,6 mm; Fase móvel - A: ácido acético 1% em H₂O; B: acetonitrila; Gradiente - tempo 0- B =10%; tempo 40 - B = 80%; Taxa de fluxo - 1,0 mL/min; Detector - UV 280 nm. Picos: 1- fenol; 2- Guaiacol; 3- m-cresol; 4- p-cresol; 5- o-cresol; 6- 4-etil-fenol; 7- 2-etil-fenol; 8- 3,5-xilenol; 9- 4-etil-guaiacol; 10- Euglenol; 11- Padrão interno. Fonte:Alltech: <http://en.akrom.ee/kataloog/toode.php?uniq=KROM80753c1613158df73>

HPLC/MS

Cromatografia líquida de alta performance (ou alta pressão) também pode ser utilizada para a detecção de compostos aromáticos. Edlin et al. (1995) utilizaram esta técnica de separação e detecção combinando o HPLC ao MS para determinar a concentração de precursores de aromas. Verificaram que *Brettanomyces* é capaz de metabolizar os ácidos p-cumárico, caféico e ferúlico para formar representantes dos 4-vinil e 4-etil. O ácido p-cumárico forma o 4-etil-fenol e 4-vinil-fenol. O ácido caféico é o precursor do 4-vinil-catecol e do 4-etil-catecol. O ácido ferúlico é metabolizado, dando origem a 4-vinil-guaiacol e 4-etil-guaiacol. A análise cromatográfica para separar os diferentes compostos, definida por Edlin et al. (1995), é trabalhosa, pois utiliza cromatografia líquida preparativa para depois empregar a espectrometria de massa.

HPLC/UV - GC/DIC

Tanto o 4-etil-fenol como o 4-etil-guaiacol podem ser detectados por cromatografia líquida de alta performance, utilizando detector UV. Há no comércio colunas para cromatografia líquida que separam substâncias fenólicas com grande eficiência. O cromatograma e as condições básicas operacionais estão dispostas na Figura 22.

O 4-etil-fenol e outros compostos fenólicos podem ser também detectados por gás cromatógrafo (CG), utilizando uma coluna empacotada e de detector de ionização de chama DIC. Em menos de 10 min, o pico do 4-etil-fenol será observado. A Figura 23 mostra o cromatograma e as condições básicas preestabelecidas.

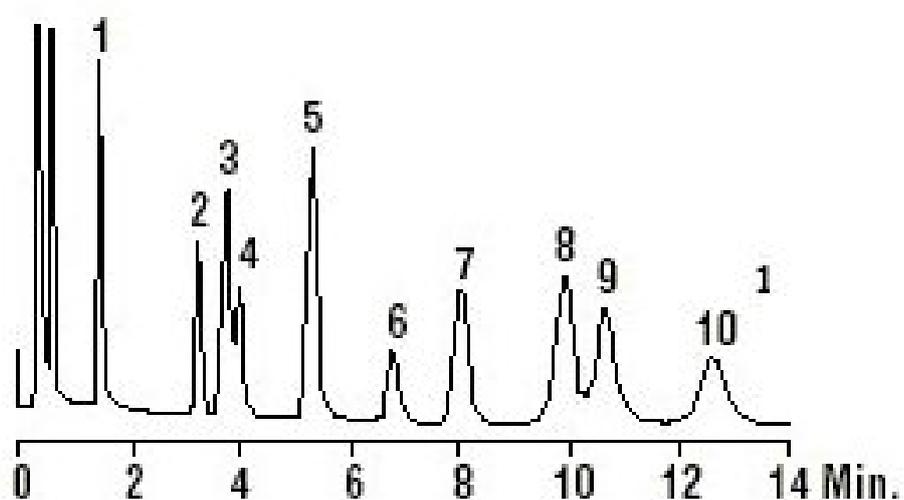


Fig. 23. Cromatograma de compostos fenólicos detectados por GC, utilizando detector DIC e coluna empacotada: Coluna de vidro de 1,83 m X 2 mm DI; Fase móvel: 0,1% de Alltech AT*-1000 Fase estacionária: Graphpac - GC, 80/100; Temperatura: 210 °C; Gás de arraste: He; Fluxo: 25 mL/min; Detector DIC. Picos: 1- fenol; 2- o-cresol; 3- m-cresol; 4- p-cresol; 5- o-etil-fenol; 6- p-etil-fenol ou 4-etil fenol; 7- 2,6-etil-fenol; 8- 2,4-dimetil-fenol + 2,5-dimetil-fenol; 9- 2,3-dimetil-fenol + 3,5-dimetil-fenol; 10- 3,4-dimetil-fenol. Fonte: Alltech: <http://en.akrom.ee/kataloog/toode.php?uniq=KROM214573c16131324135>

Dificuldades referentes à detecção de *Dekkera* e *Brettanomyces* por monitoramento analítico de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol

A primeira dificuldade está relacionada com a aquisição de equipamentos capazes de detectar estes dois compostos aromáticos. A formação de 4-etil-fenol em vinhos não é exclusividade de *Dekkera* e *Brettanomyces*, como já mencionado. Assim, a análise pura e simples não significa necessariamente atividade destes dois gêneros em vinhos. As enzimas pectinolíticas usadas no processo de elaboração de vinhos podem conter outras enzimas e afetar o perfil aromático do vinho. A estearase cinâmica é uma delas. Esta enzima é conhecida por formar fenol ácido livre a partir de éster de fenol ácido. O fenol ácido livre sofre uma descarboxilação devido à ação da cinamato descarboxilase de leveduras, dando origem ao vinil-fenol. Este, por sua vez, é o intermediário do 4-etil-fenol. A cinamato descarboxilase é formada por leveduras, entre elas a *Sacch. cerevisiae*. Portanto, nem todo 4-etil-fenol formado no vinho pode ser atribuído à atividade de *Dekkera* e *Brettanomyces*.

Métodos não Convencionais de Detecção e de Identificação de *Dekkera* e *Brettanomyces*

Não é o escopo deste trabalho entrar em detalhes sobre a detecção destes dois gêneros por meio da biologia molecular, mas convém ressaltar que esta ferramenta de detecção pode ser empregada e é, sem dúvida, uma forma segura de detecção. Há vários modos de se trabalhar na detecção destes dois gêneros por meio da biologia molecular.

