



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

**Caracterização da conversão metabólica de ácidos  
fenólicos em fenóis voláteis por  
*Brettanomyces/Dekkera***

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Aplicada

por

Joana Lousada Gomes

Julho 2012



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

**Caracterização da conversão metabólica de ácidos fenólicos em fenóis voláteis por  
*Brettanomyces/Dekkera***

***Characterization of the metabolic conversion of phenolic acids to volatile phenols by  
Brettanomyces/Dekkera***

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Aplicada

por

Joana Lousada Gomes

Sob orientação de José António Couto e Francisco Campos

Julho 2012

*Deus é o nosso refúgio e a nossa força; amparou-nos nas tribulações.  
Por isso a terra pode tremer, que nada tememos: as próprias montanhas podem  
afundar-se nos mares. Ainda que as águas tumultuem e se agitem fervilhando e  
venham abalar os montes, está connosco o Senhor dos exércitos, nosso protetor é  
o Deus de Jacob.  
Salmos 45; 2-5*

## Resumo

A acumulação de fenóis voláteis em vinhos tem causado grande preocupação na enologia moderna, sendo considerado, nos dias de hoje, um ponto-chave no controlo da qualidade dos vinhos. Os vinilfenóis (4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol) e etilfenóis (4-etilfenol e 4-etilguaiacol) podem ser produzidos nos vinhos na sequência de atividade microbiana dando origem a odores e sabores indesejados geralmente descritos como “couro”, “suor de cavalo”, “animal” e “medicinal”. A origem exata dos fenóis voláteis tem sido pesquisada em diferentes estudos de diferentes autores. A produção destes compostos tem sido reconhecida como uma característica importante das leveduras *Brettanomyces/Dekkera*.

O objetivo deste trabalho é a caracterização da conversão metabólica da levedura *Brettanomyces/Dekkera*, nomeadamente no que respeita à atividade das enzimas hidroxicinamato descarboxilase e vinilfenol reductase usando diferentes precursores para a produção de 4-etilfenol.

Foi observado que os ácidos p-cumárico e ácido florético não têm influência significativa no crescimento de *D. bruxellensis* e *D. anomala* nas concentrações testadas (até 500 mg L<sup>-1</sup>). A enzima hidroxicinamato descarboxilase mostrou ter afinidade para substratos contendo a ligação dupla no grupo carboxílico (para os ácidos hidroxicinâmicos). A posição do grupo -OH também demonstrou ter influencia no funcionamento da enzima e consequente produção de 4-etilfenol. O ácido florético não foi transformado em 4-etilfenol por *Dekkera/Brettanomyces*. Todas as estirpes metabolizaram (totalmente ou parcialmente) os precursores, ácido p-cumárico e 4-vinilfenol a 4-etilfenol.

### Abstract

The accumulation of volatile phenols in wine has been a cause of great concern in modern enology, being considered, nowadays, a key point in the control of wine quality. Vinylphenols (4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol) and ethylphenols (4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol) may be produced in wine, in a sequence pathway, due to microbial activity, imparting undesirable odours and flavours commonly described as “leather”, “horse sweat”, “animal” and “medicinal”. The precise origin(s) of volatile phenols has been under discussion for some time. The production of these compounds has been recognised as an important characteristic of the yeast *Brettanomyces/Dekkera*.

It is aimed in this work to characterize growth and metabolic activity of *Brettanomyces/Dekkera* in particular as regards the activity of the enzymes hydroxycinnamate decarboxylase and vinylphenol reductase using different precursors for the production of 4-ethylphenol.

It was identified that the p-coumaric acid and phloretic acid have no significant influence on the growth of *D. bruxellensis* and *D. anomala*. The enzyme hydroxycinnamate decarboxylase showed specificity towards precursors with a double bond at the carboxylic group (hydroxycinnamic acids). The position of the substituent -OH group also shown to have influence on the functioning of the enzyme and subsequent production of 4-ethylphenol. Phloretic acid was metabolized but not in 4-ethylphenol. All tested strains converted p-coumaric acid and vinylphenol to 4-ethylphenol, although to different extents.

## Agradecimentos

Concluída a elaboração do presente trabalho, resta agradecer formalmente a determinadas pessoas que estiveram presentes e tornaram possível a sua concretização.

Quero agradecer a todos pelo tempo despendido comigo, o qual foi muito útil para tornar este trabalho uma realidade.

Posto isto quero agradecer:

Ao Professor Doutor Francisco Campos pela competência científica, pelo incansável e incondicional apoio, pela disponibilidade que sempre teve para comigo, pela dedicação, ensinamentos transmitidos, pela orientação deste trabalho. Obrigada por tudo.

Ao Professor Doutor José António Couto, pela competência científica, por todo tempo e apoio dispensado e por todos os conhecimentos transmitidos.

Sou muito grata aos meus pais, à minha irmã e meu cunhado, Sandra e Jorge, pelo incentivo recebido ao longo destes dois anos. Agradeço pelo tempo, pelos sorrisos, pela compreensão e incondicional apoio.

A Carla Oliveira pela competência científica, por todo o tempo, apoio prático e por todos os ensinamentos.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia dos Vinhos, pelo fantástico ambiente de trabalho, pelo apoio, ajuda e incentivos nos momentos de menor motivação. Sendo que um agradecimento especial deve ser dirigido a Cristiana Peixoto, pela amizade sólida e companheirismo, por todos os momentos divertidos, pela alegre convivência, pela energia positiva e por todo o carinho.

A todos os amigos e colegas do Mestrado de Microbiologia Aplicada, e todos os amigos e colegas de Vila Real, muito obrigada.

## Índice

<b>Dedicatória</b> .....	3
<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Agradecimentos</b> .....	6
<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>1. Introdução</b> .....	10
1.1. Características gerais de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> .....	11
1.2. Compostos fenólicos .....	14
1.2.1. Ácidos fenólicos .....	15
1.3. Mecanismos de produção de voláteis por <i>Brettanomyces</i> .....	16
1.4. Presença de <i>Brettanomyces</i> no vinho .....	19
1.5. Controlo da produção de aromas fenólicos .....	21
1.5.1. Higienização .....	22
1.5.2. Tratamentos químicos .....	23
1.5.2.1. Dióxido de enxofre .....	23
1.5.2.2. Dicarbonato dimetílico (DMDC) .....	24
1.5.3. Ácidos orgânicos .....	24
1.5.4. Oxigénio .....	24
1.5.5. Filtração, clarificação e centrifugação .....	25
1.5.6. Tratamentos térmicos .....	26
1.6. Detecção da presença de <i>Brettanomyces</i> .....	27
<b>2. Material e Métodos</b> .....	29
2.1. Estirpes de levedura usadas .....	29
2.2. Preparação do meio de cultura .....	29
2.3. Condições de crescimento .....	29
2.4. Preparação das soluções de ácidos fenólicos e da solução de 4-vinilfenol ---	30
2.5. Influência do ácido p-cumárico e ácido florético no crescimento de <i>D.</i> <i>bruxellensis</i> e <i>D. anomala</i> .....	30
2.6. Verificação da produção de 4-etilfenol partindo de diferentes precursores --	31
2.7. Metabolismo dos ácidos 2-hidroxicinâmico e 3-hidroxicinâmico .....	32

2.8.	Influencia do ácido florético na produção de de 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico -----	32
2.9.	Conversão do ácido florético -----	33
2.10.	Análise instrumental – GC-FID -----	33
2.10.1.	Protocolo de extração -----	33
2.10.2.	Condições GC-FID -----	34
2.11.	Curvas de calibração -----	34
2.12.	Análise instrumental – HPLC -----	36
<b>3.</b>	<b>Resultados e discussão</b> -----	<b>38</b>
3.10.	Influencia do ácido p-cumárico e ácido florético no crescimento de <i>D. bruxellensis</i> e <i>D. anomala</i> -----	38
3.11.	Verificação da produção de 4-etilfenol partindo de diferentes precursores - -----	40
3.12.	Metabolismo dos ácidos 2-hidroxicinâmico e 3-hidroxicinâmico -----	44
3.13.	Influencia do ácido florético na produção de 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico -----	46
3.14.	Conversão do ácido florético -----	47
<b>4.</b>	<b>Conclusões</b> -----	<b>49</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b> -----	<b>50</b>

### Abreviaturas

2HC – Ácido 2-hidroxicinâmico

3HC – Ácido 3-hidroxicinâmico

4-EG – 4-etilguaiacol

4-EF – 4-etilfenol

4-VG – 4-vinilguaiacol

4-VF – 4-vinilfenol

AC – Ácido p-cumárico

AF – Ácido florético

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

FID – Detetor de Ionização por Chama

GC – Cromatografia de Gás

D.O. – Densidade Ótica

HPLC – Cromatografia Líquida

ESB – Escola Superior de Biotecnologia

UCP – Universidade Católica Portuguesa

mg L<sup>-1</sup> – Miligramas por litro

DMDC – Dicarbonato Dimetílico

*B.* – *Brettanomyces*

*D.* – *Dekkera*

## 1. Introdução

A uva, fruto da espécie *Vitis vinifera*, é utilizada na elaboração de vinhos e pode transportar consigo, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma diversidade de outros géneros e espécies de leveduras. Os principais microrganismos associados ao fruto e aos vinhos são leveduras, bactérias do ácido láctico e acético e bolores. Os géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* têm importância do ponto de vista enológico devido ao seu potencial em deteriorar vinhos já elaborados. Apresentam características metabólicas diferentes das apresentadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que contribui para o seu comportamento não competitivo durante a etapa de fermentação. *Dekkera/Brettanomyces* pode encontrar-se presente desde o início da fermentação, permitindo que outras leveduras atuem no processo fermentativo. Após esta fase, entram lenta e progressivamente em atividade, podendo causar sérios danos no produto final.

O vinho é obtido através de um processo cujas origens remontam há milénios atrás. Basicamente consiste na maceração da uva, na fermentação alcoólica por leveduras e se desejada, na fermentação maloláctica, maturação, clarificação e engarrafamento. O complexo processo de vinificação envolve interações entre vários microrganismos. As bactérias do ácido láctico são responsáveis pela fermentação maloláctica, a qual é benéfica para a qualidade do vinho; no entanto, por vezes, podem estar, juntamente com bactérias do ácido acético, relacionadas com a deterioração do produto (Boulton *et al*, 1996).

A levedura *Brettanomyces bruxellensis* pode ser isolada quer da superfície das uvas, embora não seja muito comum, quer de barricas de madeira usadas durante o armazenamento ou o envelhecimento dos vinhos. No entanto a maior preocupação é a sua presença no produto final. *Brettanomyces bruxellensis* caracteristicamente está envolvida na produção de dois compostos aromáticos, o 4-etilfenol e o 4-etilguaicol, os quais podem facilmente ser medidos por técnicas analíticas. Estes metabolitos são indicativos da presença e atividade desta levedura. *Brettanomyces* pode também produzir uma variedade de outros compostos que contribuem para a complexidade aromática do vinho. O “carácter Brett” resulta da produção de um largo espectro de aromas e “flavours” onde estão incluídos cravinho, estrebaria, suor de cavalo, medicinal e rato, mascarando os desejáveis aromas frutados e florais presentes nos vinhos. A

ocorrência destes aromas pode ter um efeito positivo ou negativo consoante a concentração de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol e as expectativas do consumidor.

Dependendo da concentração, estes compostos associados à presença de *Brettanomyces* podem contribuir positiva ou negativamente para as características organolépticas do produto final. Em concentrações elevadas podem sobrepor-se aos aromas agradáveis do vinho prejudicando a sua qualidade (Chatonnet e Pons, 1990), em contrapartida, em concentrações mais baixas, há autores que consideram que podem contribuir para a complexidade aromática do vinho. A qualidade dos vinhos contendo metabolitos de *Brettanomyces* é controversa, estando dependente de preferências individuais e culturais.

O reconhecimento do papel desempenhado por *B. bruxellensis* na deterioração de vinhos tintos a granel ou em vinhos engarrafados, devido à produção do odor a “suor de cavalo”, apresentou, na última década um novo desafio para os produtores de vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006). Além disso os seus efeitos são particularmente notórios em vinhos tintos de alta qualidade envelhecidos em barricas de carvalho, o que aumenta consideravelmente as perdas económicas provocadas pela ação desta levedura. Atualmente, *B. bruxellensis* é considerada como a principal ameaça para a qualidade de vinhos representada por leveduras. O efeito não é só direto, devido à produção de fenóis voláteis, mas também indireto devido às medidas tecnológicas necessárias para controlar a sua atividade que podem também levar à redução da qualidade dos vinhos.

*B. bruxellensis* tem sido conhecida como um contaminante indesejável, também devido à produção de ácido acético e ao aparecimento do odor a “rato”, e é inequívoca a relação entre a sua atividade e a produção de etilfenóis (Chatonnet *et al.* 1995, 1997). A controvérsia entre enólogos, jornalistas e consumidores acerca da sua influência na qualidade dos vinhos tem feito desta espécie a mais estudada no campo da deterioração microbiológica de vinhos.

### **1.1. Características gerais de *Brettanomyces/Dekkera***

O termo *Brettanomyces* foi pela primeira vez usado por N. Hjelt Claussen da cervejaria New Carlsberg Brewery para especificar a levedura necessária na elaboração de cerveja Inglesa, sendo o nome *Brettanomyces* uma alusão ao termo “British”. Em 1920 foi reconhecido o seu género depois de leveduras semelhantes terem sido isoladas

em cervejas belgas (Henschke *et al.*, 2007). A levedura *Brettanomyces* spp. pode ser encontrada quer em vinhos quer em cervejas de aroma forte, produzidas de forma tradicional, a qual pode já se encontrar presente ou ser adicionada durante a fermentação, sendo responsável pelo sabor e aroma tradicionais deste tipo de cerveja. Nas décadas de 1950 e 1960 a levedura foi identificada como *Brettanomyces* spp. sendo também isolada em vinhos provenientes de França, Itália e África do Sul. Mas só entre 1980 e 1990 é que esta levedura foi relacionada com o impacto nas características sensoriais do vinho (Henschke *et al.*, 2007). *Brettanomyces* spp. é a forma não esporulada do género *Dekkera*, no entanto as duas denominações são usadas mutuamente. Existe um total de cinco espécies pertencentes ao género *Brettanomyces/Dekkera*: *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis* e *Brettanomyces nanus* (Kurtzman e Fell, 2000), sendo *B. bruxellensis* entre todas as espécies a que mais impacto tem nos vinhos. Esta espécie pode ser isolada quer da superfície de uvas quer de barricas de madeira durante o armazenamento ou o envelhecimento dos vinhos.

