

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

ESTUDO DE *BRETTANOMYCES/DEKKERA* E ETIL-FENÓIS EM VINHOS
TINTOS BRASILEIROS

LARISSA DIAS DE ÁVILA
Farmacêutica-Bioquímica – Tecn. de Alimentos
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na área de Microbiologia Industrial, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil
Junho, 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

A958e Ávila, Larissa Dias de

Estudo de Brettanomyces-Dekkera e etil-fenóis em vinhos tintos
brasileiros / Larissa Dias de Ávila. – 2010.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto
de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub

1. Leveduras 2. Dekkera 3. Brettanomyces 4. Fenóis 5. Vinho tinto I.
Ayub, Marco Antônio Záchia, orient. II. Título.

CDU 579.2 (043)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marco Antônio Záchia Ayub, pela orientação, amizade e confiança.

Ao IFRS Campus Bento Gonçalves e aos colegas, pela concessão do afastamento necessário para a realização deste estudo.

Às Associações dos produtores de vinho da Serra Gaúcha, AFAVIN, ASPROVINHO, APROVALE e todas as vinícolas que participaram com amostras para este trabalho.

Ao Paulo Gustavo Celso e demais funcionários do Laboratório Nacional de Agricultura/RS (LANAGRO), pela amizade, confiança e total apoio na realização das análises.

Aos professores e funcionários da UFRGS, por todo o aprendizado e apoio recebido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Às alunas Aline Guillen, Aline Oliveira e Silva, Carolina Schneider e Juliana Zaparoli, pela excelente participação neste trabalho.

Aos colegas e amigos, imprescindíveis.

À Mel, pela companhia de todas as horas.

À minha família pelo apoio e estímulo que sempre me dedicaram.

Aos meus guias espirituais, por toda luz e proteção.

ESTUDO DE *BRETTANOMYCES/DEKKERA* E ETIL-FENÓIS EM VINHOS TINTOS BRASILEIROS

Autor: Larissa Dias de Ávila

Orientador: Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

¹ RESUMO

A levedura *Brettanomyces/Dekkera* pode causar alterações importantes em vinhos tintos, com a formação de etil-fenóis, compostos de aromas desagradáveis. Este estudo teve como objetivo determinar a presença dessa levedura e de etil-fenóis em vinhos tintos comerciais e durante a vinificação em escala industrial, além de observar sua possível inibição pelo ácido sórbico. *Brettanomyces/Dekkera* foi quantificada em meio seletivo, e etil-fenóis, por cromatografia gasosa. SO₂ livre e total, álcool, extrato seco total, açúcares residuais, acidez total e volátil e pH também foram determinados. O crescimento durante a vinificação foi acompanhado usando diferentes meios seletivos. *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961) e leveduras isoladas de vinhos brasileiros foram cultivadas em meio sintético e vinho, contendo ácido sórbico entre 0 e 250 mg/L. Das 126 amostras de vinhos comerciais, 26,98% apresentaram *Brettanomyces/Dekkera*, e 46,03%, etil-fenóis acima do limiar de 426 µg/L, com SO₂ e álcool mostrando-se como fatores limitantes. A passagem dos vinhos por barricas e as variedades de uva não influenciaram os níveis de contaminação e de etil-fenóis. Durante a vinificação, *Brettanomyces/Dekkera* foi detectada a partir do mosto. A baixa população não foi suficiente para formar etil-fenóis durante cinco meses após o esmagamento. Os meios não foram completamente seletivos, especialmente para uvas e mostos. O ácido sórbico inibiu a cepa de *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961), especialmente para concentrações acima de 150 mg/L, sendo variável o grau de inibição para os isolados.

¹ Tese de doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia Industrial, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (136 p.) Junho, 2010.

STUDY OF *BRETTANOMYCES/DEKKERA* AND ETHYLPHENOLS IN BRAZILIAN RED WINES

Author: Larissa Dias de Ávila

Advisor: Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

² ABSTRACT

The yeast *Brettanomyces/Dekkera* can cause significant spoilage in red wines, with the production of ethylphenols, compounds of unpleasant odors. This study aimed at determining the presence of this yeast and ethylphenols in commercial red wines during vinification in industrial scale and to observe its possible inhibition by sorbic acid. *Brettanomyces/Dekkera* was quantified on selective medium, while ethylphenols were quantified by gas chromatography. Free and total SO₂, alcohol, total dry extract, residual sugar, total and volatile acidity, and pH were also determined. The growth during winemaking was followed using different selective media. *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961) and Brazilian wines yeasts were grown in synthetic medium and in wine, containing sorbic acid between 0 and 250 mg/L. *Brettanomyces/Dekkera* was present in 26.98% of the 126 samples of commercial wines. The ethylphenols were above of the 426 µg/L threshold in 46.03% of the samples. SO₂ and alcohol were limiting factors. The stage in barrels and the varieties did not affect the levels of contamination and ethylphenols. During winemaking, *Brettanomyces/Dekkera* was detected from the must. The low population was not enough to produce ethylphenols in five months after crushing. The media were not completely selective, especially for grapes and musts. Sorbic acid inhibited the strains of *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961), especially at concentrations above 150 mg/L, with variable degree of inhibition for the isolates.

² Doctoral thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (136 p.) June, 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
SUMÁRIO	vi
RELAÇÃO DE TABELAS.....	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	viii
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. <i>Brettanomyces/Dekkera</i> e seus efeitos.....	4
2.2. Origem da contaminação e crescimento de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> no vinho	10
2.3. Técnicas de detecção de <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	14
2.4. Fatores que favorecem a produção de etil-fenóis nos vinhos.....	18
2.5. Medidas de prevenção e controle.....	20
2.6. Problemática dos etil-fenóis no mundo vitivinícola	24
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	26
3.1. Artigo 1: Presença de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> e etil-fenóis em vinhos tintos brasileiros.....	26
3.2. Artigo 2: Crescimento de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> durante a vinificação em escala industrial	50
3.3. Artigo 3: Growth inhibition of isolated yeasts in selective medium for <i>Brettanomyces/Dekkera</i> by sorbic acid in culture and wine	78
4. DISCUSSÃO GERAL.....	99
5. CONCLUSÕES.....	110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	112
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS.....	131

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações de etil-fenóis e percentagens de vinhos tintos produzidos em diferentes regiões do mundo	25
Tabela 1	Artigo 1: Determinação de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> (UFC/mL), 4-etil-fenol (4-EF) e 4-etil-guaiacol (4-EG), em µg/L, e percentagens acima do limiar de preferência de 126 amostras de vinhos tintos varietais brasileiros.....	35
Tabela 2	Artigo 1: Parâmetros químicos das 126 amostras de vinhos tintos varietais brasileiros.....	37
Tabela 3	Artigo 1: Médias das contagens de leveduras e das concentrações de etil-fenóis de amostras que passaram e não passaram por estágio em barrica.....	40
Tabela 4	Artigo 1: Médias das contagens de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> e dos parâmetros químicos nos vinhos das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot	42
Tabela 1	Artigo 2: Resultados das análises microbiológicas das amostras de uvas, do mosto e do vinho em diferentes etapas do processo de elaboração	63
Tabela 2	Artigo 2: Composição química do mosto e vinho em diferentes etapas da vinificação de Cabernet Sauvignon, safra 2009, em escala industrial.....	70

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1 Artigo 1: Relação entre 4-etil-fenol e (a) contagens de *Brettanomyces/Dekkera* log+1 e (b) SO₂ livre; relação entre contagens de *Brettanomyces/Dekkera* log+1 e (c) SO₂ livre e (d) álcool.....38
- Figura 1 Artigo 2: Fotografias de colônias crescidas em meio DBDM (a, c, e) e em meio DBDM modificado (b, d, f), oriundas de 20 µL de uvas Cabernet Sauvignon (a, b), de 0,1 mL do mosto, (c, d) e 0,1 mL do vinho na metade da fermentação alcoólica (e, f).....64
- Figura 2 Artigo 2: Fotografias de colônias crescidas em meio DBDM (a, c) e em meio DBDM modificado (b, d), oriundas de 0,1 e 1 mL, respectivamente, do vinho após fermentação alcoólica (a, b) e de 20 mL do vinho após fermentação malolática (c, d)69
- Figure 1 Artigo 3: Growth of the isolates 4CS302 (a), 4CS31 (b), 8MBa (c), 8MBv (d), 11CSA (e), 11CSB (f), 11MA (g), 11MAa (h), 11MB (i), 11MBa (j), 12CSB (k), and of the *D. bruxellensis* (NRRL Y – 12961) (l) strain in the culture medium containing different concentrations of sorbic acid: 0 (◆), 100 (■), 150 (▲), 200 (●), and 250 (○) mg/L88
- Figure 2 Artigo 3: Growth of the isolates 4CS302 (a), 8MBv (b), 11CSA (c), 11MA (d), and of the *D. bruxellensis* (NRRL Y – 12961) strain (e) in wine containing different concentrations of sorbic acid: 0 (◆), 100 (■), 150 (▲), 200 (●), and 250 (○) mg/L.....91

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SO ₂	dióxido de enxofre
H ₂	gás hidrogênio
ppm	parte por milhão
%	porcentagem
<i>Brett</i>	<i>Brettanomyces</i>
POF ⁺	<i>phenolic off-flavor</i> (composto fenólico de odor desagradável)
mL	mililitros
µg	micrograma
m	metro
µm	micrômetro
nm	nanômetro
d. i.	diâmetro interno
g/L	gramas por litro
mg/L	miligramas por litro
µg/L	microgramas por litro
g/kg	gramas por quilo
kg	quilo
% (v/v)	porcentagem em volume
UFC/mL	unidades formadoras de colônias por mililitro
CFU/mL	<i>colony forming unit per milliliter</i>
Céls/mL	células por mililitro
mL/L/min	mililitro por litro por minuto
rpm	rotações por minuto
°C	graus centígrados
<i>r</i>	coeficiente de correlação
<i>r</i> ²	coeficiente de determinação
<i>r_s</i>	coeficiente de correlação de Spearman
CV	coeficiente de variação
pH	potencial hidrogeniônico
DBDM	<i>Dekkera/Brettanomyces differential medium</i> (meio diferencial para <i>Dekkera/Brettanomyces</i>)
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> (ensaio imunossorvente ligado a enzima)
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PCR-DGGE	<i>Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis</i> (Reação em cadeia da polimerase - eletroforese em gel com gradient de desnaturação)
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i> (Amplificação circular isotérmica)
DNA	ácido desoxirribonucléico
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaçadores internos transcritos)

RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i> (Amplificação ao acaso do DNA polimórfico)
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i> (ácido nucléico peptídico)
CG	Cromatografia gasosa
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Extração em fase sólida)
SPME	<i>Solid phase micro-extraction</i> (Micro-extração em fase sólida)
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i> (Extração sortiva em barras de agitação)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Bar	unidade de pressão = 0,987 atm
mm	milímetros
DMDC	dimetil dicarbonato
PEF	<i>Pulsed electric field</i> (Campo elétrico pulsado)
mM	milimolar
KpKt	toxina killer de <i>Kluyveromyces phaffii</i>
4-EF	4-etil-fenol
4-EG	4-etil-guaiacol
Σ	somatório
EUA	Estados Unidos da América
S	South (Sul)
W	West (Oeste)
CS	<i>Cabernet Sauvignon</i>
M	<i>Merlot</i>
T	<i>Tannat</i>
Mars	<i>Marselan</i>
CF	<i>Cabernet Franc</i>
tq.	tanque
AA	ácido acético
FAL	fermentação alcoólica
FML	fermentação malolática
EST	extrato seco total
AR	açúcares residuais
OD	optical density (densidade ótica)
ATP	adenosina tri-fosfato

1. INTRODUÇÃO

As leveduras pertencentes ao gênero *Brettanomyces/Dekkera* são conhecidas em enologia por provocar graves defeitos de aroma, que determinam a deterioração do vinho. O problema mais freqüente ocasionado pelo desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera* no vinho consiste na transformação de ácidos fenólicos (ácido ferúlico e *p*-cumárico) em etil-fenóis (Heresztyn, 1986, Lauritsen et al., 1991, Chatonnet et al., 1992), que possuem aromas fenólicos, medicinais ou animais (couro, suor de cavalo, estábulo) (Chatonnet et al., 1990). A contaminação mais freqüente ocorre nos vinhos tintos, durante o processo de maturação em barricas (Chatonnet et al., 1990, 1992). Entretanto, mais recentemente tem sido observada a produção de etil-fenóis em vinhos estocados em tanques de concreto ou aço inoxidável (Rodrigues et al., 2001), ou mesmo na garrafa (Pérez-Prieto et al., 2003; Coulon et al., 2010).

Brettanomyces/Dekkera tem causado alterações em vinhos de diferentes regiões do mundo (Chatonnet et al. 1992; Heimoff, 1996; Heresztyn 1986; Ibeas et al. 1996; Fugelsang and Edwards 2007), o que tem sido motivo de preocupação na área vitivinícola. Essa levedura tolera 100 ppm de SO₂ total

(30-40 ppm de SO₂ livre) (Froudiere and Larue, 1988; Conterno et al., 2006) e até 12% de álcool (Silva et al., 2004).

Diversas medidas de prevenção, tais como a desinfecção do ambiente e de equipamentos e a utilização de conservantes são empregadas objetivando controlar o problema. Devido a sua eficácia e à falta de toxicidade, o uso do ácido sórbico em vinhos é permitido em diversos países. Sua ação inibitória frente à *Brettanomyces/Dekkera* tem sido controversa em estudos desenvolvidos em meios de cultura (Beech & Carr, 1955, 1958; Restaino et al., 1982; Warth, 1985; Sofos, 1989; Neves et al., 1994; Mihyar et al., 1997; Praphailong & Fleet, 1997; Rodrigues et al., 2001; Malfeito-Ferreira et al., 2004a; Stratford, 2006), restando, portanto, dúvidas quanto à inibição no vinho.

A origem primária de *Brettanomyces/Dekkera* ainda permanece obscura (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003). Devido à dificuldade de sua detecção nas uvas (Fleet and Heard, 1993; Combina et al., 2005, Renouf et al., 2006, Barata et al., 2008a, 2008b), sua origem sempre esteve associada a algum foco dentro da vinícola, como equipamentos, materiais ou vinho contaminado (Van der Walt and van Kerken, 1961; Larue et al., 1991). Até o momento dois estudos demonstraram a sua presença em uvas. *Brettanomyces/Dekkera* foi detectada em uvas infectadas com míldio (Gadoury et al., 2002), e em outro estudo, através da utilização de um meio de enriquecimento (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007). A presença de *Brettanomyces/Dekkera* durante a vinificação e após engarrafamento foi demonstrada (Renouf et al., 2006, 2007; Coulon et al., 2010), mas sua quantificação ainda têm sido difícil.

A vitivinicultura no Brasil tem se ampliado e modernizado. Os novos parreirais e plantas vinícolas estão voltados para a obtenção de vinhos de melhor qualidade. Nesse contexto, os aromas típicos de fenóis voláteis nos vinhos constituem-se fatores de preocupação. Como se desconhece a problemática relacionada à presença de *Brettanomyces/Dekkera*, este trabalho teve como objetivos: determinar a presença dessas leveduras e de etil-fenóis em vinhos tintos, e correlacionar com suas características químicas; observar a presença e o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* durante a vinificação em escala industrial; observar a resistência ao ácido sórbico, de *Dekkera bruxellensis* e de leveduras isoladas em meio seletivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Brettanomyces/Dekkera* e seus efeitos

As leveduras de contaminação pertencentes ao gênero *Brettanomyces/Dekkera* são conhecidas em enologia por provocar graves defeitos olfativos, que determinam a deterioração do vinho (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004). São leveduras que fazem parte da microbiota de outros produtos, como cerveja, sidra, refrigerantes, pickles e kefir, na maioria das vezes consideradas deteriorantes (Verachtert & Dawoud, 1984; Demain et al., 1998).

O problema mais freqüente ocasionado pelo desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera* no vinho consiste na transformação de ácidos fenólicos (ácido ferúlico e *p*-cumárico) em etil-fenóis (Heresztyn, 1986, Lauritsen et al., 1991, Chatonnet et al., 1992). Esses compostos possuem aromas desagradáveis, descritos como, fenólicos, medicinais ou animais (couro, suor de cavalo, estábulo) (Chatonnet et al., 1990). O desenvolvimento dessa levedura ocorre principalmente em vinhos tintos, levando à perda total de aromas frutados, alterações na cor e estrutura do vinho (Majcenovic, 2003).

O maior perigo da contaminação de mostos e vinhos com *Brettanomyces/Dekkera*, embora mais raro, é o aparecimento do chamado odor

a “rato” (Grbin & Henschke, 2000). Três compostos foram identificados em vinhos como responsáveis: 2-etil-tetrahidropiridina, 2-acetil-tetrahidropiridina e 2-acetilpirrolina (Tucknott, 1978; Strauss & Heresztyn, 1984; Heresztyn, 1986; Herderich et al., 1995; Grbin et al., 1996; Grbin & Henschke, 2000). Esses compostos podem ainda ser biossintetizados por *Lactobacillus* (heterofermentativo), *Oenococcus* e *Pediococcus* (Heresztyn, 1986; Costello et al., 1993; Costello et al., 2001).

O gênero *Brettanomyces* pertence à classe Deuteromycetes e à família Cryptococcaceae, portanto não forma esporos. Já sua forma esporulada, *Dekkera*, pertence à classe Ascomycetes, à família Saccharomycetaceae e apresenta brotamento multilateral (Walker, 1998). Atualmente, *D. anomala* (anamorfo: *B. anomalus*), *D. bruxellensis* (anamorfo: *B. bruxellensis*), *B. custersianus*, *B. naardenensis*, e *B. nanus* são espécies aceitas (Smith, 1998). Todos os isolados de vinho têm sido identificados como *B. bruxellensis* (Mittrakul et al., 1999) ou *D. bruxellensis* (Stender et al., 2001; Curtin et al., 2007).

O formato mais característico das células de *Brettanomyces/Dekkera* é o de barco, ou ogival, lembrando arcos góticos, o qual foi descrito por Smith (1998). Mas, na verdade menos de 10% das células de uma cultura velha, exibem esse formato (Fugelsang & Edwards, 2007). As células são menores, mas similares a *Saccharomyces cerevisiae*. Possuem gemação multipolar e ocasionalmente, a separação incompleta das células filhas pode ocasionar cadeias (Zoecklein et al., 2001).

O estudo dos mecanismos de biossíntese dos etil-fenóis por *Brettanomyces/Dekkera* põe em evidência a ação sequencial de duas enzimas. A primeira é uma cinamato descarboxilase, que transforma os ácidos cinâmicos (*p*-cumárico e ferúlico) em vinil-fenóis. A segunda enzima é uma vinilfenol redutase, responsável pela formação de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol a partir dos vinil-fenóis (Heresztyn, 1986, Lauritsen et al., 1991, Chatonnet et al., 1992).

Os ácidos cinâmicos da uva encontram-se freqüentemente na forma de ésteres do ácido tartárico, *trans-p*-cumaroil tartárico e *trans*-cafeoil tartárico (Ribéreau-Gayon, 1965), os quais provavelmente também são metabolizados. De acordo com Silva et al. (2005), as concentrações desses ésteres e de quercetina diminuíram em vinhos inoculados com cepas de *Dekkera bruxellensis*.

Há décadas se conhece a capacidade de algumas *Saccharomyces* de descarboxilar os ácidos *p*-cumárico e ferúlico para produzir, respectivamente, 4-vinil-fenol e 4-vinil-guaiacol. Mas, sendo *Saccharomyces cerevisiae* desprovida de vinilfenol redutase, não pode levar à formação de etil-fenóis. Em nenhuma outra espécie de microrganismo do vinho se tem detectado a atividade dessa enzima. Devido a isso, sua presença é indicadora da atividade de *Brettanomyces/Dekkera* e de sua forma esporulada correspondente, *Dekkera* sp (Chatonnet et al., 1992). Certas cepas de *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus plantarum* podem produzir etil-fenóis, mas as quantidades são extremamente baixas quando comparadas com as que *Brettanomyces/Dekkera* pode produzir (Chatonnet et al., 1995). Além disso, certos resultados experimentais indicam que a cinamato descarboxilase

bacteriana é inibida pelos compostos fenólicos, como a de *Saccharomyces cerevisiae* (Chatonnet et al., 1997). Segundo Shinohara et al. (2000), outras espécies de leveduras como, *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* e *Hansenula*, são produtoras de vinil-fenóis, mas não etil-fenóis. Mais recentemente, Dias et al. (2003a) demonstraram que algumas cepas de *Pichia guilliermondii*, cultivadas em meio DBDM (*Dekkera/Brettanomyces differential medium*), são capazes de converter ácido *p*-cumárico em 4-etil-fenol com eficiência aproximada àquela observada em *D. bruxellensis* e *D. anomala*. Mas, ao contrário de *Brettanomyces/Dekkera*, não são capazes de crescer em vinhos (Malfeito-Ferreira et al., 2004a).

Brettanomyces/Dekkera pode ainda formar 4-etil-siringol, a partir do ácido sinápico da madeira de carvalho (Heresztyn, 1986), álcool e ácido vanílico, a partir da vanilina (Edlin et al., 1995), etil-decanoato e álcool isoamílico (Fugelsang & Zoecklein, 2003). Mais recentemente, 4-etil-catecol também foi detectado em vinhos afetados por aromas típicos de *Brettanomyces/Dekkera*, provavelmente oriundo do ácido caféico (Hesford et al., 2004). Se *Brettanomyces/Dekkera* estiver presente na uva e no mosto, pode produzir ácidos octanóico e decanóico, os quais afetam negativamente o desenvolvimento de *Saccharomyces* (Larue et al., 1991; Fugelsang et al., 1993). Nesse aspecto, deve-se tomar cuidado com a maceração pré-fermentativa, a frio, em tintos, pois pode permitir o crescimento da flora de leveduras nativas (Zoecklein et al., 2001; Renouf et al., 2006).

Brettanomyces/Dekkera produzem quantidades relativamente altas de ácido acético (Freer, 2002; Freer et al., 2003). Concentrações superiores a

0,5 g/L em vinho branco foram demonstradas por Ciani et al. (2003). A fermentação do mosto de uvas, sob aeração, por *Brettanomyces intermedius* (sin. *Dekkera bruxellensis*) foi capaz de gerar 3,36 g (ácido acético)/L de acidez volátil (Larue et al., 1991). *Brettanomyces lambicus* (sin. *Dekkera bruxellensis*) foi detectada em vinícolas produtoras de Jerez, como responsáveis de elevada acidez volátil nos vinhos (Ibeas et al., 1996). Ciani & Ferraro (1997) e Vigentini et al. (2008) observaram a produção de acetato e glicerol paralela ao crescimento de *D. bruxellensis* em vinho sintético. *B. bruxellensis* foi inoculada em vinhos estéreis, secos e com 20 g/L de açúcares residuais. Concentrações entre 0,26 e 0,85 g/L de ácido acético foram produzidas somente no vinho doce (Romano et al., 2008). De acordo com Abbott et al. (2005), somente altas concentrações de glicose (4%) e elevadas taxas de aeração (acima de 30 mL/L/min.) demonstram elevada produção de ácido acético. *B. bruxellensis* é a espécie que mais produz ácido acético, sendo favorecida por uma temperatura de 30°C (Castro-Martinez et al., 2005). Dias et al. (2003b) salientaram que a produção de ácido acético não está correlacionada à produção de 4-etil-fenol, exceto quando a concentração de açúcar é elevada. Entretanto, correlação ($r = 0,6$) entre esses produtos foi demonstrada por Vigentini et al. (2008).

Brettanomyces/Dekkera fermenta lentamente os açúcares (Ciani et al., 2003), mas é capaz de produzir e resistir a elevadas concentrações de etanol (Dias et al., 2003b). *B. bruxellensis* e *D. anomala* são capazes de crescer lentamente em meio sintético contendo até 9% de etanol, usando-o como única fonte de carbono e energia. Elas apresentam maior capacidade de crescimento sob altas concentrações de etanol (12%) do que *Saccharomyces*

cerevisiae (Silva et al., 2004). Foi demonstrado por Dias et al. (2003b) que *Dekkera bruxellensis* não utiliza ácido *p*-cumárico como fonte de energia e carbono. Mas, é capaz de convertê-lo em 4-etil-fenol, na presença de etanol como a única fonte de energia. À medida que aumenta a concentração de etanol, a produção de 4-etil-fenol é inibida, sendo evitada por completo a 13% (v/v) de etanol.

Brettanomyces/Dekkera necessita de biotina e tiamina, pode utilizar arginina como fonte de carbono e nitrogênio, mas não requer nenhum aminoácido para crescer. Cresce bem sobre celobiose, galactose, maltose, sacarose e trealose (Joseph & Bisson, 2004).

Brettanomyces/Dekkera multiplica-se no vinho pela fermentação de pequenas quantidades de açúcares residuais (glicose, frutose, arabinose e trealose) (Chatonnet et al., 1995). Em vinho sintético, *D. bruxellensis* não utiliza etanol, consome inicialmente o açúcar (frutose) e posteriormente o ácido málico e láctico (Vigentini et al., 2008). Teoricamente, concentrações de hexoses de 100 mg/L podem suportar populações de *Brettanomyces/Dekkera* de 10^7 células/mL (Smith, 1998). Em meio sintético, a produção de 4-etil-fenol inicia a partir de 200 mg/L de glicose ou frutose (Barata et al., 2008c). Níveis de 300 mg/L de açúcares residuais são suficientes para formar etil-fenóis em uma concentração correspondente ao seu limite de percepção (426 µg/L) (Chatonnet et al., 1995). A correlação inversa entre o nível de açúcares residuais e de 4-etil-fenol, de 303 vinhos, foi atribuída ao provável consumo dos açúcares durante o crescimento de *Brettanomyces* (Henschke et al., 2004).

2.2. Origem da contaminação e crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* no vinho

A contaminação mais freqüente ocorre após as fermentações, quando os fenômenos de antagonismo e de competição entre microrganismos diminuem, e *Brettanomyces bruxellensis*, a espécie mais comum, pode desenvolver-se em anaerobiose estrita em vinhos ditos secos e produzir grandes quantidades de etil-fenóis (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

Embora a presença de *Brettanomyces/Dekkera* já tenha sido observada em vinhos brancos e espumantes (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004), a maturação de vinhos tintos em barricas é o foco de contaminação mais generalizado (Chatonnet et al., 1990, 1992). O risco de degradação microbiana dos vinhos é particularmente elevado nas barricas de madeira, devido à dificuldade de limpeza e desinfecção desse material (Malfeito-Ferreira et al., 2004b). Em vinícolas que utilizam muito a fermentação em barrica, e/ou onde a desinfecção não é adequada, podem-se desenvolver altas populações dessas leveduras (Zoecklein et al., 2001).

Vinhos que maturam em barris usados têm apresentado concentrações mais altas de etil-fenóis do que barris novos (Chatonnet et al., 1993; Pollnitz et al., 2000). A reforma de barris usados, através de raspagem e queima parece reduzir sua carga microbiana, resultando em vinhos com concentrações menores de etil-fenóis (Pollnitz et al., 2000). Entretanto, as infecções parecem também perigosas em barris novos, os quais favorecem a entrada de oxigênio e a liberação de celobiose, açúcar metabolizado por *Brettanomyces/Dekkera* (Lonvaud-Funel & Renouf, 2005). Os resultados dos

trabalhos de Frey et al. (1996) levam a suspeita de que mesmo a barrica nova pode ser fonte de contaminação, já que houve crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* no vinho estéril armazenado em barricas novas. A barrica pode oferecer condições (oxigênio, nutrientes, ou ambos) que favoreçam o desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera*, quando comparada ao tanque de aço inoxidável, pois nesse recipiente o vinho inoculado com *Brettanomyces/Dekkera* não sofreu alteração.

Atualmente se sabe que o desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera* não ocorre exclusivamente nas barricas. A formação de etil-fenóis em altas quantidades foi observada após 90 dias de maturação em barricas e durante a estocagem em garrafas (Pérez-Prieto et al., 2003; Coulon et al., 2010). Rodrigues et al. (2001) observaram a formação de 4-etil-fenol após quatro meses da fermentação, e em vinhos estocados em tanques de concreto ou aço inoxidável, que não estiveram em recipientes de madeira.