PCR (Polymerase Chain Reaction) - Reação de Polimerização em Cadeia

Esta técnica permite amplificar fragmentos de DNA específicos. O DNA da levedura é extraído previamente ou não (dependendo da metodologia) e desnaturado, ou seja, as duas fitas de DNA são separadas, formando duas fitas de ssDNA (single strand DNA), uma fita 5'→3' e outra fita 3'←5'. Logo em seguida, o DNA desnaturado é posto em contato com oligonucleotídeos (iniciadores). A amplificação destas duas fitas só será efetuada se novas fitas de DNA forem confeccionadas. Portanto, deverá haver um sistema no qual as duas fitas simples se convertam em duas fitas duplas. Para isto é necessário que:

- as duas fitas de DNA simples entrem em contato com os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs)

- estejam presentes curtos fragmentos de DNA denominados iniciadores (oligonucleotídeos)
- esteja presente uma enzima denominada Taq DNA polimerase
- sejam estabelecidas as condições de incubação em cada fase

Para haver amplificação é necessário que se estabeleçam as condições para o ciclo de reação. Embora haja metodologias preconizando 40 ciclos, são efetuados, em geral, em torno de 30 ciclos e cada ciclo deverá contemplar três passos fundamentais (Becker et al., 1996):

- Desnaturação (96 °C) por 30 segundos
- Emparelhamento do iniciador 5'→3' com a fita simples de DNA 3'←5' e do iniciador 3'←5' com a fita simples 5'→3' a 55 °C por 30 segundos
- Alongamento (72 °C) do iniciador colocando os nucleotídeos na posição complementar da fita de ssDNA por ação da Taq DNA polimerase por 60 segundos e por 5 minutos no último ciclo

Nestas condições e aplicando temperaturas específicas para cada fase, pode-se obter a amplificação da seqüência alvo. A amplificação funcional só será obtida depois de vários ciclos. O segmento é amplificado de forma exponencial. Para se ter uma idéia do que isto significa, se forem utilizados 30 ciclos, com uma eficiência de 100%, haverá em torno de $1,07 \times 10^9$ fitas de ssDNA em uma hora e cinco minutos (1,0833).

Ibeas et al. (1993) observaram que dos fragmentos de DNA radioativos, preparados de uma linhagem de *Dekkera*, usados para hibridizar DNA de leveduras, havia um fragmento de 0,6 kb (quilo bases) que hibridizava especificamente DNA de *Dekkera/Brettanomyces*. Este fragmento após seqüenciamento mostrou, segundo o banco de dados, homologia significativa com o gene RAD4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Havia, portanto, necessidade de tornar o processo de amplificação mais específico para detectar *Dekkera/Brettanomyces*. Isso foi possível por meio da técnica denominada PCR aninhada (Ibeas et al., 1996). Para isto, usaram dois pares de iniciadores (DB1, DB3, DB4, DB2) como apresentado a seguir:

A rejeição contra *Dekkera* e *Brettanomyces* é unânime?

Até o momento foram abordados aspectos do metabolismo de *Dekkera* e *Brettanomyces* que levam à rejeição destes dois gêneros de levedura. Pela complexidade de metabólitos formados por estes microrganismos, é de se esperar não haver unanimidade no que se refere aos efeitos nocivos que possam produzir no vinho. Ostler (2002) diz textualmente: "Não é necessário entender o que vem a ser a levedura *Brettanomyces* e nem por que você precisa entendê-la. Eu mesmo não entendia até o momento em que me vi no centro

de um debate, moderado, é certo, mas nem por isso menos caloroso, a respeito dos méritos dos efeitos benéficos que linhagens desta levedura têm sobre o vinho, em oposição ao potencial de dano que estas possam conferir ao mesmo". Neste debate foi sugerido diferenciar dois tipos de linhagens de *Dekkera* e *Brettanomyces*: As "boas" e as "más". A presença de *Dekkera* e *Brettanomyces*, segundo este relato, leva a uma evolução no aroma. Neste caso, deve-se efetuar um trabalho para identificar os dois tipos de linhagem (Franson, 2001). Segundo este autor, enquanto a maioria dos vinicultores consideram a presença de *Dekkera* e *Brettanomyces* um fato negativo, há uns poucos que advogam em favor destes microrganismos, pois acreditam que agregam valor aromático. Vinhos com 400 µg/L (ppb) de 4-etil-fenol receberam notas elevadas por parte de degustadores americanos. Observar que o valor mostrado não ultrapassa o LP que é de 426 µg/L. Por outro lado, os mesmos advogados que não vêem problema na presença de *Brettanomyces* também não aconselham inocular esta levedura em vinhos. Muitas vezes os consumidores americanos não reconhecem estes aromas e nem o gosto deixado por este tipo de problema porque simplesmente não os conhecem e acham que o que se espera do vinho é que tenha estas características organolépticas (Franson, 2001). Há, cita o autor, entre os consumidores americanos uma ansiedade por fortes odores e aromas e é preciso saber para quem se está elaborando o vinho. Há ainda uma sugestão para valorizar o produto com estas características como sendo parte da assinatura de uma determinada vinícola. Tudo isto se resume numa maneira de pensar: se não se pode eliminar o problema, mais fácil é adotá-lo e tirar dele o melhor proveito.

Tem sido encontrado gosto desagradável (*Brettanomyces*) em bons vinhos franceses (<http://www.wine-lovers-page.com/cgi-bin/quest/ga.cgi?q=37>. 13/05/2002). Será apresentada uma frase, que não será traduzida e nem interpretada, que diz o quanto vinhos franceses de renome contêm o aroma e gosto conferidos por metabólitos de *Dekkera* e *Brettanomyces*: "Brett is often found in red Rhone wines and Burgundies, where no less a luminary than Voltaire once commented, apparently favourably, that Burgundy smells like "MERDE.. Talvez seja difícil encontrar quem deseje degustar um vinho com aroma descrito por Voltaire.

Dekkera e *Brettanomyces* dividem tanto os consumidores que as cervejas belgas dependem da presença de *Brettanomyces lambicus* para apresentar sua rara característica. Tem sido relatado que nem mesmo as teias de aranha são removidas do local de elaboração por medo de eliminar estas leveduras nativas (<http://www.wine-lovers-page.com/cgi-bin/quest/ga.cgi?q=37>. 13/05/2002).

O gosto francês é tão propenso a aceitar a deterioração de vinhos por *Brettanomyces* que Franson (2001) comenta a observação feita por um vinicultor da Simi Winery, Dave Ostheimer: "He says that Brett growth in the bottle is more detrimental than that in the barrel since you can't do anything about it, "Except sell it in France,"he says tongue in cheek". Esta observação dá a verdadeira dimensão da ação de *Dekkera* e *Brettanomyces* nos vinhos mesmo em países de larga tradição e que, sendo de difícil eliminação, o problema se reverte, até certo ponto, em carimbo para rotular qualidade.

Se o 4-etil-fenol pode conferir qualidade ao aroma de vinhos tintos, seria interessante estabelecer a concentração ideal para tal. Esta concentração foi determinada por Etiévant et al. (1989) e se encontra em torno de 1,8 µg/mL. Esta concentração estaria muito acima do limiar de percepção (426 µg/L) estabelecido por Chatonnet et al. (1992). Etiévant et al. (1989) consideram 4 µg/mL de 4-etil-fenol ser o limiar de percepção no vinho.

Controle e precauções

Para evitar a permanência de microrganismos viáveis nos vinhos, uma série de propostas tem sido aventada, mas apenas duas delas apresentam amplo emprego industrial. O uso de preservativo químico, como a utilização de SO₂, e filtração.

SO₂

A resistência de *Dekkera* e *Brettanomyces* ao SO₂ é um assunto controverso. Enquanto uns afirmam que estes dois gêneros são altamente resistentes ao SO₂, outros consideram a resistência dentro dos níveis normais. Pela estrutura celular, é natural que *Dekkera* seja mais resistente a condições de estresse que *Brettanomyces*.