Países como Portugal, França, África do Sul, Alemanha, Espanha, Inglaterra, Uzbequistão, Nova Zelândia, Austrália, Brasil e Estados Unidos reportaram a ocorrência de *Brettanomyces* em vinhos (Licker *et al.*, 1998). Até cerca de 1991, casos da presença desta levedura em vinhos provenientes da Austrália eram praticamente inexistentes. Este facto não foi devido à ausência de *Brettanomyces*, mas sim devido à ausência de técnicas eficazes de deteção. Tal facto levou a que passassem a ser aplicadas metodologias de determinação de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol e passou-se a relacioná-los com a ação direta destes microrganismos. O "Australian Wine Research Institute" (AWRI) acredita que as contaminações estejam a aumentar no país e como medida de prevenção tem facultado formações aos viticultores a fim de que implementem medidas de monitorização para minimizar esta ameaça (Franson, 2001).

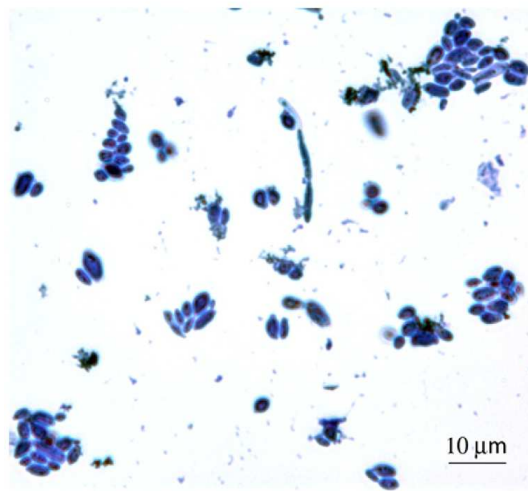
Na Argentina, foi também detetada a presença de *Brettanomyces* em mostos durante a fermentação e antes do engarrafamento (Roccatto *et al.*, 2001). Licker *et al.* (1998) afirmam ter sido em Jura, em 1955, que pela primeira vez foi detetada a presença desta levedura em França. Posteriormente foi também encontrada em outras regiões de Bordéus. Em análises efetuadas em vinhos engarrafados de colheitas diferentes (de 1979 a 1990) e provenientes de diversas vinhas de Bordéus, revelaram que em 36% dos

vinhos os níveis de fenóis voláteis encontravam-se acima do limiar de percepção (Chatonnet *et al.*, 1992).

Diferentes autores relatam a presença de *Brettanomyces* em diferentes ambientes, desde vinhos, adegas, cervejas, fábricas de cidra, tequila e chás. Ela pode ser encontrada nestes ambientes bem como nos produtos finais devido à capacidade de sobrevivência por longos períodos de tempo e também devido à capacidade de iniciar o crescimento em produtos acabados e armazenados (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006).

*B. bruxellensis* apresenta uma forma oval ou elítica e reproduz-se por gemulação (Figura 1). A sua morfologia varia da forma elítica para a forma ramificada após alguns meses de incubação. A sua fisiologia tem sido bastante estudada devido à grande capacidade de produção de compostos aromáticos não desejáveis e também devido à sua capacidade de realizar o efeito de Custer, que consiste na inibição da fermentação alcoólica em condições de anaerobiose, produzindo grandes concentrações de ácido acético (Henschke *et al.*, 2007; Van Dijken e Scheffers, 1986; Vigentini *et al.*, 2008).

2



**Figura 1 – Morfologia das células de *B. bruxellensis* (fonte: Wedral *et al.*, 2010)**

A presença de *Brettanomyces* em vinhos é comum quando estes são fermentados ou envelhecidos em barricas de carvalho (Rayne e Eggers, 2008). *B. bruxellensis* apresenta uma velocidade de crescimento muito lenta daí que só sejam notados os efeitos do seu crescimento a longo prazo, ou seja durante o envelhecimento do vinho.

Caso se encontre presente durante a fermentação em pequenas quantidades, pode facilmente passar despercebida. Tanto técnicas modernas de produção enológica como metodologias eficazes de sanitização, utilização de elevados níveis de dióxido de

carbono e baixos níveis de azoto levam a que a presença de *Brettanomyces* seja pouco frequente (Wedral *et al.*, 2010).

Diferentes capacidades de crescimento e de produção de compostos fenólicos estão associadas à diversidade genética de estirpes (Vigentini *et al.*, 2008). Por exemplo, estirpes de *B. bruxellensis* apresentam variações significativas na capacidade de crescer em vinhos obtidos a partir da variedade *Pinot Noir* (Fugelsang e Zoecklein, 2003) e estirpes individuais diferem no impacto sobre os perfis fenólicos do vinho (Silva *et al.*, 2005).

Subtipos genéticos semelhantes de *B. bruxellensis* foram encontrados em todo o mundo, o que é uma indicação de que a levedura se espalhou geograficamente, provavelmente devido ao comércio internacional de sumo de uva, de barricas, e equipamentos. No entanto adaptações genéticas idênticas podem ter surgido independentemente devido a condições de stress semelhantes no ambiente de vinificação (Curtin *et al.*, 2007).

## 1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos fazem parte de um grande grupo de substâncias muito importantes para a qualidade dos vinhos, pois deles depende a sua coloração, sabor, adstringência ou amargor, assim como são responsáveis pelas diferenças entre vinhos tintos e brancos (Macheix *et al.*, 1990; Jackson, 2000). O conteúdo total em polifenóis encontra-se entre 150 a 400 mg L<sup>-1</sup> para os vinhos brancos e 900 a 1400 mg L<sup>-1</sup> no caso dos vinhos tintos (García-Ruiz *et al.*, 2008).

Os polifenóis presentes nos vinhos são os compostos geralmente associados ao efeito benéfico do consumo moderado de vinho. Eles apresentam capacidade bactericida, antioxidante assim como propriedades de vitaminas e têm a capacidade de proteger os consumidores de possíveis doenças cardiovasculares (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000b).

Estas moléculas têm origem em diferentes partes das uvas e são extraídas durante o processamento do vinho. Existem três fatores que influenciam a presença de compostos fenólicos no vinho: a transformação do substrato previamente presente na uva que pode ser enzimática; a atividade microbiana de algumas leveduras que podem converter substâncias não fenólicas em compostos fenólicos; e por fim o contacto com a

madeira das barricas onde os fenóis podem ser progressivamente eluídos da madeira alterando assim a composição inicial em compostos fenólicos presente no vinho, bem como as suas propriedades organoléticas (Macheix *et al.*, 1990; Jackson, 2000).

O conteúdo fenólico dos vinhos está dependente de diferentes características como a variedade da uva, o seu grau de maturação, o local, solo e condições ambientais em que a uva se desenvolve. Está também condicionado pelas técnicas de vinificação, assim como pelos métodos de envelhecimento dos vinhos.

Durante o processamento do vinho há parâmetros que podem ter influência na extração dos compostos fenólicos, em particular a prensagem, o tempo e temperatura de maceração e o teor em etanol. Devido a todos estes fatores o conteúdo em compostos fenólicos é muito variável de vinho para vinho, em relação aos seus outros constituintes (Macheix *et al.*, 1990; Jackson, 2000).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos, os não-flavonóides que incluem os ácidos fenólicos, aldeídos e álcoois; e os flavonóides que compreendem as antocianinas, flavonóis e flavanóis (Macheix *et al.*, 1990).

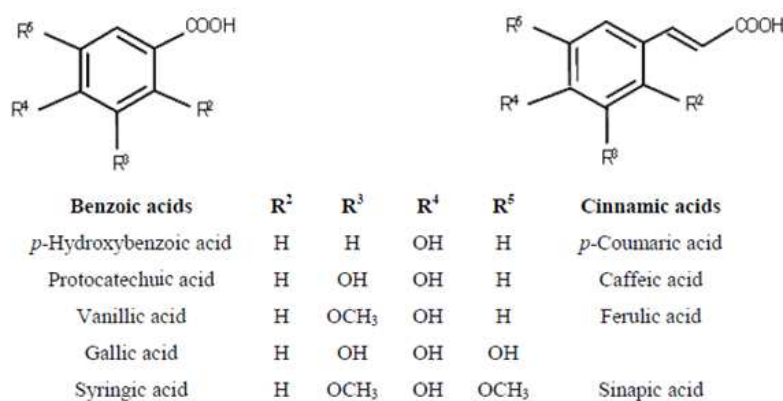
A maioria dos não-flavonóides possui um ou mais grupos hidroxilo e metoxi diretamente ligados a um anel benzóico. Os aldeídos fenólicos têm uma estrutura semelhante aos ácidos fenólicos e são originados pela degradação da lenhina das madeiras usadas para as barricas durante as etapas de envelhecimento ou armazenamento (Jackson, 2000).

### 1.2.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos provêm de diferentes partes da uva e são extraídos durante a maceração no processamento do vinho. Os dois maiores subgrupos de ácidos fenólicos são os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, os quais se encontram presentes em concentrações na ordem de 100-200 mg L<sup>-1</sup> em vinhos tintos e 10-20 mg L<sup>-1</sup> em vinhos brancos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000b).

Os ácidos hidroxibenzóicos apresentam uma estrutura do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> derivada diretamente do ácido benzóico (Macheix *et al.*, 1990). A substituição do anel de benzeno é responsável pelas diferenças existentes entre os ácidos que têm sido identificados no vinho (Figura 2).

Vários ácidos hidroxicinâmicos de estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, têm sido identificados em vinhos e uvas onde aparecem principalmente sob a forma combinada, esterificados com açúcares ou ácidos orgânicos, principalmente o ácido tartárico (Figura 2). Os ésteres tartáricos de ácidos hidroxicinâmicos (ácido caftárico, coutárico e fertárico) podem ser hidrolisados na presença de pectinas metil esterases, dando origem aos ácidos cafeico, p-cumárico e ferrúlico (Boulton *et al*, 1996; Jackson, 2000; Ribéreau-Gayon *et al*, 2000b).



**Figura 2 – Ácidos fenólicos presentes nas uvas e nos vinhos (adaptado de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000)**

Organoleticamente, os ácidos fenólicos não apresentam nenhum sabor ou odor em particular, no entanto apresentam-se como precursores para a formação de fenóis voláteis (vinilfenóis e etilfenóis) que afetam fortemente a qualidade sensorial do vinho.

### 1.3.Mecanismo de produção de voláteis por *Brettanomyces*

Geralmente a detecção dos aromas produzidos por *Brettanomyces* ocorre durante a maturação dos vinhos em barricas de madeira (Godoy *et al.*, 2008). Na produção destes aromas, está envolvida a ação de duas enzimas, as quais atuam a partir dos ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, ferrúlico ou caféico) como substratos. A enzima hidroxicinamato descarboxilase primeiro transforma os ácidos hidroxicinâmicos em hidroxiestirenos, ou vinilfenóis (Edlin *et al.*, 1998), que serão posteriormente reduzidos a derivados etil pela enzima vinilfenol reductase produzindo assim os etilfenóis (Figura 3) (Dias *et al.*, 2003). O ácido p-cumárico e ferrúlico são descarboxilados a 4-vinilfenol

e 4-vinilguaiacol pela enzima hidroxicinamato descarboxilase e em seguida estes compostos são reduzidos a 4-etilfenol e 4-etilguaiacol por ação da enzima vinilfenol reductase (Suárez *et al.*, 2007).

Existem algumas espécies de bactérias capazes de degradar os ácidos hidroxicinâmicos por uma via metabólica diferente. Esta via alternativa foi pela primeira vez descrita por Whitin e Carr (1959) e consiste igualmente numa reação de dois passos. O primeiro passo é a redução do ácido hidroxicinâmico por ação da enzima ácido fenólico reductase, e sendo o segundo passo uma reação de descarboxilação que transforma o ácido fenólico previamente reduzido em etilfenóis. A principal diferença entre as duas vias é o tipo de compostos intermediários produzidos (Curiel *et al.*, 2010; Couto *et al.*, 2006). Esta última via não leva à produção de vinilfenóis como compostos intermediários, mas sim à produção de ácidos fenilpropiónicos, que podem depois ser descarboxilados aos correspondentes etilfenóis (Curiel *et al.*, 2010).

Ambas as vias metabólicas coexistem em alguns microrganismos. Por exemplo, algumas bactérias do ácido láctico são capazes de sintetizar etilfenóis através da primeira via e são também capazes de produzi-los pela via alternativa (Barthelmebs *et al.*, 2000; Buron *et al.*, 2012). Neste sentido, nestes microrganismos, parece existir competição entre as duas vias, e a produção de fenóis voláteis pela primeira, ou pela segunda ou até por ambas depende da concentração inicial do ácido hidroxicinâmico ou da mistura deles (Curiel *et al.*, 2010; Cavin *et al.*, 1997).

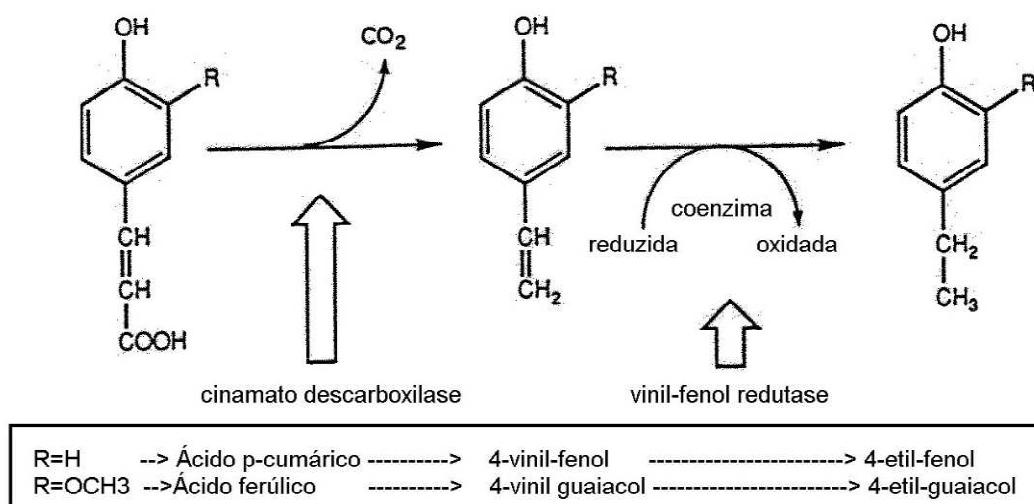
Existem outras espécies de leveduras capazes de reduzir o ácido p-cumárico a 4-vinilfenol, no entanto apenas *B. bruxellensis* tem a capacidade de reduzir o composto 4-vinilfenol em compostos aromáticos, 4-etilfenol ou 4-etilguaiacol em grandes quantidades (Chatonnet *et al.*, 1995).