A origem primária de *Brettanomyces/Dekkera* ainda permanece obscura (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Inicialmente, Van der Walt & Van Kerken (1961) e Larue et al. (1991) sugeriram que a infecção se devia a algum foco dentro da vinícola, pois não a detectaram na uva. *Brettanomyces/Dekkera* sempre foi considerada ausente (Fleet & Heard, 1993) ou rara na superfície das bagas (Henick-Kling et al., 2000). De 1985 a 1993, alguns pesquisadores isolaram *Brettanomyces/Dekkera* de uvas, mas não houve confirmação (Fugelsang & Edwards, 2007). Mais recentemente, Gadoury et al. (2002) demonstraram sua presença em uvas infectadas com míldio, e Renouf & Lonvaud-Funel (2007), utilizando um meio de enriquecimento. Entretanto, em

outros estudos *Brettanomyces/Dekkera* não foi detectada em uvas (Larue et al., 1991, Combina et al., 2005, Renouf et al., 2006, Barata et al., 2008b, 2008d). Renouf et al. (2006) acreditam que sua detecção na uva é difícil devido a baixa população. Embora *Brettanomyces/Dekkera* já tenha sido isolada em mostos sob fermentação em várias regiões do mundo (Henick-Kling et al., 2000), elas não estão entre os organismos dominantes, provavelmente devido a sua baixa velocidade de crescimento, a qual as torna incapazes de competir com *Saccharomyces* (Abbott et al., 2005).

Acredita-se que *Brettanomyces/Dekkera* se espalha numa vinícola pela presença de um vinho contaminado, pela sanitização deficiente das superfícies de contato, pela mosca comum das frutas (Zoecklein et al., 2001), através de uvas com podridão (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003), ou ainda pelo ar ambiente da vinícola (Connel et al., 2002). Sangorrín et al. (2008) não detectaram a presença de *Brettanomyces/Dekkera* em superfícies internas de tanques de três vinícolas argentinas. De acordo com Loureiro & Malfeito-Ferreira (2003), a dificuldade de detecção em superfícies dentro da vinícola se deve a utilização de meios de cultura inadequados e de períodos curtos de incubação.

Devido à falta de métodos adequados, a quantificação de *Brettanomyces/Dekkera* durante a vinificação tem sido difícil, entretanto, alguns estudos já revelam algumas informações. Renouf et al. (2007) utilizaram a técnica de PCR-DGGE na identificação dos microrganismos presentes na uva, durante a vinificação e em vinhos engarrafados. *Brettanomyces bruxellensis* foi detectada sobre a película nos primeiros estádios de desenvolvimento das

uvas, em vinhos engarrafados há bastante tempo, na água de lavagem e na superfície das barricas. Durante a maturação do vinho até o engarrafamento foi a única espécie encontrada. *D. bruxellensis* cresce bem em mosto e vinho tinto sem inibição por *Saccharomyces* (Dias et al., 2003a; Renouf et al., 2006). Observando o crescimento de diferentes espécies de leveduras inoculadas em suco de uva comercial, sete dias após a fermentação alcoólica *Brettanomyces* foi a única que permaneceu viável (10^4 UFC/mL). Após o 20º dia, seu crescimento chegou a 10^5 UFC/mL. Em escala industrial, *Brettanomyces* foi detectada somente após o final da fermentação alcoólica, predominando entre as não-*Saccharomyces* até o final da fermentação malolática (Renouf et al., 2006). A produção de etil-fenóis é maior ao final da fermentação alcoólica do que ao final da malolática, assim como no vinho com açúcares residuais (Romano et al., 2008).

O crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* foi acompanhado durante o período de armazenamento em garrafas. Em um grupo de vinhos, as células cresceram elevando os níveis de etil-fenóis. Em outro, em que os vinhos já continham altas concentrações de etil-fenóis, provavelmente já em declínio, as células permaneceram em números estáveis, com baixa produção de etil-fenóis, e incapazes de crescer no meio de cultura (Coulon et al., 2010).

A formação de fenóis voláteis em vinhos é proporcional ao tamanho da população de *Brettanomyces/Dekkera* (Gerbaux et al., 2000). O maior aumento na concentração de etil-fenóis em vinhos ocorre após a população atingir $2,5 \times 10^5$ células/mL (Fugelsang & Zoecklein, 2003), mas entre 10^2 a 10^3 células/mL os aromas de etil-fenóis já podem estar presentes (Henick-Kling et

al., 2000). A produção de 4-etil-fenol tem sido observada durante a fase exponencial do crescimento de *D. bruxellensis* (Dias et al., 2003b; Barata et al., 2008c; Romano et al., 2008; Agnolucci et al., 2009; Oelofse et al., 2009). Em vinhos tintos foi demonstrada a variação de 349 a 1882 mg/L por 1 log UFC/mL (Barata et al., 2008c).

Brettanomyces/Dekkera apresenta grande diversidade intra-específica (Curtin et al., 2007; Barbin et al., 2008; Agnolucci et al., 2009). Em vinho sintético (2 g de glicose, 8 g de frutose, 0,5 g de extrato de levedura, 0,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g de KH_2PO_4 , 0,4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de ácido tartárico, 3 g de ácido málico, 0,3 g de ácido cítrico, 6 g de glicerol, 5 mg de ácido *p*-cumárico, 10% (v/v) de etanol e 1 L de H_2O), a produção de 4-etil-fenol foi de 0,35 a 2,77 mg/L, portanto muito variável entre diferentes cepas de *Brettanomyces bruxellensis* (Barbin et al., 2008). Somente para algumas cepas esteve associada à fase de crescimento (Barbin et al., 2008; Vigentini et al., 2008). A produção de fenóis voláteis difere entre meio de cultura e vinho, em relação aos seus teores máximos (Oelofse et al., 2009).

2.3. Técnicas de detecção de *Brettanomyces/Dekkera*

Em geral, *Brettanomyces/Dekkera* apresenta como inconveniente o crescimento lento em meios de cultura, levando de 15 a 20 dias (Smith et al., 1990, Rodrigues et al., 2001). Normalmente se utiliza a cicloheximida, para inibir o crescimento de fungos filamentosos e de leveduras com maior velocidade de crescimento, como *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* sp. (Loureiro, 2000; Zoecklein et al., 2001). Como *Brettanomyces/Dekkera* é

altamente acidogênica (Gerós et al., 2000; Freer, 2002; Freer et al., 2003), a produção de ácido acético é indicativa da sua presença, sendo detectada no meio pelo uso de um indicador de pH. O ácido *p*-cumárico também é adicionado ao meio, já que é substrato para a produção de 4-etil-fenol, facilmente detectado pelo odor. Um meio com essas características não é totalmente seletivo, já que *Hanseniaspora* e *Kloeckera*, presentes de maneira natural no mosto, também são resistentes a cicloheximida (Loureiro, 2000).

Visando contornar os problemas e com base nos componentes citados, Rodrigues et al. (2001), entre várias formulações, definiram um meio considerado seletivo e diferencial (DBDM), capaz de recuperar *Brettanomyces/Dekkera* do vinho e de ambientes relacionados. O uso de etanol (6%), como única fonte de carbono providenciou a inibição de *Hanseniaspora*. Entretanto, de acordo com Dias et al. (2003a), esse meio deveria ser referido como seletivo e diferencial a outras espécies também produtoras de 4-etil-fenol, especialmente em uvas e mostos, já que permite o crescimento de *Pichia guilliermondii*.

A otimização das condições de enriquecimento seletivo, ajustando a concentração de etanol e o volume de meio de enriquecimento adicionado na amostra foi estudada por Roccatto et al. (2001), para o isolamento e contagem de *Brettanomyces/Dekkera* em uva, mosto e vinho. Couto et al. (2005a) desenvolveram uma metodologia baseada em meio líquido bastante sensível (1-10 céls/mL) e simples para ser usada em vinícolas. A detecção de *Brettanomyces/Dekkera* consiste na observação da turbidez e da presença do

aroma de 4-etil-fenol. O tempo que leva até o resultado positivo permite ter uma idéia do nível de contaminação.

Em vista de problemas relacionados às técnicas tradicionais, esforços científicos têm sido feitos para desenvolver técnicas de identificação mais rápidas e específicas para *Brettanomyces/Dekkera* (Ganga, 2003). Imunoabsorção com enzimas ligadas (ELISA) é um método específico (Kuniyuki et al., 1984), mas relativamente caro. Vários métodos moleculares foram utilizados: amplificação e análise do gene 26S rRNA usando reação em cadeia da polimerase (PCR) (Cocolin et al., 2004; Contreras et al., 2008); Nested-PCR (Ibeas et al., 1996); amplificação isotérmica mediada por “loop” (LAMP), um método diferente de amplificação do DNA (Hayashi et al., 2007); análise do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do gene 5.8S do rRNA e de dois espaçadores internos transcritos do ribossomo (ITS) (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Granchi et al., 1999; Egli & Henick-Kling, 2001; Martorell et al., 2006); amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) (Mitrakul et al., 1999; Contreras et al., 2008); Real Time-PCR (Phister & Mills, 2003; Delaherche et al., 2004; Hierro et al., 2006; Tessonnière et al., 2009) e hibridação de peptídeos de ácidos nucleicos (PNAs) (Stender et al., 2001; Connel et al., 2002).

Os métodos citados apresentam alta especificidade, confiabilidade e rapidez, mas a maioria é somente qualitativa, utilizados para detecção e identificação, além de necessitar um isolamento ou enriquecimento prévio, o que os tornam trabalhosos (Phister & Mills, 2003). As análises baseadas em PCR geralmente não asseguram que existam células vivas de

Brettanomyces/Dekkera nas amostras, pois amplifica DNA, o qual pode ser proveniente de células mortas (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004). Outro problema para a quantificação é o alto limite de detecção, em torno de 10^4 UFC/mL (Delaherche et al., 2004; Cocolin et al., 2004). Alguns estudos mencionados procuraram contornar esses problemas otimizando a quantificação (Granchi et al., 1999; Phister & Mills, 2003; Hierro et al., 2006; Tessonnière et al., 2009). Mais recentemente, Benito et al. (2009) apresentaram um método que permite estimar a população de *Brettanomyces/Dekkera* na fase inicial de fermentação através do modelo de regressão entre o tempo necessário para a conversão do ácido *p*-cumárico em 4-etil-fenol e diferentes tamanhos de inóculos.

A microscopia de fluorescência, a análise do perfil de ácidos graxos (Malfeito-Ferreira et al., 1997; Dias et al., 2003a) e de componentes voláteis são outros métodos clássicos de detecção utilizados. A análise de 4-etil-fenol por cromatografia gasosa (CG) é o método mais conveniente (Henick-Kling et al., 2000; Zoecklein et al., 2001). Esse método normalmente prevê um passo prévio de extração e concentração dos analitos, devido às baixas concentrações encontradas ($\mu\text{g/L}$). O método clássico de extração por solvente (líquido-líquido) foi empregado por diversos autores na análise dos fenóis voláteis e da composição aromática dos vinhos (Chatonnet & Boidron, 1988; Monje et al., 2002, Simon et al., 2003; Calleja & Falqué, 2005; Falqué et al., 2008). Díaz-Plaza et al. (2002) otimizaram esse tipo de extração e acrescentaram um passo de dessorção térmica na análise em CG. Atualmente, métodos de extração mais simples e mais seletivos têm sido aplicados, tais

como, extração em fase sólida (SPE) (Dominguez et al., 2002, López et al., 2002; Culleré et al., 2003, 2004; Ferreira et al., 2001), microextração em fase sólida (SPME) (Martorell et al., 2002; Monje et al., 2002; Mejías et al., 2003; Bouton & Chatonnet, 2007; Carrillo & Tena, 2007; Pizarro et al., 2007; Gonçalves et al., 2009) e extração “stir bar sorptive” (SBSE) (Díez et al., 2004; Garde-Cerdán et al., 2008). Padrões deuterados foram desenvolvidos para simplificar, reduzir o tempo gasto com a extração, e tornar a análise mais precisa (Pollnitz et al., 2000, 2004; Rayne & Eggers, 2007). Esses padrões foram usados por Pérez-Prieto et al. (2003) no estudo de compostos voláteis de vinhos em barricas e garrafas. Algumas vezes a cromatografia gasosa foi associada à olfatométria (Aznar et al., 2001; Ferreira et al., 2001; Culleré et al., 2004), para caracterização dos aromas e determinação do limiar de percepção. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também tem sido empregada na quantificação dos etil-fenóis (Bettin et al., 2002; Meyer et al., 2003; Vanbeneden et al., 2006, 2008; Caboni et al., 2007; Vigentini et al., 2008).

2.4. Fatores que favorecem a produção de etil-fenóis nos vinhos

Brettanomyces/Dekkera é uma levedura extremamente comum em vinícolas e cervejarias. A formação de fenóis voláteis em vinhos depende da presença de seus precursores (Gerbaux et al., 2000). Diferentes variedades de uvas e práticas de vinificação e maturação que afetam a fração fenólica podem indiretamente afetar a fração volátil (Pollnitz et al., 2000; Escalona et al., 2002). Portanto, uvas muito maduras com alto conteúdo de ácidos fenólicos, bem como macerações longas e o uso de enzimas pectolíticas podem favorecer o

aumento de etil-fenóis (Gerbaux et al., 2002; Pérez-Prieto et al., 2003). Já, a quantidade de polifenóis não afeta a produção de etil-fenóis (Chatonnet et al., 1997).

A razão de 4-etil-fenol para 4-etil-guaiacol, sendo dependente da região e variedade de uva, pode variar de 2 a 38 entre os vinhos (Henschke et al., 2004). Desta forma, razões de aproximadamente 10:1, para Cabernet Sauvignon, 9:1 para Shiraz, 8:1 para Merlot e 3,5:1 para Pinot Noir foram encontradas por Pollnitz et al. (2000). Como a concentração de ácido *p*-cumárico no vinho pode ser comparada a de 4-etil-fenol, variedades, como Pinot Noir, que apresentam menor teor de ácido *p*-cumárico (Goldberg et al., 1998) terão menor razão entre 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol (Pollnitz et al., 2000). Em mais de 180 vinhos chilenos, a razão foi cerca de nove (Majcenovic, 2003), e em vinhos franceses foi cerca de oito (Chatonnet et al., 1992). A elevação dos teores de etil-fenóis nos vinhos é favorecida pela temperatura mais elevada (Dias et al., 2003b; Jensen et al., 2009), pela maior concentração de oxigênio dissolvido (Ciani & Ferraro, 1997) e de açúcares residuais (Chatonnet et al. 1995), bem como pela menor concentração de etanol e de dióxido de enxofre (Froudière & Larue, 1988; Chatonnet et al., 1992, 1993; Gerbaux et al. 2000, Rodrigues et al., 2001; Barata et al 2008a; Jensen et al., 2009). Em pH 3,5 a síntese de etil-fenóis é menor que a pH 3,7 (Romano et al., 2008).

A presença de oxigênio estimula o crescimento e o metabolismo fermentativo de *Brettanomyces/Dekkera* (Silva et al., 2004). Em meio com glicose, o crescimento de *B.bruxellensis* é estimulado pela aeração moderada

(Uscanga et al., 2003), bem como no vinho (Du Toit et al., 2005). Quanto maior o suprimento de oxigênio, maior a produção de ácido acético e menor a produção de etanol (Ciani & Ferraro, 1997; Uscanga et al., 2003).

2.5. Medidas de prevenção e controle

Brettanomyces/Dekkera é especialmente difícil de controlar, porque sua presença pode passar despercebida até que o vinho esteja permanentemente afetado. Uma boa higiene da vinícola, unida a uma manutenção muito rigorosa das barricas e a presença nos vinhos de doses de SO₂ livre suficiente, protege eficazmente contra o aumento dos fenóis voláteis nos vinhos (Chatonnet et al., 1993).

As medidas de controle aconselhadas pelo Australian Wine Research Institute incluem: higiene geral, acompanhamento das concentrações de nutrientes residuais, otimização da efetividade das adições de SO₂, controle do pH, melhoramento dos procedimentos de clarificação do vinho e controle dos barris (Henschke et al., 2004).

A prevenção da contaminação por *Brettanomyces/Dekkera* em barricas impõe a limpeza e desinfecção da madeira com água quente (85-95°C) sob pressão, o que permite acelerar a limpeza sem afetar as fibras da madeira. Uma desinfecção mais profunda é obtida com vapor de água a 105°C e 0,5 bar durante 15 minutos, mas ainda assim é difícil de erradicar contaminações em barricas que foram usadas sem controle microbiológico e químico adequado (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004). O tratamento com vapor elimina a contaminação até 2 mm de profundidade da madeira, mas *D.*

bruxellensis pode ser encontrada até 8 mm, o que corresponde ao nível de penetração do vinho (Malfeito-Ferreira et al., 2004b). Couto et al. (2005b) constataram que a inativação térmica de *Brettanomyces/Dekkera* inicia a 50°C, em solução tampão e a 35°C, em vinho. A desinfecção dos tonéis ainda pode ser feita com a queima de enxofre ou injeção de gás sulfuroso no seu interior. As trasfegas dos vinhos com ajuste do nível de SO₂ livre e a desinfecção dos tonéis devem ser feitas obrigatoriamente a cada três meses, durante o primeiro ano de maturação (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

De acordo com Loureiro & Malfeito-Ferreira (2003), o controle adequado do SO₂ e a filtração ou a pasteurização são os métodos disponíveis para parar a ação de *Brettanomyces/Dekkera*. Essa levedura tolera 100 ppm de SO₂ total (30-40 ppm de SO₂ livre) (Froudiere & Larue, 1988). Cabe assinalar que o pH do vinho influi fortemente sobre a concentração do SO₂ molecular (ativo), assim em pH elevado se deve agregar doses maiores para ter o mesmo efeito que a pH baixo (Sudraut & Chauvet, 1985). Devido a isso, as indicações de concentrações de SO₂ livre que inibem *Brettanomyces/Dekkera* variam entre 20 (Chatonnet et al., 1993) a 40 mg/L (Barata et al., 2008a). Alguns autores recomendam considerar o nível de SO₂ molecular, que segundo Henick-Kling et al. (2000) deveria ser de 0,8 mg/L. Em meio de cultura, *Brettanomyces bruxellensis* é inibida com 0,25 a 0,5 mg/L de SO₂ molecular (Du Toit et al., 2005; Jensen et al., 2009). Se o pH do vinho for muito elevado, a concentração de SO₂ necessária para a prevenção de *Brettanomyces* terá de ser muito alta, quase impraticável. Em trabalho mais

recente, 49% de 35 isolados de *Brettanomyces* estudados demonstraram tolerância ao sulfito em doses acima de 30 mg/L (Conterno et al., 2006).

Segundo Malfeito-Ferreira et al. (2004a), o dimetil-dicarbonato (DMDC) é efetivo contra *Brettanomyces*, mas é dependente do conteúdo em etanol e do pH do vinho. *Brettanomyces intermedius* foi inibida por 250 mg/L de DMDC em mosto (pH 3,54) (Delfini et al., 2002). Uma população de 500 UFC/mL de *Dekkera bruxellensis* em vinho (12% de álcool e pH 3,5) foi morta com 100 mg/L de DMDC (Costa et al., 2008). O momento do engarrafamento é ideal para sua adição ao vinho, já que durante a vinificação DMDC inibe o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni* (Renouf et al., 2008).

De acordo com Sofos (1989) e Praphailong & Fleet (1997) *Brettanomyces/Dekkera* e diversas outras espécies de leveduras são inibidas pelo ácido sórbico, especialmente na faixa de pH do vinho (pH 3,0) e na concentração de 250 mg/L (Praphailong & Fleet, 1997). Somolinos et al. (2007), ao aplicarem campo elétrico pulsado (PEF) associado a ácido sórbico (2000 ppm e pH 3,8), observaram que *Dekkera bruxellensis* foi mais sensível ao ácido sórbico do que *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, alguns autores mostraram que o ácido sórbico não é efetivo na inibição de *Brettanomyces/Dekkera* (Warth, 1985; Restaino et al., 1982; Mihyar et al., 1997; Malfeito-Ferreira et al., 2004a). Segundo Beech & Carr (1955, 1958) *Brettanomyces* resiste a 500 mg/L de ácido sórbico, em ágar mosto sob pH de 5,4. Neves et al. (1994) demonstraram o crescimento de uma cepa de *Brettanomyces bruxellensis* em meio de cultura contendo até 350 ppm de ácido

sórbico. Várias cepas de *Dekkera* cresceram em meio mineral (pH 4,5) adicionado de 10 mg/L de cicloheximida e 250 mg/L de ácido sórbico (Rodrigues et al., 2001). Stratford (2006) relatou a resistência de *Dekkera bruxellensis* a aproximadamente 504 mg/L de ácido sórbico e a 244 mg/L de ácido benzóico. Essa controvérsia pode estar relacionada às características da cepa ou das condições de crescimento. Segundo Sofos (1989), a resistência de leveduras a inibição pelo sorbato depende da espécie e da cepa, concentração de sorbato, pH, nível de inóculo, temperatura de estocagem, e prévia exposição do organismo a baixos níveis de sorbato.

O efeito inibitório dos ácidos hidróxi-cinâmicos sobre *Dekkera* foi demonstrado por Harris et al. (2008, 2010). A concentração mínima inibitória de ácido ferúlico foi de 0,75 mM para *D. bruxellensis* em vinho. Os autores sugerem a manipulação das concentrações do ácido ferúlico para o controle da levedura.

Toxinas killer produzidas por *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii* e *K. lactis* têm demonstrado capacidade de eliminar *D. bruxellensis* no vinho (Comitini et al., 2004a; Sangorrín et al., 2008). A toxina killer (KpKt) de *Kluyveromyces phaffii*, ativa contra diversas leveduras que alteram os vinhos, foi purificada e caracterizada por Comitini et al. (2004b).

Na tentativa de remover fenóis voláteis de vinhos, Ugarte et al. (2003) utilizaram um sistema contínuo de filtração por osmose inversa e adsorção, obtendo uma redução de 76 a 87% desses compostos nos vinhos, embora houvesse também a remoção de alguns ésteres.

2.6. Problemática dos etil-fenóis no mundo vitivinícola

Brettanomyces/Dekkera tem causado alterações em vinhos de diferentes regiões produtoras do mundo (Chatonnet et al., 1992; Heimoff, 1996; Heresztyn, 1986; Ibeas et al., 1996; Fugelsang & Edwards, 2007), o que tem sido motivo de preocupação na área vitivinícola. Segundo estudo do Institut Technique de la Vigne et du Vin (ITV), Beaune, na região de Borgonha, a presença de *Brettanomyces/Dekkera* foi constatada em 50% dos vinhos sob maturação e em 25% de 44 garrafas de Pinot Noir (Gerbaux et al., 2000). Em outro estudo, a prevalência foi de 57% para 88 vinhos tintos, chegando a 2500 UFC/mL (Rodrigues et al., 2001).

A tabela 1 mostra as concentrações de etil-fenóis encontradas em vinhos de diferentes países, bem como o percentual acima dos limiares de preferência estipulados por Chatonnet et al. (1992), de 620 µg/L para 4-etil-fenol, 140 µg/L para 4-etil-guaiacol e 426 µg/L para uma mistura 10:1 de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol.

Tabela 1 – Concentrações de etil-fenóis e percentagens de vinhos tintos produzidos em diferentes regiões do mundo.

País	Número de amostras	Σ etil-fenóis > 426 $\mu\text{g/L}$	4-EF > 620 $\mu\text{g/L}$	Médias ($\mu\text{g/L}$)	Máximas ($\mu\text{g/L}$)	Referência
França	44 Pinot Noir			4-EF = 175 4-EG = 50		Gerbaux et al., 2000
França	83	36%	28%	4-EF = 440 4-EG = 82	4-EF = 6.047 4-EG = 1.561	Chatonnet et al., 1992
França	51			Σ etil-fenóis 350	Σ etil-fenóis 1.370	Romano et al., 2009
EUA	28 Pinot Noir		7,14%		4-EF = 1.193 4-EG = 403	Conterno & Henick-Kling, 2003
EUA	35 Cabernet Franc	37%				Arvick et al., 2002
Austrália	303 Safras 1996 a 2000		75%	4-EF = 847 a 1164		Henschke et al., 2004;
Austrália	Safra 2001	40%		4-EF = 490		Henschke et al., 2004
Austrália	61	59%	45%	4-EF = 795 4-EG = 99	4-EF = 2.660 4-EG = 437	Pollnitz et al., 2000
Portugal	88	48%	43%		4-EF = 4.430	Rodrigues et al., 2001
Itália	47	49%	19%			Di Stefano, 1985
Espanha	57			4-EF = 390 4-EG = 76	4-EF = 1500 4-EG = 420	López et al., 2002
Alemanha	589			4-EF = 17,7 4-EG = 4,7	4-EF = 2.583 4-EG = 517	Nikfardjam et al., 2009
Canadá	54 em barricas			4-EF = 58 4-EG = 86	4-EF = 586 4-EG = 411	Rayne & Eggers, 2007

4-EF, 4-etil-fenol; 4-EG, 4-etil-guaiacol.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1. Artigo 1: Presença de *Brettanomyces/Dekkera* e etil-fenóis em vinhos finos tintos brasileiros

(Artigo a ser traduzido e submetido à “Journal International des Sciences de La Vigne et du Vin”)

Larissa Dias de Ávila¹ e Marco Antônio Záchia Ayub²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brasil;

² Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência: Marco Antônio Záchia Ayub. Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048, e-mail: mazayub@ufrgs.br

Resumo

Objetivos: A levedura *Brettanomyces/Dekkera* pode causar alteração importante em vinhos tintos, com a formação de etil-fenóis, compostos de aromas desagradáveis. Este estudo teve como objetivo determinar a presença dessa levedura e de etil-fenóis em vinhos tintos brasileiros, bem como rever suas correlações com outras características químicas.

Métodos e Resultados: *Brettanomyces/Dekkera* foi quantificada por plaqueamento em meio seletivo, e etil-fenóis, por extração em fase sólida e cromatografia gasosa, em 126 amostras de vinhos tintos secos. SO₂ livre e total, álcool, extrato seco total, açúcares residuais, acidez total e volátil e pH também foram determinados. *Brettanomyces/Dekkera* estava presente em 26,98% das amostras, chegando a $2,25 \times 10^3$ UFC/mL. Os etil-fenóis ficaram acima do limiar de 426 µg/L em 46,03%. Os teores de SO₂ e açúcares residuais mostraram condições favoráveis a alterações microbianas.

Conclusões: A prevalência de *Brettanomyces/Dekkera* e as concentrações de etil-fenóis foram elevadas, considerando o impacto sensorial que provocam. O crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* foi dependente dos teores de SO₂ e de álcool. A passagem dos vinhos por barricas e as variedades não influenciaram os níveis de contaminação e de etil-fenóis.

Significância e impacto do estudo: O conhecimento dos níveis de contaminação e de etil-fenóis, e de suas relações com as características químicas dos vinhos, alertam para medidas mais eficazes na prevenção de *Brettanomyces/Dekkera*.

Palavras-chaves: *Brettanomyces*, *Dekkera*, 4-etil-fenol, 4-etil-guaiacol, vinho.

INTRODUÇÃO

Os vinhos, assim como os alimentos e diversas bebidas, podem sofrer alterações de origem química e microbiológica. Uma deterioração importante, especialmente em vinhos tintos, é ocasionada pelo desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera*, a qual forma etil-fenóis, compostos de aromas desagradáveis, descritos como *fenólicos, medicinais ou animais (couro, suor, estábulo)* (Chatonnet et al., 1990). Os etil-fenóis, 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, provêm da transformação de ácidos fenólicos (ácido ferúlico e *p*-cumárico) pela ação de uma cinamato descarboxilase, que forma vinil-fenóis, e de uma vinilfenol redutase, responsável pela formação dos etil-fenóis a partir dos vinil-fenóis (Heresztyn, 1986; Lauritsen et al., 1991; Chatonnet et al., 1992).

O momento em que surge a alteração tem sido após as fermentações, geralmente durante o processo de maturação em barricas (Chatonnet et al., 1990, 1992). O risco de degradação microbiana dos vinhos é particularmente elevado nas barricas de madeira, devido a sua dificuldade de limpeza e desinfecção (Malfeito-Ferreira et al., 2004). Mas o desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera* e a formação de etil-fenóis ocorrem também na garrafa (Pérez-Prieto et al., 2003) ou em tanques de concreto ou aço inoxidável (Rodrigues et al., 2001).