O emprego de SO₂ para eliminar microrganismos apresenta limitações, uma vez que há microrganismos que resistem à dosagem de SO₂ mesmo em concentrações nas quais o SO₂ já começa a prejudicar a qualidade do vinho. É conhecida a insensibilidade destes microrganismos, *Dekkera* e *Brettanomyces*, ao SO₂ e ao etanol (Chatonnet et al., 1990). Nem o SO₂, utilizado nas concentrações permitidas, e nem o etanol presente no vinho impedem o desenvolvimento destas leveduras. Vinhos com teores de etanol de 13 °GL são passíveis de sofrer deterioração por estes microrganismos.

Franson (2001) relata experiências com relação ao SO₂ obtidas em cantinas da Califórnia onde os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* têm causado problemas. A concentração de SO₂ acima de 30 mg/L ajuda a reduzir os problemas quando o vinho é filtrado. A filtração altera a qualidade do vinho tornando-os, entre outras características, duros. O uso de SO₂ deve ser balanceado com outros fatores e com a concentração e linhagem de *Dekkera* e *Brettanomyces* encontrada. De uma forma geral, acima de 28 mg/L de SO₂, *Brettanomyces* pode ser controlada apenas por um curto período de tempo em vinhos não filtrados. Este mesmo vinho, com 0,2 g/L de açúcar residual, favorece o crescimento da levedura. Um vinho engarrafado com 0,5 g/L de açúcar e com uma concentração de 22-24 mg/L de SO₂ permite o crescimento de *Brettanomyces*. A levedura pode se instalar em barricas de madeira dentro de três meses, atingindo seu mais alto nível entre nove e 12 meses.

No processo de monitoramento é necessário efetuar a contagem de células de *Dekkera* e *Brettanomyces* e ao mesmo tempo determinar a concentração de 4-etil-fenol. Deve-se considerar que 300 ufc (unidades formadoras de colônia) podem formar 500 ng/L de 4-etil-fenol (Franson, 2001). Levando em consideração estes valores e sem contar com a taxa de formação deste produto no vinho, a concentração de 4-etil-fenol atingiria 426 µg/L quando a concentração celular fosse de 2,55 x10⁵ ufc. Acontece que este produto é acumulado e, portanto, o efeito sobre o vinho pode se dar com concentrações de leveduras bem menores. Para se ter estes valores, haveria necessidade de estabelecer a taxa específica de crescimento da levedura nas condições de armazenamento do vinho e obter a taxa específica de formação de produto nas mesmas condições.

Com a tendência de se reduzir a concentração de SO₂ porque este componente retarda não apenas o processo de polimerização de compostos fenólicos mas também o processo de amaciamento do vinho durante o envelhecimento, estes dois gêneros ganham cada vez mais espaço. O valor de pH do vinho tem importância no processo de

inibição de *Dekkera* e de *Brettanomyces* uma vez que quanto maior este valor maior será a quantidade de SO₂ a ser adicionada para manter o mesmo nível de SO₂ livre. Por exemplo, comparando um vinho com um pH de 3,30 e outro com um pH de 3,75, este último necessitará, aproximadamente, 2,8 vezes mais SO₂ que o primeiro para manter o mesmo nível de SO₂ livre (Olsen, 2002).

Dimetil dicarbonato-DMDC

Tem sido aventado o uso de dimetil dicarbonato (DMDC), com nome comercial de Velcorin, para eliminar *Dekkera* e *Brettanomyces* (Olsen, 2002). Seu uso em vinhos foi permitido desde 1988 e tem sido usado em outras bebidas e produtos alimentícios. O DMDC é perigoso pois irrita os olhos e a pele. Seu uso exige equipamento especial cujo custo se torna proibitivo. A máquina, para a aplicação de Velcorin pode ser adquirida da Empresa Bayer, por um preço aproximado de U\$ 50.000,00 e requer manuseio especializado (Franson, 2001). Velcorin mata fungos filamentosos, leveduras em geral e bactérias. Segundo o autor, Velcorin apresenta sinergia com o SO₂, não afeta a cor, o gosto, o aroma do vinho e se degrada, formando pequenas quantidades de CO₂ e **metanol**. Como se degrada, não é um preservativo químico durável. Observa-se que a informação do fabricante do equipamento (Bayer, 2001) diz textualmente: "It also hydrolyses quickly into **naturally occurring products** and does not affect the taste, bouquet or colour of the beverage"(Sofre hidrólise rápida, transformando-se em produtos naturalmente encontrados e não afeta o gosto, buquê e a cor da bebida). Ou seja, a informação de que o produto se decompõe em CO₂ e **metanol** (altamente tóxico) é omitida. A organização FDA (Food and Drug Administration) permite o uso do DMDC na concentração máxima de 200 µg/mL (53 RF 41325) (Davidson & Juneja, 1990) e considera o Velcorin um "processing aids", aqui traduzido como "aditivos de processamento"secundário (Franson, 2001). A European Community Comments Codex Committee On Food Additives And Contaminants de 2002 (European Community Comments Codex Committee On Food Additives And Contaminants, 2002) decidiu discutir no comitê do CODEX sobre Aditivos e Contaminantes de Alimentos a definição de "processing aids". A Comunidade não vê razão para fazer emendas na definição de aditivos alimentares mas considera oportuna uma emenda na definição do termo "processing aids". A emenda exige que conste na definição a informação de que os resíduos do "processing aids"**não exerçam qualquer efeito sobre o alimento final e que estes resíduos não apresentem qualquer risco para a saúde humana**.

Em 2001, o Scientific Committee on Food (SCF) (EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2001) debateu especificamente a adição de DMDC no vinho. Na avaliação deste comitê, os seguintes pontos foram levantados:

1. O DMDC se decompõe em CO₂ e metanol.
2. Forma pequenas quantidades de outros produtos resultantes da reação (carboximetoxilação) com aminas, açúcares, aminoácidos e outros ácidos orgânicos normalmente presentes no alimento (produtos de carboximetoxilação > 1,7-5 mg/L).
3. Na presença de amônia ou íons de amônia, pode formar quantidades menores que 25 µg/L de metilcarbamato .

4. No caso de bebidas alcoólicas e não alcoólicas, outras reações com o metanol podem ocorrer, como o monometilcarbonato e o dimetilcarbonato.
5. Com bebidas alcoólicas, além destes dois produtos acima apresentados, pode ser formado metiletilcarbonato (8,2-10,3 mg/L).
6. Dados toxicológicos do DMDC e de seus produtos de reação, incluindo os produtos de reação com o etanol, não motivam preocupação.
7. A quantidade e metilcarbamato formada no vinho não é afetada pela presença de álcool etílico mas pela presença de amônia ou íon amônio como ocorre em bebidas não alcoólicas.
8. Vinhos tratados com Velcorin e armazenados por 12 meses não tiveram o teor de etilcarbamato aumentado além dos níveis normalmente encontrados.
9. A adição de 200 mg/L de DMDC libera 98 mg/L de metanol.
10. O metanol do vinho, originário de fontes naturais, se situa em torno de 140 mg/L.
11. O organismo humano saudável processa o metanol numa taxa de 1.500 mg metanol/h.
12. A quantidade final de metanol do vinho tratado com 200 mg DMDC/L deverá ser de aproximadamente 240 mg/L.
13. O teor de metanol de um vinho tratado com DMDC está dentro da capacidade metabólica do organismo humano.
14. Concluem, finalmente:
 - **"A formação de metanol e de produtos outros decorrentes do uso de DMDC no tratamento de vinhos é similar ao que ocorre com bebidas não alcoólicas. Portanto, a opinião prévia sobre o uso de DMDC para bebidas não alcoólicas é igualmente aplicável a vinhos tratados com DMDC".**

Se se considerar a quantidade de metanol (mg/L) acima descrita pelo SCF, um indivíduo normal consumindo sozinho uma garrafa de vinho (750 mL) tratado com DMDC ingeriria 180 mg de metanol. Esta quantidade de metanol levaria apenas 7,2 min para ser metabolizada. E para atingir a capacidade metabólica máxima, este mesmo indivíduo saudável deveria consumir 8,3 garrafas de vinho sozinho.