A enzima responsável pela descarboxilação encontra-se presente num elevado número de bactérias, fungos, e outras leveduras, no entanto a enzima responsável pelo segundo passo, a redução, encontra-se apenas presente nas espécies, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomala*, *Pichia guillermondii*, *Candida versatilis*, *Candida halophila* e *Candida mannitofaciens* (Chatonnet, *et al.*, 1995; Chatonnet, *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 2003; Edlin *et al.*, 1995).

Inicialmente pensava-se que a presença de fenóis voláteis nos vinhos era devida à presença de bactérias do ácido láctico, e no entanto elas são mesmo capazes de

produzirem quantidades significativas de vinilfenóis, mas em contexto enológico apenas produzem pequenas quantidades (Suárez e Suárez-Lepe, 2007). Outras leveduras presentes nos vinhos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Torulaspota spp.* e *Zygosaccharomyces spp.* apresentam também a capacidade de produzirem 4-vinilfenol mas não de reduzir este composto a 4-etilfenol (Dias *et al.*, 2003).

Vinhos contaminados por *Brettanomyces*, além do carácter fenólico, que confere aromas desagradáveis, podem também apresentar uma coloração indesejada, que pode resultar da atividade glicosídica ou da formação de complexos vinilfenol-piranoantocianinas (Oelofse *et al.*, 2008).



**Figura 3 - Mecanismo de formação de etilfenóis por *Dekkera/Brettanomyces*. (adaptado de Chatonnet *et al.*, 1992)**

A concentração dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaiacol que afetam negativamente o aroma do vinho é de 0,62 mg L<sup>-1</sup> e 0,14 mg L<sup>-1</sup> com limiar de perceção de 426 µg L<sup>-1</sup> (para uma mistura de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol na proporção 10:1 em vinhos tintos) (Chatonnet *et al.*, 1992). O 4-etilfenol e o 4-etilguaiacol estão presentes nos vinhos em concentrações e rácios variáveis, dependendo da variedade de uva usada na elaboração e do tipo de vinho. Em média, eles aparecem numa proporção de 10 para 1 respetivamente, o que corresponde aproximadamente ao rácio dos respetivos precursores, ácido p-cumárico e ácido ferúlico (Chatonnet *et al.*, 1992; Romano *et al.*,

2008).

Estudos recentes demonstram que *B. bruxellensis* pode não ser o único organismo responsável pela produção de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol e que nem todas as estirpes desta espécie têm a capacidade de produzir estes compostos. Um estudo demonstrou que 20% das estirpes de *Brettanomyces* são produtoras de fenóis voláteis (Conterno *et al.*, 2006). Outros organismos como *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus* parecem ter a capacidade de descarboxilar o ácido p-cumárico em 4-vinilfenol, mas poucas espécies - *Brettanomyces* e *Lactobacillus plantarum* - são capazes de produzir etilfenóis (Chatonnet *et al.*, 1995). Num estudo realizado por Couto *et al.* (2006), verificou-se que 37% das bactérias do ácido láctico testadas foram capazes de produzir fenóis voláteis (apesar de que apenas 9% produziram 4-etilfenol como produto final).

O que diferencia *Brettanomyces* dos outros organismos é a produção relativamente elevada de etilfenóis. Por exemplo *Pichia guilliermondii* é capaz de converter o ácido p-cumárico em 4-etilfenol em sumo de uva, em equipamentos enológicos, mas em vinhos a conversão é muito reduzida (Dias *et al.*, 2003) tornando a levedura *Dekkera/Brettanomyces* a principal responsável pelo aparecimento do carácter fenólico em vinhos (Barata *et al.*, 2006; Vigentini *et al.*, 2008).

A formação do “carácter Brett” é influenciada pela estirpe, pelo pH do vinho, pela quantidade de nutrientes presentes no mosto, e pelo estado de contaminação da adega e equipamentos (Romano *et al.*, 2008). A quantidade de azoto fermentável é mais importante do que a quantidade de açúcares residuais para a limitação da produção de aromas desagradáveis (Conterno *et al.*, 2007). O ácido p-cumárico parece induzir a produção de aromas desagradáveis mais do que outros precursores como o ácido ferrúlico, no entanto este efeito varia consoante a estirpe em questão (Harris *et al.*, 2009).

#### **1.4. Presença de *Brettanomyces* no vinho**

*B. bruxellensis* pode-se encontrar presente em qualquer uma das fases de vinificação, no entanto devido à elevada tolerância a níveis de etanol (*Brettanomyces* pode tolerar entre 14,0 a 14,5% (v/v) de etanol em vinhos tintos [Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003]) e a baixos níveis de açúcares, bem como devido ao facto das barricas de

madeiras poderem ser uma fonte de contaminação, é mais frequentemente associada ao envelhecimento dos vinhos, fermentações alcoólicas paradas ou lentas e também à fermentação malolática (Dias *et al.*, 2003; Renouf *et al.*, 2006).

Devido à produção de ácido acético, *Brettanomyces* pode desacelerar o crescimento de outras leveduras de que é exemplo a levedura *Saccharomyces* (Uscanga *et al.*, 2003).

Os vinhos tintos são particularmente sensíveis a infeções por esta levedura devido ao facto de apresentarem baixa acidez, conteúdos mais elevados de ácidos fenólicos (precursores) e por normalmente serem envelhecidos em madeira.

As variedades de *Vitis vinifera* tintas com teor mais elevado de precursores fenólicos são as mais suscetíveis à posterior contaminação dos vinhos por *Brettanomyces*. Por outro lado, as variedades de uvas com baixo teor em compostos fenólicos apresentam, geralmente, níveis de ácido p-cumárico mais baixos, levando a que a levedura tenha menos substrato para a produção de 4-etilfenol (Wedral *et al.*, 2010).

O crescimento lento de *B. bruxellensis* leva a que vinhos envelhecidos em madeira por longos períodos de tempo se tornem mais suscetíveis à sua influência (Suárez *et al.*, 2007). Vinhos tintos de alta qualidade são, geralmente, envelhecidos em barricas de madeira por longos períodos de tempo, elevando-se assim o risco de serem contaminados por *Brettanomyces*, a qual pode ser encontrada até uma profundidade de 8 milímetros na madeira (Malfeito-Ferreira, 2005).

Caso a barrica de madeira seja infetada por esta levedura, não é possível eliminá-la apenas pela lavagem ou por outras técnicas simples de limpeza, tendo, assim, de ser tomadas precauções para que o seu crescimento seja minimizado (Garde-Cerdán *et al.*, 2008).

A fermentação malolática é considerada outro período de grande vulnerabilidade devido ao facto de estar associada a baixos níveis de dióxido de enxofre livre na presença de açúcares residuais (Oelofse *et al.*, 2008).

*Brettanomyces* é mais frequentemente isolada em vinhos tintos do que em vinhos brancos. A perda de viabilidade, e conseqüente não proliferação de vinhos brancos deve-se essencialmente à eficiência do dióxido de enxofre em condições de pH baixo (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003) e também ao facto das variedades de uvas

usadas para a elaboração de vinhos brancos apresentarem menores teores de precursores fenólicos (Chatonnet *et al.*, 1992).

O principal fator que afeta as propriedades sensoriais do vinho contaminado por *B. bruxellensis* é a produção dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaiacol (Vigentini *et al.*, 2008).

Foram isoladas estirpes de *Brettanomyces* na maioria das regiões produtoras de vinhos (Conterno *et al.*, 2006). Um estudo Português que consistiu na pesquisa e análise de fenóis voláteis em vinhos provenientes de diferentes partes do mundo concluiu que 25% dos vinhos tintos analisados continham o composto 4-etilfenol em níveis mais elevados que o limite de  $620 \mu\text{gL}^{-1}$  acima do qual o vinho é normalmente rejeitado pelos consumidores (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). O mesmo estudo mostrou que a presença de fenóis voláteis relacionados com a contaminação por *Brettanomyces* é um problema em diferentes países. Um outro estudo realizado em vinhos da Borgonha feitos a partir da casta *Pinot Noir* demonstrou que estas leveduras estavam presentes em 50% dos vinhos em maturação e em 25% dos vinhos já engarrafados (Gerbaux *et al.* 2000).

Diferentes autores chegaram à conclusão de que o controlo do crescimento de *Brettanomyces* é o maior desafio microbiológico na produção moderna de vinhos, já que o seu crescimento indesejado provoca graves perdas económicas (Boulton *et al.* 1996; Fugelsang, 1997).

### **1.5. Controlo da produção de aromas fenólicos**

O enólogo tem ao seu dispor uma série de medidas a fim de prevenir a atividade e contaminação dos vinhos. Estas medidas compreendem o uso de agentes inibitórios ou letais, como tratamentos químicos ou tratamentos térmicos. Outras técnicas como clarificação ou filtração, embora não tenham efeito letal, servem para diminuir ou eliminar a presença de possíveis microrganismos contaminantes. Todas estas medidas devem ser acompanhadas por rigorosos processos de limpeza, a fim de prevenir a colonização das superfícies da adega bem como dos seus equipamentos. Além disso há que ter em conta que o próprio vinho não apresenta um ambiente favorável ao crescimento microbiológico (Malfeito-Ferreira, 2011).

As características intrínsecas de cada vinho determinam a eficiência das medidas de controlo aplicadas. Por exemplo, um vinho com baixo teor em nutrientes torna-se menos suscetível de ser alvo de contaminações assim como o elevado teor em etanol aumenta a sua robustez (Malfeito-Ferreira, 2011). Com efeito oposto, pode ser adicionado oxigénio para promover o envelhecimento de vinhos, o que é um procedimento que pode estimular o crescimento de leveduras. Além disso, um grande obstáculo enfrentado pela indústria de vinhos é a necessidade de diminuir o uso de dióxido de enxofre, devido à sua associação a alergias em humanos. Este composto está sujeito a um rigoroso controlo do limite legal.

Devido ao facto da levedura *B. bruxellensis* ser o principal organismo responsável pela contaminação em garrafa, muitos esforços têm sido concentrados na aplicação de medidas de controlo e minimização dos seus efeitos (Renouf *et al.*, 2007). As medidas de controlo têm de ser aplicadas em toda a linha de produção, desde a vinha até ao engarrafamento. Estas medidas centram-se no controlo da presença e crescimento de *B. bruxellensis* bem como no controlo da presença de precursores para a produção de aromas fenólicos no produto final.

### **1.5.1. Higienização**

*B. bruxellensis* pode ser encontrada quer em uvas, quer nos equipamentos da adega, pelo que o primeiro passo para a sua prevenção consiste na aplicação de medidas de higienização. A eficiência da higienização decresce a partir de materiais como o aço inoxidável, betão, plástico e borracha, devido ao aumento da rugosidade da superfície. A superfície mais difícil, ou praticamente impossível de higienizar corretamente é a madeira usada para a maturação dos vinhos. Na vinificação moderna, barricas de carvalho, que são amplamente utilizados, especialmente para vinhos tintos de alta qualidade, representam a principal dificuldade na prevenção da contaminação do vinho por *B. bruxellensis*. Os tratamentos mais comuns usam água quente, soluções de dióxido de enxofre, e ozono como agentes de limpeza e desinfecção. No entanto, a sua eficiência é muito limitada, devido à natureza porosa da madeira. A contaminação das camadas exteriores da madeira pode ser significativamente reduzida, no entanto, as camadas interiores constituem um problema pois podem voltar a ser fonte de contaminação mesmo depois de procedimentos de limpeza e desinfecção (Laureano *et al.*, 2004).

Deve ser evitado o uso de agentes de limpeza que contenham cloro na sua constituição de forma a prevenir a formação de compostos tricloroanisóis, responsáveis pelo "gosto a rolha".

### 1.5.2. Tratamentos químicos

#### 1.5.2.1. Dióxido de enxofre

O método de controlo do crescimento microbiano mais eficaz é a manutenção de níveis adequados de dióxido de enxofre. Em vinhos, este agente está presente quer na forma livre quer na forma combinada, sendo a sua forma ativa a forma molecular. O dióxido de enxofre não pode ser adicionado continuamente, pois está sujeito a limites máximos legais. Na União Europeia, estes limites são atribuídos em função do tipo de vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira 2003), já nos EUA o nível máximo permitido de sulfito total é de 350 mg L<sup>-1</sup> (Fugelsang e Edwards, 2007).

Após a adição, uma fração do sulfito é combinada e conseqüentemente perde atividade antimicrobiana daí que todas as condições que levam à combinação do sulfito devam ser minimizadas. A taxa de combinação pode ser de 50% ou mais da quantidade adicionada, portanto as adições devem ser controladas pela medição do sulfito após o tratamento. A utilização de doses elevadas de dióxido de enxofre antes da fermentação pode aumentar a produção de acetaldeído por leveduras fermentativas.

Para impedir o crescimento microbiano, os níveis de dióxido de enxofre aconselhados são de 0,5-0,8 mg L<sup>-1</sup> (Fugelsang e Edwards, 2007), mas há que ter em conta que diferentes leveduras apresentam diferentes resistências a este agente além de que populações em crescimento são mais resistentes. Para prevenir a proliferação de *B. bruxellensis*, é necessário 1 mg L<sup>-1</sup> de dióxido de enxofre molecular (Barata *et al.*, 2008a). *Brettanomyces* pode entrar num estado viável mas não cultivável depois da exposição ao dióxido de enxofre, o que pode fazer com que esta esteja presente mesmo depois da diminuição da concentração de dióxido de enxofre livre (Umiker e Edwards, 2007). O nível de dióxido de enxofre deve ser mantido a uma concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> durante todo o processo de vinificação; no entanto, a eficiência deste método é reduzida em vinhos com valores de pH mais altos (Barata *et al.*, 2008).