Todos os vinhos são suscetíveis a contaminação, mas alguns fatores a favorecem, como em uvas muito maduras, com alto conteúdo de

ácidos fenólicos e alto pH, macerações longas e fermentações difíceis, que atrasam a adição de SO₂ (Gerbaux et al., 2002; Pérez-Prieto et al., 2003). A elevação dos teores de etil-fenóis nos vinhos é favorecida pela temperatura e pH mais elevados (Dias et al., 2003; Romano et al., 2008), pela maior concentração de oxigênio dissolvido (Ciani & Ferraro, 1997) e de açúcares residuais (Chatonnet et al., 1995), bem como pela menor concentração de etanol (Gerbaux et al., 2000) e de dióxido de enxofre (Gerbaux et al., 2002; Chatonnet et al., 1992, 1993; Barata et al., 2008), não sendo afetada pela quantidade de polifenóis (Chatonnet et al., 1997). *Brettanomyces/Dekkera* toleram 100 ppm de SO₂ total (30-40 ppm de SO₂ livre) (Froudiere & Larue, 1988) e até 12% de álcool (Silva et al., 2004).

Dekkera pode utilizar ácido acético (Gerós et al., 2000) e etanol (Dias et al., 2003) como única fonte de carbono. Mas, etanol não é utilizado na presença das fontes de carbono normalmente presentes em vinho (Vigentini et al., 2008). Ela se multiplica no vinho pela utilização de pequenas quantidades de açúcares residuais (glicose, frutose, arabinose e trealose) (Chatonnet et al., 1995), arginina (Joseph & Bisson, 2004) e ácidos orgânicos (Vigentini et al., 2008). Teoricamente, concentrações de hexoses de 100 mg/L podem suportar populações de *Brettanomyces* de 10⁷ células/mL (Smith, 1998). A produção de aromas característicos de *Brettanomyces* pode ocorrer quando a população está entre 10² a 10³ células/mL (Henick-Kling et al., 2000), sendo que o maior aumento na concentração de etil-fenóis ocorre após a população atingir 2,5.10⁵ células/mL (Fugelsang & Zoecklein, 2003).

Brettanomyces/Dekkera tem causado alterações em vinhos de diferentes regiões do mundo (Chatonnet et al., 1992; Heimoff, 1996; Heresztyn, 1986; Ibeas et al., 1996; Fugelsang & Edwards, 2007), o que tem sido motivo de preocupação na área vitivinícola. Estudos mostraram a presença de *Brettanomyces/Dekkera* até $2,5 \cdot 10^3$ UFC/mL em 25% de 44 garrafas de Pinot Noir (Gerbaux et al 2000) e em 47% de 88 vinhos portugueses (Rodrigues et al., 2001). Os valores médios e máximos (em µg/L) encontrados chegaram a 1164 e 6047, para 4-etil-fenol, e 99 e 1561, para 4-etil-guaiacol, respectivamente (Chatonnet et al., 1992; Gerbaux et al., 2000; Pollnitz et al., 2000; Rodrigues et al., 2001; López et al., 2002; Henschke et al., 2004; Nikfardjam et al., 2009; Romano et al., 2009).

Nos vinhos brasileiros desconhecemos a problemática relacionada à presença de *Brettanomyces/Dekkera*, portanto este trabalho teve como objetivo determinar a presença dessas leveduras e de etil-fenóis em vinhos finos tintos, bem como correlacionar com suas características químicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Vinhos

Foram analisadas 126 amostras de 63 vinhos tintos secos, obtidos por doação de 26 vinícolas situadas na Serra Gaúcha (latitude 29° Sul, longitude 51° Oeste), maior região produtora do Brasil, abrangendo os municípios de Bento Gonçalves e Farroupilha (RS). A maioria das vinícolas participou com duas garrafas de variedades Cabernet Sauvignon e/ou duas de

Merlot, totalizando 54 e 63, respectivamente, incluídas 3 amostras de tanques. Sete amostras pertenceram a outras variedades, e duas foram misturas das variedades citadas. A maioria dos vinhos pertencia às safras de 2002 a 2008, sendo 80% de 2004 e 2005.

2. Meio de cultura e técnica de análise microbiológica

Volumes de vinho de 0,1, 1 e 20 mL, foram inoculados em meio de cultura seletivo para *Brettanomyces/Dekkera* (DBDM), descrito por Rodrigues et al. (2001), modificado pela adição de 5 g/L de glicose e 100 mg/L de cloranfenicol. O meio foi esterilizado por filtração e o agar autoclavado separadamente. O volume de 0,1 mL foi espalhado sobre o meio, enquanto os demais foram filtrados por membrana. Após a abertura da garrafa, parte do vinho foi congelada para análises químicas posteriores.

3. Reagentes e padrões

Padrões puros de ácido *p*-cumárico, 4-etil-guaiacol, 4-etil-fenol e 3,4-dimetil-fenol foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), assim como cicloheximida. Cloranfenicol foi fornecido pela empresa Northeast General Pharmaceutical Factory (Shenyang, China). Todos os demais produtos químicos possuíam grau analítico.

4. Análises físico-químicas

Após descongelamento das amostras, foram determinados: SO₂ livre, pela aeração da amostra acidificada, fixação em solução de hidróxido de

sódio em Oenological Analyser modelo Quick equipado com SO₂ Bubble (Gibertini, Milano, Italy) e titulação com iodo; SO₂ total, através de arraste de vapor em destilador em Oenochemical Distilling Unit modelo DEE (Gibertini, Milano, Italy) e titulação com iodo; álcool e extrato seco total, em aparelho Alcolyzer Wine e densímetro modelo DMA 4500 (Anton Paar[®] GmbH, Graz, Austria); açúcares residuais, acidez total e volátil e pH por espectroscopia em infravermelho no WineScan[™] FT120 (FOSS, Denmark).

5. Determination de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol por cromatografia gasosa

5.1. Preparação de amostras

Foi utilizada a extração em fase sólida com cartuchos de polidivinilbenzeno Lichrolut-EN – 200mg (Merck). De acordo com López et al. (2002), o cartucho foi condicionado com 4 mL de diclorometano, 4 mL de metanol e 4 mL de solução de etanol a 12% (v/v). Posteriormente, 50 mL de vinho filtrado e adicionado do padrão interno (3,4-dimetil-fenol) foram passados através do cartucho sob fluxo de 2 mL/min. O cartucho foi lavado com 3 mL de água Milli-Q, submetido a secagem pela passagem de ar durante 30 minutos e finalmente, os etil-fenóis foram eluídos com 1,4 mL de diclorometano. O eluato foi conservado em freezer até o momento da análise.

As curvas geraram coeficientes de determinação (r^2) de 0,99979 e 0,99987 para 4-etil-fenol (1 a 250 mg/L) e 4-etil-guaiacol (1 a 30 mg/L), respectivamente. As recuperações com soluções padrões foram de 98,54% e 105,4%, e com amostras adicionadas de padrões foram de 101,1% e 96,19%, para 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, respectivamente.

5.2. Condições analíticas

A análise foi conduzida em cromatógrafo gasoso modelo CG-14B (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipado com detector de ionização de chama (FID). As condições analíticas determinadas foram: H₂ como gás de arraste, a 1 mL/min; Volume de injeção: 1 µL; Injetor no modo split (razão 1:10, 250°C); Coluna DB-wax (60m x 0,25mm d. i. x 0,25 µm espessura do filme) da Agilent J&W (Folsom, USA); Programa de temperatura da coluna: 50°C por 1 min., seguindo quatro rampas consecutivas: 180°C (10°C/min.), 205°C (3°C/min.), 215°C (2°C/min.), 230°C (15°C/min.), e 230°C durante 30 minutos. O detector foi mantido a 250°C.

6. Análise estatística

Análises de regressão linear e de correlação de Spearman (r_s) foram feitas com objetivo de correlacionar a contagem de leveduras e as concentrações de etil-fenóis, entre elas e com os parâmetros físico-químicos. O teste-t foi usado para comparação de médias. As análises foram feitas no software Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation) e SPSS 16.0 for Windows (SPSS Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e quatro amostras (26,98 %) (Anexo 1) mostraram formação de colônias típicas de *Brettanomyces/Dekkera*, conforme descrição de Rodrigues et al. (2001), que chegaram até $2,25 \cdot 10^3$ UFC/mL (Tabela 1).

Esses valores são similares aos estudos prévios de Gerbaux et al. (2000) e Rodrigues et al. (2001), o que é motivo de preocupação devido as dificuldades de controle dessa levedura. O mesmo pode ser referido aos valores de etil-fenóis encontrados.

Chatonnet et al. (1992) estabeleceram os limiares de preferência dos etil-fenóis, ou seja, a concentração máxima admissível, em um vinho padrão, acima da qual mais do que 50% dos degustadores rejeitaram a amostra. Os valores encontrados foram de 620 µg/L para 4-etil-fenol, 140 µg/L para 4-etil-guaiacol e 426 µg/L para uma mistura 10:1 de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol. As percentagens de amostras acima desses limiares e as concentrações máximas dos etil-fenóis (Tabela 1) são elevadas, considerando o impacto sensorial que provocam, entretanto estão dentro da faixa encontrada por outros autores (Di Stefano, 1985; Chatonnet et al., 1992; Pollnitz et al., 2000; Rodrigues et al., 2001; Arvik et al., 2002; López et al., 2002; Henschke et al., 2004).

As contagens de *Brettanomyces/Dekkera* correlacionaram (nível de significância de 0,01) com as concentrações de 4-etil-fenol ($r_s = 0,397$) e 4-etil-guaiacol ($r_s = 0,318$) (Figura 1a), entretanto, os etil-fenóis estiveram presentes em um número superior de amostras, o que também foi observado por Rodrigues et al. (2001). Esse fato levou as seguintes suspeitas: produção de etil-fenóis anterior aos processos que reduzem a carga microbiana para o engarrafamento; aparente falha do meio de cultura ou da técnica de análise na recuperação das leveduras; as células poderiam estar no estado não cultivável, estudado por Millet & Lonvaud-Funel (2000), viáveis, mas incapazes de crescimento em meio de cultura; ação de *Pichia*, *Candida* e *Lactobacillus*,

microrganismos capazes de formar etil-fenóis em baixas concentrações (Chatonnet et al., 1995, 1997; Edlin et al., 1995; Dias et al., 2003a; Couto et al., 2006; Rivas et al., 2009).

Tabela 1 – Determinação de *Brettanomyces/Dekkera* (UFC/mL), 4-etil-fenol (4-EF) e 4-etil-guaiacol (4-EG), em µg/L, e percentagens acima do limiar de preferência de 126 amostras de vinhos tintos varietais brasileiros.

	<i>Brett/Dekkera</i>	4-etil-fenol	4-etil-guaiacol	EF/EG
Mínimo	0	0	0	1,29
Máximo	2.250,00	3.819,65	259,67	21,98
Média	76,03±314,42	593,40±694,62	65,24±52,69	7,77±4,56
CV (%)	413,56	117,05	80,77	53,69
Acima do limiar de preferência (%)		34,92	7,93	46,03*

CV, coeficiente de variação; * refere-se à mistura (10:1) de 4-EF e 4-EG.

Do ponto de vista microbiológico, cada garrafa deveria ser avaliada individualmente, devido à variação entre garrafas do mesmo vinho, observada também por outros autores (Chatonnet et al., 1993; Di Stefano, 1985). Em nove vinhos a presença da levedura ocorreu em apenas uma das garrafas (Anexo 1). Já a variação na concentração de etil-fenóis foi menor e menos freqüente. As diferentes condições ambientais de cada tanque, barrica ou garrafa, ou a maior carga microbiana de materiais e equipamentos no início da operação de engarrafamento podem ser responsáveis pelas variações.

As concentrações de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol correlacionaram ($r_s = 0,860$), e a razão entre elas foi 1,37 a 21,98, o que se aproxima da faixa encontrada por Pollnitz et al. (2000) e Henschke et al. (2004), de 1,6 a 38. Essa razão depende da relativa abundância dos precursores, o que varia com a

região e variedade de uva (Pollnitz et al., 2000; Henschke et al., 2004; Romano et al., 2008).

Pela análise de correlação de Spearman, somente SO₂ total e livre, álcool e acidez volátil (Tabela 2) correlacionaram com as contagens de *Brettanomyces/Dekkera* ou concentrações de etil-fenóis. Um número elevado de amostras (37,3%) apresentou níveis de SO₂ livre abaixo da média, favoráveis ao desenvolvimento microbiano. A maior parte delas apresentou níveis elevados de etil-fenóis (Figura 1b) e contagens de *Brettanomyces/Dekkera* (Figura 1c), o que justifica a correlação, mesmo que fraca, entre as concentrações de 4-etil-fenol e de SO₂ livre e total ($r_s = -0,177$ e $-0,176$, respectivamente). Um teor de SO₂ livre de 30 mg/L (Ribéreau-Gayon et al., 2003) a 40 mg/L (Gerbaux et al., 2000) é necessário para a eliminação total das populações viáveis de *Brettanomyces/Dekkera*. Em vinhos com pH elevado deve-se agregar doses maiores de SO₂ para ter o mesmo efeito que a pH baixo (Sudraut & Chauvet, 1985), devendo ser mantido com 0,8 mg/L de SO₂ molecular (Henick-Kling et al., 2000). Sabe-se que a fração SO₂ livre diminui, através da combinação e oxidação, com o tempo de garrafa, o que talvez justifique valores tão baixos. Entretanto, em 16% das amostras os níveis de SO₂ total ficaram abaixo de 20 mg/L, o que permite suspeitar que nesses casos a adição foi feita somente uma vez, deixando o vinho desprotegido.

Tabela 2 - Parâmetros químicos das 126 amostras de vinhos tintos varietais brasileiros.

	Mínimo	Máximo	Média	CV (%)
SO ₂ total (mg/L)	3,07	137,43	50,36±28,92	57,43
SO ₂ Livre (mg/L)	0	29,63	6,53±6,73	103,01
pH [†]	3,4	4,04	3,73±0,13	3,42
Álcool (% vol.)	10,83	14,05	12,64±0,66	5,25
Extrato seco total (g/L)	22,52	38,78	29,51±2,69	9,13
Açúcares totais (g/L)	1,1	6,7	3,94±1,22	30,94
Acidez volátil (g/L)	0,65	1,17	0,90±0,11	12,49
Acidez total [†] (g/L)	4,56	7,33	5,84±0,49	8,38

CV, coeficiente de variação; acidez volátil dada em g de ácido acético/L; acidez total dada em g de ácido tartárico/L.

[†] A acidez dos vinhos diminuiu pelo congelamento das amostras, portanto os valores de pH estão aproximadamente 0,11 acima dos valores reais.

O teor alcoólico correlacionou fracamente ($r_s = -0,282$) com as contagens de *Brettanomyces/Dekkera*, mas o maior número de amostras com contagens altas possuíam até 13% (v/v) de álcool (Figura 1d), concentração mínima inibitória demonstrada por outros autores (Froudière & Larue, 1988; Chatonnet et al 1993; Rodrigues et al., 2001; Dias et al., 2003).

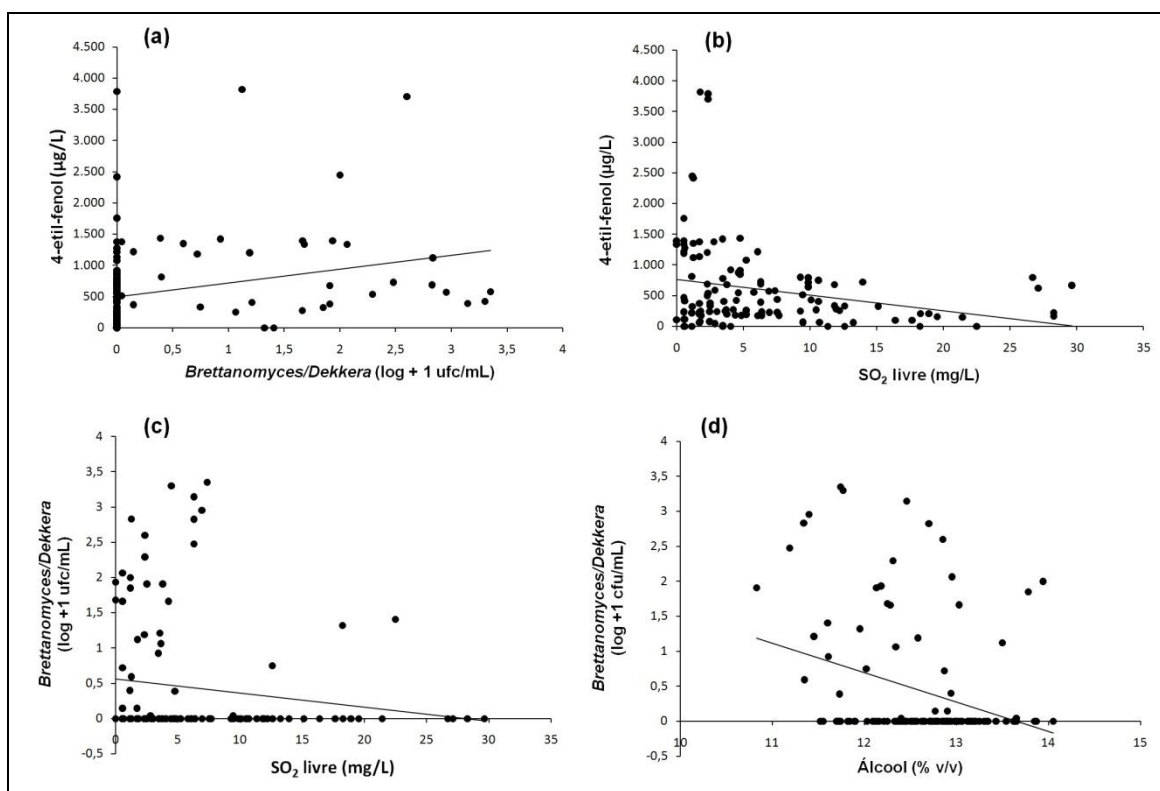


Figura 1. Correlação entre 4-etil-fenol e (a) contagens de *Brettanomyces/Dekkera* log+1 e (b) SO₂ livre; relação entre contagens de *Brettanomyces/Dekkera* log+1 e (c) SO₂ livre e (d) álcool.

Os gráficos de regressão mostraram que a faixa intermediária de 5,5 a 6,7 g ác. tartárico/L de acidez total foi preferencial para *Brettanomyces/Dekkera* e etil-fenóis, distribuindo-se amplamente na faixa de pH encontrada nos vinhos (dados não demonstrados). A acidez volátil foi elevada, considerando a percepção sensorial em torno de 0,6 a 0,9 g ác. acético/L (Ough & Amerine, 1988). Vinte e três amostras apresentaram acidez volátil acima de 1 g/L, o que é prejudicial ao aroma do vinho. Uma fraca correlação ($r_s = 0,193$) com as contagens sugere alguma produção de ácido acético por *Brettanomyces/Dekkera*, em vista dos açúcares residuais elevados. Em geral, a produção de ácido acético está relacionada à concentração de

açúcar no meio (Ciani & Ferraro, 1997; Dias et al., 2003; Abbott et al., 2005; Romano et al., 2008; Vigentini et al., 2008).

A Legislação Brasileira estabelece o teor máximo de 5 g/L de açúcares residuais para vinhos secos, mas o vinho verdadeiramente seco, obtido pela fermentação completa dos açúcares tem até 1 g/L (Ough & Amerine, 1988). Vinte e três amostras (18,25%) apresentaram níveis de açúcares acima do previsto pela Legislação e favoráveis ao desenvolvimento microbiano. Segundo Chatonnet et al. (1995), níveis de 300 mg/L de açúcares residuais são suficientes para formar etil-fenóis em uma concentração correspondente ao limite de percepção. Silva et al. (2004) demonstraram que, quando *B. bruxellensis* ISA 1791 foi cultivada aerobicamente em meio mineral com glicose como única fonte de carbono e energia, o aumento da concentração de açúcar de 0,1 para 12% não promoveu um aumento das taxas específicas de crescimento. Já que concentrações tão baixas de açúcares são capazes de provocar o aumento de etil-fenóis a níveis elevados, é possível pensar que concentrações maiores não fariam diferença. De fato, a falta de correlação entre os açúcares residuais e o número de *Brettanomyces/Dekkera* (ou a concentração de etil-fenóis) leva a mesma conclusão.

Informações sobre o uso ou não de barricas na elaboração dos vinhos foram fornecidas por 13 vinícolas (71 amostras). As altas contagens dos vinhos de uma única vinícola, que participou com 8 amostras, elevaram a média dos vinhos que não passaram por barricas (Tabela 3), resultando em diferença estatística. Já, os etil-fenóis não foram diferentes entre os dois grupos de amostras. A alteração dos vinhos por *Brettanomyces/Dekkera*

sempre esteve associada ao período de maturação em barricas de madeira, entretanto neste trabalho não foi possível considerar diferenças entre os recipientes. As barricas de madeira apresentam uma série de fatores que favorecem a contaminação (oxigênio, porosidade, volume menor, etc) (Suarez et al., 2007), mas como observado por alguns autores (Rodrigues et al., 2001; Pérez-Prieto et al., 2003; Coulon et al., 2010), o problema associado a essas leveduras não é exclusivo de longos períodos de maturação em barricas. O desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera* e produção de etil-fenóis é influenciada pelas práticas de vinificação (Chatonnet et al., 1992, 1995) e tempo de estocagem do vinho (Pérez-Prieto et al., 2003), o que pode ter relação com os resultados obtidos. As vinícolas brasileiras que dispõem e utilizam barricas de carvalho em grande escala ainda são poucas, devido ao alto custo. Desta forma, parece que o uso em pequena escala e por períodos curtos tem favorecido o maior cuidado durante a maturação, comparado com a estocagem em tanques de aço inoxidável ou de concreto.

Tabela 3 – Médias das contagens de leveduras e das concentrações de etil-fenóis de amostras que passaram e não passaram por estágio em barrica.

	Com barrica	Sem barrica
Total de amostras	39	32
Amostras positivas para <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	8	14
<i>Brettanomyces/Dekkera</i> (UFC/mL)*	9,91	261,52
4-etil-fenol (µg/L)	610,66	495,13
4-etil-guaiacol (µg/L)	65,84	59,08

* - Médias diferentes pelo teste-t.

A presença de *Brettanomyces/Dekkera* demonstrou não estar ligada a variedade de uva. Pelas características de pH e extrato seco total (Tabela 4), os vinhos Cabernet Sauvignon estavam levemente mais propensos a alteração microbiana do que os vinhos Merlot, entretanto, não apresentaram maior prevalência (10,3 e 11,1 %, respectivamente) ou contagens de *Brettanomyces/Dekkera*. Isso sugere que as práticas de vinificação sejam semelhantes para os dois tipos de vinhos. A razão entre 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol foi maior para Cabernet Sauvignon, o que está ligada à maior concentração de ácido *p*-cumárico na variedade (Pollnitz et al., 2000). Os valores se aproximaram daqueles encontrados por outros autores, 10:1, para Cabernet Sauvignon e 8:1 para Merlot (Pollnitz et al., 2000), 8:1 para vinhos tintos de Bordeaux (Chatonnet et al., 1992) e aproximadamente 9:1, para vinhos chilenos (Majcenovic, 2003).

Tabela 4 - Médias das contagens de *Brettanomyces/Dekkera* e dos parâmetros químicos nos vinhos das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot.

	<i>Cabernet Sauvignon</i>	<i>Merlot</i>
<i>Brettanomyces/Dekkera</i> (UFC/mL)	26,91	59,49
4-etil-fenol (µg/L)	628,71	553,45
4-etil-guaiacol (µg/L)	65,60	65,88
4-EF/4-EG*	9,24	7,51
pH *	3,78	3,68
Acidez total (g/L) *	5,96	5,76
Acidez volátil (g/L) *	0,93	0,87
Extrato seco total (g/L) *	30,33	28,76
SO ₂ total (mg/L)	49,72	51,67
SO ₂ livre (mg/L)	6,67	5,99
Teor alcoólico (% vol.)	12,60	12,67
Açúcares residuais (g/L)	4,12	3,95

* - Médias diferentes pelo teste-t; acidez volátil dada em g de ácido acético/L; acidez total dada em g de ácido tartárico/L.

CONCLUSÕES

A prevalência de *Brettanomyces/Dekkera* e as concentrações de etil-fenóis nos vinhos foram similares aos de outras regiões. Mas, considerando o impacto sensorial que provocam, apresentaram valores elevados. Os teores de SO₂ e açúcares residuais mostraram condições favoráveis a alterações microbianas. O crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* foi dependente dos teores de SO₂ e de álcool, enquanto pareceu indiferente às variações de açúcar, acidez e extrato seco total. Apesar da correlação, os etil-fenóis foram mais freqüentes do que *Brettanomyces/Dekkera*. A passagem dos vinhos por

barricas e as variedades, Cabernet Sauvignon e Merlot, não influenciaram os níveis de contaminação e de etil-fenóis. A razão entre 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol foi maior para Cabernet Sauvignon.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao Eng. Agr. Paulo Gustavo Celso (LANAGRO) e as vinícolas participantes. Suporte financeiro para este trabalho foi fornecido pela CAPES, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT D.A., HYNES S.H. and INGLEDEW W.M., 2005. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechn.*, **66**, 641-647.
- ARVIK T.J., CONTERNO L. and HENICK-KLING T., 2002. *Brettanomyces bruxellensis* in New York State wines: a global issue. In: *31st Ann. New York Wine Ind. Works. New York*, p. 124-125.
- BARATA A., CALDEIRA J., BOTELHEIRO R., PAGLIARA D., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V., 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 201-207.
- CHATONNET P., BOIDRON J. and PONS M., 1990. Elevage des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sci. Alim.*, **10**, 565-587.
- CHATONNET P., DUBOURDIEU D. and BOIDRON N., 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic bacteria on the ethylphenol

- content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 463-468.
- CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. and LAVIGNE V., 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.*, **62**, 191-202.
- CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. and PONS M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.*, **60**, 165-178.
- CHATONNET P., VIALA C. and DUBOURDIEU D., 1997. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 443-448.
- CIANI M. and FERRARO L. 1997. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J. Sci. Food Agric.*, **75**, 489-495.
- COULON, J., PERELLO M. C., LONVAUD-FUNEL A., REVEL G.; and RENOUF V., 2010. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. *J. of Appl. Microbiol.*, **108**, 1450-1458.
- COUTO J.A., CAMPOS F.M., FIGUEIREDO A.R. and HOGG T.A., 2006. Ability of Lactic Acid Bacteria to Produce Volatile Phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 166-171.
- DI STEFANO R., 1985. The ethyl phenols in wines. *Vignevini*. **12**, 35-38.
- DIAS L., PEREIRA-DA-SILVA S., TAVARES M., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V., 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* **20**, 377-384.

- EDLIN D.A.N., NARBAD A., DICKINSON J.R., and LLOYD D., 1995. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS-Microbiol. Lett.*, **125**, 311–316.
- FROUDIÉRE I. and LARUE F., 1988. Conditions de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. *Conn. vigne vin.* **2**, 296–303.
- FUGELSANG K.C. and EDWARDS C.G., 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2th ed., Ed.Springer, New York.
- FUGELSANG K.C. and ZOECKLEIN B.W., 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) wines. 2003. *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**, 294-300.
- GERBAUX V., JEUDY S. and MONAMY C., 2000. Etude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bull. OIV*, **73**, 581-599.
- GERBAUX V., VINCENT B. and BERTRAND A., 2002. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53**, 131–137.
- GERÓS H., CÁSSIO F. and LEÃO C., 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J. Food Prot.*, **63**, 96-101.
- HEIMOFF S., 1996. Brett study yields surprises. *Wine Business Monthly.* **3**, 37-40.
- HENICK-KLING T., EGLI C., LICKER J., MITRAKUL C. and ACREE T.E., 2000. *Brettanomyces* in wine. *In: Fifth Int. Symp. Cool Climate Vitic. Oenol. Melbourne.* Winetitles, Melbourne, p. 1-7.