Ozônio (O₃)

O ozônio é um gás naturalmente formado pelos raios ultravioleta do sol e durante a descarga de raios. Sua concentração na atmosfera, ao nível do mar, se encontra entre 0,01 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$, podendo variar de acordo com a região, estação do ano e altitude (Ankeney, 2002). O autor salienta haver concentrações mais elevadas nas montanhas e afirma não ter havido morte causada por ozônio desde 1885. Embora não seja prejudicial à saúde humana nas concentrações encontradas na natureza, em altas doses este gás pode causar problema. O indivíduo, após inalar altas concentrações, sente dificuldade em respirar, podendo, até mesmo, passar 24 h com mal estar e com a sensação de não poder respirar profundamente. Estes sintomas desaparecem gradativamente.

É o segundo mais potente oxidante que se conhece. Perde apenas para o flúor. O ozônio é usado na Europa, Estados Unidos e em outros países especialmente no tratamento de água. Atua sobre microrganismos, reagindo com as duplas ligações dos ácidos graxos da membrana celular, e sobre proteínas de capsídios de vírus. Em microrganismos, a oxidação resulta em alteração da permeabilidade celular, na formação de grandes poros e, conseqüentemente, no vazamento do conteúdo celular. Também exerce uma ação fisiológica sobre os frutos retardando o amadurecimento por destruir o etileno e combater odores estranhos (Ankeney, 2002). O autor ressalta ser o ozônio a forma que a natureza encontrou para purificar o ar que respiramos.

Na luta contra *Dekkera* e *Brettanomyces*, o emprego de O₃ também tem sido investigado. É especialmente importante na esterilização de barril de madeira e outros equipamentos. Segundo Franson (2001), 230 geradores de ozônio estão em operação nas cantinas da Califórnia. A organização FDA está estudando a expansão de seu uso como aditivo. Talvez sejam as vantagens do ozônio sobre outros agentes esterilizantes que estão impulsionando o uso deste gás em indústrias de alimento e em especial nas cantinas de vinho. Entre as vantagens descritas em <http://www.appliedozone.com/applications.html> e por Ankeney (2002) estão:

- decompor-se rapidamente (vida útil de 20 min)
- não deixar traços
- não produzir qualquer composto halogenado tóxico
- proporcionar uma taxa de morte bacteriana 3125 vezes mais elevada que o cloro
- ter poder oxidante 50% mais forte que o cloro
- apresentar 25 vezes mais eficiência que o ácido hipocloroso
- ser 2.500 vezes mais efetivo que o hipoclorito
- ser 5.000 vezes mais efetivo que a cloramina

Em Portugal, além de H₂O₂ e o SO₂, O₃ gás e a microonda são considerados métodos novos no tratamento de rolhas (<http://www.corkmasters.com/facts/treating-the-stoppers.stm>). No caso de aplicação direta no vinho, há o inconveniente de se aumentar o grau de oxidação. Testes efetuados na Embrapa Uva e Vinho com vinho branco, revelaram ser, nas doses empregadas, uma técnica impraticável. O vinho se tornou escuro, exalando, ao contrário do que afirma Ankeney (2002), odores extremamente desagradáveis. Os efeitos negativos observados se devam talvez aos altos níveis de O₃ aplicados e ao tempo de exposição. Testes efetuados em outros meios, como caldo de cana de açúcar contaminado com bactérias, e com tempo de exposição de 0 a 120 s não resultaram em eliminação completa de microrganismos. Além disso, odores estranhos, a exemplo do vinho branco, apareceram de forma gradativa durante o envelhecimento do produto tratado.

Filtração

A filtração, apesar de ser o tratamento mais adequado, é um processo relativamente caro e é praticável, segundo van der Walt & van Kerken (1958), quando o volume de vinho não é muito alto e o número de microrganismos também não é elevado. Estes autores ainda comentam que estes microrganismos não são considerados normais da flora da uva ou do mosto. Encontram-se no ambiente da cantina e nos utensílios usados no processo de elaboração de vinho. Na verdade, acham-se em todas as instalações de indústrias de fermentação, especialmente nas cervejarias e cantinas.

A filtração esterilizante é eficaz não apenas para remover células de microrganismos, mas também altera algumas características por remover o caráter frutado, reduzir a viscosidade e deixar o vinho tinto mais duro (Olsen, 2002).

Infelizmente não existe uma forma eficaz de esterilizar barris de madeira sem ter que lançar mão do processo de destruição por combustão. Mesmo tomando estas precauções, o perigo de haver crescimento destes dois gêneros em vinho ainda não está descartado (Olsen, 2002). O autor ainda salienta que, se por um lado barricas velhas podem conter microrganismos contaminantes em seus poros, por outro lado barricas novas apresentam quantidades maiores de celobiose que barricas usadas. Este dissacarídeo é prontamente hidrolisado por β -glicosidases formadas por uma espécie de *Dekkera* e seis espécies de *Brettanomyces*, produzindo duas moléculas de glicose. Esta fonte de carbono liberada pode promover o crescimento não apenas destes mas também de outros microrganismos deterioradores. Assim, barricas novas apresentam maior potencial para o crescimento destes dois gêneros que barricas usadas. Além disso, a produção de glicosidases pode alterar a cor de vinhos tintos uma vez que estas enzimas reagem com os glicosídeos, removendo o grupo açúcar de álcoois, fenóis e aminas.

A curva de crescimento *Dekkera* e *Brettanomyces* nos vinhos apresenta uma forma de "sino" (Olsen, 2002). Isto significa dizer que o número de microrganismos aumenta gradativamente, atinge o pico máximo e depois decresce. O pico máximo é atingido entre os seis e dez meses após o vinho ter sido transferido para as barricas. Algumas cantinas, quando detectam o problema, tentam controlá-lo e esperam que o número de microrganismos caia para que se efetue o engarrafamento. Com isto, evitam o crescimento destes microrganismos na garrafa. Há ainda aquelas empresas que efetuam um corte precoce para permitir que, se houver desenvolvimento de *Dekkera* e *Brettanomyces*, o crescimento se efetue no vinho pronto para ser engarrafado. Isto evita que um vinho sirva de inóculo e o outro seja fonte de substrato para o microrganismo e assim possa inadvertidamente se desenvolver na garrafa. O que se deseja é a estabilidade microbiológica do vinho com relação aos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* antes do engarrafamento.