### 1.5.2.2. Dicarbonato dimetílico (DMDC)

O uso do agente químico, dicarbonato dimetílico (DMDC) foi recentemente aprovado na UE na concentração máxima de 200 mg L<sup>-1</sup> no engarrafamento de vinhos com mais de 5 g L<sup>-1</sup> de açúcar residual. Nos EUA, pode ser utilizado durante o armazenamento em quantidades regulares, até ao nível máximo de 200 mg L<sup>-1</sup> (Fugelsang e Edwards, 2007). Este composto inativa quer a levedura *B. bruxellensis* quer outras leveduras que podem iniciar a refermentação em garrafa (Oelofse *et al.*, 2008) e é usado atualmente na preservação de vinhos que ainda contêm açúcares residuais (> 5g L<sup>-1</sup>) ou vinhos que não foram filtrados.

A sua eficiência depende da contaminação microbiana inicial. A suscetibilidade das leveduras à ação deste químico é variável (Daudt e Ough, 1980; Costa *et al.*, 2008). As bactérias apresentam resistência mais elevada do que as leveduras e por isso este conservante não deve ser considerado como um agente esterilizante, quando utilizado sozinho (Costa *et al.*, 2008). Portanto, o DMDC deve ser usado rotineiramente em conjunto com dióxido de enxofre durante o engarrafamento ou armazenamento. A sua atividade conjunta depende de uma homogeneização adequada, o que é conseguido por um aparelho de dosagem dispendioso. Outro fator que requer precauções é a toxicidade deste composto para os humanos (Fugelsang e Edwards, 2007).

### 1.5.3. Ácidos Orgânicos

O uso de uvas com elevado teor de ácidos ou então a adição de ácidos orgânicos durante o processamento do vinho podem fazer com que o crescimento de *Brettanomyces* seja diminuído (Oelofse *et al.*, 2009).

### 1.5.4. Oxigénio

A maioria das leveduras de deterioração são microrganismos anaeróbios facultativos e são estimulados por pequenas quantidades de oxigénio. O efeito do ar em contacto com o vinho é bem conhecido. Se as cubas ou barricas não forem isoladas totalmente (de modo a não haver qualquer contacto com oxigénio), dar-se-á o desenvolvimento de uma película microbiana na superfície do vinho, assim como o desenvolvimento de um odor oxidado devido à formação de acetaldeído. No entanto,

baixas quantidades de oxigénio são necessários para a maturação do vinho, especialmente no caso de vinhos tintos. Portanto, a gestão adequada de todas as operações de introdução de oxigénio no vinho é necessária para minimizar a deterioração através do crescimento de leveduras. Máquinas de engarrafamento inadequadas podem introduzir oxigénio no vinho engarrafado, o que estimula o crescimento de leveduras (Malfeito-Ferreira *et al.*, 1990).

Em barricas de carvalho, o oxigénio difunde-se de forma contínua até 30 mg L<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> através da madeira (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), facto que estimula o crescimento de *B. bruxellensis* (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2001; du Toit *et al.*, 2006).

A concentração de 4-etilfenol e 4-etilguaicol em vinhos tintos está relacionada positivamente com a quantidade de oxigénio dissolvido e negativamente com a humidade da adega (Rayne e Eggers, 2008).

#### **1.5.5. Filtração, clarificação e centrifugação**

Procedimentos como clarificação, sedimentação ou centrifugação levam à redução do material em suspensão, incluindo microrganismos. O uso de agentes clarificantes é geralmente dirigido para o melhoramento das características organoléticas do vinho através da remoção de microrganismos. A técnica de filtração por terra de diatomáceas é feita atualmente durante o envelhecimento do vinho o que reduz drasticamente o número da população microbiana. A filtração pode reduzir a população de bactérias e leveduras, no entanto leveduras em estado viável mas não cultivável apresentam dimensões menores e podem passar através de filtro de membranas de 0,45 µm de porosidade (Millet e Lonvaud-Funel, 2000). Caso se verifique esta situação devem ser aplicados níveis mais elevados de tratamento com efeito estabilizante. Os processos de filtração e clarificação são tidos como processos indesejáveis na vinificação de vinhos de maior qualidade apesar de apresentarem a capacidade de reduzir os níveis de *Brettanomyces* (Arvik e Henick-Kling, 2002). Uma higienização rigorosa é importante depois de uma filtração estéril ou pasteurização a fim de evitar contaminações diretas, ou contaminações cruzadas. A correta gestão das operações de clarificação e filtragem favorece a minimização da utilização de produtos químicos ou tratamentos térmicos durante o armazenamento. Quando o vinho está pronto para engarrafar, a filtração pré engarrafamento é o procedimento mais comum

para atingir a "esterilização". Podem ser usados diferentes tipos de filtração. Sendo que o objetivo final é a prevenção do crescimento microbiano em vinhos engarrafados (Malfeito-Ferreira, 2010).

Alguns vinhos, particularmente tintos de elevada qualidade, não podem ser submetidos a tratamentos de filtração ou pasteurização por obedecerem a regras de qualidade restritas; no entanto, nestes casos, é necessária a aplicação de uma dose mais elevada de conservantes para evitar o desenvolvimento microbiano no produto engarrafado. Estes vinhos não filtrados são os mais frequentemente afetados pelo carácter "Brett" conferindo o característico odor a "suor de cavalo" e também mais suscetíveis à refermentação em garrafa (Malfeito-Ferreira, 2011).

#### **1.5.6. Tratamentos térmicos**

Os microrganismos presentes no vinho são sensíveis ao calor e temperaturas relativamente amenas são suficientes para garantir a esterilização do produto (Devéze e Ribéreau-Gayon, 1977; Barata *et al.*, 2008b). Ao contrário de outras indústrias de bebidas (cerveja, sumos ou refrigerantes), os tratamentos térmicos raramente são usados na indústria do vinho. Os tratamentos térmicos por calor devem ser incluídos entre as opções atuais, principalmente para vinhos com açúcar residual. Geralmente os produtores são relutantes à aplicação de tratamentos térmicos, devido a alegados efeitos nocivos na qualidade organoléptica do vinho bem como na sua longevidade. Vários tratamentos térmicos podem ser aplicados no processamento de vinhos com ou sem qualquer efeito deliberado sobre os microrganismos. A termovinificação consiste no aquecimento de uvas tintas esmagadas a fim de promover a separação do sumo com coloração fortemente carregada para ser fermentado sem maceração (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Neste caso o objetivo é extrair os compostos corantes e não destruir os contaminantes microbiológicos. No entanto, no caso de leveduras de deterioração, esta técnica é especialmente apropriada para o processamento de uvas podres porque elimina todos os microrganismos contaminantes e permite fermentações essencialmente dominadas por *S. cerevisiae*. Na pasteurização o vinho é aquecido e posteriormente arrefecido em placas e pode ser esterilizado por filtração antes do engarrafamento a fim de evitar a recontaminações. No engarrafamento a quente, o vinho é aquecido e engarrafado à temperatura desejada, sendo arrefecido novamente após este processo

(Humbert, 1980). O armazenamento a baixas temperaturas em caves naturalmente arrefecidos ou sob refrigeração, pode atrasar o crescimento microbiano, no entanto não deve ser considerado um agente letal, pois a maioria dos microrganismos retoma o crescimento assim que a temperatura voltar a aumentar.

### **1.6.Deteção da presença de Brettanomyces**

A ausência de *B. bruxellensis* deve ser verificada regularmente durante o armazenamento, pois apenas a presença de uma célula viável por garrafa pode estragar o produto caso tenha tempo suficiente para o seu crescimento (Barata *et al.*, 2008a, b).

Regra geral, a deteção de leveduras, bem como a sua contagem, é baseada no crescimento em placas com meio de cultura adequado e a amostragem é efetuada depois da filtração por membrana de amostras de vinhos (Loureiro *et al.*, 2004). Para a deteção de leveduras de deterioração, têm sido desenvolvidos meios seletivos e/ou diferenciais. Os métodos clássicos de microbiologia, como cultura ou características morfológicas não são suficientes por si só para a identificação de *Brettanomyces* spp., daí que tenham de ser combinados com outras técnicas como microscopia fluorescente, PCR, cromatografia de gás, espectroscopia de massa ou análise sensorial com painel treinado (Suárez *et al.*, 2007). *Brettanomyces bruxellensis* é uma levedura difícil de isolar a partir de fontes contaminadas, devido à baixa taxa de crescimento. Assim, o uso de meios de cultura seletivos e longos períodos de incubação são essenciais para sua recuperação. Sendo já isolada a partir de uvas (Guerzoni e Marchetti, 1987; Renouf e Lonvaud-Funel, 2007), equipamentos e ambiente em adegas (Connel *et al.*, 2002). É dominante em vinhos tintos engarrafados, como produtora de etilfenóis devido à sua capacidade de permanecer viável por longos períodos de tempo bem como pela aptidão em proliferar quando as condições de stress diminuem (Renouf *et al.*, 2007). A deteção ocasional destas leveduras em vinhos espumantes pode estar relacionada com a sua resistência ao dióxido de carbono. No entanto, raramente é isolada a partir de vinhos brancos, que induzem a morte celular na gama normal de etanol, utilização de dióxido de enxofre e valores de pH ácidos (Barata *et al.*, 2008a). *B. bruxellensis* pode ser encontrada em qualquer fase de produção de vinhos, e pode também permanecer em estado viável mas não cultivável ou em estado dormente, em vinhos, por longos períodos de tempo. Células que não são cultiváveis por meios convencionais podem ter a capacidade de

reviver e resumir o seu crescimento (Arvik e Henick-Kling, 2002). Outro aspeto único desta levedura é que ela é capaz de produzir o “carácter Brett” característico mesmo quando a densidade celular é baixa, o que torna a deteção física muito difícil, devido à baixa taxa de crescimento e ao baixo número de células (Arvik *et al.*, 2002). Os metabolitos voláteis podem estar presentes mesmo quando a presença das células da levedura são indetetáveis ou minimamente detetáveis.

Alguns marcadores químicos podem ser utilizados para monitorizar a atividade de leveduras de uma forma rápida e fácil. A presença de *Brettanomyces* pode ser detetada desde cedo direta ou indiretamente através da análise dos seus metabolitos. A determinação direta de microrganismos compreende a utilização de técnicas de cultura, para isso têm sido desenvolvidos meio seletivos e ou diferenciais e reação da polimerase em cadeia (PCR). Recentemente têm sido desenvolvidas técnicas de hibridação *in situ*, usando a cadeia peptídica dos ácidos nucleicos.

Couto *et al* (2005) desenvolveram um método de deteção baseado no crescimento em meio de cultura líquido, bastante sensível e simples de ser usado em adegas. Depois da inoculação com vinho, o meio é monitorizado através de inspeção visual da turbidez bem como por análises olfativas periódicas. Os vinhos contaminados por *Brettanomyces* desenvolvem uma visível turbidez e bem como o aroma a 4-etilfenol, facilmente detetado pelo odor. Em caso positivo, o tempo que leva até ao aparecimento de resultados permite ter uma ideia do nível de contaminação.

A realização deste trabalho teve como objetivo caracterizar a conversão metabólica de diferentes precursores de fenóis voláteis (ácido p-cumárico, ácido florético e vinilfenol) por *Brettanomyces/Dekkera*, especialmente no que respeita à produção de 4-etilfenol.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Estirpes de levedura usadas

As leveduras usadas neste estudo foram *Dekkera bruxellensis* PYCC 4801, *Dekkera anomala* PYCC 5153, ambas obtidas do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal. Foram também utilizadas as leveduras *Dekkera/Brettanomyces* 1, 2, 22, 26, 30, 32 e 33 isoladas de vinhos na Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal.

### 2.2. Preparação do meio de cultura

O meio de cultura usado em todas as experiências foi YM Difco<sup>TM</sup> (Detroit, USA), contendo 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 5,0 g L<sup>-1</sup> de peptona e 10,0 g L<sup>-1</sup> de dextrose, com pH final de 6,2 ±0,2.

A esterilização do meio foi efetuada em frascos Schott (Mainz, Alemanha) numa autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos e transferido, em ambiente estéril, para tubos de plástico estéreis para a inoculação das leveduras.

O meio YM sólido foi usado para as culturas em rampa, tendo sido preparado com 2,1g de Difco<sup>TM</sup> YM Broth suplementado com 2,0% de agar (Liofilchem Diagnostici, Roseto degli Abruzzi, Itália) em 100 ml de água desionizada e esterilizado a 121°C durante 15 minutos.

Todos os reagentes foram pesados numa balança analítica digital (Mettler PM2000, Vernon Hills, USA).

### 2.3. Condições de crescimento

Todas as estirpes foram inoculadas em aproximadamente 10 ml de meio YM Difco<sup>TM</sup> em tubos de plástico estéreis e incubadas a 30°C durante 2-3 dias. Estas culturas foram usadas para a realização das experiências e foram regularmente recultivadas em meio fresco. Foram também preparadas culturas-stock, em rampas, em meio estéril YM Difco<sup>TM</sup> suplementado com agar a 2%, foram incubadas a 30°C durante dois dias e posteriormente guardadas a 3°C no frigorífico.

#### 2.4. Preparação das soluções de ácidos fenólicos e da solução de 4-vinilfenol

As soluções-stock dos ácidos p-cumárico, florético, 2-hidroxicinâmico e 3-hidroxicinâmico (Sigma, Steinheim, Alemanha), com concentração final de 10g L<sup>-1</sup> com 50% (v/v) de etanol foram preparadas através da dissolução de 100 mg de pó do ácido numa solução de 10 ml (50:50 água desionizada:etanol) (99,5% de pureza, AGA, Lisboa, Portugal). As soluções foram filtradas com filtros estéreis de membrana de acetato de celulose de 30 mm e porosidade de 0,45 µm (Orange Scientific, Alleud, Bélgica) e armazenadas num congelador a -20°C.

A solução-stock de vinilfenol (10% diluído em propileno glicol, SAFC (St Louis, EUA) com concentração final de 10 g L<sup>-1</sup> em 100% etanol foi preparada através da dissolução de 1g numa solução de 10 ml de etanol (99,5% de pureza, AGA, Lisboa, Portugal). A solução foi filtrada com filtro estéril de membrana de acetato de celulose de 30mm e porosidade de 0,45 µm (Orange Scientific; Alleud, Bélgica) e foi armazenada num congelador a aproximadamente -20°C.