- HENSCHKE P., BELLON J., CAPONE D., COULTER A., COWEY G., COZZOLINO D., CURTIN C., FIELD J., GISHEN M., GRAVES P., LATEY K., ROBINSON E., FRANCIS I.L., LOPES M.B. and GODDEN P., 2004. Incidence and control of *Brettanomyces*: The Australian perspective. *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 304-A.
- HERESZTYN T., 1986. Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts. *Arch. Microbiol.*, **146**, 96–98.
- IBEAS J.I., LOZANO I., PERDIGONES F. and JIMENEZ J., 1996. Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a Nested PCR method. *Appl Environm. Microbiol.* **62**, 998-1003.
- JOSEPH C.M.L. and BISSON L., 2004. Physiological diversity of *Brettanomyces/Dekkera* isolated from wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 302-A.
- LAURITSEN F.R., NIELSEN L.T., DEGN H., LLOYD D. and BOHATKA S., 1991. Identification of dissolved volatile metabolites in microbial cultures by membrane inlet tandem mass-spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **20**, 253-258.
- LÓPEZ R., AZNAR M., CACHO J. and FERREIRA V., 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromat. A.* **966**, 167-177.
- MAJCENOVIC A. B., 2003. Etilfenoles como indicadores de la actividad de *Brettanomyces*. In: *IX Congr. Latinoamer. Vitic. Enol.* Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile, p. 205.

- MALFEITO-FERREIRA M., LAUREANO P., BARATA A., D'ANTUONO I., STENDER H. and LOUREIRO V., 2004. Effect of different barrique sanitation procedures on yeasts isolated from the inner layers of wood. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 304-A.
- MILLET V. and LONVAUD-FUNEL A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, 136-141.
- NIKFARDJAM M.P., MAY, B. and TSCHIRSCH, C., 2009. 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol contents in bottled wines from the German 'Württemberg' region. *Eur. Food Res. Technol.*, **230**, 333–341.
- OUGH C.S. and AMERINE M.A., 1988. *Methods for analysis of musts and wines*. 2th ed., Ed. John Wiley & Sons, New York.
- PÉREZ-PRIETO L.J., LÓPEZ-ROCA J.M., MARTÍNEZ-CUTILLAS A. PARDO-MÍNGUEZ F. and GÓMEZ-PLAZA E., 2003. Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *J.Agric. Food Chem.* **51**, 5444-5449.
- POLLNITZ A.P., PARDON K.H. and SEFTON M.A., 2000. Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *J. Chromat. A*. **874**, 101-109.
- RIBÉREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A. and DUBOURDIEU D. 2003. *Tratado de Enología: Química del Vino, Estabilización y Tratamientos*. v. 2, Hemisfério Sur, Buenos Aires. 537 p.

- RIVAS B., RODRÍGUEZ H., CUIEL J.A., LANDETE J.A. and MUÑOZ, R., 2009. Molecular Screening of Wine Lactic Acid Bacteria Degrading Hydroxycinnamic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 490–494.
- RODRIGUES N., GONÇALVES G., PEREIRA-DA-SILVA S., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 588-599.
- ROMANO A., PERELLO M.C., DE REVEL G. and LONVAUD-FUNEL A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces /Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1577–1585.
- ROMANO A., PERELLO M.C., LONVAUD-FUNEL A., SICARD G. and DE REVEL, G., 2009. Sensory and analytical re-evaluation of “Brett character”. *Food Chem.*, **114**, 15–19.
- SILVA P., CARDOSO H. and GERÓS H., 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp.. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 65-72.
- SMITH M.T., 1998. *Brettanomyces* Kufferath and van Laer. 450–453 In: *The Yeasts*. 4th edition, Elsevier, New York.
- SUÁREZ R., SUÁREZ-LEPE J. A., MORATA A. and CALDERÓN F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.*, **102**, 10–21.
- SUDRAUT P., and CHAUVET S., 1985. Activité antilevure de l'anhydride sulfureux moléculaire. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **19**, 31–40.
- VIGENTINI I., ROMANO A., COMPAGNO C., MERICO A., MOLINARI F., TIRELLI A., FOSCHINO R. and VOLONTERIO G., 2008. Physiological

and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1087–1096.

3.2. Artigo 2: Crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* durante a vinificação em escala industrial.

(Artigo a ser traduzido e submetido à “Journal International des Sciences de La Vigne et du Vin”)

Larissa Dias de Ávila¹ e Marco Antônio Záchia Ayub²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brasil;

² Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência: Marco Antônio Záchia Ayub. Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048, e-mail: mazayub@ufrgs.br

Resumo

Objetivos: As leveduras pertencentes ao gênero *Brettanomyces/Dekkera* são conhecidas em enologia por provocar graves defeitos de aroma, que determinam a deterioração do vinho. Esse trabalho teve como objetivo observar a presença e o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* durante as etapas da vinificação em escala industrial, utilizando diferentes meios de cultura seletivos.

Métodos e Resultados: A vinificação de uvas Cabernet Sauvignon em escala industrial foi acompanhada através de análises em meios seletivos para *Brettanomyces/Dekkera*. Parâmetros químicos e etil-fenóis também foram avaliados. As amostras das uvas mostraram números elevados de leveduras, entretanto o primeiro indício da presença de *Brettanomyces/Dekkera* ocorreu no mosto. O odor de 4-etil-fenol no meio de Couto et al. (2005) foi um forte indicador de sua presença, que permaneceu positiva até a estocagem, mas sempre em números baixos. Os meios não foram completamente seletivos, especialmente para uvas e mostos. A população de leveduras não-*Saccharomyces* reduziu com a fermentação alcoólica e a correção do SO₂, mas aumentou durante a fermentação malolática, com as operações de *bâtonnage*. O período de cinco meses não foi suficiente para produção de etil-fenóis no vinho, provavelmente devido à baixa população de *Brettanomyces/Dekkera*.

Conclusões: *Brettanomyces/Dekkera* não foi detectada na uva, mas deixou a suspeita de estar presente no mosto, permanecendo no vinho até a estocagem. A baixa população de *Brettanomyces/Dekkera* não foi suficiente para formar

etil-fenóis durante cinco meses após o esmagamento. Os meios não foram seletivos, especialmente para amostras de uvas e mostos.

Significância e impacto do estudo: *Brettanomyces/Dekkera* pode estar presente do mosto ao final da fermentação malolática, mas não em população capaz de produzir etil-fenóis.

Palavras-chaves: *Dekkera*, *Brettanomyces*, vinho, vinificação, etil-fenóis.

INTRODUÇÃO

As leveduras pertencentes ao gênero *Brettanomyces/Dekkera* são conhecidas em enologia por provocar graves defeitos de aroma, que determinam a deterioração do vinho. O problema mais freqüente ocasionado pelo desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera* no vinho consiste na transformação de ácidos fenólicos (ácido ferúlico e *p*-cumárico) em etil-fenóis (Heresztyn, 1986, Lauritsen et al., 1991, Chatonnet et al., 1992), que possuem aromas fenólicos, medicinais ou animais (couro, suor de cavalo, estábulo) (Chatonnet et al., 1990). A contaminação mais freqüente ocorre nos vinhos tintos, durante o processo de maturação em barricas (Chatonnet et al., 1990, 1992). Entretanto, mais recentemente têm se observado que a produção de etil-fenóis também ocorre em curto espaço de tempo, como quatro meses após a fermentação, em vinhos estocados em tanques de concreto ou aço inoxidável (Rodrigues et al., 2001), ou mesmo na garrafa (Pérez-Prieto et al., 2003).

A origem primária de *Brettanomyces/Dekkera* ainda permanece obscura (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Inicialmente, Van der Walt & van Kerken (1961) e Larue et al. (1991) sugeriram que a infecção se devia a algum foco dentro da vinícola, pois não a detectaram na uva. *Brettanomyces/Dekkera* sempre foi considerada ausente (Fleet & Heard, 1993) ou rara na superfície das bagas (Henick-Kling et al., 2000). Mais recentemente, Gadoury et al. (2002) demonstraram sua presença em uvas infectadas com míldio, e Renouf & Lonvaud-Funel (2007) detectaram-na utilizando um meio de enriquecimento. Entretanto, *Brettanomyces/Dekkera* não tem sido detectada em uvas em outros

estudos (Combina et al., 2005, Renouf et al., 2006, Barata et al., 2008a, 2008b), o que é considerado difícil devido a baixa população (Renouf et al., 2006). Embora já tenha sido isolada em mostos sob fermentação em várias regiões do mundo (Henick-Kling et al., 2000), elas não estão entre os organismos dominantes.

Acredita-se que *Brettanomyces/Dekkera* se espalha numa vinícola pela presença de um vinho contaminado, pela sanitização deficiente das superfícies de contato, pela mosca comum das frutas (Zoecklein et al., 2001), através de uvas com podridão (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003), ou ainda pelo ar ambiente da vinícola (Connel et al., 2002).

Devido à falta de métodos adequados, a quantificação de *Brettanomyces/Dekkera* durante a vinificação tem sido difícil, entretanto, alguns estudos já revelam algumas informações. *Brettanomyces bruxellensis* foi detectada, com a técnica de PCR-DGGE, sobre a película nos primeiros estádios de desenvolvimento das uvas, em vinhos engarrafados há bastante tempo, na água de lavagem e na superfície das barricas (Renouf et al., 2007). Durante a maturação do vinho até o engarrafamento foi a única espécie encontrada. *D. bruxellensis* cresce bem em mosto e vinho tinto sem inibição por *Saccharomyces* (Dias et al., 2003; Renouf et al., 2006). *Brettanomyces* foi a única levedura viável (10^4 UFC/mL) após sete dias da fermentação alcoólica. Após o 20º dia, seu crescimento chegou a 10^5 UFC/mL. Em escala industrial, *Brettanomyces* foi detectada somente após o final da fermentação alcoólica, predominando entre as não-*Saccharomyces* até o final da fermentação malolática (Renouf et al., 2006).

De acordo com Loureiro & Malfeito-Ferreira (2003), a dificuldade de detecção de *Brettanomyces/Dekkera* se deve a utilização de meios de cultura inadequados e de períodos curtos de incubação. Apesar da alta especificidade das técnicas moleculares usadas na detecção de leveduras, o crescimento em meios de cultura ainda é o método mais simples, barato e preciso para a quantificação, apresenta baixo limite de detecção e parte sempre de células viáveis. Em geral, *Brettanomyces/Dekkera* apresenta como inconveniente o crescimento lento em meios de cultura, levando de 15 a 20 dias (Smith et al., 1990; Rodrigues et al., 2001). Normalmente a cicloheximida é utilizada para inibir o crescimento de fungos filamentosos e de outras leveduras (Loureiro, 2000; Zoecklein et al., 2001). A produção de ácido acético é indicativa da sua presença (Gerós, et al., 2000; Freer, 2002; Freer et al., 2003), sendo detectada no meio pelo uso de um indicador de pH. O ácido *p*-cumárico também é adicionado ao meio, já que é substrato para a produção de 4-etil-fenol, facilmente detectado pelo odor.

Rodrigues et al. (2001), entre várias formulações, definiram um meio seletivo e diferencial (DBDM) para *Brettanomyces/Dekkera*, com base nos componentes citados. O uso de etanol como única fonte de carbono providenciou a inibição de *Hanseniaspora*. Couto et al. (2005) desenvolveram uma metodologia baseada em meio líquido, bastante sensível (1-10 céls/mL) e simples para ser usada em vinícolas. A detecção de *Brettanomyces/Dekkera* consiste na observação da turbidez e da presença do odor de 4-etil-fenol no meio. O tempo de incubação até o resultado positivo permite ter uma idéia do nível de contaminação.

Esse trabalho teve como objetivo observar a presença e o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* durante as etapas da vinificação em escala industrial, utilizando diferentes meios de cultura seletivos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Processo de vinificação

A vinificação foi conduzida em uma vinícola localizada no Distrito de Pinto Bandeira, no Município de Bento Gonçalves (latitude 29°07' Sul, longitude 51°26' Oeste a altitude aproximada de 725 metros), Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A vinícola foi selecionada por *Brettanomyces/Dekkera* ter sido detectada em seus vinhos em trabalho prévio. Uvas da variedade Cabernet Sauvignon (10.000 kg) da safra de 2009, cultivadas na própria vinícola, em parreiral conduzido em latada, foram desengaçadas, esmagadas e enviadas diretamente para um tanque de aço inoxidável (Ganimedi n°1) de 13.000 litros de capacidade. As uvas estavam parcialmente (em torno de 20%) infectadas com *Glomerella*, alguns cachos recobertos com resíduo de enxofre e sulfato de cobre (2:1), e era grande a quantidade de *Drosophila* no recebimento. A relação sólido/líquido foi aumentada, retirando-se em torno de 20% de mosto, logo após encher o tanque. O mosto, com 18°Babo, foi adicionado de SO₂ (50 ppm), 0,2 g/kg da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BP726 – Maurivin) e 0,02 g/kg de enzima pectolítica. A fermentação alcoólica foi conduzida sob temperatura de 28 a 30°C. Foram feitas 8 remontagens por dia, de forma automática, além de uma *delestage* (retirada de todo o líquido do tanque e

retorno sobre as cascas). Durante a fermentação alcoólica foram adicionados pedaços de carvalho. No quarto dia de fermentação foi feita a correção do açúcar, para aumento de 1,5 % de álcool. O mosto foi fermentado na presença do bagaço, durante 7 dias, até todo açúcar ser consumido. Após a primeira trasfega, o vinho foi conduzido para duas pipas de grápia revestida com pintura epóxi, de 4.000 litros cada uma. O vinho permaneceu nessas pipas durante 65 dias, para a realização da fermentação malolática. Durante o início do período foi feita uma *bâtonnage* (mistura da borra fina sedimentada no tanque com o vinho) a cada três dias, e uma vez por semana posteriormente. O conteúdo das duas pipas foi filtrado por terra diatomácea e transferido para um tanque de aço inoxidável de 12.000 litros de capacidade. O SO₂ livre foi corrigido para 40 mg/L. Para completar o volume, foi acrescentado o vinho de uma terceira pipa (pipa C) de Cabernet Sauvignon, da mesma safra e do mesmo vinhedo. O vinho permaneceu em estoque por 2 meses, até que parte do volume foi engarrafada, sendo o restante transferido para uma das pipas utilizadas anteriormente.

2. Coleta de amostras

Amostras das uvas, do mosto e do vinho em diferentes momentos da vinificação, foram coletadas e submetidas a análises microbiológicas, químicas e de etil-fenóis. Para as duas últimas, as amostras foram congeladas para análises posteriores. Inicialmente duas amostras (A e B) de aproximadamente 1 kg de cachos de uva foram coletadas diretamente do vinhedo para embalagens estéreis, utilizando uma tesoura flambada. Outra

amostra de uvas (em torno de 1 kg) já colhida foi tomada de seis caixas, usando uma pinça flambada. As uvas foram esmagadas dentro do próprio plástico, e alíquotas do suco resultante foram analisadas. Amostras de mostos e vinhos (1 litro) em duplicata foram coletadas de tanques para garrafas estéreis, após a limpeza e flambagem da torneira. As embalagens foram fechadas e transportadas em bolsa térmica até o laboratório (em torno de 4 horas), onde permaneceram refrigeradas até o dia seguinte. Amostras de mosto foram coletadas no tanque quando 4.000 kg de uvas haviam sido esmagados e a quantidade de metabissulfito de potássio para o volume total de 10.000 Kg de uvas (50 ppm de SO₂) já havia sido adicionada (mosto inicial). Desta forma, devido a quantidade de uva no tanque, o SO₂ estava em excesso, aproximadamente 125 ppm. Uma segunda amostragem do mosto foi feita após o tanque ser completado (mosto final). Na seqüência da vinificação foram tomadas amostras na metade da fermentação alcoólica, após sua finalização e trasfega, 30 dias mais tarde (durante o período destinado a realização da fermentação malolática) e após filtração a terra e correção de SO₂. Nesse momento foram coletadas amostras do vinho (pipa C) que foi adicionado para completar o volume do tanque e após a mistura do volume das três pipas. A amostra deste último não sofreu correção do SO₂, somente a filtração por terra. Uma última amostragem foi feita dois meses após, durante a estocagem.

3. Meios de cultura e análise microbiológica

Dois meios foram utilizados para a contagem de leveduras durante a vinificação: meio seletivo e diferencial para *Brettanomyces/Dekkera* (DBDM),

desenvolvido por Rodrigues et al. (2001), acrescido de 100 mg/L de cloranfenicol; meio DBDM modificado, pela adição de 5 g/L de glicose e aumento da concentração de cicloheximida para 100 mg/L. Os meios foram esterilizados por filtração, sendo o agar autoclavado separadamente. Os volumes de amostra utilizados foram de 0,02 - 0,1 - 1 e 5 mL para uvas e mosto, e 0,1 - 1 e 20 mL para o vinho. Os volumes de 0,02 e 0,1 mL foram espalhados sobre a superfície do meio e os demais, filtrados por membrana de 0,45 µm. As contagens foram feitas após 3 e 14 dias de incubação a 28°C.

As amostras também foram analisadas em meio líquido descrito por Couto et al. (2005), contendo, em dupla concentração: 13,4 g/L de Yeast Nitrogen Base (Himedia Laboratories), 10 g/L de glicose, 20 mg/L de ácido *p*-cumárico, 20 mg/L de cicloheximida, e 200 mg/L de cloranfenicol (pH 5). Na análise microbiológica, 20 mL da amostra são inoculados em 20 mL do meio, levando a concentração final para a metade. Para amostras de uvas, mostos e da metade da fermentação alcoólica, o meio foi adaptado para se assemelhar a composição original. Volumes menores de amostra, 1 e 4 mL, para uvas e mostos, e 2 e 8 mL, para as amostras na metade da fermentação alcoólica, foram utilizados, completando-se o volume de 20 mL com água estéril. A concentração final foi levada para 100 mg/L de cicloheximida e 6% de etanol. A incubação foi a 28°C, sob agitação (150 rpm.), até resultado positivo ou durante 10 dias, sendo estendida no caso de uvas e mostos. O resultado positivo foi atribuído pela presença do odor de etil-fenóis, através de análise olfativa.

4. Reagentes e padrões

Padrões puros de ácido *p*-cumárico, 4-etil-guaiacol, 4-etil-fenol e 3,4-dimetil-fenol foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), assim como cicloheximida. Cloranfenicol foi fornecido pela empresa Northeast General Pharmaceutical Factory (Shenyang, China). Todos os demais produtos químicos possuíam grau analítico.

5. Análises químicas

O vinho foi descongelado e foram determinados: SO₂ livre, pela aeração da amostra acidificada, fixação em solução de hidróxido de sódio em *Oenological Analyser* modelo Quick equipado com *SO₂ Bubble* (Gibertini, Milano, Italy) e titulação com iodo; SO₂ total, através de arraste de vapor em *Oenochemical Distilling Unit* modelo DEE (Gibertini, Milano, Italy) e titulação com iodo; álcool e extrato seco total, em aparelho *Alcolyzer Wine* e densímetro modelo DMA 4500 (Anton Paar® GmbH, Graz, Austria); açúcares residuais, acidez total e volátil e pH por espectroscopia em infravermelho no aparelho *WineScan*TM FT120 (FOSS, Denmark).

6. Determinação de etil-fenóis por cromatografia gasosa

6.1. Preparação de amostras

As amostras passaram por extração em fase sólida utilizando cartuchos de poliestireno-divinilbenzeno Lichrolut-EN – 200mg da Merck. De acordo com López et al. (2002), os cartuchos foram condicionados com 4 mL de diclorometano, 4 mL de metanol e 4 mL de solução de etanol a 12% (v/v). Posteriormente, 50 mL de vinho filtrado e adicionado do padrão interno (3,4-

dimetil-fenol) foram passados através do cartucho sob fluxo de 2 mL/min.. O cartucho foi lavado com 3 mL de água Milli-Q, submetido a secagem pela passagem de ar durante 30 minutos e finalmente, os etil-fenóis foram eluídos com 1,4 mL de diclorometano. O eluato foi conservado em freezer até o momento da análise por cromatografia gasosa.

As curvas geraram coeficientes de determinação (r^2) de 0,99979 e 0,99987 para 4-etil-fenol (1 a 250 mg/L) e 4-etil-guaiacol (1 a 30 mg/L), respectivamente. As recuperações com soluções padrões foram de 98,54% e 105,4%, e com amostras adicionadas de padrões foram de 101,1% e 96,19%, para 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, respectivamente.

6.2. Condições analíticas

As análises foram conduzidas em cromatógrafo gasoso, modelo CG-14B (Shimadzu, Tokyo, Japan), equipado com detector de ionização de chama (FID). As condições analíticas foram: H₂ como gás de arraste, a 1 mL/min; Volume de injeção: 1 µL; Injetor no modo split (razão 1:10, 250°C); Coluna DB-wax (60m x 0,25mm d. i. x 0,25 µm espessura do filme) da Agilent J&W (Folsom, USA); Programa de temperatura da coluna: 50°C por 1 min., seguindo quatro rampas consecutivas: 180°C (10°C/min), 205°C (3°C/min), 215°C (2°C/min), 230°C (15°C/min), e 230°C durante 30 minutos. O detector foi mantido a 250°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras da uva (Tabela 1) mostraram números elevados de leveduras, entretanto a presença de *Brettanomyces/Dekkera* não pôde ser confirmada. Com essas amostras, apesar da acidificação do meio, o odor típico de 4-etil-fenol algumas vezes deixou dúvida nos meios DBDM e DBDM modificado. O crescimento foi rápido, ao contrário do que normalmente ocorre com *Brettanomyces/Dekkera*. Em três dias de incubação já havia crescimento de mais de 10^3 UFC/mL, e a morfologia da maioria das colônias (Figura 1a e 1b) não se assemelha ao descrito por Rodrigues et al. (2001) para *Brettanomyces/Dekkera*. Nas duas amostras de uvas obtidas diretamente das videiras, o número de leveduras foi muito diferente (Tabela 1), portanto não foi feita a média entre a duplicata. A presença desuniforme de resíduos de enxofre e sulfato de cobre e a podridão que infectava alguns cachos, e que é responsável pela maior carga e diversidade microbiana (Gadoury et al., 2002; Barata et al., 2008b), podem explicar a heterogeneidade entre as amostras. Um número maior de amostras teria sido ideal. As contagens das amostras de uvas se referem às colônias bem desenvolvidas, pois um “tapete” com possivelmente micro-colônias (Figura 1a e 1b) ao fundo da placa não foram consideradas na contagem.

Tabela 1 – Resultados das análises microbiológicas das amostras de uvas, do mosto e do vinho em diferentes etapas do processo de elaboração.

Meio de cultura	Contagem de leveduras (UFC/mL)		Detecção do odor de 4-etil-fenol nas placas		Detecção do odor de 4-etil-fenol e de ácido acético
	DBDM modif.	DBDM	DBDM modif.	DBDM	Líquido (Couto et al., 2005)
Uva do parreiral – A	$1,95 \times 10^3$	$1,65 \times 10^3$	Suspeito	Suspeito	EF - AA +
Uva do parreiral – B	$1,68 \times 10^4$	$1,38 \times 10^4$	-	-	EF - AA -
Uva das caixas	9×10^3	$1,9 \times 10^4$	Suspeito	Suspeito	EF - AA +
Mosto inicial	$>3 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	-	-	EF Suspeito em 24 dias AA -
Mosto final	$2,48 \times 10^3$	$1,38 \times 10^3$	-	-	EF + em 10 dias AA +
Metade da FAL	$5,47 \times 10^2$	$1,47 \times 10^3$	Suspeito ^a	Suspeito ^a	EF + em 7 e 10 dias AA +
Final da FAL	$1,17 \times 10^2$	$1,4 \times 10^{2ab}$	+	-	EF + em 7 dias ^a AA +
30 dias após FAL – pipa A	$1,79 \times 10^3$	^b	+	-	EF + em 12 dias AA +
30 dias após FAL – pipa B	$2,6 \times 10^3$	^b	+	-	EF + em 7 dias AA +
Vinho da pipa C	12,2	9,88	+	+	EF + em 7 dias AA +
Após filtração e correção de SO ₂	6,67	73,3	+	+	EF - AA -
Estocagem	ND	14,5	-	-	EF - AA -

+, positivo; -, negativo; EF, 4-etil-fenol; AA, ácido acético; FAL, fermentação alcoólica; FML, fermentação malolática; ND, não detectado; ^aVálido para somente uma das amostras; ^bCrescimento de fungos filamentosos impossibilitou as contagens.

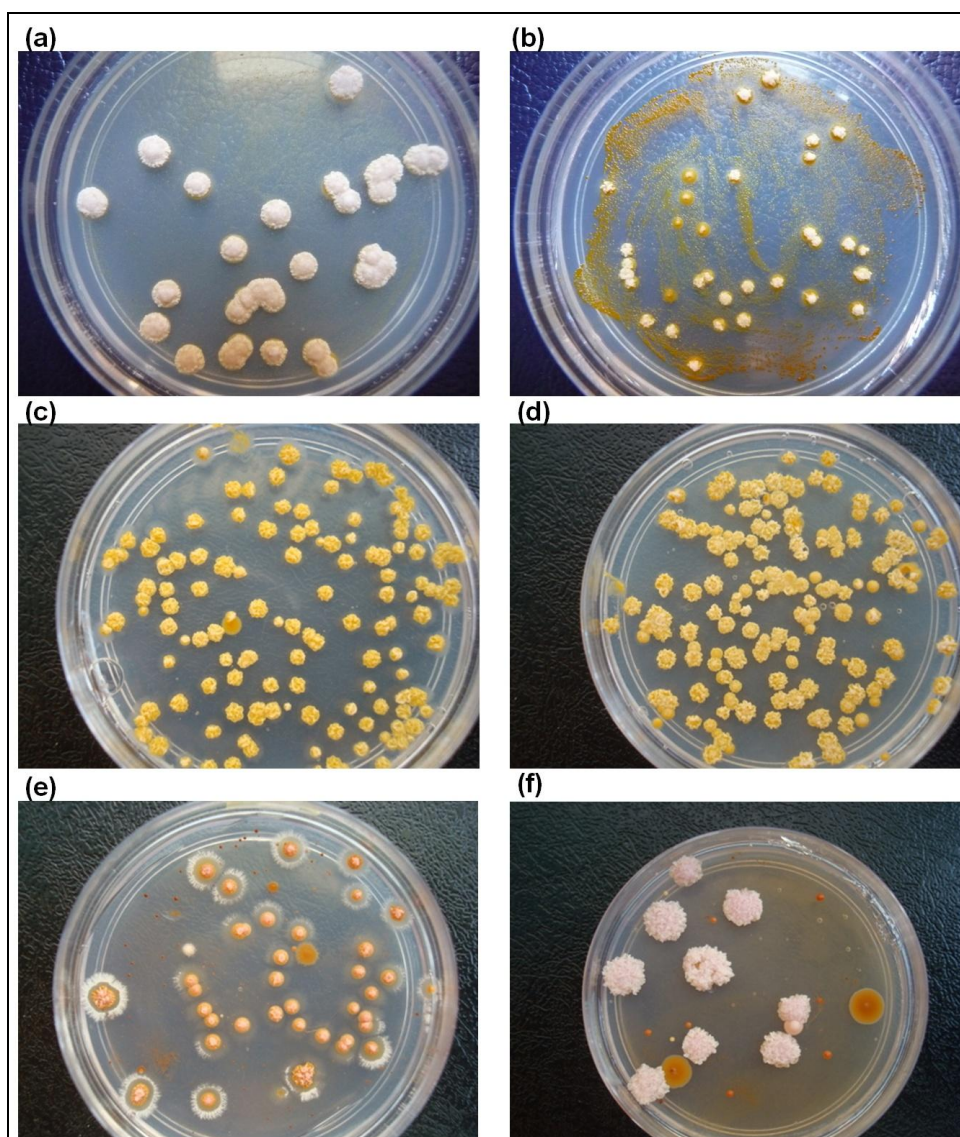


Figura 1 – Fotografias de colônias crescidas em meio DBDM (a, c, e) e em meio DBDM modificado (b, d, f), oriundas de 20 μ L de uvas Cabernet Sauvignon (a, b), de 0,1 mL do mosto, (c, d) e 0,1 mL do vinho na metade da fermentação alcoólica (e, f).