Cuidados redobrados devem ser tomados com os vinhos que servem de atesto. Estes vinhos devem ser livres de *Dekkera* e de *Brettanomyces* e devem possuir a menor quantidade possível de açúcares. Vinhos secos, mesmo aqueles com 1 g/L de açúcar podem servir como fonte de carbono para o crescimento de *Dekkera* e *Brettanomyces*. Assim sendo, a reposição de SO_2 , que se efetua após a fermentação, deve ser realizada apenas quando o teor de açúcar do vinho seco atingir 0,5 g/L.

Temperatura e pH

Há outras estratégias que podem ser utilizadas para reduzir a atividade de *Dekkera* e *Brettanomyces* ou até mesmo inibir o crescimento destes microrganismos em vinhos. Entre estas alternativas estão redução do pH, pois potencializa o efeito do SO₂ adicionado, como já discutido, e o decréscimo na temperatura de estocagem do vinho. A redução na temperatura de envelhecimento traz algumas desvantagens para o vinho. Entre elas estão a redução da taxa de polimerização de polifenóis e a diminuição da velocidade de amadurecimento (Olsen, 2002).

Procedimentos de controle

Os métodos de prevenção e controle da contaminação por *Dekkera* e *Brettanomyces*, acima citados, traz, em geral, prejuízos para o vinho. Portanto, o bom senso deve nortear os procedimentos que se deve adotar no processo de prevenção. Para exemplificar, uma prática que redunde em prejuízo é aquela recomendada por um dos métodos de prevenção em não utilizar barricas no envelhecimento de vinhos tintos. O aparecimento de *Dekkera* e *Brettanomyces* em vinhos engarrafados é desastroso porque o odor tende a ser mais pronunciado. O vinho pode ficar turvo e formar sedimentos.

É preciso entender e considerar que uma vez contaminado com *Dekkera* ou com *Brettanomyces* e com os efeitos decorrentes desta contaminação, não há como remover o odor de tal vinho. Na França em particular, há quem prefira vinhos com uma pequena porcentagem de substâncias formadas por estas leveduras. Acreditam que um vinho com estas características são mais complexos. Muitos vinicultores, para se livrar da nota animal e por ter consciência de que há consumidores que apreciam tais vinhos, misturam vinhos com 4-etil-fenol com vinhos com baixos teores deste composto de modo que a concentração fique abaixo do LP ou atinja o limite de aceitabilidade daquele consumidor.

Entre as sugestões para reduzir a incidência de *Dekkera* e *Brettanomyces* nos vinhos estão:

- não permitir que nas proximidades da cantina seja acumulada casca de uva ou material passível de fermentação
- usar agentes esterilizantes (calor, ozônio, gás de enxofre ou DMDC) na limpeza das barricas, das rolhas e das tubulações que entram em contato com o vinho
- ajustar o pH do mosto de modo que, depois da fermentação malolática, o pH se situe entre 3,5 e 3,6 (Franson, 2001)
- estabilizar o tartarato (Franson, 2001)
- não permitir que o SO₂ livre fique abaixo de 25 mg/L, após a fermentação malolática, (Franson, 2001)
- manter o vinho numa temperatura entre 12 °C e 14 °C (Franson, 2001)

- efetuar o corte muito antes do engarrafamento para evitar o aparecimento de *Dekkera* e *Brettanomyces* na garrafa (Olsen, 2002)
- detectar indícios da presença de *Dekkera* e *Brettanomyces* por meio da sensação odorífera característica no espaço livre do tanque (Franson, 2001)
- se a concentração de 4-etil-fenol estiver acima de 426 µg/L, deve-se:
 - isolar o tanque para que não haja contaminação
 - determinar a concentração de células viáveis de *Dekkera* e *Brettanomyces*
 - verificar a concentração de 4-etil-fenol
 - determinar a concentração de SO₂ livre e ajustar para 35-45 mg/L (Franson, 2001)
 - determinar a concentração de células viáveis de *Dekkera* e *Brettanomyces* depois de 15 dias e, se necessário, repita a determinação de 15 em 15 dias
 - verificar a concentração de 4-etil-fenol depois de 15 e, se necessário, repetir a análise de 15 em 15 dias
 - verificar a concentração de 4-etil-fenol em cada trasfega (Franson, 2001)
 - tratar o vinho antes do engarrafamento, se disponível e se permitido por lei, com DMDC, não ultrapassando a concentração final no vinho de 200 mg/L)
 - alternativamente filtrar o vinho (Olsen, 2002)
 - iniciar o engarrafamento dos vinhos sem problema de contaminação
 - esterilizar por vapor toda a linha de enchimento antes de iniciar o processo

Referências bibliográficas

ALLTECH. **Phenols In Whiskey**. Disponível em

<http://www.akrom.ee/admin/tooted_dok/cat500/475.pdf>. Acesso em: 03 Jun. 2002.

ALLTECH. **Phenols**. < http://www.akrom.ee/admin/tooted_dok/cat500/149.pdf>. Acesso em: 03 Jun. 2002.

ANKENEY, C. **Useful applications of ozone: for treating water, air and food**. Disponível em <<http://www.familyhealthnews.com/32.html> >. Acesso em: 16 maio 2002.

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

BARTHELMEBS, L.; DIVIÈS, C.; CAVIN, J. F. Molecular characterization of the phenolic acid metabolism in the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*. **Lait** Paris, v. 81, p. 161-171, 2001.

BAYER. **Bayer Corporation's Velcorin® microbial control agent permitted for use in non-carbonated juice beverages**. Disponível em <<http://engine.bayernews.com/engine/index.cfm?hera=5F05&zeus=50>>. Acesso em: 09 maio 2002.

- BEECH, F. W.; CARR, J. G. A survey of inhibitory compounds for the separation of yeasts and bacteria in apple juices and ciders. **Journal of General Microbiology**, Londres, v. 12, p. 85-94, 1955.
- BEECH, F. W.; CARR, J. G. Selective isolation of micro-organisms. **Chemical Products**, v. 21, p. 285-287, 1958.
- BOEKHOUT, T.; KURTZMAN, C. P.; O'DONNELL, K.; SMITH, M. T. Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, England, v. 44, n. 4, p. 781-786, 1994.
- BOIDRON, J. -N.; CHATONNET, P.; PONS, M. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, Talence, v. 22, n.4, p. 275-294, 1988.
- BRETT: what's that "barnyard" smell? Disponível em <<http://www.wine-lovers-page.com/cgi-bin/quest/ga.cgi?q=37>>. Acesso em: 13 maio 2002.
- CAMPBELL, I. Numerical analysis of *Hansenula*, *Pichia* and related yeast genera. **Journal of General Microbiology**, London, v. 77, p. 427-441, 1973.
- CHATONNET, P.; BOIDRON, J. -N.; PONS, M. Élevage des vins rouges en fûts de chêne: Évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 10, p. 565-587, 1990.
- CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. N. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, USA, v. 46, n. 4, p. 463-468, 1995.
- CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. -N.; LAVIGNE, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.62, p. 191-202, 1993.
- CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. -N.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 60, p. 165-178, 1992.
- CHATONNET, P.; MASNEUF, I.; GUBBIOTTI, M. -C.; DUBOURDIEU, D. Prevention et identification des contaminations par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage des vins. **Revue Francaise d'oenologie**, Paris, n.179, p. 20-24, 1999.
- 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.
- CONTROL CALIDAD SEIMC. **Control de Calidad de Micología**. Disponível em <<http://www.seimc.org/control/infdef1999/pdf/mico199.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2001.
- CORKMASTER. **Treating the stoppers**. Disponível em <<http://www.corkmasters.com/facts/treating-the-stoppers.stm>>. Acesso em: 13 maio 2002.