#### 2.5. Influência do ácido p-cumárico e ácido florético no crescimento de *D. bruxellensis* e *D. anomala*

A fim de se verificar uma possível interferência no crescimento de *D. bruxellensis* PYCC 4801 foi conduzida uma experiência com concentrações crescentes de ácido p-cumárico e ácido florético.

Foram pipetados 10 ml de meio YM para 12 tubos de vidro estéreis com tampa. Diferentes concentrações de ácido p-cumárico e ácido florético foram adicionadas em triplicado aos tubos, tendo em atenção o ajuste para a concentração de etanol, tal como apresentado na Tabela 4. Finalmente, 100 µl de *D. bruxellensis* foi adicionada a cada tubo e incubados a 30° C durante 5 dias. A densidade ótica (660nm) das soluções foi verificada uma vez por dia recorrendo ao uso de um espectrómetro (Nicolet Evolution 100, Thermo Electron Corporation; Cambridge, Reino Unido). Foram efetuadas diluições com água desionizada a fim de minimizar os desvios de linearidade à lei de Beer-Lambert.

A mesma experiência foi realizada com a estirpe *D. anomala* PYCC 5153.

**Tabela 4** – Concentrações de ácidos e solução 50% (v/v) água/etanol.

	Ácidos (mg L <sup>-1</sup> )	Solução 50% (v/v) água/etanol (mg L <sup>-1</sup> )
AC ou (AF) <sub>100</sub>	100	400
AC ou (AF) <sub>250</sub>	250	250
AC ou (AF) <sub>500</sub>	500	0
Controlo	-	500

## 2.6. Verificação da produção de 4-etilfenol partindo de diferentes precursores

Foram conduzidas experiências em meio YM suplementado com 500 µl dos ácidos p-cumárico, ácido florético e vinilfenol e 500 µl de levedura.

O ensaio suplementado com ácido p-cumárico, como precursor para a produção de fenóis voláteis teve como objetivo verificar se todas as estirpes de levedura usadas eram capazes de converter o ácido p-cumárico em 4-etilfenol.

A adição de ácido florético foi efetuada a fim de verificar a possível produção de 4-etilfenol a partir da descarboxilação do ácido florético.

A fim de se verificar o funcionamento da enzima vinilfenol reductase, foi também feito um ensaio usando o precursor vinilfenol. O procedimento seguido foi o mesmo para todos os diferentes precursores mencionados.

Depois das leveduras terem atingido a fase de crescimento exponencial (ao final de 2-3 dias), 500 µl de cultura foram adicionados a 100 ml de meio líquido YM previamente esterilizado, contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de cada ácido ou vinilfenol. As amostras foram depois incubadas a 30° C durante 7 dias no escuro e sem agitação.

No início de cada experiência foram guardados aproximadamente 5 ml para posterior análise em HPLC. Ao final da experiência foram analisados os resultados em CG e HPLC.

Estas experiências foram realizadas com as estirpes *D. bruxellensis* PYCC 4801, *D. anomala* PYCC 5153 e *Dekkera/Brettanomyces* 1, 2, 22, 26, 30, 32 e 33.

## 2.7. Metabolismo dos ácidos 2-hidroxicinâmico e 3-hidroxicinâmico

A fim de se verificar a especificidade da enzima hidroxicinamato descarboxilase, foi avaliada a capacidade de degradação do ácido 2-hidroxicinâmico e do ácido 3-hidroxicinâmico. Foi também verificada a possível interferência destes compostos no metabolismo do ácido p-cumárico. O procedimento seguido foi o mesmo que o mencionado anteriormente.

Esta experiência foi conduzida com a levedura *D. bruxellensis* PYCC 4801 (50 mg L<sup>-1</sup>). Segue a Tabela 1 exemplificativa das concentrações de cada ácido, usadas nesta experiência.

**Tabela 1** – Concentrações usadas no ensaio suplementado com o ácido 2-hidroxicinâmico, 3-hidroxicinâmico e ácido p-cumárico em meio de cultura YM com a levedura *D. bruxellensis* PYCC 4801 (50 mg L<sup>-1</sup>).

	2HC (mg L <sup>-1</sup> )	3HC (mg L <sup>-1</sup> )	AC (mg L <sup>-1</sup> )
Controlo AC	-	-	25
Db_2HC	25	-	-
Db_3HC	-	25	-
Db_2HC+AC	25	-	25
Db_3HC+AC	-	25	25

## 2.8. Influência do ácido florético na produção de 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico

A fim de se verificar a possível interferência (competição) entre o ácido florético (AF) e ácido p-cumárico (AC) no funcionamento da enzima hidroxicinamato descarboxilase e consequente produção de 4-etilfenol (4-EF) foi conduzida uma experiência nos mesmos moldes das anteriormente descritas. Segue a Tabela 2, em que exemplifica as concentrações usadas. Este ensaio foi conduzido com *D. bruxellensis* PYCC 4801 (50 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabela 2** – Concentrações de ácido p-cumárico e ácido florético usadas na experiência em meio de cultura YM com a levedura *D. bruxellensis* PYCC 4801 (50 mg L<sup>-1</sup>).

	AF (mg L <sup>-1</sup> )	AC (mg L <sup>-1</sup> )
Controlo	-	10
Db_AF <sub>50</sub> AC <sub>10</sub>	50	10
Db_AF <sub>100</sub> AC <sub>10</sub>	100	10
Db_AF <sub>250</sub> AC <sub>10</sub>	250	10

## 2.9. Conversão do ácido florético

A fim de se verificar se a enzima hidroxycinamato descarboxilase apresentava a capacidade de metabolizar o ácido florético e de se verificar em que metabolitos este foi convertido, foi conduzido um ensaio com adição de níveis crescentes de ácido florético nas mesmas condições dos anteriores. Segue a Tabela 3, em que exemplifica as concentrações usadas. Este ensaio foi conduzido com *D. bruxellensis* PYCC 4801 (50 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabela 3** - Concentrações usadas de ácido florético na experiência em meio de cultura YM com a levedura *D. bruxellensis* PYCC 4801 (50 mg L<sup>-1</sup>).

	AF (mg L <sup>-1</sup> )
Controlo	-
Db_AF <sub>20</sub>	20
Db_AF <sub>50</sub>	50
Db_AF <sub>100</sub>	100

## 2.10. Análise Instrumental – GC-FID

### 2.10.1. Protocolo de extração

O procedimento para a análise dos etilfenóis foi realizado segundo o protocolo descrito por Bertrand (1981).

Foi preparada uma solução de 50:50 (v/v) de éter dietílico:n-hexano (ambos da Merck, Darmstadt, Alemanha) pela mistura de volumes iguais de cada solvente. Foi usada como padrão interno uma solução de 3-octanol com a concentração de 447 mg L<sup>-1</sup> em metanol.

As amostras foram centrifugadas à rotação de 3000 g durante 10 minutos (Centromix, Selecta, Barcelona, Espanha). 25 ml do sobrenadante foram transferidos para um balão volumétrico e diluídos com água desionizada (50:50, v/v). Foram acrescentados 50 µl da solução de padrão interno, 3-octanol. As amostras foram sucessivamente extraídas com a mistura de éter dietílico e n-hexano acima descrita. Foram realizadas três extrações com adição de 4 ml, 2 ml e 2 ml da mistura dos solventes de extração e de seguida foram colocadas por um período de 5 minutos em agitação. A fase orgânica que permanecia no topo da ampola de separação foi recolhida ao longo das três extrações para frascos de “headspace”, e a fase inorgânica foi deixada no fundo. A solução de solvente foi adicionada a esta última fase inorgânica para a próxima extração. A fase orgânica de cada extração foi recolhida por meio de pipetas de Pasteur e transferida para um vial de 1,50 ml e concentradas a cerca um terço de volume original sob uma corrente de azoto, até ter aproximadamente 0,50 ml de volume de amostra, pronta para a análise instrumental no cromatógrafo de gás CG-FID.

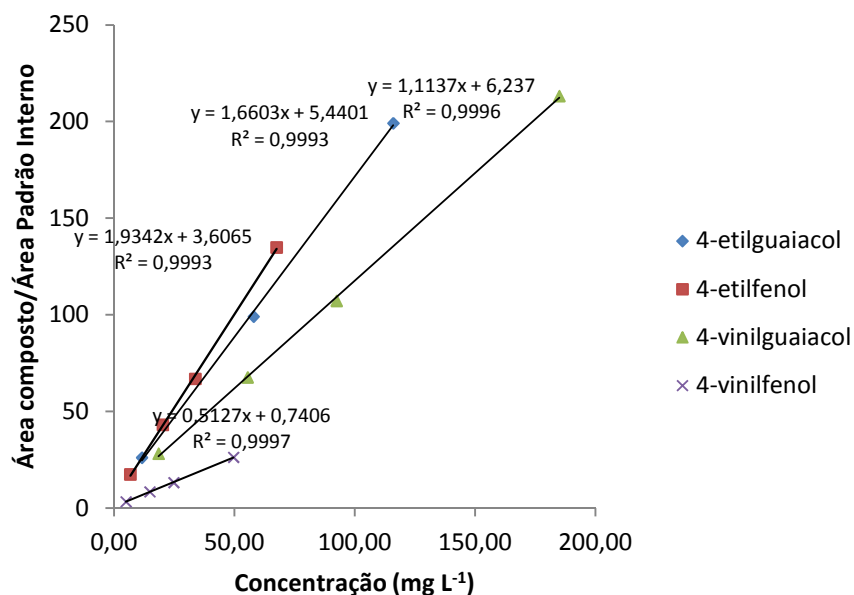
### 2.10.2. Condições GC-FID

Após a extração as amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa com detetor de Ionização por Chama (CG-FID 5890A da Hewlett Packard). A coluna usada foi do tipo FFAP (BP1), com dimensões 50 m por 0,22 mm por 0,25 µm (SGE, Austin, EUA). Foram injetados 2 µl de amostra num injetor aquecido a 250°C, com tempo de splitless de 0,3 min e fluxo de splitless de 30 ml/min. O gás transportador foi o hidrogénio, a um fluxo de 1 ml/min. A temperatura inicial do forno foi de 40°C durante 1 min, seguida de um aumento de 2 °C por minuto até aos 220 °C durante 20 minutos.

### 2.11. Curvas de calibração

As curvas de calibração foram preparadas com diferentes concentrações de fenóis voláteis numa mistura de 50:50 (v/v) de éter dietílico:n-hexano com 50 µl da

solução de padrão interno, 3-octanol (447 mg L<sup>-1</sup> em metanol). Os compostos, 4-etilfenol (99% de pureza) e 4-etilguaiacol (98% de pureza) foram obtidos da Aldrich (Steinheim, Alemanha) e os compostos 4-vinilfenol (10% diluído em propileno glicol) e 4-vinilguaiacol (98% de pureza) foram obtidos da SAFC (St Louis, EUA). As curvas de calibração são apresentadas na figura 4.



**Figura 4** – Curvas de calibração para os compostos 4-etilguaiacol, 4-etilfenol, 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol obtidas em GC-FID.

Os tempos de retenção médios foram de aproximadamente: 25 min para o 3-octanol, 63 min para 4-EG, 70 min para 4-EP, 71 min para 4-VG e 80 min para 4-VP (Tabela 5).

**Tabela 5** – Tempo de retenção para os fenóis voláteis e padrão interno, 3-octanol obtidos na calibração em CG.

Composto	Tempo de Retenção médio (minutos)
Padrão Interno (3-octanol)	25,88
4-etilguaicol	63,30
4-etilfenol	70,05
4-vinilguaicol	71,43
4-vinilfenol	80,29

## 2.12. Análise Instrumental – HPLC

A presença residual do ácido p-cumárico no meio de crescimento e dos dois possíveis intermediários resultantes da descarboxilação ou redução foi determinada através de um sistema de HPLC-DAD.

A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo Beckman Gold sistem (Beckman Coulter, EUA), equipado com detetor de díodos. A coluna usada foi uma coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 de dimensões 4,6 x 150 mm, com esferas de 5 micrómetros de diâmetro, obtida da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA). O caudal utilizado foi de 1 mL/min. As condições de operação utilizaram um gradiente de 0 min = 100% B; 2 min = 60% B; 28 min = 100% B (durante 2 minutos).

Para o equipamento HPLC foram utilizadas duas fases móveis diferentes. A fase móvel A consistia em 100% de acetonitrilo, obtido por Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido) e 2% de ácido trifluoroacético (98% de pureza) obtido a partir de Sigma-Aldrich (Stenheim, Alemanha), a fase móvel B, consistia em 95% água ultrapura, 5% de acetonitrilo e 0,2% de ácido trifluoroacético. Ambas as fases foram filtrados e submetidas a ultrassons durante 5 minutos antes da sua utilização.

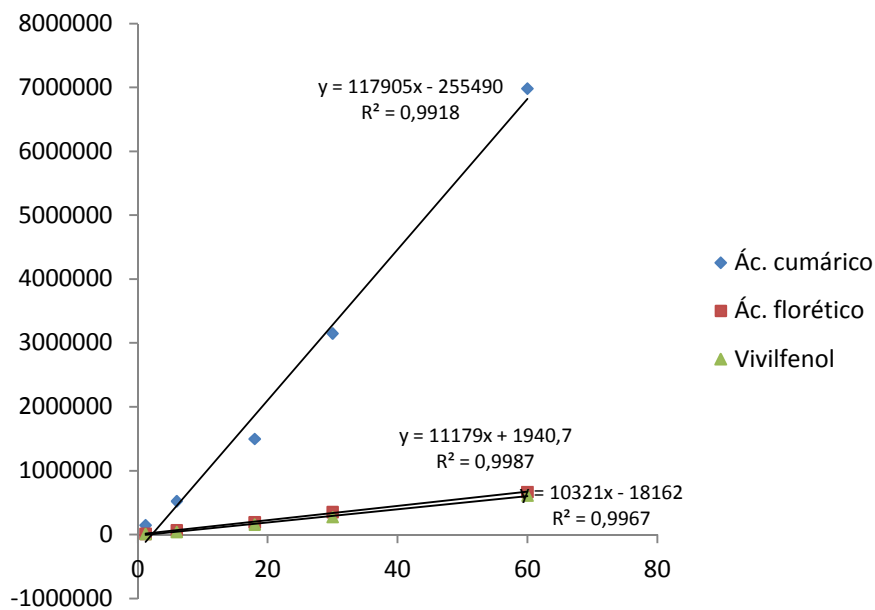
Todas as amostras foram microfiltradas antes da injeção utilizando filtros de seringa de 0,45 µm de porosidade (VWR International, EUA). A identificação dos picos foi baseada nos tempos de retenção e na forma dos espectros. A quantificação foi realizada em comparação com os resultados obtidos a partir das soluções-padrão.