A seletividade dos meios DBDM e DBDM modificado foi insuficiente para uvas e mostos, nas quais a diversidade e carga microbiana são maiores do que no vinho. No meio de Couto et al. (2005), apesar da turbidez, o aroma fenólico não foi detectado em até 29 dias de incubação. Todos esses fatores levam a crer na ausência de *Brettanomyces/Dekkera* nas amostras de uva. É possível que *Brettanomyces/Dekkera* esteja presente nas uvas em números

realmente muito baixos, o que pode ser dependente das características do vinhedo, mas para considerar esta afirmativa é necessário o aperfeiçoamento de métodos para sua quantificação.

Na primeira amostra de mosto não se esperava um número elevado de leveduras, devido ao excesso de SO₂, mesmo assim, com três dias de incubação as contagens já estavam acima de 3 x 10² UFC/mL, e no mosto final, acima de 10³ UFC/mL. No meio de Couto et al. (2005) o aroma fenólico foi detectado em 10 dias com 20 mL de amostra, sem deixar dúvidas, o que de acordo com Couto et al. (2005), indica a presença de 0,5 a 2 células de *Brettanomyces/Dekkera*/mL.

De acordo com Dias et al. (2003), o meio DBDM deveria ser referido como seletivo e diferencial a outras espécies também produtoras de 4-etil-fenol, especialmente em uvas e mostos, já que permite o crescimento de *Pichia guilliermondii*. A possibilidade de 4-etil-fenol ter sido formado por essa levedura, não nos permite afirmar a presença de *Brettanomyces/Dekkera* no mosto. Renouf et al. (2006) detectou *Brettanomyces/Dekkera* somente após a fermentação alcoólica, porém aqui fica a suspeita de sua entrada no mosto.

A população de leveduras viáveis na uva sadia normalmente varia entre 3 e 5 log UFC/mL (Parish & Carroll, 1985; Fleet & Heard, 1993; Renouf et al., 2006; Barata et al., 2008a, 2008b). Em meio DBDM, Barata et al. (2008a, 2008b) encontraram populações de 3,7 a 4,11 log UFC/mL em uvas sadias, e entre 4,49 e 4,80 log UFC/mL em uvas danificadas. Neste trabalho as contagens nas uvas variaram de 3,21 a 4,27 log UFC/mL, o que é elevado se considerarmos que são espécies que crescem sob 6% de etanol, como única

fonte de carbono (DBDM), e são resistentes a 100 mg/L de cicloheximida (DBDM modificado). Entre as leveduras, essas espécies podem ser basidiomicetos, *Candida tropicalis*, *C. amapae*, *C. oleophila*, *C. apicola*, *C. viswamathii*, *Debaryomyces hansenii*, *D. polymorphus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia guilliermondi* e *Zygoascus helenicus*, as quais são habitantes naturais da uva (Davenport, 1976; Heard & Fleet, 1986; Holloway et al., 1990; Longo et al., 1991; Fleet & Heard, 1993; Sabate et al., 2002), e podem crescer no meio DBDM (Rodrigues et al., 2001; Barata et al., 2008a, 2008b). *Metschnikowia pulcherrima* também poderia crescer nesse meio, dadas as suas características (Barnett et al., 2000, Fugelsang & Edwards, 2007). O meio DBDM modificado, contendo glicose, certamente permitiria o crescimento das mesmas espécies, além daquelas que não se desenvolvem em etanol como única fonte de carbono, mas como contém 100 mg/L de cicloheximida, teoricamente deve inibir *Candida stellata*, *C. vini*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, *P. fermentans* e *P. membranaefaciens* (Barnett et al., 2000; Fugelsang & Edwards, 2007).

Apesar da grande variabilidade de espécies de leveduras presentes em uvas e mostos, e que poderiam crescer nos meios utilizados, nas uvas houve predomínio de colônias brancas, redondas com borda levemente irregular, opacas, de aparência rugosa e consistência cremosa (Figura 1a e 1b), e no mosto predominaram colônias de características similares, mas de coloração amarela (Figura 1b e 1c). A baixa diversidade na morfologia sugere uma espécie predominante. A presença de ácido acético foi detectada pelo

odor em algumas placas e no meio de Couto et al. (2005) (Tabela 1), o que nem sempre ocorreu nas duas amostras. A presença desse ácido, somado ao odor de 4-etil-fenol, seria um bom indicador de *Brettanomyces/Dekkera*. Como nem sempre os dois foram produzidos juntamente, acredita-se que o ácido acético pode ter sido produzido por outras leveduras. Leveduras aeróbicas como *Candida*, *Hansenula*, *Pichia anomala*, *M. pulcherrima* e *H. uvarum* (*K. apiculata*) são conhecidas por produzirem altos níveis de acetato de etila e ácido acético antes e durante a fase inicial de fermentação, levando a séria deterioração do vinho (Shimazu & Watanabe, 1981; Sponholz, 1993; Romano et al., 1992; Plata et al., 2003, Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Nas duas amostras sob fermentação alcoólica, o resultado foi positivo no meio de Couto et al. (2005), em 7 e 10 dias para os volumes de 8 mL, e em mais de 20 dias para 2 mL. Esses resultados permitem prever entre 0,5 e 75 células de *Brettanomyces/Dekkera*/mL. Assim como nas amostras anteriores, houve crescimento com 3 dias de incubação, de $2,31 \times 10^2$ e $5,15 \times 10^2$ UFC/mL nos meios DBDM modificado e DBDM, respectivamente, indicando que a maioria das colônias não se referiam a *Brettanomyces/Dekkera*. A morfologia das colônias apareceu diversificada (Figura 1e e 1f).

O crescimento com 3 dias de incubação diminuiu a partir do final da fermentação alcoólica, mostrando maior seletividade dos meios, embora o vinho também ofereça maior seletividade que o mosto. Várias leveduras presentes no mosto são inibidas pelo teor alcoólico do vinho, como *Pichia guilliermondii* (Malfeito-Ferreira et al., 2004). No meio de Couto et al. (2005), as

amostras tiveram resultado positivo em 7 dias de incubação, o que indica em torno de 30 células/mL. As amostras posteriores a filtração e correção do SO₂ não apresentaram odor de 4-etil-fenol ou turbidez no meio de Couto et al. (2005), apesar do crescimento sobre o meio DBDM.

Etil-fenóis não foram produzidos no vinho durante o período estudado (5 meses), mostrando que, durante o processo de vinificação realizado não houve população de *Brettanomyces/Dekkera* suficiente para ocorrer transformação detectável dos ácidos cinâmicos. Uma população de 10³ UFC/mL deveria ser crítica para produção significativa de etil-fenóis (Renouf & Lonvaud-Funel, 2005).

O crescimento nos meios DBDM e DBDM modificado durante todo o período estudado foi muito variável, não havendo diferença pelo test-t. Geralmente, as contagens de amostras de uvas e mostos foram menores em DBDM, indicando que a fonte de carbono foi o agente mais seletivo nesse caso. A partir da metade da fermentação alcoólica, as contagens passaram a ser menores no meio modificado, indicando que no vinho, 100 mg/L de cicloheximida é o maior responsável pela seletividade. A partir do final da fermentação alcoólica, o meio DBDM demonstrou uma grande tendência ao crescimento de fungos filamentosos (Figura 2), o que dificultou a contagem das leveduras e a detecção do odor de 4-etil-fenol. A concentração inferior de cicloheximida pode ter sido responsável.

O meio de Couto et al. (2005) também não mostrou seletividade para *Brettanomyces/Dekkera*, pois a turbidez foi freqüente na ausência do odor de 4-etil-fenol, mas o aroma fenólico foi mais bem discriminado nesse meio. A

utilização de volumes de amostra inferiores a 20 mL mostrou ser desnecessária, prolongou o tempo de incubação e o aroma fenólico pareceu menos nítido, certamente decorrente do baixo número de *Brettanomyces/Dekkera* presentes. O aparecimento de resultado positivo em até 10 dias é vantajoso porque permite prever a população de leveduras, de acordo com Couto et al.(2005).

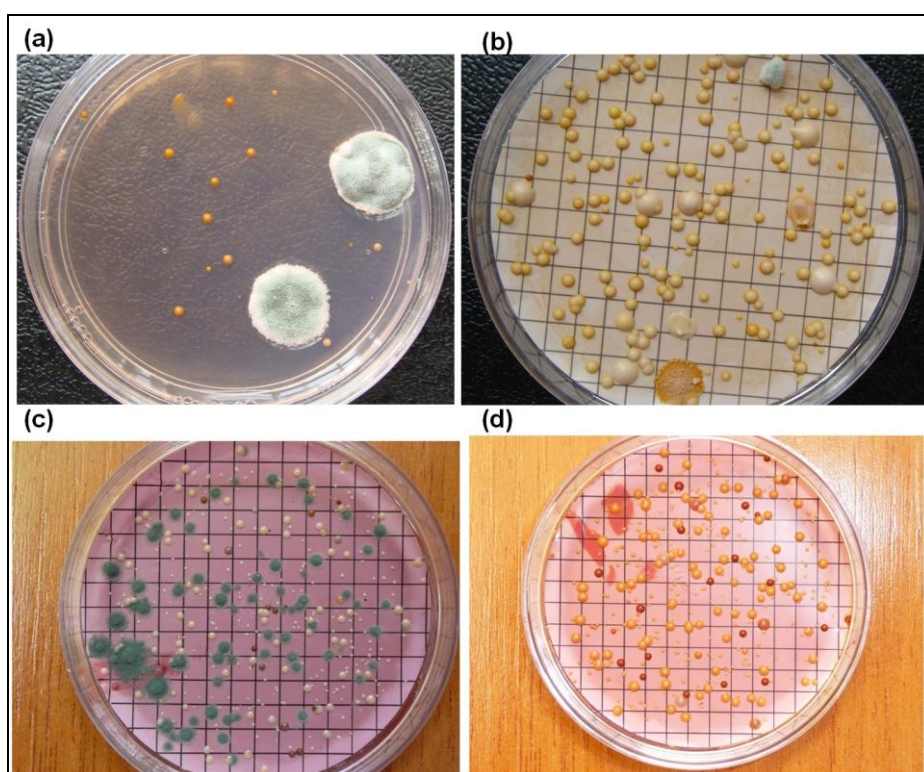


Figura 2 - Fotografias de colônias crescidas em meio DBDM (a, c) e em meio DBDM modificado (b, d), oriundas de 0,1 e 1 mL, respectivamente, do vinho após fermentação alcoólica (a, b) e de 20 mL do vinho após fermentação malolática (c, d).

Durante a vinificação o número de microrganismos da uva declinou com a adição de SO_2 no mosto e mais ainda com o andamento da fermentação alcoólica, devido certamente a sensibilidade de determinadas espécies ao etanol (Tabela 2), e outros fatores de competição. Após a fermentação

alcoólica, a população aumentou em DBDM modificado, possivelmente devido à *bâtonnage*, a qual pode oxigenar o vinho. Posteriormente, a filtração a terra e a correção do SO₂ livre para 40 mg/L provocaram uma redução drástica na população, o que levou a ausência de *Brettanomyces/Dekkera* no meio de Couto et al. (2005). O desenvolvimento da população de leveduras não-*Saccharomyces* durante a vinificação foi observado por Renouf et al. (2006). Em duas vinícolas da região de Bordeaux, os resultados coincidem com aqueles obtidos neste trabalho. Após dois meses de estocagem, a população reduziu ainda mais, mas algumas células permaneceram (no meio DBDM). Essas células restantes podem desenvolver-se futuramente, já que a tendência é de não submeter o vinho a filtrações posteriores, a fim de manter a complexidade de aromas, pigmentos e colóides que expressam todo seu potencial (Suárez et al., 2007).

Tabela 2 – Composição química do mosto e vinho em diferentes etapas da vinificação de Cabernet Sauvignon, safra 2009, em escala industrial.

Amostras	SO ₂ total (mg/L)	SO ₂ livre (mg/L)	pH ^a	Álcool (% vol.)	EST (g/L)	AR (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Acidez Total ^a (g/L)
Mosto final	43.17	1.22	3.49	-	-	167.0	0.33	8.09
Metade da FAL	37.09	2.43	3.71	7.1	76.61	44.4	0.62	7.07
Final da FAL	15.2	1.22	3.63	11.25	28.66	1.5	0.57	7.2
30 dias após FAL								
- pipa A	6.08	0	3.82	11.41	27.38	1.8	0.7	5.77
30 dias após FAL								
- pipa B	23.1	3.65	3.55	11.34	21.63	2	0.7	5.71
Após filtração	117.34	38.3	3.7	11.73	25.22	1.8	0.77	5.69
Estocagem	118.56	40.73	3.7	11.64	25.52	1.7	0.76	5.78

EST, Extrato seco total; AR, açúcares residuais; ^aA acidez dos vinhos diminuiu devido ao congelamento das amostras, portanto os valores de pH estão aproximadamente 0,11 acima dos valores reais.

CONCLUSÃO

As amostras de uvas apresentaram contagens elevadas nos meios DBDM e DBDM modificado, mas as características de cultura não apontam para *Brettanomyces/Dekkera*, mostrando que os meios não foram seletivos. *Brettanomyces/Dekkera* não foi detectada na uva, mas sua presença não deve ser descartada. O primeiro indício da presença dessa levedura ocorreu no mosto, pelo odor de 4-etil-fenol no meio de Couto et al. (2005). Os meios DBDM e DBDM modificado foram mais seletivos para amostras de vinho, já que não permitiram a presença de leveduras de crescimento rápido. A população de leveduras não-*Saccharomyces* reduziu com a fermentação alcoólica e a correção do SO₂, mas aumentou durante fermentação malolática, com as operações de *bâtonnage*. O período de cinco meses não foi suficiente para formação de etil-fenóis nos vinhos, provavelmente devido à baixa população de *Brettanomyces/Dekkera*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. Paulo Gustavo Celso, do Laboratório Nacional de Agricultura/RS (LANAGRO), e as vinícolas brasileiras participantes. Suporte financeiro para este trabalho foi fornecido pela CAPES, Brasil.

REFERÊNCIAS

BARATA A., GONZÁLEZ S., MALFEITO-FERREIRA M., QUEROL A. and

- LOUREIRO V., 2008a. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 1008–1017.
- BARATA A., SEBORRO F., BELLOCH C., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V. 2008b. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1182–1191.
- BARNETT J.A., PAYNE R.W. and YARROW D., 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, Cambridge University Press, Cambridge.
- CHATONNET P., BOIDRON J. and PONS M., 1990. Elevage des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sci. Alim.*, **10**, 565-587.
- CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. and PONS M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **60**, 165-178.
- COMBINA M., MERCADO L., BORGO P., ELIA A., JOFRÉ V., GANGA A. and MARTINEZ C., 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1055-1061.
- CONNELL L., STENDER H. and EDWARDS C.G., 2002. Rapid detection of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53**, 322–324.
- COUTO J.A., BARBOSA A. and HOGG T., 2005. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**, 505-510.
- DAVENPORT R.R., 1976. *Microflora of fruit juice products*. Long Ashton Report, University of Bristol, UK.

- DIAS L., PEREIRA-DA-SILVA S., TAVARES M., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V., 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* **20**, 377-384.
- FLEET G.H. and HEARD G. M., 1993. Yeasts - Growth during fermentation, 27–55. *In: Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur.
- FREER S.N., 2002. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World J. Microbiol. Biotech.*, **18**, 271-275.
- FREER S.N., DIEN B. and MATSUDA S., 2003. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* under conditions of constant pH. *World J. Microbiol. Biotech.*, **19**, 101-105.
- FUGELSANG K.C. and EDWARDS C.G., 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Ed. Springer, New York.
- GADOURY D.M., SEEM R.C., WILCOX W. and HENICK-KLING T., 2002. Effect of powdery mildew on bunch rots, berry microflora, and juice and wine quality. *In: 4th Int. Workshop Powdery Downy Mildew Grapevine*, University of California (Pubs.), Davis, p. 64– 65.
- GERÓS H., CÁSSIO F. and LEÃO C., 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J. Food Prot.*, **63**, 96-101.
- HEARD G.M. and FLEET G.H., 1986. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Aust*, **38**, 22–25.

- HENICK-KLING T., EGLI C., LICKER J., MITRAKUL C. and ACREE T.E., 2000. *Brettanomyces* in wine. *In: 5th Int. Symp. Cool Clim. Vitic. Oenol.* Melbourne, p. 1-7.
- HERESZTYN T., 1986. Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts. *Arch. Microbiol.*, **146**, 96–98.
- HOLLOWAY P., SUBDEN R. E. and LACHANCE M. A., 1990. The yeasts in a Riesling must from the Niagara grape-growing region of Ontario Canada. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **23**, 212–216.
- LARUE F., ROZES N., FROUDIÉRE L., COUTY C. and PERREIRA G.P., 1991. Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **25**, 149-165.
- LAURITSEN F.R., NIELSEN L.T., DEGN H., LLOYD D. and BOHATKA S., 1991. Identification of dissolved volatile metabolites in microbial cultures by membrane inlet tandem mass-spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **20**, 253-258.
- LONGO E., CANSADO J., AGRELO D. and VILLA T. G., 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 141–144.
- LÓPEZ R., AZNAR M., CACHO J. and FERREIRA V., 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromat. A.* **966**, 167-177.

- LOUREIRO V., 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Res. Int.*, **33**, 247-256.
- LOUREIRO V. and MALFEITO-FERREIRA M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 23-50.
- MALFEITO-FERREIRA M., BARATA A., NOBRE A., TAVARES M., DIAS L., PEREIRA-DA-SILVA S., GONÇALVES G., RODRIGUES N. and LOUREIRO V., 2004. Behavior of *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* in wines. In: ASEV 55th Annual Meeting, San Diego, *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 304-A.
- PARISH M.E. and CARROLL D. E., 1985. Indigenous yeasts associated with Muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 165–169.
- PÉREZ-PRIETO L.J., LÓPEZ-ROCA J.M., MARTÍNEZ-CUTILLAS A. PARDO-MÍNGUEZ F. and GÓMEZ-PLAZA E., 2003. Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5444-5449.
- PLATA C., MILLÁN C., MAURICIO J.C. and ORTEGA J.M., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* **20**, 217– 224.
- RENOUF V. and LONVAUD-FUNEL A. 2005. Incidence microbiologique de l'utilisation de barriques neuves et/ou de barriques usagées. *Rev Fr Œnologie* **211**, 10–13.

- RENOUF V. and LONVAUD-FUNEL A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.*, **162**, 154-167.
- RENOUF V., FALCOU M., MIOT-SERTIER C., PERELLO M.C., DE REVEL G. and LONVAUD-FUNEL A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 1208–1219.
- RIBÉREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONÈCHE B. and LONVAUD A., 2006. *Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley & Sons, Chichester, 497 p.
- RODRIGUES N., GONÇALVES G., PEREIRA-DA-SILVA S., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 588-599.
- ROMANO P., SUZZI G., COMI G. and ZIRONI R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 126– 130.
- SABATE J., CANO J., ESTEVE-ZARZOSO B. and GUILLAMÓN J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes. *Microbiol. Res.*, **157**, 1– 8.
- SHIMAZU Y. and WATANABE M., 1981. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. *J. Ferment. Technol.*, **59**, 27–32.
- SMITH M. T., YAMAZAKI M. and POOT G. A., 1990. *Dekkera, Brettanomyces*

- and *Eeniella*: electrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology. *Yeast*, **6**, 299-310.
- SPONHOLZ W. F., 1993. Wine spoilage by microorganisms. 395– 419. *In: Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur.
- SUÁREZ R., SUÁREZ-LEPE J. A., MORATA A. and CALDERÓN F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.*, **102**, 10–21.
- VAN DER WALT J.P. and VAN KERKEN A.E., 1961. The wine yeasts of the Cape. Part V. Studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **27**: 81–90.
- ZOECKLEIN B.W., FUGELSANG K.C., GUMP B.H. and NURY F.S., 2001. *Análisis y producción de vino*. Ed. Acribia, Zaragoza. 613 p.

3.3. Artigo 3: Growth inhibition of isolated yeasts in selective medium for *Brettanomyces/Dekkera* by sorbic acid in culture and wine

Artigo submetido na “Journal International des Sciences de La Vigne et du Vin”

Larissa D. ÁVILA¹ and M. A. Z. AYUB^{2,*}.

¹ Education, Science and Technology Federal Institute of Rio Grande do Sul, Osvaldo Aranha 540, ZC 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil;

² Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048.

*Corresponding author: e-mail mazayub@ufrgs.br

Abstract

Aims: The organoleptic alterations caused in wines by *Brettanomyces/Dekkera* prompted the evaluation of preservatives in order to control this yeast. The resistance of *Brettanomyces/Dekkera* to sorbic acid in synthetic media has been documented, but its effect in wines is still unknown. Therefore, this work aimed at observing the effect of sorbic acid over *Dekkera bruxellensis* and other isolated yeasts in wines and comparing their resistances in synthetic medium.

Methods and results: We tested *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961) and several yeasts isolated from Brazilian red wines to different concentrations of sorbic acid varying from 0 to 250 mg/L in both wine and synthetic medium. Results have shown that sorbic acid inhibited *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961), especially for concentrations above 150 mg/L. The *Dekkera* strain showed to be the most sensitive to inhibition in the culture medium at concentrations of 200 and 250 mg/L, while in the wine inhibition was less evident.

Conclusion: Sorbic acid inhibits the growth of isolated yeasts in selective medium for *Brettanomyces/Dekkera* and in special *Dekkera bruxellensis* strain NRRL Y – 12961 in wines.

Significance and impact of study: The optimization of sorbic acid use in winemaking could be a technological alternative for the prevention of *Brettanomyces/Dekkera* growth in red wines.

Keywords: *Brettanomyces*, *Dekkera*, sorbic acid, wine.

Résumé

Objectif: Les modifications organoleptiques des vins causées par *Brettanomyces/Dekkera* ont incité l'évaluation de l'effet d'agents de conservation afin de contrôler cette levure. La résistance de *Brettanomyces/Dekkera* à l'acide sorbique en milieux synthétiques a été documentée, mais son effet dans les vins n'est pas encore connu. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'observer l'effet de l'acide sorbique sur *Dekkera bruxellensis*, et sur d'autres levures, dans le vin et dans le milieu synthétique.

Méthodes et résultats: *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961) et plusieurs levures isolées de vins rouges brésiliens, ont été soumises à différentes concentrations d'acide sorbique (0 à 250 mg/L), dans le vin et en milieu synthétique. Les résultats ont montré que l'acide sorbique a inhibé *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961), en particulier à des concentrations supérieures à 150 mg/L. La souche *Dekkera* est plus sensible à l'inhibition dans le milieu de culture à des concentrations de 200 et 250 mg/L, alors que l'inhibition dans les vins est moins évidente.

Conclusions: L'acide sorbique inhibe la croissance des levures isolées sur milieu sélectif pour *Brettanomyces/Dekkera* dans les vins, et en spécial *Dekkera bruxellensis* souche NRRL Y – 12961.

Signification et impact de l'étude: L'optimisation de l'utilisation d'acide sorbique dans la vinification peut être une alternative technologique pour la prévention de la croissance de *Brettanomyces/Dekkera* dans les vins rouges.

Mots clés: *Brettanomyces*, *Dekkera*, acide sorbique, vin.

INTRODUCTION

The presence of *Brettanomyces/Dekkera* yeast in wines is linked to the production of ethylphenols, 4-ethylguaiaicol and 4-ethylphenol, from the ferulic and *p*-coumaric acids, respectively (Heresztyn, 1986, Lauritsen *et al.*, 1991, Chatonnet *et al.*, 1992). These ethylphenols produce unpleasant odors, commonly referred as *horse sweat, stable, and pharmaceutical*, among others, which may diminish the quality of wine (Chatonnet *et al.*, 1990). *Brettanomyces/Dekkera* occurs specially in red wines after the onset of alcoholic and malolactic fermentation (Froudriere and Larue, 1988). For a long time, this problem was associated with maturation in oak barrels (Chatonnet *et al.*, 1990, 1992), but recently it was demonstrated that *Brettanomyces/Dekkera* can develop in stainless steel tanks (Rodrigues *et al.*, 2001) or even in bottles (Pérez-Prieto *et al.*, 2003), negatively affecting the wine sensorial characteristics.

The contamination of wine by *Brettanomyces/Dekkera* in different world regions has been of much concern the winery industry (Henick-Kling *et al.*, 2000). Several measures of prevention, such as the disinfection of the environment and equipments, and the utilization of preservatives, have been employed aiming to control the problem, with mixed results. According to Loureiro and Malfeito-Ferreira (2003), filtration, SO₂ or flash pasteurization are the available methods to stop the action of *Brettanomyces/Dekkera*. Sulphur dioxide, a preservative of general use in wineries, inhibits *Brettanomyces/Dekkera* in doses of 40 mg/L in its free fraction (Barata *et al.*,

2008), being this dose dependent on the pH of wine. Henick-Kling *et al.* (2000) recommended the use of 0.8 mg/L of molecular SO₂. However, when the pH of the wine is high, the effective concentrations of SO₂ necessary to prevent *Brettanomyces/Dekkera* should be very high, which is impracticable. Conterno *et al.* (2006) demonstrated the tolerance of 49 % from a total of 35 isolates of *Brettanomyces* to sulfite in doses above 30 mg/L. According to Malfeito-Ferreira *et al.* (2004), the dimethyl dicarbonate (DMDC) is effective against *Brettanomyces/Dekkera*, but its concentration depends on the ethanol content and pH of wine. The bottling is the ideal moment for its addition to wine, since during vinification DMDC inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* (Renouf *et al.*, 2008).

Due to its lack of toxicity, the use of sorbic acid in wines is allowed in several countries, at maximal concentration of 200 mg/L. The ethanol content of the wine synergistically increases the fungicidal activity of sorbic acid, inversely to the wine pH (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Besides its action on classic yeast fermentation, the sorbic acid acts against yeasts that develop on the surface of the wine, such as *Candida* for instance (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Species of *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulasporea*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces* and *Yarrowia* were mentioned as being inhibited by sorbate (Sofos 1989; Praphailong and Fleet, 1997, Suárez *et al.*, 2007), especially in the range of pH 3.0 and at concentration of 250 mg/L (Praphailong and Fleet, 1997). Somolinos *et al.* (2007), when applying pulsed electric field

(PEF) associated with sorbic acid (2,000 ppm at pH 3.8), observed that *Dekkera bruxellensis* was more sensitive to the sorbic acid than *Saccharomyces cerevisiae*. However, some authors have demonstrated that sorbic acid is not effective for the inhibition of *Brettanomyces/Dekkera* and several strains of *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Triganopsis* and *Zygosaccharomyces* (Warth, 1977, 1985; Splittstoesser *et al.*, 1978; Restaino *et al.*, 1982; Bills *et al.*, 1982; Cole *et al.*, 1987; Lenovich *et al.*, 1988; Mihyar *et al.*, 1997). According to Beech and Carr (1955, 1958) *Brettanomyces* resists 500 mg/L of sorbic acid in wort agar at pH of 5.4. Neves *et al.* (1994) demonstrated the growth of a strain of *Brettanomyces bruxellensis* in culture medium containing up to 350 ppm of sorbic acid. Several strains of *Dekkera* grew in mineral medium (pH 4.5) containing 10 mg/L of cycloheximide and 250 mg/L of sorbic acid (Rodrigues *et al.*, 2001). Stratford (2006) reported the resistance of *Dekkera bruxellensis* in 504 mg/L of sorbic acid and 244 mg/L of benzoic acid. As the previously mentioned studies were all carried out in culture media, some doubt still remains on the possible behavior of the *Brettanomyces/Dekkera* to sorbic acid in wine, since in general species will present physiological differences. This study aimed to study the resistance of some yeast strains isolated from red wines to different concentrations of sorbic acid, both in culture medium and in wine.

MATERIALS AND METHODS

1. Yeast strains

In this study, a type strain from ARS Culture Collection of *Dekkera bruxellensis* (Db) (NRRL Y – 12961) was used, kindly donated by the Center for Agricultural Utilization Research (USA). Additionally, eleven yeasts isolated from red wines of the varieties Cabernet Sauvignon and Merlot were also investigated. These strains were morphologically and biochemically tested for genus classification according to Rodrigues *et al.* (2001), based on colony morphology, time for growth, change in colour of medium, and production of phenolic flavour. Bottled wines from harvests of 2002, 2003, and 2004, came from four wineries situated in the region of Vineyards Valley, in Gaúcha Mountains (latitude 29°S, longitude 51°W), Rio Grande do Sul, Brazil. The isolates were denominated 4CS31, 4CS302, 8MBv, 8MBa, 11CSA, 11CSB, 11MAa, 11MA, 11MBa, 11MB and 12CSB, being the coded numbers a reference to the wineries.