DAVIDSON, P. M.; JUNEJA, V. K. Antimicrobial agents. In: BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M. SALMINEN, S. (Eds.). **Food additives**. New York, Marcel Dekker, 1990. p. 83-173.

DIGESTIVE FERMENTS COMPANY. **Difco Manual**: Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10th ed. Detroit, USA, 1984. 1155 p.

DUBOIS, P.; BRULE, G.; ILLIC, M. Étude des phénols volatils de deux vins rouges, **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v. 20, p. 131 -139, 1971.

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

ETIÉVANT, P.X. Wine. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in foods and beverages**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 483-546.

ETIÉVANT, P. X. Volatile Phenols determination in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 29, p. 65-67, 1981.

ETIÉVANT, P. X.; ISSANCHOU, S.; DUCRET, V. M. S.; FLANZY, C. Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma: influence of carbonic maceration and time of storage. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 9, p. 19-33, 1989.

ETS Laboratories. **Brettanomyces: Monitoring by Analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiaicol** Disponível em

<<http://www.etslabs.com/ContentDocs/Brettanomyces%20bulletin.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2002.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION
DIRECTORATE-GENERAL. **Opinion of the Scientific Committee on Food on the use of dimethyl dicarbonate (DMDC) in wines**. Disponível em

<http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out96_en.pdf>. Acesso em: 09 maio 2002.

EUROPEAN COMMUNITY COMMENTS CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. **Discussion Paper on the Consideration of Processing Aids and Carriers in the Context of the General Standard on Food Additives (GSFA)**.

Disponível em <http://europa.eu.int/comm/food/fs/ifsi/eupositions/ccfac/ccfac_ec-comments_item8_en.pdf>. Acesso em: 09 maio 2002.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, p. 101-117, 1999.

FRANSON, P. The Threat of Brett. **Vineyard & Winery Management**, New York, v. 27, n.5, 2001. Disponível em

<http://www.vwm-online.com/magazine/archive/2001/vol27_No5/Brett.htm>. Acesso em: 8 maio 2002.

HARTMANN, P. J.; MCNAIR, H. M.; ZOECKLEIN, B. W. The effect of wine matrix ingredients on 3-alkyl-2-methoxypyrazine measurement by headspace solid-phase microextraction. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR ENOLOGY AND VITICULTURE, 52., 2001, San Diego, California. Technical Abstracts... p. 3.

Disponível em

<<http://www.asev.org/Events/AnnualMeeting/AbstractPDFs/2001ASEVAbstracts.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2002.

HERESZTYN, T. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, USA, v. 37, p. 127-132, 1986.

HERNÁNDEZ, C. M. *Brettanomyces claussenii* as a contributor in yellowfin tuna spoilage. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE TROPICAL, AND SUBTROPICAL, SCIENCE AND TECHNOLOGY SOCIETY OF THE AMERICAS, 19., 1994, New Orleans, USA. **Proceedings...** Gainesville FL: Florida Sea Grant Program College Program, 1996. Disponível em http://nsgl.gso.uri.edu/source/flsgpw95001/flsgpw95001_part_1.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2002.

HOEBEN, P.; CLARK-WALKER, G. D. An approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from *Dekkera/Brettanomyces* and *Eeniella* genera. **Current Genetics**, Nova York, v. 10, p. 371-379, 1986.

HOEBEN, P.; WEILLER, G.; CLARK-WALKER, G. D. Larger rearranged mitochondrial genomes in *Dekkera/Brettanomyces* yeasts are more closely related than smaller genomes with conserved gene order. **Journal of Molecular Evolution**, Nova York, v. 36, p. 263-269, 1993.

HONG, S. G.; CHUN, J.; OH, H. W.; BAE, K. S. *Metschnikowia koreensis* sp. nov. , a novel yeast species isolated from flowers in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, England, v. 51, p. 1927-1931, 2001.

JONG, S. C.; LEE, F. L. The new species *Dekkera naardenensis*, teleomorph of *Brettanomyces naardenensis*. **Mycotaxon**, Ithaca, USA, v. 25, p. 147-152, 1986.

KELLING, F. J.; OTTER, D.; AND C. J. Chemical and electrophysiological analysis of components, present in natural products that attract houseflies. In: KELLING, F.J. (Ed.). **Olfaction in Houseflies Morphology and Electrophysiology**. Groningen: Van Denderen, 2001. p. 105-121. Disponível em <<http://www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/f.j.kelling/thesis.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2002.

KRAJEWSKA-KULAK, E.; NICZYPORUK, W.; LUKASZUK, C.; WINTER, W.; ZLOTKOWSKI, W. Susceptibility of *Candida* strains towards antimycotics independent of the site of their isolation. **Medical Science Monitor**, Warszawa, Poland v. 5, n.4, p. 640-646, 1999.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Subcutaneous and deep mycoses. In: KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. (Ed.) **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p. 280-336.

LEE, F.L.; JONG, S. C. The new species *Dekkera abstinens*, teleomorph of *Brettanomyces abstinens*. **Mycologia**, Nova York, v. 78, p. 150-151, 1986b.

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

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**. ACS Symposium Series, v. 714, p. 96-115, 1998.

- MEIS, J. F. G. M.; RUHNKE, M.; DE PAUW, B. E.; ODDS, F. C.; SIEGERT, W.; VERWEIJ, P. E. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, USA, v. 5, n. 1, p. 150-153, 1999.
- MEYER, S. A.; AHEARN, D. G.; YARROW, D. Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts: genus 4: *Candida* Berkhout. In: KREGER-VAN RIJ. N. J. W. (Ed.), **The Yeast a taxonomic study**. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1984. p. 585-844.
- MITRAKUL, C. M.; HENICK-KLING, T.; EGLI, C. M. Discrimination of *Brettanomyces* /*Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiology**, London, v. 16, p. 3-14, 1999.
- MOGHADDAS, J.; TRUANT, A. L.; JORDAN, C.; BUCKLEY, H. R. Evaluation of the RapID Yeast Plus System for the Identification of Yeast. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 35, p. 271-273, 1999.
- MOLINA, F. I.; SHEN, P.; JONG, S. -C. Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, England, v. 43, p. 32-35, 1993.
- MONJE, M. -C.; PRIVAT, C.; GASTINE, V.; NEPVEU, F. Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 21712, p. 1-7, 2001.
- OLSEN, E. **Brettanomyces: occurrence, flavour effects and control**. Wine Making. Disponível em <<http://www.makewine.com/makewine/brett.html>>. Acesso em: 31 fev. 2002.
- OSTLER, T. **Understanding Brettanomyces**. Wine Making. Disponível em <<http://www.makewine.com/makewine/brett.html>>. Acesso em: 13 fev. 2002.
- OZONE Applications. In Air, Food, Water. Disponível em <<http://www.appliedozone.com/applications.html>>. Acesso em: 16 maio 2002.
- POLLNITZ, A.; SKOUROUMOUNIS, G.; PARDON, K.; CAPONE, D.; SEFTON, M. **The analysis of wine volatiles derived from oak**. Disponível em <<http://www.latrobe.edu.au/anzsms/Conferences/ANZSMS18/ANZSMS18Abs/MoO/MoO-14.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2002.
- ROCCATO, A.; DAGUERRE, C.; MERCADO, L.; CATANIA, C.; COMBINA, M. Detección de *Dekkera/Brettanomyces* en uva, mosto y vinos: metodología y primeros resultados. In: VITIVINICULTURE AND ENOLOGY LATIN AMERICAN CONGRESS, 8., 2001, Montevideo, Uruguay. p. 1-7.
- RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 588-599, 2001.
- ROMNEY, M. C.; BRYCE, E. A.; RENNIE, R. P.; SAND, C. A. Rapid identification of clinical yeast isolates using the colorimetric AUXACOLOR system. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 36, p. 137-138, 2000.