Da mesma forma que se procedeu para o ensaio no GC-FID, foi efetuado um ensaio de calibração para os compostos 4-VP, ácido florético e ácido p-cumárico, através da preparação de duas soluções-padrão. As curvas de calibração obtidas para os

três compostos mencionados e os tempos de retenção médios obtidos na análise por HPLC estão representados na figura 5 e tabela 6 respectivamente.

**Tabela 6** – Tempo de retenção e comprimento de onda para o valor de absorvância máximo obtida na calibração em HPLC para os compostos ácido p-cumárico, ácido florético e vinilfenol.

Compostos	Tempo de retenção médio (min)	Comprimento de onda para absorvância máxima (nm)
Ácido p-cumárico	14,4	317-320
Ácido Florético	13,2	276-277
Vinilfenol	23,6	257

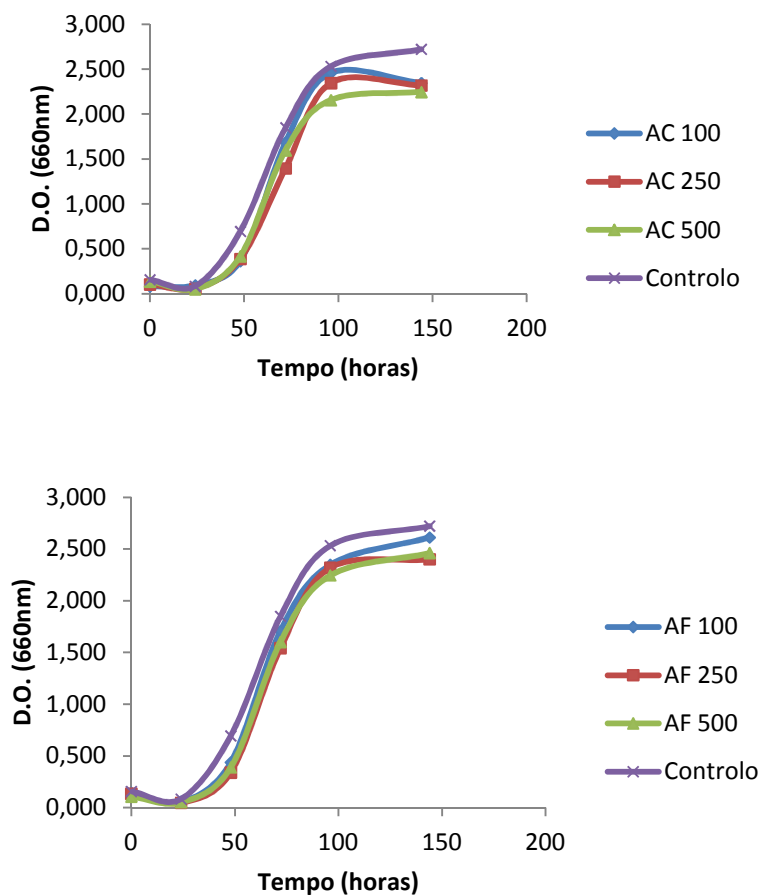


**Figura 5** - Curvas de calibração obtidas para os compostos ácido p-cumárico, ácido florético e vinilfenol.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Influência do ácido p-cumárico e ácido florético no crescimento de *D. bruxellensis* e *D. anomala*

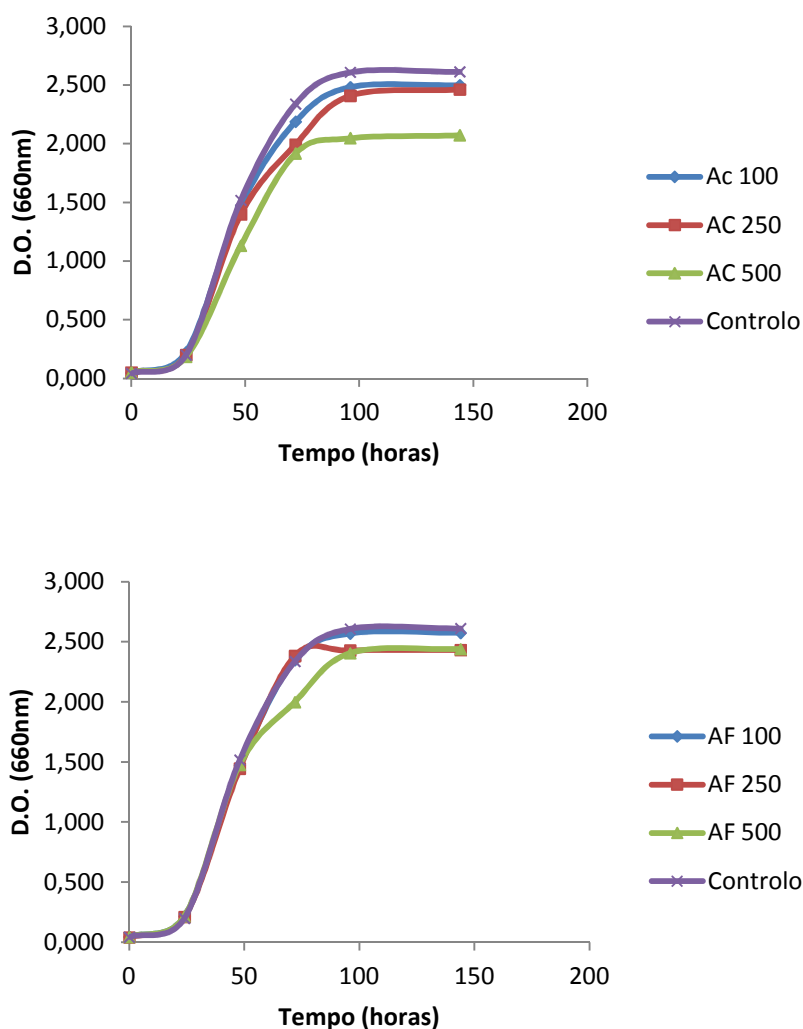
Para verificar se os ácidos p-cumárico e florético apresentavam influência no crescimento das estirpes *D. bruxellensis* PYCC 4801 e *D. anomala* PY 5153, suplementou-se o meio de cultura YM com as concentrações de 100, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup> de ambos os ácidos. As curvas de crescimento obtidas estão representadas nas figuras 6 e 7.



**Figura 6** – Curva de crescimento para *D. bruxellensis* PYCC 4801 em meio YM com concentrações de 100, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup> de ácido p-cumárico e ácido florético.

Pode-se verificar que a presença do ácido p-cumárico teve influência no crescimento de *D. bruxellensis* afetando, principalmente, a biomassa final obtida. O ácido florético teve pouca influência no crescimento de *D. bruxellensis*, no entanto para

as concentrações de 250 e 500 mg L<sup>-1</sup> verificou-se um crescimento menor. *D. bruxellensis* mostrou-se mais resistente à presença do ácido florético. O ácido p-cumárico teve um efeito ligeiramente inibidor no crescimento de *D. bruxellensis* a partir de 100 mg L<sup>-1</sup>, sendo este efeito mais notório a concentrações mais altas (particularmente a 500 mg L<sup>-1</sup> em que houve um decréscimo da biomassa final).



**Figura 7** – Curva de crescimento para *D. anomala* PYCC 5153 em meio YM com concentrações de 100, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup> de ácido p-cumárico e ácido florético.

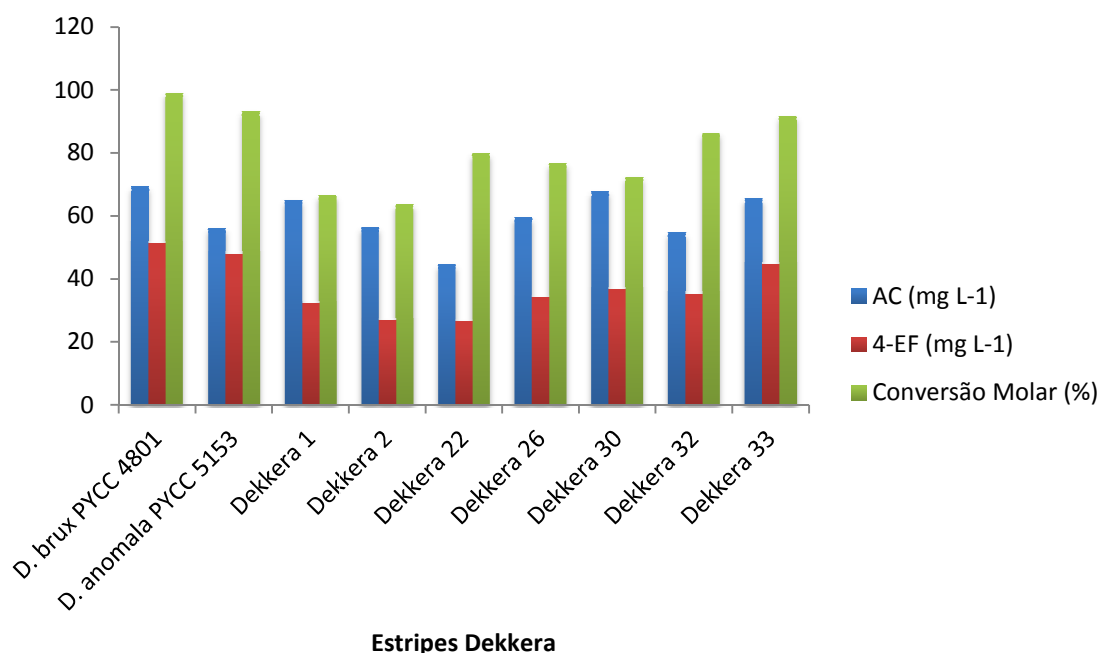
O ácido florético parece ter mais influência no crescimento de *D. anomala* do que em *D. bruxellensis*, no entanto na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> não se verificou qualquer alteração do crescimento de *D. anomala*.

A estirpe *D. anomala* apresentou mais suscetibilidade à presença do ácido p-cumárico do que à presença do ácido florético. O crescimento desta estirpe foi afetado pela presença de ácido p-cumárico à concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>. Os efeitos das concentrações de ácido p-cumárico de 100 mg L<sup>-1</sup> e 250 mg L<sup>-1</sup> tiveram o mesmo efeito.

### **3.2. Verificação da produção de 4-etilfenol partindo de diferentes precursores**

Nesta experiência o meio de cultura YM foi suplementado com 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido p-cumárico (AC) para que fosse verificada a capacidade de conversão do mesmo em 4-etilfenol (4-EF) pelas diferentes estirpes estudadas após 7 dias de incubação a 30 °C.

O composto 4-etilfenol foi quantificado pela análise dos resultados obtidos em GC-FID e as concentrações iniciais e finais do ácido p-cumárico foram calculadas através da análise dos resultados obtidos pelo HPLC. A percentagem de conversão molar foi calculada pela divisão da concentração molar do 4-etilfenol pela concentração molar inicial do ácido p-cumárico adicionado ao meio de cultura. Os resultados obtidos estão representados na figura 8.



**Figura 8** – Produção de 4-etilfenol partindo do precursor ácido p-cumárico em meio YM após 7 dias de incubação a 30° C.

Os resultados obtidos mostram que todas as estirpes de *Dekkera* testadas nesta experiência foram capazes de produzir 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico. Verifica-se também que se obtiveram diferentes valores de conversão molar o que vem de acordo com o autor Vigentini *et al.*, (2008) que afirmou que estão associadas diferentes capacidades de crescimento e de produção de compostos fenólicos à diversidade genética de estirpes. Em nenhuma das análises de HPLC no final da experiência foi encontrado ácido p-cumárico. As estirpes que apresentaram maior percentagem de conversão foram a *D. bruxellensis* PYCC 4801, *D. anomala* PYCC 5153 e *Dekkera/Brettanomyces* 33 tendo valores perto de 100%. A estirpe que apresentou menor taxa de conversão molar foi a *Dekkera/Brettanomyces* 2.

Segundo Dias *et al.* (2003), outros organismos como *Pichia guilliermondii* são capaz de converter o ácido p-cumárico em 4-etilfenol, mas em pequenas quantidades, sendo que o que diferencia *Dekkera/Brettanomyces* dos outros organismos é a produção relativamente elevada de etilfenóis, e pode-se constatar pelos elevados valores de conversão molar (próximos de 100%) obtidos nesta experiência. Outros organismos como *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus* parecem ter a capacidade de

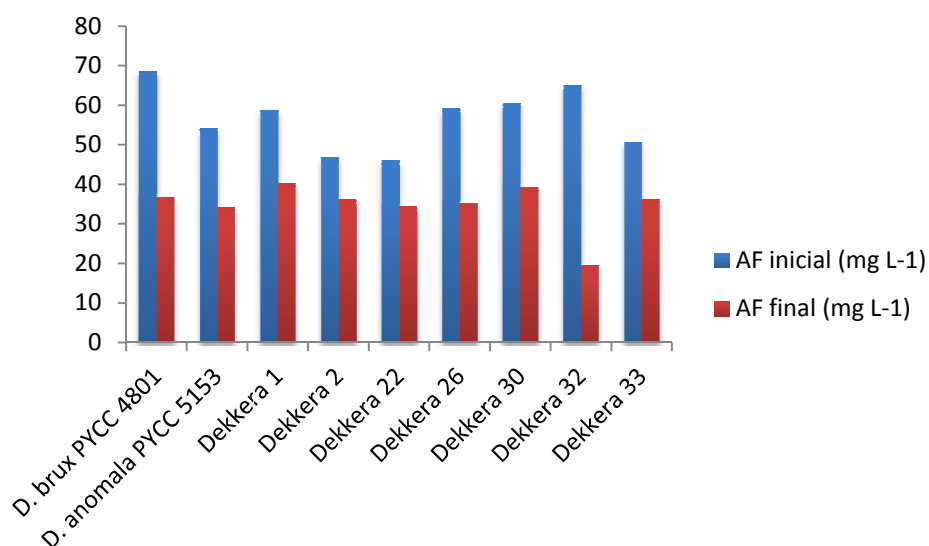
descarboxilar o ácido p-cumárico em 4-vinilfenol, mas poucas espécies - *Brettanomyces* e *Lactobacillus plantarum* - são capazes de produzir etilfenóis (Chatonnet *et al.*, 1995).