2. Culture media

Yeast strains were kept in modified GYP agar that contained (in g/L): glucose, 20; yeast extract, 5; peptone, 10; agar, 20; and calcium carbonate, 5; pH 6.0. A selective medium for *Brettanomyces/Dekkera* (DBDM), described by Rodrigues *et al.* (2001) was modified by the addition of 5 g/L glucose and 100 mg/L chloramphenicol. . This medium was used for the direct plating of wines and for the purification of colonies from liquid cultures. The liquid medium used for yeast growth contained (in g/L): Yeast Nitrogen Base (Himedia Laboratories), 6.7; glucose, 5; ethanol, 60; and *p*-coumaric acid, 0.1; with pH adjusted to 5.0. Except for GYP agar, the media were sterilized by filtration. For

the modified DBDM medium, agar was autoclaved separately. For the inhibition experiments, sorbic acid was added to the medium and to wine as described below. All chemicals were of analytical grade.

3. Strain isolation

Eleven isolates were obtained from plating of wines in the modified DBDM medium. After growth, each colony was transferred to 40 mL of medium. The growth was carried out at 30°C under agitation (150 rpm). The biomass was determined as optical density (OD) at 550 nm for the kinetics of growth. Cells in stationary phase were plated by streaks for re-isolation, which were carried out by transferring one colony from each plate to Erlenmeyer flasks containing 40 mL of the medium.

4. Inhibition by sorbic acid in culture medium

The growth of each yeast isolate was accompanied by OD until mid-exponential phase (OD 0.9). At this point, 1 mL of each isolate cultivation was transferred to tubes containing 9 mL of the medium, added with the following concentrations of sorbic acid: 100, 150, 200, and 250 mg/L. One of the tubes that received the inoculum was not added of sorbic acid (control). The cultures were incubated at 30°C under agitation (150 rpm), and the growth in the tubes was monitored by OD.

5. Inhibition by sorbic acid in wine

One loopful of each of the isolates Db, 4CS302, 8MBv, 11MA and

11CSA, were transferred to 40 mL of culture medium in Erlenmeyer flasks of 125 mL. In this case, the medium was added of 5 mg/L of cycloheximide and 50 mg/L of chloramphenicol. The cultures were incubated at 30°C under agitation (150 rpm). A volume of 2 mL from mid-exponential cultures (OD 0.9) was removed and re-inoculated into tubes containing 18 mL of membrane-filtered wine added of 100, 150, 200, and 250 mg/L of sorbic acid. The experiments were carried out in duplicates and for each isolate two tubes were left without the addition of sorbic acid (control). A series of tubes without inoculation was also incubated (blanc), considering a possible variation of OD due to the evaporation and transformation of phenolic compounds to be subtracted from the readings for the isolates. The wine used was a Sangiovese, vintage 2005, which presented the following composition: 30.83 mg/L of total SO₂ (3.36 mg/L of free SO₂), alcoholic content of 12.91% (v/v), 0.99360 of relative density, 27.18 g/L of total dry extract, 3.5 g/L of residual sugars, 6.58 g/L of total acidity, 0.88 g/L of volatile acidity, and pH 3.53.

Incubation was carried out at 30°C, under agitation (150 rpm). The readings of OD were carried out at 650 nm, due to the interference of the color of wine in lower wave lengths, before the inoculation, and subsequently in days 4, 7, 10, 13, 18, and 23.

6. Statistical analysis

The results were submitted to statistical analysis as a randomized split plot design, considering that the isolate, the concentration of sorbic acid, and the interaction of sorbic acid concentration versus isolate (error a) were

tested for the whole plot. The sources of variation that involved time (days) were tested by the error b. For the statistical analysis, DEX/UFLA, SISVAR software, version 4.6 (Build 65), Copyright Daniel Furtado Pereira 1999-2003, was utilized.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Inhibition of yeasts growth by sorbic acid in culture medium

The isolates were not identified by analysis of the 26S fragment, but had all the characteristics that identify the genus *Brettanomyces/Dekkera* on the medium developed by Rodrigues *et al.* (2001), used here to obtain isolates: colonies yellow to olive green, acidification of the medium, phenolic flavour and slow growth.

As general trend for the majority of the isolates, as the concentration of sorbic acid in the culture medium increased, the cell growth was slower, but after a adaptation or lag-phase, final OD readings were very similar (Figure 1). For isolate 11MB for instance, it becomes very clear the effect of sorbic acid effect upon adaptation (Figure 1i). For most of the isolates (4CS302, 4CS31, 8MBa, 8MBv, 11MB, 11MBa; Figures 1 a, b, c, d, i, and j, respectively), the adaptation phase extended up to 5 days of incubation for concentration of 250 mg/L. In contrast to all other isolates, the strain of *Dekkera bruxellensis* (Db) (Figure 1l) showed the longest adaptation phase. This yeast was inhibited in concentrations of 200 and 250 mg/L. At lower concentrations, however, Db showed slower growth rates but was still able to grow to similar final cell

concentrations as for the control. Finally, for some isolates (11CSA and 11CSB, Figure 1e and 1f, respectively), even the higher sorbic acid concentrations did not affect growth.

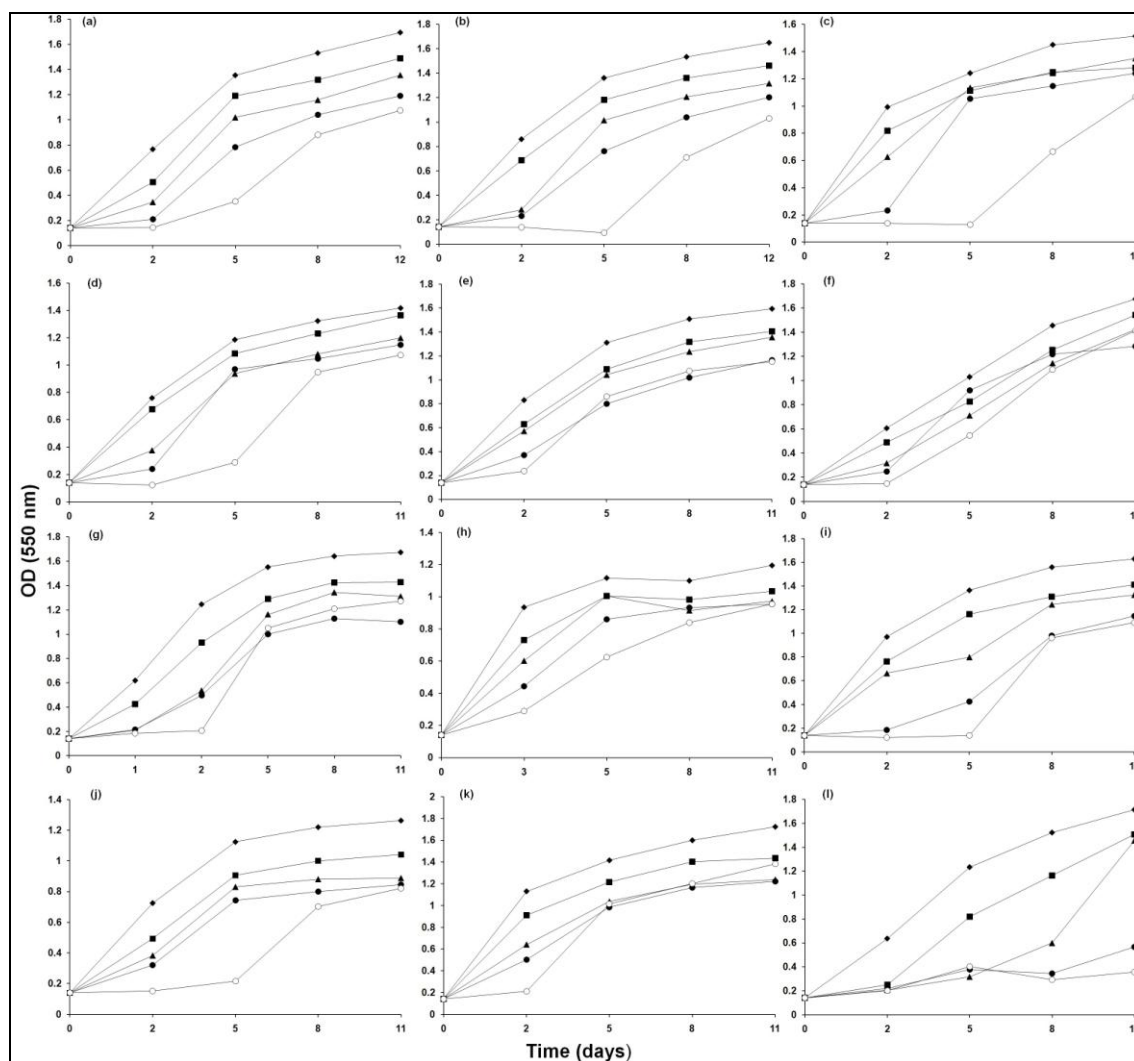


Figure 1 - Growth of the isolates 4CS302 (a), 4CS31 (b), 8MBa (c), 8MBv (d), 11CSA (e), 11CSB (f), 11MA (g), 11MAa (h), 11MB (i), 11MBa (j), 12CSB (k), and of the *D. bruxellensis* (NRRL Y – 12961) (l) strain in the culture medium containing different concentrations of sorbic acid: 0 (◆), 100 (■), 150 (▲), 200 (●), and 250 (○) mg/L.

The growth profiles of the type strain of *Dekkera* and the isolates have demonstrated that the inhibition by sorbic acid has occurred by the extension of the adaptation phase causing a growth delay. In fact, weak acids

that act as preservatives such as sorbic acid, do not kill microorganisms. Instead, they will inhibit growth, causing the delay in the lag phase and affecting cell yield (Freese *et al.*, 1973). Although other events may be involved, the classical theory of the inhibition process in an environment of low pH involves a rapid diffusion of non-dissociated molecules through the plasmatic membrane. Within cells, the molecules release protons, acidifying the cytoplasm and preventing growth (Krebs *et al.*, 1983; Cole and Keenan, 1987). The decrease in cell yield may be due to the use of ATP for pumping protons through the membrane (Lambert and Stratford, 1999). Stratford and Anslow (1998) and Somolinos *et al.* (2007) have shown that sorbic acid may affect the integrity and/or functionality of the cytoplasmatic membrane.

Although other studies have shown strains of *Brettanomyces* resistant to concentrations as high as 500 mg/L of sorbic acid (Beech and Carr, 1955, 1958; Stratford, 2006; Goretti *et al.*, 2009), the strain of *Dekkera* studied here has demonstrated considerable inhibition in 200 and 250 mg/L. There have been contradictory findings for *Brettanomyces/Dekkera* resistance towards sorbic acid, with some authors reporting sensitivity, while others showing the yeast to be resistant to the acid. This controversy may be related to the characteristics of different strains or growth conditions. According to Sofos (1989), the resistance of yeasts to sorbate depends on the specie and strain, concentration of sorbate, pH, size of inoculum, temperature of storage, and previous exposition of the organism to low levels of sorbate. Goretti *et al.* (2009) observed different responses among strains of *Dekkera bruxellensis*, where 20% of the 15 studied strains were sensitive to concentrations of 512 mg/L or

even smaller of potassium sorbate. Rodrigues *et al.* (2001) did not recommend the use of 250 mg/L of sorbic acid as selective agent in a specific culture medium for *Brettanomyces/Dekkera*, since it did not offer the expected selectivity.

2. Inhibition of yeasts growth by sorbic acid in wine

Figure 2 shows the results for the effect of sorbic acid concentration on cell growth and inhibition on wine for some isolates and for *Dekkera bruxellensis*. All the plots were statistically analyzed for differences among days of growth, concentration of sorbic acid, and among isolates. For the kinetics of growth, the isolate 4CS302 (Figure 2a), concentrations of 100 and 150 mg/L caused the same inhibitory effect, extending the adaptation phase until the 7th day of incubation, while concentrations of 200 and 250 mg/L extended the adaptation phase until the 10th day. Similar effects were also observed for isolates 8MBv (Figure 2b), and 11CSA (Figure 2c) for concentrations of 200 and 250 mg/L, respectively. For the isolate 11MA (Figure 2d), there was no difference of inhibition for any concentration.

Since growth in wine was slower than in culture medium for all isolates and *Dekkera bruxellensis*, the difference of growth from the control was statistically significant from the 7th day of culture, being more evident for higher concentrations (200 and 250 mg/L). The isolates 4CS302 and 11CSA were inhibited for all concentrations. 8MBv was inhibited from concentrations 150 mg/L and for 11MA, only concentrations of 200 and 250 mg/L demonstrated some inhibition.

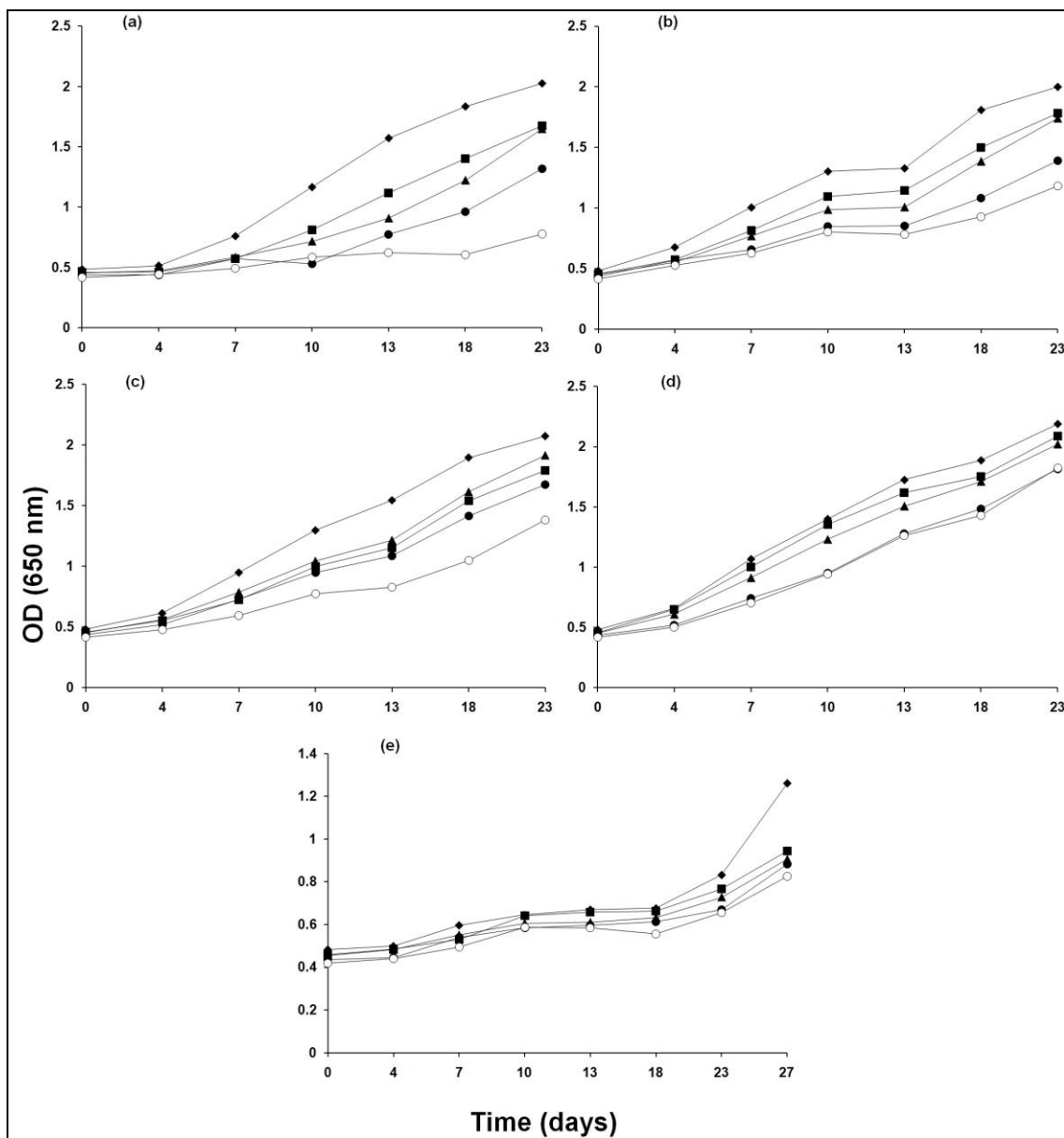


Figure 2 - Growth of the isolates 4CS302 (a), 8MBv (b), 11CSA (c), 11MA (d), and of the *D. bruxellensis* (NRRL Y – 12961) strain (e) in wine containing different concentrations of sorbic acid: 0 (◆), 100 (■), 150 (▲), 200 (●), and 250 (○) mg/L.

For the strain of *Dekkera bruxellensis* (Figure 2e), growth was slow for both the control and for all concentrations of sorbic acid. The lag phase was extended until the 18th day of incubation for the control and as far as the 23rd day for all concentrations of sorbic acid.

In general, it was observed a stronger inhibition of cell growth in wine as compared with culture medium, being less apparent for strain 11MA. The higher sensitivity towards sorbic acid in wine might be explained by the presence of other inhibitor factors. In comparison with the culture medium, the wine used in this research had higher alcohol content, lower pH and sugar concentration, and a small amount of free SO₂. Most wines have narrow bands of the parameters cited, which does not assume large variations in response to sorbic acid. The use of sorbic acid has been recommended only in the case of sweet wines, in order to avoid alterations caused by *Saccharomyces* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). It should be always used in association with sulfur dioxide, which prevents bacterial growth, especially lactic bacteria that could degrade the sorbic acid, resulting in serious olfactory alteration (Crowell and Guymon, 1975). In his study, Machado *et al.* (2007) detected sorbic acid levels from 91 to 309.5 mg/L in 15 Brazilian red wine samples. Many samples showed detectable levels of sorbic acid above the legal limits of 200 mg/L, which is the standard in several countries.

CONCLUSION

In this study it has been found that sorbic acid inhibits *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961) and other isolated yeast from wine, both in culture medium and red wine, with variations in the inhibition observed for the isolates. In wine, the adaptation phase in the presence of sorbic acid was around 7 days of cultivation, with inhibition becoming apparent especially for concentrations above 150 mg/L of sorbic acid. In the culture medium, cell

growth was more vigorous, allowing a better characterization of the inhibition period. When considering the inhibition obtained with the sorbic acid in this study, it might be suggested its use in wines for delaying the development of *Brettanomyces/Dekkera*, especially when the product is intended for rapid consumption. The general methods of contamination prevention, such as adequate hygienic industrial procedures, filtration, adequate levels of sulfur dioxide, among others, are still the most indicated for avoiding the development of *Brettanomyces/Dekkera*.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Cletus P. Kurtzman and Dr. Patrícia Valente for kindly providing the strain of *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961). Financial support for this work was provided by CAPES, Brazil.

REFERENCES

- BARATA A., CALDEIRA J., BOTELHEIRO R., PAGLIARA D., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V., 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 201-207.
- BEECH F. W. and CARR J. G., 1955. A survey of inhibitory compounds for the separation of yeasts and bacteria in apple juices and ciders. *J. Gen. Microbiol.*, **12**, 85-94.
- BEECH F. W. and CARR J. G., 1958. Selective isolation of micro-organisms. *Chem. Prod.*, **21**, 285-287.

- BILLS S., RESTAINO L. and LENOVICH L. M., 1982. Growth-response of an osmotolerant sorbate-resistant yeast, *Saccharomyces-rouxii*, at different sucrose and sorbate levels. *J. Food Prot.*, **45**,1120-&.
- CHATONNET P., BOIDRON J. and PONS M., 1990. Elevage des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sci. Alim.*, **10**, 565-587.
- CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. and PONS M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **60**, 165-178.
- COLE M. B. and KEENAN M. H. J., 1987. Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii* and its implications in weak-acid resistance. *Yeast*, **3**, 23–32.
- COLE M. B., FRANKLIN J. G. and KEENAN M. H. J., 1987. Probability of growth of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in a model fruit drink system. *Food Microbiol.*, **4**, 115-119.
- CONTERNO L., JOSEPH C. L. M., ARVIK T. J., HENICK-KLING T. and BISSON L. F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 139-147.
- COUTO J. A., BARBOSA A. and HOGG T., 2005. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Lett. Appl. Microbiol.*, **41**, 505-510.
- CROWELL E. A. and GUYMON M. F., 1975. Wine constituents arising from sorbic acid addition and identification of 2-ethoxyhexa-3,5-diene as a source of geranium-like off- odour. *Am. J. Enol. Vitic.*, **26**, 97–102.

- FREESE E., SHEU C. W. and GALLIERS E., 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, **241**, 321-325.
- FROUDIÈRE I. and LARUE F., 1988. Conditions de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. *Conn. vigne vin.* **2**, 296–303.
- GORETTI M., TURCHETTI B., BURATTA M., BRANDA E., CORASSI L., VAUGHAN-MARTINI A. and BUZZINI P., 2009. *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, **131**, 178-182.
- HENICK-KLING T., EGLI C., LICKER J., MITRAKUL C. and ACREE T.E., 2000. *Brettanomyces* in wine. *In: 5th Int. Symp. Cool Clim. Vitic. Oenol.* Melbourne, p. 1-7.
- HERESZTYN T., 1986. Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts. *Arch.Microbiol.*, **146**, 96–98.
- KREBS H. A., WIGGINS D., STUBBS M., SOLS A. and BEDOYA F., 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.*, **214**, 657–663.
- LAMBERT R. J. and STRATFORD M., 1999. Weak acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. *J. Appl.Microbiol.*, **86**, 157-164.
- LAURITSEN F.R., NIELSEN L.T., DEGN H., LLOYD D. and BOHATKA S., 1991. Identification of dissolved volatile metabolites in microbial cultures by membrane inlet tandem mass-spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, **20**, 253-258.

- LENOVICH L. M., BUCHANAN R. L., WORLEY N. J. and RESTAINO L., 1988. Effect of solute type on sorbate resistance in *Zygosaccharomyces-rouxii*. *J. Food Sci.*, **53**, 914-916.
- LOUREIRO V. and MALFEITO-FERREIRA M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 23-50.
- MACHADO R. M. D., TFOUNI S. A. V., VITORINO S. H. P., VICENTE E. and TOLEDO M. C. F., 2007. Presence of benzoic and sorbic acids in Brazilian wines and ciders. *Ciênc. Tecn. Alim.*, **27**, 847 – 850.
- MALFEITO-FERREIRA M., BARATA A., NOBRE A., TAVARES M., DIAS L., PEREIRA-DA-SILVA S., GONÇALVES G., RODRIGUES N. and LOUREIRO V., 2004. Behavior of *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* in wines. In: ASEV 55th Annual Meeting, San Diego, *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 304-A.
- MIHYAR G. F., YAMANI M. I. and ALSAED A. K., 1997. Resistance of yeast flora of labaneh to potassium sorbate and sodium benzoate. *J. Dairy Sci.*, **80**, 2304-2309.
- NEVES L., PAMPULHA M. E. and LOUREIRO-DIAS M. C., 1994. Resistance of food spoilage yeasts to sorbic acid. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**, 8-11.
- PÉREZ-PRIETO L.J., LÓPEZ-ROCA J.M., MARTÍNEZ-CUTILLAS A. PARDO-MÍNGUEZ F. and GÓMEZ-PLAZA E., 2003. Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5444-5449.
- PRAPHAILONG W. and FLEET G. H., 1997. The effect of pH, sodium chloride,

- sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.*, **14**, 459–468.
- RENOUF V., STREHAIANO P. and LONVAUD-FUNEL A., 2008. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control.* **19**, 208–216.
- RESTAINO L., LENOVICH L. M. and BILLS S., 1982. Effect of acids and sorbate combinations on the growth of 4 osmophilic yeasts. *J. Food Prot.*, **45**, 1138-&.
- RIBÉREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONÈCHE B. and LONVAUD A., 2006. *Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications.* John Wiley & Sons, Chichester, 497 p.
- RODRIGUES N., GONÇALVES G., PEREIRA-DA-SILVA S., MALFEITO-FERREIRA M. and LOUREIRO V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 588-599.
- SOFOS J. N., 1989. *Sorbate Food Preservatives.* CRC Press, Boca Raton, 248 p.
- SOMOLINOS M., GARCÍA D., CONDÓN S., MAÑAS P. and PAGÁN R., 2007. Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3814–3821.
- SPLITTSTOESSER D. F., QUEALE D. T. and MATTICK L. R., 1978. Growth of *Saccharomyces-bisporus var bisporus*, a yeast resistant to sorbic acid. *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, 272-276.

- STRATFORD M., 2006. Food and Beverage Spoilage Yeasts (335-379). *In: The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages*. Ed. Springer, New York, 453 p.
- STRATFORD M. and ANSLOW P. A., 1998. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**, 203-206.
- SUÁREZ R., SUÁREZ-LEPE J. A., MORATA A. and CALDERÓN F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.*, **102**, 10–21.
- WARTH A. D., 1977. Mechanism of resistance of *Saccharomyces baillii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.*, **43**, 215–230.
- WARTH A. D., 1985. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *J. Food Prot.*, **48**, 564–569.

4. DISCUSSÃO GERAL

A presença de *Brettanomyces/Dekkera* em 27% das amostras e as contagens foram similares aos estudos prévios de Gerbaux et al. (2000) e Rodrigues et al. (2001), o que não deixa de ser motivo de preocupação devido as dificuldades de controle dessa levedura. O mesmo pode ser referido aos valores de etil-fenóis, acima do limiar de preferência de 426 µg/L, em 46,03% das amostras. Vários autores apontaram valores similares (Di Stefano, 1985; Chatonnet et al., 1992; Pollnitz et al., 2000; Rodrigues et al., 2001; Arvik et al., 2002; López et al., 2002; Henschke et al., 2004), entretanto são elevados, considerando o impacto sensorial que provocam.

As contagens de *Brettanomyces/Dekkera* correlacionaram (nível de significância de 0,01) com as concentrações de 4-etil-fenol ($r_s = 0,397$) e 4-etil-guaiacol ($r_s = 0,318$), entretanto, a prevalência de etil-fenóis foi superior a de *Brettanomyces/Dekkera*, o que também foi observado por Rodrigues et al. (2001). Esse fato levou as seguintes suspeitas: produção de etil-fenóis anterior aos processos que reduzem a carga microbiana para o engarrafamento; aparente falha do meio de cultura ou da técnica de análise na recuperação das leveduras; as células poderiam estar no estado não cultivável, estudado por Millet & Lonvaud-Funel (2000), viáveis, mas incapazes de crescimento em meio

de cultura; ação de *Pichia*, *Candida* e *Lactobacillus*, microrganismos capazes de formar etil-fenóis em baixas concentrações (Chatonnet et al., 1995, 1997; Edlin et al., 1995; Dias et al., 2003a; Couto et al., 2006; Rivas et al., 2009).

Do ponto de vista microbiológico, cada garrafa deveria ser avaliada individualmente, devido à variação entre garrafas do mesmo vinho, observada também por outros autores (Chatonnet et al., 1993; Di Stefano, 1985). As diferentes condições ambientais de cada tanque, barrica ou garrafa, ou a maior carga microbiana de materiais e equipamentos no início da operação de engarrafamento podem ser responsáveis pelas variações.

As concentrações de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol correlacionaram ($r_s = 0,860$), e a razão entre elas foi 1,37 a 21,98, o que se aproxima da faixa encontrada por Henschke et al. (2004), de 1,6 a 38. Essa razão depende da relativa abundância dos precursores, o que varia com a região e variedade de uva (Pollnitz et al., 2000; Henschke et al., 2004; Romano et al., 2008).