SCHEFFERS, W. A. On the inhibition of alcoholic fermentation in *Brettanomyces* yeasts under anaerobic conditions. **Experientia**, Basel, Switzerland, v. 17 p. 40-46, 1961.

SCHEFFERS, W. A. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. **Nature**, London, 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, p. A31-A32, 1969.

SMITH, M. T.; VEGTE, W. H. B. van der; SCHEFFERS, W. A. *Eeniella*, a new yeast genus of the Torulopsidales. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, England, v. 31, p. 196-203, 1981.

SMITH, M. T.; YAMAZAKI, M.; POOT, G. A. *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eeniella*: electrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology. **Yeast**, Davis, USA, v. 6, p. 299-310, 1990.

SOLID Phase Microextraction (SPME) - Other SPME Applications. Disponível em <<http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme2.gif>>. Acesso em: 31 maio 2002.

SOLID Phase Microextraction (SPME) - Principle of SPME - Direct SPME vs Headspace SPME. Disponível em <<http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme5.gif>>. Acesso em: 31 maio 2002.

SOLID Phase Microextraction (SPME) - SPME Device for GC Applications. Disponível em <<http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/SPME/spme1.gif>>. Acesso em: 31 maio 2002.

THURSTON, P. A.; TUBB, R. S. Screening yeast strains for their ability to produce phenolic off-flavours: a simple method for determining phenols in wort and beer. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 87, p. 177 -179, 1981.

TRAN, M. T.; MITCHELL, T. M.; KENNEDY, D. T.; GILES, J. T. Role of coenzyme Q10 in chronic heart failure, angina, and hypertension. **Pharmacotherapy**, Washington, v. 21, n.7, p. 797-806, 2001. Disponível em <<http://www.arabmedmag.com/issue-4-12/cardiology/main07.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2002.

UDEN, N. van Transport-limited fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* and its competitive inhibition. **Archiv für Mikrobiologie**, Berlin, v. 58, p. 155-168, 1967.

USCANGA, M. G. A.; DELIA, M. -L.; STREHAIANO, P. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n.11, p. 1047, 2000.

VERWEIJ, P. E.; BREUKER, I. M.; RIJS, A. J.; MEIS, J. F. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 52, n. 4, p. 271-273, 1999.

WALT, J.P. van der; KERKEN, A. E. van The wine yeasts of the cape: part I: a taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 24, p. 239-252, 1958.

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

WALT, J. P. van der Discussion of the genera belonging to the ascosporogenous yeasts: genus 8: *Dekkera* van der Walt. In: KREGGER-van RIJ. N.J.W. (Ed.), **The Yeast a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984a. p. 146-151.

WALT, J. P. van der Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts: genus 2: *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. In: KREGGER-van RIJ. N. J. W. (Ed.). **The Yeast a taxonomic study**, Amsterdam, Elsevier Science, 1984b. p. 562-576.

WALT, J. P. van der; KERKEN, A. E. van The wine yeasts of the Cape: part V: studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 27, p. 81-90, 1961.

WIKÉN, V. T.; RICHARD, O. Zur Kenntnis der Bedeutung des Sauerstoffs für die Vergärung der Glucose durch Bier- und Weinhefen (Fehlen des Pasteur-Meyerhof-Effekts). **Schweizerische Zeitschrift für Allgemeine Pathologie und Bakteriologie**, Basel, Switzerland, v. 17, p. 475-486, 1954.

WRIGHT, J. M.; PARLE, J. N. *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, New Zealand, v. 17, p. 273-278, 1974.

YAMADA, Y.; TAKINAMI-NAKAMURA, H.; TAHARA, Y.; SMITH, M. T. The coenzyme Q system in the classification of ascosporogenous yeast genus *Dekkera* and the asporogenous yeast *Brettanomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 46, p. 595-599, 1980.

Índice

- μ máx, 29
 (C₅H₈)₉-H, 34
 (NH₄)₂HPO₄, 41
 (NH₄)₂SO₄, 41
 ácido 2-metil-butírico, 28
 ácido acético, 9, 20, 21, 24, 28
 ácido caféico, 50
 ácido ferúlico, 50
 ácido isoalérico, 28
 ácido isobutírico, 28
 ácido p-cumárico, 41, 42, 50
 ácido p-fumárico, 40
 ácido sórbico, 22, 41, 42
 ácido tartárico, 41
 ácido trans-ferrúlico, 27
 ácido trans-p-cumárico, 27, 43
 ácidos fenólicos, 27
 ácidosórbico, 41
 ágar, 42
 áidop-cumárico, 41
Brettanomyces, 9, 19, 31, 35, 43, 44, 53
Dekkera, 9, 31, 35, 43, 44, 53
Br. abstinens, 19, 28, 42
Br. anomalus, 19, 20, 31, 42
Br. bruxellensis, 26
Br. bruxellensis, 19, 27, 28, 31
Br. calussenii, 28
Br. claussenii, 19
Br. custersianus, 12, 20
Br. intermedius, 43
Br. naardenensis, 12, 28, 36, 42
Brettanomyces abstinens, 42
Brettanomyces anomalus, 9
Brettanomyces bruxellensis, 19, 40
Brettanomyces claussenii, 19
Brettanomyces custersii, 19
Brettanomyces intermedius, 19
Brettanomyces lambicus, 19
Brettanomyces, 8, 9, 12, 19–24, 26–31, 34, 36, 40–44, 52–56, 58–61
C. tropicalis, 42
Candida glabrata, 32
Candida kefyr, 32
Candida parapsilosis, 32
Candida, 22, 29, 30, 42
Cryptococaceae, 12
D. abstinens, 12
D. anomala, 36
D. bruxellensis, 12, 30, 31, 36
D. custersiana, 36
D. intermedia, 12
D. naardenensis, 12, 36
Dekkera custersiana, 12
Dekkera, 8, 9, 12, 19–24, 28–31, 34, 36, 40–44, 53, 55, 56, 58–61
Deuteromycotina, 12
Eeniella, 20
Hanseniaspora, 20
Hanseniaspora, 20
Hansenula, 29
Kl. apiculata, 42
Kloeckera, 20, 42
Kluyveromyces, 42
Lactobacillus plantarum, 26, 27
Lactobacillus, 24
Leuconostoc eonos, 26
Lodderomyces, 42
Metschnikowia koreensis, 36
Pediococcus damnosus, 26
Pediococcus, 24
Pichia, 21, 22, 29
Sacch. cerevisiae, 8, 20, 21, 23, 26, 27, 32, 43, 52
Saccharomyces, 21, 24, 41, 42
Saccharomycodes, 22, 29
Schizosaccharomyces japonicus, 22
Yarrowia, 42
Zigosaccharomyces, 42
Zygosaccharomyces, 21, 22
 antibiótico, 22
 2-acetil-2-etil-tetraidro-piridina, 24
 3,4-dimetil-fenol, 48
 4-etil-catecol, 50
 4-etil-fenol, 8, 23, 24, 26, 27, 40, 42–46, 50, 52, 54, 55, 60, 61
 4-etil-guaiacol, 23, 24, 43, 44, 46, 50
 4-etil-guaicol, 45
 4-fenil-fenol, 50
 4-vinil-catecol, 50
 4-vinil-fenol, 24, 26, 27, 46, 50
 4-vinil-guaiacol, 24, 27, 50