Para verificar se as diferentes estirpes seriam capazes de usar o ácido florético (AF) e convertê-lo em 4-etilfenol, o mesmo foi adicionado ao meio de cultura YM (50 mg L<sup>-1</sup>). Usou-se este ácido para que se pudesse aferir das características da enzima hidroxicinamato descarboxilase, pois o ácido florético e o ácido p-cumárico diferem apenas na ligação dupla do carbono do grupo carboxilo ao carbono 2 da cadeia lateral.

Curiel *et al.* (2010) e Couto *et al.* (2006) mostraram que algumas bactérias do ácido láctico apresentavam a capacidade de reduzir o ácido p-cumárico em ácido florético, o que apresenta interesse do ponto de vista enológico, uma vez que assim se poderá eventualmente utilizar essas bactérias para reduzirem a quantidade de ácido p-cumárico e assim reduzir a produção de 4-etilfenol.

No final da experiência (7 dias a 30° C) a fração volátil foi quantificada por GC-FID e a fração não volátil por HPLC, para que fosse verificada a quantidade de 4-etilfenol produzida assim como as concentrações inicial e final de ácido florético.

Os resultados desta experiência são apresentados na figura 9.

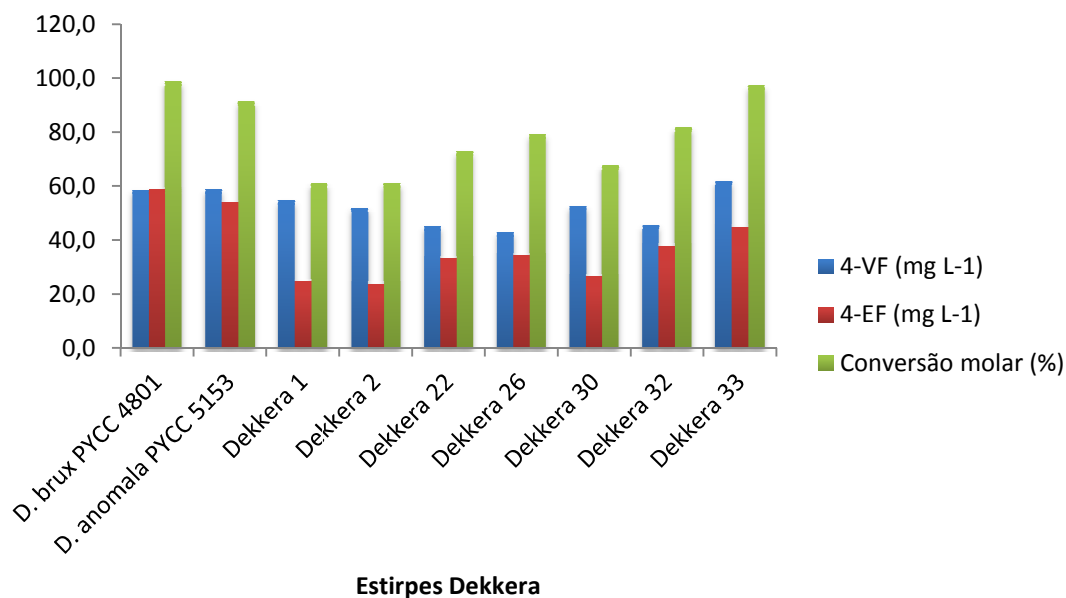


**Figura 9** – Concentrações iniciais e finais de ácido florético obtidas para as diferentes estirpes de *Dekkera/Brettanomyces*.

Verificou-se que nenhuma das estirpes estudadas produziu fenóis voláteis (4-EF e 4-VF) a partir do ácido florético. Pela análise da figura 9 pode-se constatar que houve uma diminuição da concentração do ácido florético para todas as estirpes de *Dekkera/Brettanomyces*. No entanto, não foi possível determinar em que produtos foi convertido este ácido. Estes resultados sugerem que de facto a diferença na ligação dupla parece afetar a ligação da enzima hidroxycinamato descarboxilase pois para nenhuma das estirpes estudadas se verificou a produção de 4-etilfenol partindo do ácido florético.

Outro ensaio foi conduzido com a adição do composto 4-vinilfenol (4-VF) ao meio de cultura YM, a fim de verificar o funcionamento da enzima vinilfenol reductase das estirpes em estudo. À semelhança da experiência do ácido p-cumárico, foram determinadas as concentrações iniciais de vinilfenol, as concentrações finais de 4-etilfenol e a conversão molar.

Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 10.



**Figura 10** – Produção de 4-etilfenol partindo do precursor ácido p-cumárico em meio YM após 7 dias de incubação a 30° C.

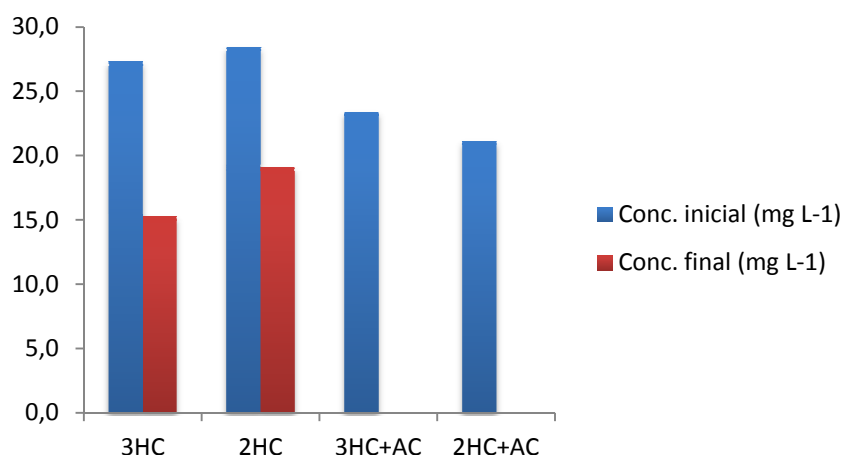
Todas as estirpes foram capazes de reduzir 4-vinilfenol a 4-etilfenol. Na análise dos resultados de HPLC, no final da experiência, não foi encontrado 4-vinilfenol em nenhum dos ensaios realizados com as diferentes estirpes.

A enzima responsável pela descarboxilação encontra-se presente num elevado número de bactérias, fungos, e outras leveduras, no entanto a enzima responsável pela redução, encontra-se apenas presente nas espécies, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Candida versatilis*, *Candida halophila* e *Candida manniotfaciens*, como foi constatado por diferentes autores, Chatonnet, *et al.* (1995); Chatonnet, *et al.* (1997); Dias *et al.* (2003) e Edlin *et al.* (1995). Segundo Dias *et al.* (2003) Outras leveduras presentes nos vinhos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Torulaspota spp.* e *Zygosaccharomyces spp.* também apresentam a capacidade de produzir 4-vinilfenol mas não de reduzir este composto a 4-etilfenol.

À semelhança dos resultados obtidos na experiência anterior, com o ácido p-cumárico, verifica-se que as leveduras *D. bruxellensis* PYCC 4801, *D. anomala* PYCC 5153 e *Dekkera/Brettanomyces* 33 tiveram valores de taxa de conversão superiores às outras estirpes.

### 3.3. Metabolismo dos ácidos 2-hidroxicinâmico e 3-hidroxicinâmico

A fim de se verificar se a posição do grupo -OH tinha influência no metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos por *D. bruxellensis* PYCC 4801, supostamente interferindo na ligação do precursor à enzima hidroxicinamato descarboxilase, foi feita uma experiência com os ácidos 2-hidroxicinâmico (2HC) e 3-hidroxicinâmico (3HC) na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> (7 dias à temperatura de 30° C) Numa outra experiência, além de 25 mg L<sup>-1</sup> de cada ácido foi também adicionado 25 mg L<sup>-1</sup> de ácido p-cumárico (4-hidroxicinâmico) para se verificar se os ácidos 2HC e 3HC interferiam na produção de 4-etilfenol a partir daquele. Os resultados obtidos estão expressos na figura 11.

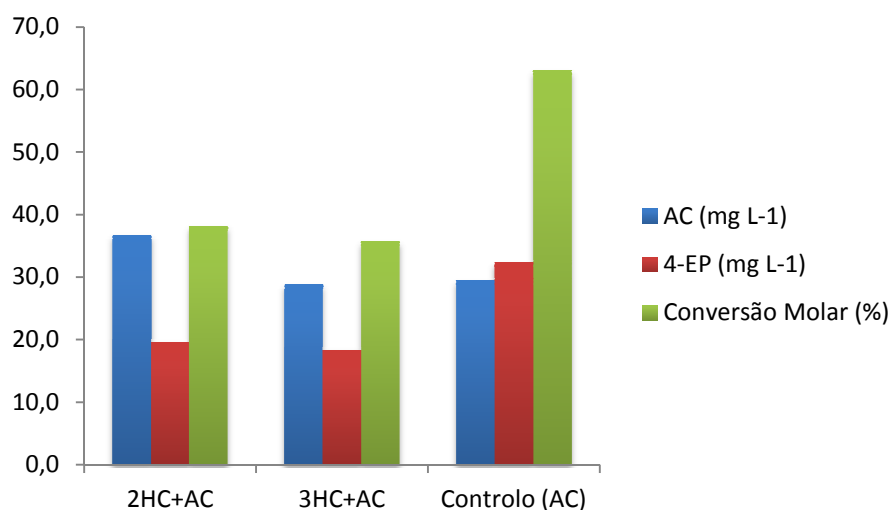


**Figura 11** – Concentrações inicial e final de ácido 2-hidroxicinâmico e ácido 3-hidroxicinâmico, na presença e ausência do ácido p-cumárico para a estirpe *D. bruxellensis* PYCC 4801.

Como está representado na figura 11, verifica-se uma diminuição da concentração quer de 2HC quer de 3HC, mas estes não foram metabolizados em 4-etilfenol de acordo com a análise por GC-FID. Na presença do ácido p-cumárico, nenhum dos ácidos (2HC e 3HC) foi detetado no final da experiência, não tendo sido encontrados nas análises por HPLC.

O ácido 2-hidroxicinâmico e o ácido 3-hidroxicinâmico são ambos análogos do ácido p-cumárico (4-hidroxicinâmico) diferindo na posição da ligação do grupo –OH ao anel benzóico. Neste ensaio, verificou-se que a posição do grupo –OH tem influência na ligação ao centro ativo da enzima hidroxicinamato descarboxilase, pois para os compostos 2HC e 3HC não se verificou a produção dos correspondentes fenóis voláteis (2-etilfenol e 3-etilfenol) na análise por GC-FID.

Na figura 12 estão representadas as concentrações de ácido p-cumárico, as concentrações de 4-etilfenol e a conversão molar (de ácido p-cumárico em 4-etilfenol).



**Figura 12** – Influência dos ácidos 2HC e 3HC na produção de 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico pela levedura *D. bruxellensis* PYCC 4801.

Na presença dos ácidos 2HC e 3HC verificou-se que a produção de 4-etilfenol partindo do ácido p-cumárico diminuiu, como se pode constatar pela observação da figura 12. Este facto pode ter-se devido a uma possível competição à ligação da enzima hidroxicinamato descarboxilase.

### 3.4. Influência do ácido florético na produção de 4-etilfenol a partir de ácido p-cumárico

Para estudar a possível interferência do ácido florético na produção de 4-etilfenol a partir do ácido p-cumárico foram adicionadas ao meio de cultura quantidades crescentes de ácido florético (50, 100 e 250 mg L<sup>-1</sup>) e a mesma quantidade de ácido p-cumárico (10 mg L<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos para este ensaio estão representados na tabela 6.

**Tabela 6** – Interferência entre o ácido florético e ácido p-cumárico na produção de 4-etilfenol, para a estirpe *D. bruxellensis* PYCC 4801.

<i>D. bruxellensis</i> PYCC 4801	AC (mg L <sup>-1</sup> )	4-EF (mg L <sup>-1</sup> )	AF inicial (mg L <sup>-1</sup> )	AF final (mg L <sup>-1</sup> )
Db_AC <sub>10</sub>	10,2	21,2	-	-
Db_AF <sub>50</sub> AC <sub>10</sub>	11,7	21,4	50,9	40,1
Db_AF <sub>100</sub> AC <sub>10</sub>	11,8	16,6	106,2	76,5
Db_AF <sub>250</sub> AC <sub>10</sub>	11,8	15,6	220,8	168,7

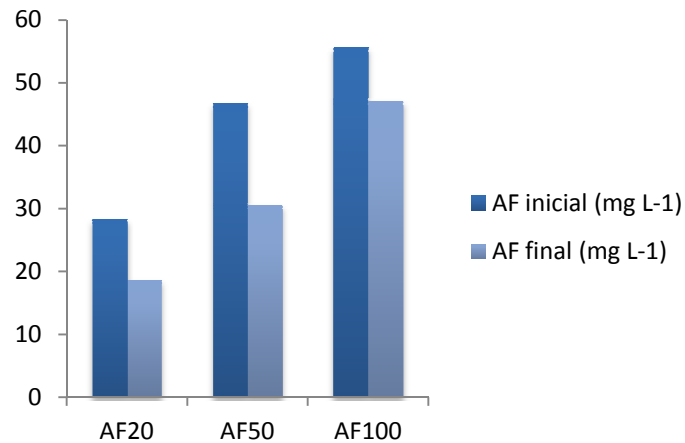
Os resultados sugerem uma diminuição da quantidade de 4-etilfenol produzido por 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido cumárico na presença de ácido florético em concentrações relativamente elevadas (> 50 mg L<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos sugerem que poderá haver competição entre o ácido florético e o ácido p-cumárico na ligação do centro ativo da enzima hidroxycinamato descarboxilase pois verificou-se um decréscimo na produção de 4-etilfenol.