Um número elevado de amostras (37,3%) apresentou níveis de SO_2 livre abaixo da média (6,5 mg/L), favoráveis ao desenvolvimento microbiano. A maior parte delas apresentou contagens de *Brettanomyces/Dekkera* e níveis elevados de etil-fenóis, o que justifica a correlação, mesmo que fraca, entre as concentrações de 4-etil-fenol e de SO_2 livre e total ($r_s = -0,177$ e $-0,176$, respectivamente). Um teor de SO_2 livre de 30 mg/L (Ribéreau-Gayon et al., 2003) a 40 mg/L (Gerbaux et al., 2000) é necessário para a eliminação total das populações viáveis de *Brettanomyces/Dekkera*. Em vinhos com pH elevado deve-se agregar doses maiores de SO_2 para ter o mesmo efeito que a pH baixo (Sudraut & Chauvet, 1985), devendo ser mantido com 0,8 mg/L de SO_2

molecular (Henick-Kling et al., 2000). Sabe-se que a fração SO₂ livre diminui, através da combinação e oxidação, com o tempo de garrafa, o que talvez justifique valores tão baixos. Entretanto, em 16% das amostras os níveis de SO₂ total ficaram abaixo de 20 mg/L, o que permite suspeitar que nesses casos a adição foi feita somente uma vez, deixando o vinho desprotegido.

O teor alcoólico correlacionou fracamente ($r_s = -0,282$) com as contagens de *Brettanomyces/Dekkera*, mas o maior número de amostras com contagens altas possuíam até 13% (v/v) de álcool, concentração mínima inibitória demonstrada por outros autores (Froudière & Larue, 1988; Chatonnet et al 1993; Rodrigues et al., 2001; Dias et al., 2003b).

A faixa intermediária de 5,5 a 6,7 g/L de acidez total foi preferencial para *Brettanomyces/Dekkera*, distribuindo-se amplamente na faixa de pH encontrada nos vinhos (dados não demonstrados).

Os vinhos apresentaram acidez volátil elevada, considerando a percepção sensorial em torno de 0,6 a 0,9 g/L (Ough & Amerine, 1988). Uma fraca correlação ($r_s = 0,193$) com as contagens sugere alguma produção de ácido acético por *Brettanomyces/Dekkera*, em vista dos açúcares residuais elevados. Em geral, a concentração de açúcar no meio está relacionada à produção de ácido acético (Ciani & Ferraro, 1997; Dias et al., 2003b; Abbott et al., 2005; Romano et al., 2008; Vigentini et al., 2008).

Segundo Chatonnet et al. (1995), níveis de 300 mg/L de açúcares residuais são suficientes para formar etil-fenóis em uma concentração correspondente ao limite de percepção. Já que concentrações tão baixas de açúcares são capazes de provocar o aumento de etil-fenóis a níveis elevados,

é possível pensar que concentrações maiores não fariam diferença, como demonstrado por Silva et al. (2004). De fato, a falta de correlação entre os açúcares residuais e o número de *Brettanomyces/Dekkera* (ou a concentração de etil-fenóis) leva a mesma conclusão.

A alteração dos vinhos por *Brettanomyces/Dekkera* sempre esteve associada ao período de maturação em barricas de madeira, entretanto neste trabalho não foi possível considerar diferenças entre os recipientes. As barricas de madeira apresentam uma série de fatores que favorecem a contaminação (oxigênio, porosidade, volume menor, etc) (Suarez et al., 2007), mas como observado por outros autores (Rodrigues et al., 2001; Pérez-Prieto et al., 2003; Coulon et al., 2010), o problema associado a essas leveduras não é exclusivo de longos períodos de maturação em barricas. O desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera* e produção de etil-fenóis é influenciada pelas práticas de vinificação (Chatonnet et al., 1992, 1995) e tempo de estocagem do vinho (Pérez-Prieto et al., 2003), o que pode ter relação com os resultados obtidos. As vinícolas brasileiras que dispõem e utilizam barricas de carvalho em grande escala ainda são poucas, devido ao alto custo. Desta forma, parece que o uso em pequena escala e por períodos curtos tem favorecido o maior cuidado durante a maturação, comparado com a estocagem em tanques de aço inoxidável ou de concreto.

A presença de *Brettanomyces/Dekkera* não está ligada a variedade de uva. Isso sugere que as práticas de vinificação sejam semelhantes para os dois tipos de vinhos. A razão entre 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol foi maior para Cabernet Sauvignon, o que segundo Pollnitz et al. (2000), está ligado à maior

concentração de ácido *p*-cumárico na variedade. Pelas características de pH e extrato seco total, os vinhos Cabernet Sauvignon estavam levemente mais propensos a alteração microbiana do que os vinhos Merlot, entretanto, não apresentaram maior prevalência ou contagens de *Brettanomyces/Dekkera*.

Na investigação da presença de *Brettanomyces/Dekkera* durante a vinificação, as amostras da uva e do mosto mostraram quantidades elevadas de leveduras, entretanto a presença de *Brettanomyces/Dekkera* não pôde ser confirmada. As características de morfologia, odor de 4-etil-fenol e crescimento lento sobre o meio seletivo, descritas por Rodrigues et al. (2001), não foram observadas.

A seletividade dos meios DBDM e DBDM modificado foi insuficiente para uvas e mostos, nas quais a diversidade e carga microbiana são maiores do que no vinho. No meio de Couto et al. (2005a), apesar da turbidez, o aroma fenólico não foi detectado nas amostras de uvas em até 29 dias de incubação. É possível que *Brettanomyces/Dekkera* esteja presente nas uvas em números realmente muito baixos, o que pode ser dependente das características do vinhedo, mas para considerar esta afirmativa é necessário o aperfeiçoamento de métodos para sua quantificação.

No meio de Couto et al. (2005a) o aroma fenólico foi detectado em 10 dias com 20 mL de amostra de mosto, sem deixar dúvidas, o que de acordo com Couto et al. (2005a), indica a presença de 0,5 a 2 células de *Brettanomyces/Dekkera*/mL. A possibilidade de 4-etil-fenol ter sido formado por outras leveduras, como *Pichia guilliermondii* (Dias et al., 2003a), não nos permite afirmar a presença de *Brettanomyces/Dekkera* no mosto. Renouf et al.

(2006) detectou *Brettanomyces/Dekkera* somente após a fermentação alcoólica, porém aqui fica a suspeita de sua entrada no mosto.

Em meio DBDM, Barata et al. (2008b, 2008d) encontraram populações de 3,7 a 4,11 log UFC/mL em uvas sadias, e entre 4,49 e 4,80 log UFC/mL em uvas danificadas. Neste trabalho as contagens nas uvas variaram de 3,21 a 4,27 log UFC/mL, o que é elevado se considerarmos que são espécies que crescem sob 6% de etanol, como única fonte de carbono (DBDM), e são resistentes a 100 mg/L de cicloheximida (DBDM modificado). Apesar da grande variabilidade de espécies de leveduras presentes em uvas e mostos, e que poderiam crescer nos meios utilizados, nas uvas houve predomínio de colônias brancas, redondas com borda levemente irregular, opacas, de aparência rugosa e consistência cremosa, e no mosto predominaram colônias de características similares, mas de coloração amarela. A baixa diversidade na morfologia sugere uma espécie predominante.

A presença do ácido acético, somado ao odor de 4-etil-fenol, seria uma boa indicação de *Brettanomyces/Dekkera*. Mas, nem sempre os dois produtos foram detectados juntamente, com isso acredita-se que o ácido acético pode ter sido produzido por outras leveduras. Leveduras aeróbicas como *Candida*, *Hansenula*, *Pichia anomala*, *M. pulcherrima* e *H. uvarum* (*K. apiculata*) são conhecidas por produzirem altos níveis de acetato de etila e ácido acético antes e durante a fase inicial de fermentação, levando a séria deterioração do vinho (Shimazu & Watanabe, 1981; Sponholz, 1993; Romano et al., 1992; Plata et al., 2003; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Os resultados das amostras sob fermentação alcoólica, no meio de Couto et al. (2005a), permitem prever entre 0,5 e 75 células de *Brettanomyces/Dekkera*/mL. Assim como nas amostras anteriores, o crescimento com 3 dias de incubação indicou que a maioria das colônias não se referiam a *Brettanomyces/Dekkera*. Leveduras de crescimento rápido diminuíram a partir do final fermentação alcoólica, o que deve ser atribuído a maior seletividade do vinho em relação ao mosto. Várias leveduras presentes no mosto são inibidas pelo teor alcoólico do vinho, como *Pichia guilliermondii* (Malfeito-Ferreira et al., 2004a). No meio de Couto et al. (2005a), o resultado positivo em 7 dias de incubação, indica em torno de 30 células/mL. As amostras posteriores a filtração e correção do SO₂ não apresentaram odor de 4-etil-fenol ou turbidez no meio de Couto et al. (2005a), apesar do crescimento sobre o meio DBDM. Etil-fenóis não foram produzidos no vinho durante o período estudado (5 meses), mostrando que, durante o processo de vinificação realizado não houve população de *Brettanomyces/Dekkera* suficiente para ocorrer transformação detectável dos ácidos cinâmicos. Uma população de 10³ UFC/mL deveria ser crítica para produção significativa de etil-fenóis (Renouf & Lonvaud-Funel, 2005).

O crescimento nos meios DBDM e DBDM modificado não mostrou diferença pelo test-t. Para as amostras de uvas e mostos, a fonte de carbono foi o agente mais seletivo. A partir da metade da fermentação alcoólica, a maior seletividade foi dada por 100 mg/L de cicloheximida. A grande tendência de crescimento de fungos filamentosos no meio DBDM pode ser devido à concentração inferior de cicloheximida. O aroma fenólico foi mais bem

discriminado no meio de Couto et al. (2005a). O aparecimento de resultado positivo em até 10 dias é vantajoso porque permite prever a população de leveduras, de acordo com Couto et al., 2005a).

Durante a vinificação o número de microrganismos da uva declinou com a adição de SO₂ no mosto e mais ainda com o andamento da fermentação alcoólica, devido certamente a sensibilidade de determinadas espécies ao etanol, e outros fatores de competição. Após a fermentação alcoólica o aumento da população ocorreu possivelmente devido à *bâtonnage*, a qual pode oxigenar o vinho. A filtração a terra e a correção do SO₂ livre para 40 mg/L provocaram uma redução drástica na população, o que levou a ausência de *Brettanomyces/Dekkera* no meio de Couto et al. (2005a). O desenvolvimento da população de leveduras não-*Saccharomyces* durante a vinificação, observado por Renouf et al. (2006), coincidiram com aqueles obtidos neste trabalho. Após dois meses de estocagem, a população reduziu ainda mais, mas algumas células permaneceram (no meio DBDM). Essas células restantes podem desenvolver-se futuramente, já que a tendência é de não submeter o vinho a filtrações posteriores, a fim de manter a complexidade de aromas, pigmentos e colóides que expressam todo seu potencial (Suárez et al., 2007).

A inibição da cepa de *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961) e dos isolados foi maior à medida que a concentração de ácido sórbico foi mais elevada. Os isolados apresentaram variação no grau de inibição. Em meio de cultura, a maioria teve a fase de adaptação estendida em 5 dias de incubação na concentração de 250 mg/L, que foi a de maior efeito inibitório. As demais concentrações demonstraram um crescimento aproximado entre si e com o

controle. Em geral, no vinho, com exceção de um dos isolados (11MA), que foi menos inibido, a fase de adaptação foi de 7 dias a partir da concentração de 100 mg/L, dependendo do isolado. As diferenças de crescimento em relação ao controle iniciaram a partir do sétimo dia, inicialmente nas concentrações mais elevadas (200 e 250 mg/L), e no decorrer do período, nas demais concentrações.

A cepa de *Dekkera bruxellensis* foi mais inibida que os isolados, especialmente nas concentrações acima de 150 mg/L. No vinho, o crescimento lento da cepa permitiu constatar uma fase de adaptação de 5 dias após a longa fase de latência (18 dias) e, somente no último dia (27°) do experimento houve diferença de todas as concentrações de ácido sórbico com o controle.

O perfil de crescimento da cepa de *Dekkera* e dos isolados mostra que a inibição provocada pelo ácido sórbico se dá pelo prolongamento da fase de adaptação, havendo um atraso no crescimento, mas sem impedi-lo. De fato, os ácidos fracos que atuam como conservantes, como o ácido sórbico, não matam microrganismos, mas inibem seu crescimento, causando prolongamento da fase de latência e diminuição do rendimento celular (Freese et al., 1973). Embora outros eventos possam estar envolvidos, a teoria clássica do processo de inibição, em ambiente de baixo pH, envolve a rápida difusão de moléculas não dissociadas através da membrana plasmática. Dentro das células essas moléculas liberam prótons, os quais acidificam o citoplasma e previnem o crescimento (Krebs et al., 1983; Cole & Keenan, 1987). A diminuição do rendimento celular pode ser devido ao desvio do ATP para o bombeamento de prótons através da membrana (Lambert & Stratford, 1999).

Foi demonstrado por Somolinos et al. (2007) que o ácido sórbico afeta a integridade e/ou a funcionalidade da membrana citoplasmática, concordando com Stratford & Anslow (1998).

Embora outros trabalhos relatem a resistência de *Brettanomyces* em concentrações que chegam a 500 mg/L de ácido sórbico (Beech & Carr, 1955, 1958; Goretti et al., 2009), a cepa de *Dekkera* estudada aqui mostra considerável inibição em 200 e 250 mg/L de ácido sórbico, se for considerado o tamanho do inóculo (10%) e as condições favoráveis de crescimento. *Brettanomyces* já foi apontada tanto sensível como resistente ao sorbato. Essa controvérsia pode estar relacionada às características da cepa ou das condições de crescimento. Diferentes respostas entre cepas de *Brettanomyces/Dekkera* foram demonstradas em estudos anteriores (Sofos, 1989; Conterno et al., 2006; Goretti et al., 2009).

O crescimento mais lento e a maior inibição no vinho, em relação ao meio de cultura, não permitiram observar a duração total da inibição. A maior sensibilidade ao ácido sórbico no vinho é de se esperar, pois outros fatores inibidores presentes interagem no sentido de dificultar o crescimento. O vinho utilizado apresentava teor alcoólico mais elevado, pH e concentração de açúcar inferior ao meio de cultura, além de uma pequena dose de SO₂ livre. A maioria dos vinhos possui faixas estreitas dos parâmetros citados, o que não pressupõe grandes variações em resposta ao ácido sórbico.

O uso do ácido sórbico tem sido recomendado somente no caso de vinhos suaves, para evitar alterações causadas por *Saccharomyces* (Ribéreau-Gayon et al., 2006). O ácido sórbico sempre deve estar associado ao dióxido

de enxofre, o qual previne o crescimento de bactérias, especialmente as bactérias lácticas que poderiam degradar o ácido sórbico, resultando em grave alteração olfativa (Crowell & Guymon, 1975). Machado et al. (2007) detectaram níveis de ácido sórbico de 91 a 309,5 mg/L em 15 amostras de vinhos tintos brasileiros. Muitas amostras mostraram níveis acima do limite legal de 200 mg/L, que é padrão em vários países.

5. CONCLUSÕES

A prevalência de *Brettanomyces/Dekkera* e as concentrações de etil-fenóis nos vinhos foram similares aos de outras regiões. Mas, considerando o impacto sensorial que provocam, apresentaram valores elevados. Os teores de SO₂ e açúcares residuais mostraram condições favoráveis a alterações microbianas. O crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* foi dependente dos teores de SO₂ e de álcool, enquanto pareceu indiferente as variações de açúcar, acidez e extrato seco total. Apesar da correlação, os etil-fenóis foram mais freqüentes do que *Brettanomyces/Dekkera*. A passagem dos vinhos por barricas e as variedades, Cabernet Sauvignon e Merlot, não influenciaram os níveis de contaminação e de etil-fenóis. A razão entre 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol foi maior para Cabernet Sauvignon.

A investigação de *Brettanomyces/Dekkera* em diferentes etapas da vinificação mostrou contagens elevadas nas uvas. Entretanto, as características de cultura não apontam para *Brettanomyces/Dekkera*, mostrando que os meios não foram seletivos. O primeiro indício da presença dessa levedura ocorreu no mosto, pelo odor de 4-etil-fenol no meio de Couto et al. (2005a). Os meios sólidos, DBDM e DBDM modificado foram mais seletivos para amostras de vinho, já que não permitiram a presença de leveduras de

crescimento rápido. A população de leveduras não-*Saccharomyces* reduziu com a fermentação alcoólica e a correção do SO₂, mas aumentou durante a fermentação malolática, com as operações de *bâtonnage*. O período de cinco meses após o esmagamento não foi suficiente para produção de etil-fenóis nos vinhos, provavelmente devido à baixa população de *Brettanomyces/Dekkera*.

Este estudo demonstrou que o ácido sórbico inibe a cepa de *Dekkera bruxellensis* (NRRL Y – 12961) e leveduras isoladas de vinho, em meio de cultura e em vinho tinto, com variações no grau de inibição para os isolados. No vinho, a fase de adaptação na presença de ácido sórbico levou em torno de 7 dias. A partir desse momento a inibição torna-se aparente especialmente para concentrações acima de 150 mg/L de ácido sórbico. No meio de cultura o crescimento foi mais rápido, permitindo uma melhor caracterização do período de inibição.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A grande preocupação em torno da levedura *Brettanomyces/Dekkera* e dos produtos de seu metabolismo, os etil-fenóis, de odores nada agradáveis para o apreciador de um bom vinho, levou pesquisadores do mundo vitivinícola a concentrarem esforços para desvendar os mistérios relacionados ao problema. Nos dez últimos anos muitos trabalhos foram feitos sobre o tema, envolvendo a prevalência, metabolismo, crescimento, nutrição, diversidade genética e fatores de inibição, mas especialmente, técnicas de detecção de *Brettanomyces/Dekkera* e de análise de etil-fenóis. Durante a realização deste trabalho, as maiores dificuldades encontraram-se justamente nos dois últimos enfoques. O único meio de cultura descrito como seletivo e diferencial deve ser aprimorado. Como inconveniente esse meio permite (ou facilita) o crescimento de fungos filamentosos, ao mesmo tempo em que aparentemente não recupera totalmente as células viáveis de *Brettanomyces/Dekkera*. Além disso, não é um meio completamente seletivo para amostras com carga microbiana elevada e diversa, como a uva e o mosto. Já as técnicas moleculares, que estão envolvidas em um número maior de estudos, são aplicadas na detecção, identificação e análise do perfil genético, mas a quantificação ainda parece que não é a ideal. Desta forma, o

estudo sobre o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* durante a vinificação ainda permanece em aberto. Na análise de etil-fenóis, a extração em fase sólida é uma técnica excelente no preparo da amostra, pois permite obter altas concentrações e recuperações de analitos presentes em concentrações muito baixas, como microgramas por litro. Essa técnica também evita o contato e gasto com grandes volumes de solventes da extração líquido-líquido. Por outro lado, o cromatograma resultante de uma amostra de vinho extraída em fase sólida apresenta muitos picos, o que dificulta a separação, sendo aconselhável o uso do detector de espectrometria de massas para correta identificação da pureza dos picos. Outra ferramenta valiosa são os padrões deuterados, que simplificam o preparo da amostra e garantem a identidade dos picos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. A.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 66, p. 641-647, 2005.

AGNOLUCCI, M.; VIGENTINI, I.; CAPURSO, G.; MERICO, A.; TIRELLI, A.; CAOMPAGNO, C.; FOSCHINO, R.; NUTI, M. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. **International Journal of Food Microbiology**. v. 130, p. 238-244, 2009.

ARVIK, T. J.; CONTERNO, L.; HENICK-KLING, T. *Brettanomyces bruxellensis* in New York State wines: a global issue. In: ANNUAL NEW YORK WINE INDUSTRY WORKSHOP, 31., 2002, New York, **Anais...** New York, April 3-5, 2002, p. 124-125.

AZNAR, M.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.F.; FERREIRA, V. Identification and quantification of impact odorants of aged wines from Rioja. CG-Olfactometry, Quantitative CG-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 2924-2929, 2001.

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

BARATA, A.; GONZÁLEZ, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.; QUEROL, A.; LOUREIRO, V. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. **FEMS Yeast Research**. v. 8, p. 1008–1017, 2008b.

BARATA, A.; PAGLIARA, D.; PICCININNO, T.; TARANTINO, F.; CIARDULLI, W.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. **FEMS Yeast Research**. v. 8, p. 1097–1102, 2008c.

BARATA, A.; SEBORRO, F.; BELLOCH, C.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged

by honeydew and sour rot. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 1182–1191, 2008d.

BARBIN, P.; CHEVAL,; GILIS, J. F.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Diversity in spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* isolated from french red wine. Assessment during fermentation of synthetic wine medium. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 114, n. 1, p. 69–75, 2008.

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.

BENITO, S.; PALOMERO, F.; MORATA, A.; CALDERÓN, F.; SUÁREZ-LEPE, J. A. A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, p. 1743-1751, 2009.

BETTIN, S. M.; ISIQUE, W. D.; FRANCO, D. W.; ANDERSEN, M. L.; KNUDSEN, S.; SKIBSTED, L. H. Phenols and metals in sugar-cane spirits. Quantitative analysis and effect on radical formation and radical scavenging. **European Food Research and Technology**. v. 215, p.169–175, 2002.

BOUTON, S.; CHATONNET, P. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavors in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 1 – 9, 2007.

CABONI, P.; SARAIS, G.; CABRAS, M.; ANGIONI, A. Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-Fluorescence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 7288-7293, 2007.

CALLEJA, A. & FALQUÉ, E. Volatile composition of Mencía wines. **Food Chemistry**. v. 90, p. 357-363, 2005.

CARRILLO, J. D.; TENA, M. T. Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 387, p.2547–2558, 2007.

CASTRO-MARTINEZ, C.; ESCUDERO-ABARCA, B. I.; RODRIGUEZ, J. G.; HAYWARD-JONES, P. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. **Journal of Food Process Engineering**. v. 28, n. 2, p. 133-143, 2005.

CHATONNET, P. & BOIDRON, J. N. Dosage des phénols volatiles dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. **Sciences des Aliments**, v. 3, p. 479-488, 1988.

CHATONNET, P.; BOIDRON, J. N.; DUBOURDIEU, D. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en éthylphénols. **Journal International Science de la Vigne et du Vin**, v. 27, n. 4, p. 277-298, 1993.

CHATONNET, P.; BOIDRON, J.; PONS, M. Elevage des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. **Science des Aliments**, v. 10, p. 565-587, 1990.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 46, n. 4, p. 463-468, 1995.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of Science of Food and Agriculture**. v. 60, p. 165-178, 1992.

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

CIANI, M.; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 75, n. 4, p. 489-495, 1997.

CIANI, M.; MACCARELLI, F.; FATICHENTI, F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 419–422, 2003.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; ZIRONI, R. ; COMI, G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 3, p. 1347-1355, 2004.

COLE, M. B.; KEENAN, M. H. J. Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii* and its implications in weak-acid resistance. **Yeast**, v. 3, p. 23–32, 1987.

COMBINA M.; MERCADO L.; BORGIO P.; ELIA A.; JOFRÉ V.; GANGA A.; MARTINEZ C. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1055-1061, 2005.

COMITINI, F.; DE, J. I.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**. v. 238, n. 1, p. 235-240, 2004a.

COMITINI, F.; DI PIETRO, N.; ZACCHI, L.; MANNAZZU I.; CIANI M. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. **Microbiology**. v. 150, p. 2535-2541, 2004b.

CONNEL, L.; STENDER, H.; EDWARDS, C. G. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 53, n. 4, p. 322-324, 2002.

CONTERNO, L.; HENICK-KLING, T. Result of Brett survey in Finger Lakes Pinot Noir. In: ANNUAL NEW YORK WINE INDUSTRY WORKSHOP, 32., 2003, New York. **Anais...** Geneva, New York, 2-4 april 2003. p. 52-57.

CONTERNO, L.; JOSEPH, C. L. M.; ARVIK, T. J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 57, p. 139-147, 2006.

CONTRERAS, A.; SALINAS, F.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Polymerase chain reaction confirmatory method for microbiological detection of *Brettanomyces bruxellensis* in wines. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. v. 16, p. 308-319, 2008.

COSTA, A.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. **Food Microbiology**. v. 25, p. 422-427, 2008.

COSTELLO, P. J.; LEE, T. H.; HENSCHKE, P. A. Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. v. 7, p. 160-167, 2001.

COSTELLO, P. J.; STOCKLEY, C. S.; LEE, T. H.; HENSCHKE, P. A. Current selection criteria of lactic acid bacteria for malolactic fermentation. In: AUSTRALIAN WINE INDUSTRY TECHNICAL CONFERENCE, 8.; Oct 25-29, 1992. **Proceedings...** Adelaide: Stockley, C. S., Johnstone, R. S., Leske, P. A., Lee, T. H., Eds.; Winetitles, 1993. p. 142-147.

COULON, J.; PERELLO, M. C.; LONVAUD-FUNEL, A.; REVEL, G.; RENOUF, V. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. **Journal of Applied Microbiology**. v. 108, p. 1450-1458, 2010.

COUTO, J. A.; BARBOSA, A.; HOGG, T. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. **Letters in Applied Microbiology**. v. 41, p. 505-510, 2005a.

COUTO, J. A.; NEVES, F.; CAMPOS, F.; HOGG, T. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 104, n. 3, p. 337-344, 2005b.

COUTO, J. A.; CAMPOS, F. M.; FIGUEIREDO, A. R.; HOGG T. A. Ability of Lactic Acid Bacteria to Produce Volatile Phenols. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 166-171, 2006.

CROWELL, E. A.; GUYMON, M. F. Wine constituents arising from sorbic acid addition and identification of 2-ethoxyhexa-3,5-diene as a source of geranium-like off- odour. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 26, p. 97–102, 1975.

CULLERÉ, L.; AZNAR, M.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Fast fractionation of complex organic extracts by normal-phase chromatography on a solid-phase extraction polymeric sorbent. Optimization of a method to fractionate wine flavor extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1017, p. 17–26, 2003.

CULLERÉ, L.; ESCUDERO, A.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 6, p.1653-1660, 2004.

CURTIN, C. D.; BELLON, J. R.; HENSCHKE, P. A.; GODDEN, P. W.; LOPES, M. A. B. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. **FEMS Yeast Research**. v. 7, p. 471–481, 2007.

DELAHERCHE, A.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**. v. 97, p. 910-915, 2004.

DELFINI, C.; GAIA, P.; SCHELLINI, R.; STRANO, M.; PAGLIARA, A.; AMBRÒ, S. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 5605–5611, 2002.

DEMAIN, A. L.; PHAFF, H. J.; KURTZMAN, C. P. The industrial and agricultural significance of yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), **The Yeasts, A Taxonomic Study**, Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998. p. 13–19.

DI STEFANO, R. The ethyl phenols in wines. **Vignevini**. v. 12, n. 5, p. 35-38, 1985.

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

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

DIAZ-PLAZA, E. M.; REYERO, J. R.; PARDO, F.; SALINAS, M. R. Comparison of wine aromas with different tannic content aged in French oak barrels. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, n. 1, p. 139-145, 2002.

DÍEZ, J.; DOMÍNGUEZ, C.; GUILLÉN, D. A.; VEAS, R.; BARROSO, C. G. Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 263 – 267, 2004.

DOMINGUEZ, C.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G. Determination of volatile phenols in fino sherry wines. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, n. 1, p. 95-102, 2002.

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

EDLIN, D. A. N.; NARBAD, A.; DICKINSON, J. R.; LLOYD, D. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 125, n. 2-3, p. 311-315, 1995.

EGLI, C. M.; HENICK-KLING, T. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 52, n. 3, p. 241-247, 2001.

ESCALONA, H.; BIRKMYRE, L.; PIGGOTT, J. R.; PATERSON, A. Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 45-54, 2002.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p. 329-337, 1999.

FALQUÉ, E.; DARRIET, P.; FERNÁNDEZ, E.; DUBOURDIEU, D. Volatile profile and differentiation between Albariño wines from different origins. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 464 – 475, 2008.

FERREIRA, V.; AZNAR, M.; LÓPEZ, E.; CACHO, J. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of na extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 10, p. 4818-4824, 2001.

FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Yeasts - Growth during fermentation. In: FLEET, G.H. (Ed.). **Wine Microbiology and Biotechnology**. Chur: Harwood Academic Publishers, 1993. cap. 2, p. 27–55.

FREER, S. N. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 18, n. 3, p. 271-275, 2002.

FREER, S. N.; DIEN, B.; MATSUDA, S. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* under conditions of constant pH. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 19, n. 1, p. 101-105, 2003.