- acetato de etila, 28
- acetona, 28
- acidez volátil, 8
- actidione, 22, 33, 41
- actil-pirolina, 24
- adonitol, 33
- animal molhado, 24
- antioxidante, 27
- API, 32
- Api 20C AUX, 32
- Api Candida, 32
- Api ID 32C, 32
- arabinose, 33
- aroma, 9
- aroma de cavalo, 28
- aroma de pão, 28
- aroma de pipoca, 28
- aroma de rato, 28
- asco, 9
- ascosporos, 9, 23
- atividade fenoloxidásica, 34
- auxacolor, 32, 33

- band-aid, 24
- barrica, 40, 55
- barricas, 44
- biotina, 40
- biscoito cracker, 28
- blastese, 19
- blatese, 9
- bretty, 24
- brotamento, 9
- brotamento bilateral, 20
- brotamento bipolar, 20
- brotamento multipolar, 20

- caráter fenólico, 24
- carboximetoxilação, 56
- catequina, 26
- catequinas, 26, 27, 43
- cavalo molhado, 26
- CD, 27, 43, 52
- celobiose, 12, 19, 28, 33
- cerveja, 22, 24
- cicloeximida, 22, 33, 34, 41, 42
- cinamato descarboxilase, 27, 43
- CODEX, 56
- coenzima Q, 36
- coenzima Q-10, 34
- coenzima Q-6, 36
- coenzima Q-7, 36
- coenzima Q-8, 36
- coenzima Q-9, 34
- coenzima Q, 20
- coluna, 48
- compostos fenólicos, 26
- condições aeróbicas, 21
- contaminação, 24
- controle, 55
- couro, 24, 26
- couro molhado, 24
- cravo da índia, 24

- DBDM, 43
- detector UV, 50
- DIC, 45, 50
- dimetilcarbonato, 57
- DMDC, 56, 57, 60, 61
- DNA mitocondrial, 9, 20
- DNA ribossomal 26S, 20
- DNA-RNA, 9

- efeito Custer, 20, 34
- efeito Paasteus negativo, 20
- efeito Pasteur, 20
- enzima CD, 43
- enzima vinil redutase, 43
- enzimas pectinolíticas, 52
- esporos, 9
- estábulo, 24
- estearase cinâmica, 52
- estomacal úlcera, 28
- etanol, 27, 28, 40–42
- etil-fenóis, 23
- etil-fenóis, 24, 28, 40, 43
- etil-fenol, 28, 40
- etilcarbamato, 57
- etilfenóis, 40
- eucarioto, 22
- exame macroscópico, 30
- exame microscópico, 30
- extrato de levedura, 42

- fenol, 24, 26
- fermentação maloláctica, 26, 60
- fibra, 49
- FID, 45
- fid, 48

- fluconazol, 32
- frutose, 28
- fucsina, 40
- fumaça, 24

- galactose, 12, 19, 20, 28, 33, 36
- GC, 47, 50
- GC/capilar, 45
- GC/DIC, 50
- GC/MS, 44
- glicosídeo, 59
- glicose, 20, 27, 28, 33, 34, 41, 42
- glicosidase, 59
- gosto fenólico, 24
- GYP, 42

- Head Space, 45
- histamina, 28
- histidina descarboxilase, 28
- homologia, 9
- HPLC, 47, 49, 50
- HPLC/MS, 50
- HPLC/UV, 50
- HS-SPME, 45, 47

- injetor, 47, 49
- inositol, 33
- invaginações, 9
- Isolamento, 29
- isoprenóides, 34
- isopreno (Q-9), 20

- K₂SO₄, 41

- lactose, 19, 33
- leveduras oxidativas, 22
- limiar de percepção, 23, 24, 43
- lisina, 28
- LP, 24, 26, 28, 43, 54, 60

- maçã, 22
- madeira queimada, 24
- maltose, 33, 41, 42
- matabólitos, 40
- meio DBDM, 42, 43
- meio diferencial, 42
- meio GYP, 41, 42
- meio líquido, 30, 44
- meio sólido, 30, 34, 44
- meio WLN, 43

- melezitose, 33
- membrana celular, 27
- metanol, 56, 57
- metilcarbamato, 57
- metilcarbonato, 56
- micélio, 9
- monometilcarbonato, 57
- mosto branco, 21
- mosto tinto, 21
- moto de uva, 22
- MS, 45, 50

- nistatina, 32
- nitrato, 28, 34
- nota animal, 60
- nota floral, 24
- nRNA, 9

- O₂, 20
- O₃, 57
- odor de rato, 24
- ogivas, 21
- ozônio, 57, 58, 60

- pácido sórbico, 42
- padrão interno, 48
- parede celular, 27
- PDMS/DVB, 47
- peptona, 42
- permeabilidade, 27
- pH, 55, 56, 60
- plástico queimado, 24
- potássio, 20
- POX, 33, 34
- precursores, 27
- procianidina, 26
- procianidinas, 26, 27, 43
- propenol, 28
- pseudo micélio, 9
- pseudomicélio, 21
- pseudomucélio, 9

- Q8, 36
- Q9, 36

- rafinose, 33
- RapID Yeast Plus system, 32
- receptores H1, 28
- receptores H2, 28
- remédio, 24

reprodução vegetativa, 9
ribitol, 33

sacarose, 28, 33, 41, 42
Sanofi Diagnostics Pasteur, 33
SCF, 56, 57, 71
SCF, 56
septos, 9
sniffing, 44, 45
SO₂, 44, 55, 56, 58–61
SO₂ livre, 40
sorbato de potássio, 41
splitless, 44, 47
SPME, 45, 47–49
suor de cavalo, 24

tanino, 26
taninos, 27
taninos catéquicos, 27
tempero forte, 24
tetraidropiridinas, 28
tiamina, 40

transporte de elétrons, 36
trealose, 27, 28, 33

urina de cavalo, 24

verde de bromo cresol, 42
vinil-fenóis, 24, 27, 43
vinil-fenol, 52
vinil-fenol redutase, 40
vitaminas, 9, 34, 41
Vitek, 32
VPR, 40
VR, 43
vulvovaginite, 32

WLN, 43

xilose, 33

yeast nitrogen base, 34, 42
Yeast STAR, 32
YM, 34
YNB, 42

Embrapa

Uva e Vinho

CGPE 4782

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