### 3.5. Conversão do ácido florético

Foram usadas concentrações crescentes de ácido florético para que se pudesse identificar o porquê da sua diminuição quando em contacto com a levedura *Dekkera*, e também para se tentar aferir em que compostos o mesmo seria convertido.

Na figura 13 estão apresentadas as concentrações iniciais e finais de ácido florético obtidas nesta experiência.



**Figura 13** – Concentrações iniciais e finais de ácido florético obtidas na experiência conduzida pela levedura *D. bruxellensis* PYCC 4801.

De facto verificou-se uma diminuição da concentração do início para o fim do ensaio mas não se conseguiu fazer a identificação de que compostos ele teria sido convertido. É possível que o ácido florético tenha sido parcialmente metabolizado pelas leveduras ou que possa ter sido eliminado do meio de cultura por adesão às paredes celulares da levedura. Mais uma vez não se verificou a produção de 4-etilfenol a partir de ácido florético.

## Conclusões

Verificaram-se ligeiras diferenças no crescimento de *D. bruxellensis* PYCC 4801 quando em contacto com ácido p-cumárico na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup>. Em relação a *D. anomala*, o seu crescimento só foi afetado na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>. O ácido florético parece não ter influência significativa no crescimento das duas estirpes referidas anteriormente. A produção de derivados do ácido p-cumárico foi verificada em diferentes estirpes. As estirpes *D. bruxellensis* PYCC 4801, *D. anomala* PYCC 5153 e *Dekkera/Brettanomyces* 33, foram as que apresentaram valores de taxas de conversão mais elevados para ambos os precursores, ácido p-cumárico e vinilfenol, tendo valores perto de 100%. A estirpe que apresentou menor taxa de conversão molar foi a *Dekkera/Brettanomyces* 2 também para ambos. Nenhuma das estirpes de *Dekkera/Brettanomyces* testadas apresentou a capacidade de metabolizar o ácido florético em 4-etilfenol.

Quer a ligação dupla do carbono do grupo carboxilo ao carbono 2 da cadeia lateral, quer a ligação do grupo –OH ao carbono 4 do anel aromático mostraram ser dois fatores determinantes para a ligação da enzima hidroxicinamato descarboxilase ao substrato (ácido p-cumárico).

A presença de outros ácidos hidroxicinâmicos, como ácido florético ou ácidos 2-hidroxicinâmico e 3-hidroxicinâmico mostraram afetar negativamente a produção de 4-etilfenol a partir do p-cumárico.

A utilização de estirpes selecionadas de bactérias do ácido láctico para reduzirem a presença do ácido p-cumárico transformando-o em ácido florético, poderá ser uma forma eficaz de reduzir a produção de 4-etilfenol em vinhos, uma vez que através do precursor ácido florético não se verificou a produção de 4-etilfenol pelas leveduras *Dekkera/Brettanomyces*.

Este trabalho deixa em aberto algumas pistas de investigação futuras, tal como a caracterização mais profunda do metabolismo do ácido florético, incluindo a identificação de potenciais produtos desta atividade.

## Referências Bibliográficas

- Arvik, T., Conterno, L., Henick-Kling, T. 2002. *Brettanomyces bruxellensis* in New York State wines: A global issue. In Proceedings from the 31st Annual New York Wine Industry Workshop. Geneva, New York.
- Arvik, T., e Henick-Kling, T. 2002. *Brettanomyces bruxellensis* occurrence, growth, and effect on wine flavor. In Proceedings from the 31st Annual New York Wine Industry Workshop. Geneva, New York.
- Agnolucci, M., Vigentini, I., Capurso, G., Merico, A., Tirelli, A., Compagno, C., Foschino, R., Nuti, M. 2009. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *Int J Food Microbiol* 130:238–244.
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 121(2), 201e207.
- Barata, A., Nobre, A., Correia, P., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. 2006. Growth and 4 ethylphenol production by yeast *Pichia guilliermondii* in grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 133-138.
- Barata, A., Pagliara, D., Piccininno, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2008b. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Res* 8:1097–1102.
- Barthelmebs, L., Divies, C., Cavin, J.F., 2000. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 66 Issue 8, p. 3368-3375.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York: Chapman and Hall.
- Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., Ledauphin, J., Guichard, H., Barillier, D., Coton, E., 2011. Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability. *Food Microbiology* Vol. 28, 1243-1251.
- Caruso, M., Fiore, C., Contursi, M., Salzano, G., Paparella, A., Romano, P. 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeast. *World J Microbiol Biotechnol* 18:159–163.
- Cavin, J.F., Barthelmebs, L., Guzzo, J., Van Beeumen, J., Samyn, B., Travers, J.-F., Diviès, C., 1997. Purification and characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 147, 291–295.
- Chatonnet, P., e Boidron, J. P. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of Science Food Agriculture*, 165 -178.
- Chatonnet, P., Dubordieu, D. and Boidron, J. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 463-468.
- Chatonnet, P., e M., P. 1990. Elevage des vins rouges futs de chene: evolution de certains composés volatiles et de leur impact aromatique. *Science des Aliments*, 565 - 587.

- Chatonnet, P., e Viala, C. D. 1997. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 443 - 448.
- Connel, L., Stender, H., Edwards, C. 2002. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am J Enol Vitic* 53:322-324.
- Conterno, L., Joseph, L. C., Arvik, T., Henick-Kling, T., Bisson, L. 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal for Enology and Viticulture* 57(2), 139e147.
- Conterno, L., e Lasik, G. T.-K. 2007. Influence of sugar and nitrogen sources on growth and phenolic off-flavor production by *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 411.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against microorganisms associated with wine. *Food Microbiol* 25:422-427.
- Couto, J. A., Barbosa, A., Hogg, T. 2005. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Letters in Applied Microbiology*, 41:505-510
- Couto, J. C. 2006. Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture* , 166-171.
- Curiel, J.A., Rodríguez, H., Landete, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2010. Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry* Vol. 120, 225-229.
- Curtin, D., Bellon, R., Henschke, A., Godden, W., De la Lopes, A. 2007. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research*, 7(3), 471e481.
- Daudt, C.E., Ough, C.S. 1980). Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *Am J Enol Vitic* 31:21-23.
- Devéze, M., Ribéreau-Gayon, P. 1977. Thermoresistance des levures dans le vin application à la stabilisation biologique des vins par la chaleur. *Connaissance Vigne Vin* 11:131-163.
- Dias, L., e Dias, S. S.-F. 2003. Identification of yeast originated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*, 567 - 574.
- Dias, L., e Pereira-da-Silva, S. T.-F. 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, 377 - 384.
- Du Toit, W.J., Lisjak, K., Marais, J., du Toit, M. 2006. The effect of microoxygenation on the phenolic composition, quality and aerobic wine-spoilage microorganisms of different South African red wines. *S Afr J Enol Vitic* 27:57-67.
- Emlin, D., e Narbad, A. D. 1995. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters*, 311-315.
- Franson, P., 2001. The Threat of Brett. *Vineyard & Winery Management*, New York, 27:4
- Fugelsang, K., e Zoecklein, B. 2003. Population Dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *American Journal for Enology and Viticulture*, 54(4), 294e300.

- Fuselsang, K. 1997. *Wine microbiology*. New York, NY: Chapman & Hall.
- Fugelsang, K., Edwards, C. 2007. *Wine microbiology*. Springer, Berlin
- García-Ruiz, A. B.-R.-Á.-A. 2008. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 835 - 841.
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Carot, J. M., Jabaloyes, J. M., Esteve, M. D., Salinas, M. R. 2008. Statistical differentiation of wines of different geographic origin and aged in barrel according to some volatile components and ethylphenols. *Food Chemistry* 111(4), 1025e1031.
- Gerbaux, V., Naudin, R., Meurgues, O., Monamy, C. 2000. Etude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bulletin de l'O.I.V.*, 73 (835e836), 581e599.
- Godoy, L., Martínez, C., Carrasco, N., Ganga, M. 2008. Purification and characterization of a *p*-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* 127: 6-11.
- Guerzoni, E., Marchetti, R. 1987) Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Appl Environ Microbiol* 53:571–576.
- Harris, V., Ford, C., Jiranek, V., Grbin, P. 2009. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Applied Microbiology & Biotechnology* 81(6), 1117e1127.
- Henschke, P., e Curtin, C. &. 2007. Molecular characterization of the wine spoilage yeast e *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. *Microbiology Australia*, 76 - 78.
- Humbert, C. 1980. Thermolisation: its effects on wine *Revue Française Oenologie* 16:51–53
- Jackson, S. R. 2000. *Wine science: principles, practice and perception*. London, UK: Academic press.
- Kurtzman, C., e Fell, J. W. 2000. *The yeasts, a taxonomic study (4th ed.)*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher BV.
- Laureano, P., D'Antuono, I., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2004. Effect of different sanitation treatments on the population of *Dekkera bruxellensis* recovered from the wood of barrels (in Portuguese). *Enologia* 43(44):3–8.
- Licker, L., Acree, T., Henick-Kling, T. 1998. What is "Brett" (*Brettanomyces*) Flavor? A preliminary investigation. *Chemistry of Wine Flavor*, 714: 96-115.
- Licker, L., Acree, T., 1999. Impact of *Brettanomyces* yeast on wine flavor: Sensory description of wines with different 'Brett' aroma character. Geneva, New York: New York State Agricultural Experiment Station, Department of Food Science and Technology.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., Carreira, A. 2004. Detecting spoilage yeasts. In: Steele R (ed) *Understanding and measuring the shelflife of food*. Woodhead, Cambridge, pp 233–288.
- Loureiro, V., e Malfeito-Ferreira, M. 2003. Spoilage yeast in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 23 - 50.
- Loureiro, V., e Malfeito-Ferreira, M. 2006. *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton: Woodhead Publishing.

- Macheix, J., e Fleuriet, A. B. 1990. *Fruits phenolics*. Florida: CRC Press.
- Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M., Loureiro, V. 1997. Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contaminations in wine bottling plants. *Int J Food Microbiol* 38:143–155.
- Malfeito-Ferreira, M., Barata, A., Loureiro, V. 2009. Wine spoilage by fungal metabolites. In: Polo C, Moreno-Arribas MV (eds) *Wine chemistry and biochemistry*, chap 11. Springer, New York, pp 615–645
- Malfeito-Ferreira, M., Lopes, J., Loureiro, V. 1990. Characterization of spoilage yeasts in Portuguese bottled dry white wines. In: Ribereau-Gayon P, Lonvaud A (eds) *Actualités Oenologiques* 89, Comptes rendus du 4eme Symposium International d'Oenologie. Bordeaux, Paris, pp 293–296.
- Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N., Loureiro, V. 2001. The influence of oxygen on the “horse sweat taint” in red wines. *Ital Food Beverage Technol* 24:34–38.
- Malfeito-Ferreira, M. 2005. Avances recientes en el control de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* en vinos. Zaragoza, Spain: Enotour Agrovin.
- Malfeito-Ferreira, M. 2010. Yeasts and off-flavours: a technological perspective. *Ann Microbiol*, 61:95-102.
- Millet, V., e Lonvaud-Funel, A. 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Applied Microbiology* 30, 136e141.
- Morata, A., & S.Benito, F. P.-L. 2008. Ecología y prevención de *Brettanomyces/Dekkera* durante la elaboración y crianza de vinos tintos. *Enologos n° 50*, 1 - 13.
- Oelofse, A., Pretorius, I. S., Du Toit, M. 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal of Enology & Viticulture* 29(2), 128e144.
- Oelofse, A., e A. Lonvaud-Funel, M. d. 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology*, 377 - 385.
- Rayne, S., e Eggers, N. 2008. 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol concentrations in barreled red wines from Okanagan Valley Appellation British Columbia. *American Journal for Enology and Viticulture*, 92-97.
- Renouf, V., e Falcout, M. M.-S.-F. 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, 1208 - 1219.
- Renouf, V., 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*, 162:154–157.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A. 2004. Racking are key stages for the microbial stabilization of wines. *J Int Sci Vigne et du Vin* 38:219–224.
- Renouf, V., Perello, M. C., de Revel, G., Lonvaud-Funell, A. 2007. Survival of wine microorganisms in the bottle during storage. *American Journal of Enology and Viticulture* 58(3), 379e386.
- Ribéreau-Gayon, P. D. 2000b. *Handbook of enology Volume II. The chemistry of Wine and Stabilization and treatments*. US: John Wiley and sons Ltd.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. 2006 *Handbook of enology* (vols 1 and 2). The microbiology of wine and vinification. Wiley, Chichester.

- Roccatò, A., Daguerre, C., Mercado, L., Catania, C. Combina, M. 2001. Detección de *Dekkera/Brettanomyces* en uva, mosto y vinos: metodología y primeros resultados. Vitivinicultura and Enology Latin American Congress, Montevideo, Uruguay. pp:1-7.
- Romano, A., e M.C. Perello, G. d-F. 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology*, 1577 - 1585.
- Silva, R., Andrade, B., Valentão, P., Seabra, M., Trujillo, E., Velázquez, E. 2005. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. *Food Chemistry*, 89(2), 185e189.
- Schuller, D., Côrte-Real, M., Leão, C. 2000. A differential Medium for the Enumeration of the Spoilage Yeast *Zygosaccharomyces bailii* in Wine. *J Food Prot* 63:1570–1575.
- Suárez, R., e Suárez-Lepe, J. A. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 10 - 21.
- Van Dijken, P. J., e Scheffers, W. A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 32, 199e224.
- Vigentini, I., e Romano, C. 2008. Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. . *FEMS Yeast Research*, 1087 - 1096.
- Umiker, N. L., e Edwards, C. G. 2007. Impact of sulfur dioxide on culturability and viability of *Brettanomyces* in wine. *American Journal for Enology and Viticulture* 58(3), 417A.
- Uscanga, M. G., Delia, M. L., Strehaiano, P. 2003. *Brettanomyces bruxellensis* effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61(2), 157e162.
- Wedral, D., e Robert Shewfelt, J. F. 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology*, 1 - 6.
- Whiting, G. C. and Carr, J. G., 1959. Metabolism of cinnamic acid and hydroxycinnamic acids by *Lactobacillus pastorianus* var. *quinicus*. *Nature* Vol. 184 (4696), 1427–1428.