FREESE, E.; SHEU, C. W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v. 241, p. 321-325, 1973.

FREY, S.; HENRY, T.; MAHANEY, P.; PARIS, P. Influence of the barrel on the growth of *Brettanomyces* yeast in barreled red wine. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 47, n. 3, p. 348,1996.

FROUDIÉRE, I.; LARUE, F. Conditions de survie de *Brettanomyces (Dekkera)* dans le moût de raisin et le vin. **Connaissance de la vigne et du vin**. v. 2, p. 296–303, 1988.

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

FUGELSANG, K. C.; OSBORN, M. M.; MULLER, C. J. Interaction of *Brettanomyces*, *Dekkera*, and *Saccharomyces* during fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 44, n. 3, p. 350, 1993.

FUGELSANG, K. C.; ZOECKLEIN, B. W. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 54, n. 4, p. 294-300, 2003.

GADOURY, D. M.; SEEM, R. C.; WILCOX, W.; HENICK-KLING, T. Effect of powdery mildew on bunch rots, berry microflora, and juice and wine quality. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON POWDERY AND DOWNY MILDEW IN GRAPEVINE, 4.; 2002, Davis. **Proceedings...**Davis: Department of Plant Pathology, University of California (Pubs.), 2002. p. 64–65.

GANGA, A. Técnicas de detección e identificación de *Brettanomyces*: estudio de cepas del continente americano y europeo. In: CONGRESSO

LATINOAMERICANO DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA, 9.; 2003, Santiago. **Anais...**Santiago: Pontificia Universidad Católica de Chile, 24-28 de noviembre de 2003. p. 203-204.

GARDE-CERDÁN, T.; LORENZO, C.; CAROT, J. M.; JABALOYES, J. M.; ESTEVE, M. D.; SALINAS, M. R. Statistical differentiation of wines of different geographic origin and aged in barrel according to some volatile components and ethylphenols. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1025 – 1031, 2008.

GERBAUX, V.; JEUDY S.; MONAMY C. Etude des phénols volatils dans les vins de Pinot Noir en Bourgogne. **Bulletin OIV**, v. 73, n. 835-836, p. 581-599, 2000.

GERBAUX, V.; VINCENT, B.; BERTRAND, A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 131–137, 2002.

GERÓS, H.; AZEVEDO, M.; CÁSSIO, F. Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. **Food Technology Biotechnology**. v. 38, n. 1, p. 59-62, 2000.

GOLDBERG, D. M.; TSANG, E.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G. J. Quercetin and *p*-coumaric acid concentrations in commercial wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 49, n. 2, p. 142-151, 1998.

GONÇALVES, B.; FALCO, V.; MOUTINHO-PEREIRA; BACELAR, E.; PEIXOTO, F.; CORREIA, C. Effects of elevated CO₂ on grapevine (*Vitis vinifera* L.): Volatile composition, phenolic content, and in vitro antioxidant activity of red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 265-273, 2009.

GORETTI, M.; TURCHETTI, B.; BURATTA, M.; BRANDA, E.; CORASSI, L.; VAUGHAN-MARTINI, A.; BUZZINI, P. *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. **International Journal Food Microbiology**, v. 131, p. 178-182, 2009.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VICENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**. v. 87, p. 949-956, 1999.

GRBIN, P. R.; COSTELLO, P. J.; HERDERICH, M.; MARKIDES, A. J.; HENSCHKE, P. A.; LEE, T. H. Developments in the sensory, chemical and microbiological basis of mousy taint in wine. In: AUSTRALIAN WINE INDUSTRY TECHNICAL CONFERENCE, 9.; 16-19, July 1995; Adelaide. **Proceedings...**Adelaide: Stockely, C. S., Sas, A. N., Johnstone, R. S., Lee, T. H., Eds.; Winetitles, 1996, p. 57-61.

GRBIN, P. R.; HENSCHKE, P. A. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. v. 6, n. 3, p. 255-262, 2000.

HARRIS, V.; FORD, C. M.; JIRANEK, V.; GRBIN, P. R. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilization of hydroxycinnamic acids in synthetic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 78, p. 997–1006, 2008.

HARRIS, V.; JIRANEK, V.; FORD, C. M.; GRBIN, P. R. Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 86, p. 721–729, 2010.

HAYASHI, N.; ARAI, R.; TADA, S.; TAGUCHI, H.; OGAWA, Y. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. **Food Microbiology**. v. 24, p. 778-785, 2007.

HEIMOFF, S. Brett study yields surprises. **Wine Business Monthly**. n. 3, p. 37-40, 1996.

HENICK-KLING, T.; EGLI, C.; LICKER, J.; MITRAKUL, C.; ACREE, T.E. *Brettanomyces* in wine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON COOL CLIMATE VITICULTURE & OENOLOGY, 15; 2000, Melbourne. **Proceedings of the International Symposium on Grapevine Phylloxera Management**, Melbourne: Winetitles, 2002. p. 1-7.

HENSCHKE, P.; BELLON, J.; CAPONE, D.; COULTER, A.; COWEY, G.; COZZOLINO, D.; CURTIN, C.; FIELD, J.; GISHEN, M.; GRAVES, P.; LATEY, K.; ROBINSON, E.; FRANCIS, I. L.; LOPES, M. B. ; GODDEN, P. Incidence and control of *Brettanomyces*: The Australian perspective. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 55, n. 3, p. 304-A, 2004.

HERDERICH, M.; COSTELLO, P. J.; GRBIN, P. R.; HENSCHKE, P. A. The occurrence of 2-acetyl-1-pyrroline in mousy wines. **Natural Product Letters**, v. 7, p. 129-132, 1995.

HERESZTYN, T. Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts. **Archives of Microbiology**, 146, 96–98, 1986.

HESFORD, F.; SCHNEIDER, K.; PORRET, N.; GAFNER, J. Identification and analysis of 4-ethyl catechol in wines tainted by *Brettanomyces* off-flavor. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 55, n. 3, p. 304-A, 2004.

HIERRO, N.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 11, p. 7148-7155, 2006.

IBEAS, J. I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F.; JIMENEZ, J. Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a Nested PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 3, p. 998-1003, 1996.

JENSEN, S. L.; UMIKER, N. L.; ARNEBORG, N.; EDWARDS, C. G. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. **Food Microbiology**. v. 26, p. 915–921, 2009.

JOSEPH, C. M. L.; BISSON, L. Physiological diversity of *Brettanomyces/Dekkera* isolated from wine. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 55, n. 3, p. 302-A, 2004.

KREBS, H. A.; WIGGINS, D.; STUBBS, M.; SOLS, A.; BEDOYA, F. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. **Biochemistry Journal**, v. 214, p. 657–663, 1983.

KUNIYUKI, A. H.; ROUS, C.; SANDERSON, J. L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of *Brettanomyces* contaminants in wine production. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 35, n. 3, p. 143-145, 1984.

LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 157-164, 1999.

LARUE, F.; ROZES, N.; FROUDIERE, I.; COUTY, C.; FERREIRA, G. P. Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les mouts et les vins. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, 25, 149-165, 1991.

LAURITSEN, F. R.; NIELSEN, L. T.; DEGN, H.; LLOYD, D.; BOHATKA, S. Identification of dissolved volatile metabolites in microbial cultures by membrane inlet tandem mass-spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**. v. 20, 253-258, 1991.

LÓPEZ, R.; AZNAR, M.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 167-177, 2002.

LOUREIRO V. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. **Food Research International**, v. 33, 247-256, 2000.

LOUREIRO V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, 23-50, 2003.

LONVAUD-FUNEL, A.; RENOUF, V. Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barrique usagées. **Revue Française d'Oenologie**. v. 211, p. 10-13, 2005.

MACHADO, R. M. D.; TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. F. Presence of benzoic and sorbic acids in Brazilian wines and ciders. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 847 – 850, 2007.

MAJCENOVIC, A. B. Etilfenoles como indicadores de la actividad de *Brettanomyces*. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA, 9.; 2003, Santiago. **Anais...Santiago**: Pontificia Universidad Católica de Chile, 24-28 de novembro de 2003. p. 205.

MALFEITO-FERREIRA, M.; BARATA, A.; NOBRE, A.; TAVARES M.; DIAS L.; PEREIRA-DA-SILVA S.; GONÇALVES G.; RODRIGUES N.; LOUREIRO V. Behavior of *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* in wines. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 55, n. 3, p. 304-A, 2004a.

MALFEITO-FERREIRA, M.; LAUREANO, P.; BARATA, A.; D'ANTUONO, I.; STENDER, H.; LOUREIRO, V. Effect of different barrique sanitation procedures on yeasts isolated from the inner layers of wood. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 55, n. 3, p. 304-A, 2004b.

MALFEITO-FERREIRA, M.; TARECO, M.; LOUREIRO, V. Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. **International Journal of Food Microbiology**. v. 38, n. 2-3, p. 143-155, 1997.

MARTORELL, N.; MARTI, M.P.; MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Determination of 4-ethyl-guaiacol and 4-ethylphenol in red wines using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 975, n. 2, p. 349-354, 2002.

MARTORELL, P.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, T.; LOUREIRO, V.; QUEROL, A. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. **International Journal of Food Microbiology**. v. 106, p. 79-84, 2006.

MEJÍAS, R. C.; MARÍN, R. N.; MORENO, M. V. G.; BARROSO, C. G. Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 995, p. 11–20, 2003.

MEYER, J.; LIESENER, A.; GÖTZ, S.; HAYEN, H.; KARST, U. Liquid chromatography with on-line electrochemical derivatization and fluorescence detection for determination of phenols. **Analytical Chemistry**. v. 75, p. 922-926, 2003.

MIHYAR, G. F.; YAMANI, M. I.; ALSAED, A. K. Resistance of yeast flora of labaneh to potassium sorbate and sodium benzoate. **Journal of Dairy Science**. v. 80, n. 10, p. 2304-2309, 1997.

MILLET, V.; LONVAUD-FUNEL A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. **Letters Applied Microbiology**, v. 30, p. 136-141, 2000.

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**. v. 16, n. 1, p. 3-14, 1999.

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**, v. 458, n. 1, p.111-117, 2002.

NEVES, L.; PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Resistance of food spoilage yeasts to sorbic acid. **Letters Applied Microbiology**. v. 19, p. 8-11, 1994.

NIKFARDJAM, M. P.; MAY, B.; TSCHERSCH, C. 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol contents in bottled wines from the German 'Württemberg' region. **European Food Research and Technology**. v. 230, p. 333–341, 2009.

OELOFSE, A.; LONVAUD-FUNEL, A.; DU TOIT, M. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. **Food Microbiology**. v. 26, p. 377-385, 2009.

OUGH, C. S.; AMERINE, M. A. **Methods for analysis of musts and wines**. 2^a ed., New York: John Wiley & Sons, 1988.

PÉREZ-PRIETO, L.J.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; PARDO-MÍNGUEZ, F.; GÓMEZ-PLAZA, E. Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 18, p. 5444-5449, 2003.

PHISTER, T. G.; MILLS, D. A. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 12, p. 7430-7434, 2003.

PIZARRO, C.; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Determination of Brett character responsible compounds in wines by using multiple headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 176–181, 2007.

PLATA, C.; MILLÁN, C.; MAURICIO, J. C.; ORTEGA, J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 20, p. 217–224, 2003.

POLLNITZ, A. P.; PARDON, K. H.; SEFTON, M. A. Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. **Journal of Chromatography A**, v. 874, n. 1, p. 101-109, 2000.

POLLNITZ, A. P.; PARDON, K. H.; SYKES, M.; SEFTON, M. A. The effects of sample preparation and gas chromatograph injection techniques on the accuracy of measuring guaiacol, 4-methylguaiacol and other volatile oak compounds in oak extracts by stable isotope dilution analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 3244-3252, 2004.

PRAPHAILONG, W.; FLEET, G.H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiology**, v. 14, p. 459–468, 1997.

RAYNE, S.; EGGERS, N. J. Quantitative determination of 4-ethylphenol and 4-ethyl-methoxyphenol in wines by a stable isotope dilution assay. **Journal of Chromatography A**, v. 1167, p. 195–201, 2007.

RENOUF, V.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 149–164, 2007.

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

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

RENOUF, V.; LONVAUD-FUNEL, A. Incidence microbiologique de l'utilisation de barriques neuves et/ou de barriques usagées. **Revue Française d'Œnologie**, v. 211, p. 10–13, 2005.

RENOUF, V.; STREHAIANO, P.; LONVAUD-FUNEL, A. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. **Food Control**, v. 19, p.208–216, 2008.

RESTAINO, L.; LENOVICH, L. M.; BILLS, S. Effect of acids and sorbate combinations on the growth of 4 osmophilic yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 12, p. 1138-&, 1982.

RIBÉREAU-GAYON, P. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartarique dans les limbes et les baies de *V. vinifera*. **C. R. Acad Sciences**, v. 260, p. 341, 1965.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006, 497 p.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Tratado de Enología: Química del Vino, Estabilización y Tratamientos**. v. 2, Buenos Aires: Hemisfério Sur, 2003, 537 p.

RIVAS, B.; RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, J. A.; LANDETE, J. A.; MUÑOZ, R. Molecular Screening of Wine Lactic Acid Bacteria Degrading Hydroxycinnamic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 490–494, 2009.

ROCCATO A.; DAGUERRE C.; MERCADO L. *et al.* Detección de *Dekkera/Brettanomyces* en uva, mostos y vinos. Metodología y primeros resultados. **VIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología**. Montevideo. Uruguay. 2001.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; MALFEITO-FERREIRA, M. AND LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90. p. 588-599. 2001.

ROMANO, A.; PERELLO, M. C.; DE REVEL, G. ; LONVAUD-FUNEL, A. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces /Dekkera bruxellensis* in red wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1577–1585, 2008.

ROMANO, A.; PERELLO, M. C.; LONVAUD-FUNEL, A.; SICARD, G.; DE REVEL, G. Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". **Food Chemistry**. v. 114, p. 15–19, 2009.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; COMI, G.; ZIRONI, R. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 126– 130, 1992.

SANGORRÍN, M. P.; LOPES, C. A.; JOFRÉ, V.; QUEROL, A.; CABALLERO, A. C. Spoilage yeasts from Patagonian cellars: characterization and potencial biocontrol based on killer interactions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 945-953, 2008.

SHIMAZU, Y.; WATANABE, M. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, p. 27–32, 1981.

SHINOHARA, T.; KUBODERA, S.; YANAGIDA, F. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 90, n. 1, p. 90-97. 2000.

SILVA, L. R.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R. M.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. **Food Chemistry**. v. 89, p. 185-189. 2005.

SILVA, P.; CARDOSO, H.; GERÓS, H. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp.. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 55, n. 1, p. 65-72, 2004.

SIMÓN, B. F.; CADAHÍA, E.; JALOCHA, J. Volatile Compounds in a Spanish Red Wine Aged in Barrels Made of Spanish, French, and American Oak Wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 7671-7678, 2003.

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

SMITH, M. T. *Brettanomyces* Kufferath and van Laer. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts**. 4. ed., New York: Elsevier, 1998. cap. 63, p. 450–453.

SOFOS, J.N. **Sorbate Food Preservatives**, Boca Raton: CRC Press, 1989.

SOMOLINOS, M.; GARCÍA, D.; CONDÓN, S.; MAÑAS, P.; PAGÁN, R. Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3814–3821, 2007.

STENDER, H.; KURTZMAN, C.; HYLDIG-NIELSEN, J. J.; SØRENSEN, D.; BROOMER, A.; OLIVEIRA, K.; PERRY-O'KEEFE, H.; SAGE, A.; YOUNG, B.; COULL, J. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 2, p. 938-941, 2001.

STRATFORD, M. Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: QUEROL, A.; FLEET, G. H. **The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages**. v. 2, Berlin: Springer, 2006. cap. 11.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. A. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. **Letters Applied Microbiology**, v. 27, p. 203-206, 1998.

STRAUSS, C. R.; HERESZTYN, T. 2-Acetyltetrahydropyridines - a cause of the 'mousy' taint in wine. **Chemistry & Industry**, p. 109-111, 1984.

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

SUÁREZ LEPE, J. A.; ÍÑIGO LEAL, B. **Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación**. Madrid: Mundi-Prensa. 2004.

SUDRAUT, P.; CHAUVET, S. Activité antilevure de l'anhydride sulfureux moléculaire. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 19, p. 31–40, 1985.

TESSONNIÈRE, H.; VIDAL, S.; BARNAVON, L.; ALEXANDRE, H.; REMIZE, F. Design and performance testing of a real time PCR assay form sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. **International Journal of Food Microbiology**. v. 129, p. 237-243, 2009.

TUCKNOTT, O. G. Taints in fermented juice products: Mousy taint in cider; **Annual Report** 1977; Long Ashton Research Station: University of Bristol, 1978; p. 132.

UGARTE, P.; VILLALOBOS, J. I.; BORDEU, E. *et al.* Desarrollo y evaluacion de um sistema de remocion de 4-etil-fenol y 4-etil-guaiacol de vinos tintos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA, 9.; 2003, Santiago. **Anais...**Santiago: Pontificia Universidad Católica de Chile, 24-28 de novembro de 2003. p. 94.

USCANGA, M. G. A.; DÉLIA, M. L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003.

VAN DER WALT, J. P.; VAN KERKEN, A. E. The wine yeasts of the Cape. Part V. Studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 27, p. 81–90, 1961.

VANBENEDEN, N.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 237–242, 2006.

VANBENEDEN, N.; GILS, F.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. **Food Chemistry**. v. 107, p. 221–230, 2008.

VERACHTERT, H.; DAWOUD, E. Microbiology of lambic-type beers. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 57, p. R11–R12, 1984.

VIGENTINI, I.; ROMANO, A.; COMPAGNO, C.; MERICO, A.; MOLINARI, F.; TIRELLI, A.; FOSCHINO, R.; VOLONTERIO, G. Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1087–1096, 2008.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons. 1998, 350 p.

WARTH, A. D. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 564–569, 1985.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K. C.; GUMP, B. H. *et al.* **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Acribia. 2001. 613 p.

ANEXOS

Anexo 1 – Contagens de *Brettanomyces/Dekkera* e concentrações de 4-etil-fenol (4-EF) e 4-etil-guaiacol (4-EG) em vinhos tintos varietais brasileiros.

Vinícolas	Amostras	<i>Brett/Dekkera</i> (UFC/mL)	4-etil-fenol (µg/L)	4-etil-guaiacol (µg/L)	EF/EG
1	CS (2004)	ND	239,98	55,35	4,34
1	CS (2004)	ND	229,53	56,18	4,09
1	M (2004)	ND	219,74	49,21	4,47
1	M (2004)	ND	230,80	59,99	3,85
2	CS (2004)	ND	ND	ND	ND
2	CS (2004)	ND	440,37	52,08	8,46
2	M (2004)	ND	557,22	53,68	10,38
2	M (2004)	ND	549,08	57,61	9,53
3	CS (2004)	ND	714,43	77,02	9,28
3	CS (2004)	ND	641,53	75,80	8,46
3	M (2004)	ND	791,87	82,46	9,60
3	M (2004)	ND	800,05	111,55	7,17
4	CS (2004)	ND	ND	ND	ND
4	CS (2004)	ND	ND	ND	ND
4	M (2004)	ND	59,45	21,10	2,82
4	M (2004)	ND	44,33	14,82	2,99
4	CS (2003)	2,93	1.350,61	81,62	16,55
4	CS (2003)	680	1.120,56	80,24	13,97
4	M (2003)	ND	469,11	108,66	4,32
4	M (2003)	ND	106,89	44,54	2,40
5	CS (2005)	ND	875,92	150,68	5,81
5	CS (2005)	ND	718,57	88,48	8,12
5	M (2005)	ND	249,84	71,54	3,49
5	M (2005)	ND	253,43	62,02	4,09
5	M (2005)	ND	153,65	57,21	2,69
5	M (2005)	ND	147,82	55,28	2,67
6	CS (2004)	ND	172,44	83,62	2,06
6	CS (2004)	ND	199,12	85,90	2,32
6	M (2004)	ND	12,79	4,96	2,58
6	M (2004)	ND	ND	ND	ND
7	CS (2004)	ND	233,00	17,78	13,11
7	CS (2004)	ND	259,55	19,18	13,54
7	M (2004)	ND	1.078,45	102,03	10,57
7	M (2004)	ND	921,72	78,92	11,68
8	CS (2004)	ND	238,07	76,21	3,12
8	CS (2004)	ND	269,39	47,25	5,70
8	M (2002)	ND	777,87	51,76	15,03
8	M (2002)	1,5	813,97	58,13	14,00
9	CS (2004)	ND	586,91	73,80	7,95
9	CS (2004)	ND	687,53	102,28	6,72
9	M (2004)	ND	1.758,84	220,79	7,97
9	M (2004)	ND	1.135,19	162,32	6,99
10	CS (2004)	ND	226,49	36,37	6,23

Anexo 1 (continuação)

Vinícolas	Amostras	<i>Brett/Dekkera</i> (UFC/mL)	4-etil-fenol (µg/L)	4-etil-guaiacol (µg/L)	EF/EG
10	CS (2004)	ND	194,38	31,77	6,12
10	M (2002)	ND	113,49	24,03	4,72
10	M (2002)	ND	113,85	23,57	4,83
11	CS (2004)	4,25	1.184,39	73,73	16,06
11	CS (2004)	0,4	1.218,86	76,31	15,97
11	M (2004)	114,93	1.336,39	130,08	10,27
11	M (2004)	45,2	1.394,39	130,70	10,67
12	CS (2004)	ND	1.376,05	127,05	10,83
12	CS (2004)	14,5	1.201,59	110,64	10,86
12	M (2004)	0,4	370,76	71,93	5,15
12	M (2004)	ND	498,56	74,93	6,65
13	CS (2004)	ND	227,33	22,25	10,22
13	CS (2004)	ND	227,10	18,79	12,08
13	M (2004)	ND	61,50	12,62	4,87
13	M (2004)	ND	74,15	13,04	5,69
14	CS (2004)	ND	269,34	51,77	5,20
14	CS (2004)	ND	236,61	44,27	5,35
14	M (2004)	ND	176,84	27,24	6,49
14	M (2004)	ND	77,64	11,07	7,01
15	M (2004)	ND	1.276,82	158,98	8,03
15	M (2004)	ND	2.417,83	195,55	12,36
15	CS (2004)	ND	3.788,85	259,68	14,59
15	CS (2004)	398	3.702,44	242,98	15,24
16	M (2005)	ND	431,51	41,60	10,37
16	M (2005)	0,1	510,87	46,61	10,96
16	CS (2004)	ND	750,98	142,11	5,28
16	CS (2004)	ND	677,68	124,10	5,46
17	M (2004)	ND	334,78	52,70	6,35
17	M (2004)	80	382,89	49,19	7,78
17	M (2005)	99	2.446,75	111,31	21,98
17	M (2005)	ND	80,63	18,90	4,27
17	M (2005)	ND	114,70	14,05	8,16
17	M (2005)	ND	ND	ND	ND
17	CS (2005)	0,1	1.379,79	100,27	13,76
17	CS (2005)	195	539,81	58,72	9,19
17	CS (2007)	ND	174,57	19,07	9,15
17	CS (2007)	ND	178,24	15,06	11,84
17	T(2005)	12,25	3.819,65	241,70	15,80
17	CF (2005)	70	323,97	41,24	7,86
17	CF (2005)	ND	415,16	24,49	16,95
17	CSM (2008)	24,5	ND	ND	ND
17	CSM (2008)	20	ND	ND	ND
18	CS (2005)	ND	207,45	85,09	2,44
18	CS (2005)	ND	205,98	35,71	5,77
18	M (2004)	ND	66,76	48,53	1,38
18	M (2004)	ND	59,45	18,05	3,29

Anexo 1 (continuação)

Vinícolas	Amostras	<i>Brett/Dekkera</i> (UFC/mL)	4-etil-fenol (µg/L)	4-etil-guaiacol (µg/L)	EF/E G
18	CS (2004)	ND	96,73	22,14	4,37
18	CS (2004)	ND	98,03	21,28	4,61
18	M (2005)	ND	666,80	65,08	10,25
18	M (2005)	ND	620,29	72,16	8,60
18	CS - tq 209	ND	798,46	69,33	11,52
18	CS - tq 243	ND	326,73	58,66	5,57
19	CS (2004)	ND	335,75	21,03	15,96
19	CS (2004)	ND	403,15	28,55	14,12
19	M (2004)	ND	175,85	22,55	7,80
19	M (2004)	ND	283,74	38,57	7,36
20	M	ND	181,90	42,60	4,27
20	M	ND	200,49	47,91	4,18
21	M (2005)	ND	ND	ND	ND
21	M (2005)	ND	ND	ND	ND
22	M (2005)	300	729,02	84,43	8,63
22	M (2005)	900	569,54	62,63	9,09
22	M (2005)	ND	848,97	78,50	10,82
22	M (2005)	ND	1.215,97	102,69	11,84
22	M (2006) - tq 34	4,6	331,03	35,98	9,20
22	CS (2005)	80	677,27	61,16	11,07
22	CS (2005)	15,31	405,28	65,98	6,14
22	Mars (2006)	2.250	577,64	71,88	8,04
22	Mars (2006)	2.000	421,42	58,44	7,21
23	M (2002)	47	1.337,36	132,40	10,10
23	M (2002)	85	1.393,25	226,80	6,14
24	M (2004)	670	688,32	87,76	7,84
24	M (2004)	1.400	392,34	65,07	6,03
24	CS (2005)	ND	247,02	43,16	5,72
24	CS (2005)	ND	238,95	41,65	5,74
24	T (2005)	45	275,04	53,13	5,18
24	T (2005)	10,6	250,37	50,57	4,95
25	M (2004)	ND	849,01	78,51	10,81
25	M (2004)	ND	910,58	92,26	9,87
25	CS (2004)	1,45	1.434,34	85,97	16,68
25	CS (2004)	7,45	1.422,29	93,83	15,16
26	CS (2005)	ND	163,46	11,89	13,75
26	CS (2005)	ND	225,44	15,69	14,36

CS, Cabernet Sauvignon; M, Merlot; CSM, mistura de Cabernet sauvignon e Merlot; T, Tannat; Mars, Marselan; CF, Cabernet Franc; tq, tanque; ND, não detectado.

VITA

Dados Pessoais

Nome: Larissa Dias de Ávila

Nascimento: 22/01/1963, Porto Alegre, RS, Brasil.

Filiação: Moacir Mesquita de Ávila e Leda Dias de Ávila

E-mail: ldavila11@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2006 – atual Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Universidade Federal do Rio Grande do sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

1991 – 1995 Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

1989 – 1989 Especialização em Princípios da Biotecnologia Moderna.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

1980 – 1985 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

1977 – 1979 Ensino Médio (2º Grau).
Escola Estadual de 1º e IIº Graus Coronel Pilar, Santa Maria, RS, Brasil.

Atuação Profissional

2008 – atual Professora Assistente
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Bento Gonçalves, RS, Brasil.

2002 – 2008 Professora Assistente
Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, CEFET/BG, Bento Gonçalves, RS, Brasil.

1997 – 2002 Professora Assistente
Escola Agrotécnica Federal Presidente Juscelino Kubitschek, EAFPJK, Bento Gonçalves, RS, Brasil.

2001 Estágio em agro-indústria de frutas e legumes
Ecole Nationale de Formation Agronomique, ENFA, Toulouse,

França.

- 1990 – 1998 Farmacêutica responsável
Farmácia Drogamed Ltda, Novo Hamburgo, RS, Brasil.
- 1996 – 1997 Bolsista recém-mestre FAPERGS
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS,
Brasil.
- 1992 Estágio no setor de vinificação
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Bento
Gonçalves, RS, Brasil.
- 1990 Bolsista de aperfeiçoamento CNPQ
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto
alegre, RS, Brasil.
- 1988 – 1989 Bolsista de aperfeiçoamento CNPQ
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS,
Brasil.
- 1986 – 1988 Microbiologista
National Distillers do Brasil S A, Santana do Livramento, RS,
Brasil.
- 1986 Estágio em controle de qualidade
Cooperativa Regional de Laticínios, CORLAC, Santa Maria, RS,
Brasil.
- 1985 Estágio no setor de embutidos
Agroindústria Cotricruz, Cruz Alta, RS, Brasil.