

Avaliação do crescimento de leveduras de alteração em vinhos utilizando a metodologia de superfícies de resposta

Inês Correia Horta Lazo Oro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Viticultura e Enologia

Orientador: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira.

Juri:

PRESIDENTE - Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

VOGAIS - Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

- Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

2014

“O que é bonito neste mundo, e anima, é ver que na vindima de cada sonho fica a cepa a sonhar outra aventura... E que a doçura que não se prova, se transfigura noutra doçura muito mais pura e muito mais nova.”

Miguel Torga

AGRADECIMENTOS

Ao terminar este trabalho não poderia fazê-lo sem antes expressar o meu agradecimento a todos aqueles que sempre me acompanharam e apoiaram. Assim gostaria de expressar o meu reconhecimento

Ao Doutor Manuel Malfeito Ferreira, meu orientador, em primeiro lugar pela sugestão do tema, por todos os ensinamentos e pela sua inteira disponibilidade, por todo o apoio que me dispensou em todos os momentos e, acima de tudo, pela sua amizade ao longo de todo este trabalho conjunto;

À Professora Luísa Brito, por todo o apoio e amizade ao longo deste percurso, pela sua força e entusiasmo. Pelo ânimo que sempre me deu.

À Carla Silva e à Rute Coutinho que sempre me acompanharam no laboratório e sem as quais a execução do trabalho experimental teria sido por vezes impossível de realizar, mas também por toda a amizade e companheirismo. Com elas os longos dias passados no laboratório eram sem dúvida mais prazerosos. Ao Mahesh Chandra, pelo apoio que sempre prestou ao longo do desenvolver do trabalho.

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, em particular à D. Lena e à D. Manuela com o auxílio das quais foi possível a execução dos ensaios fundamentais neste estudo, pela amizade e boa disposição. A todos o que como eu por aqui passaram a realizar os seus trabalhos, pelos momentos de descontração, pelo apoio e incentivo e cuja amizade jamais esquecerei, principalmente ao Yigit Keskin e à Viviana Monteiro.

Ao Ricardo Chagas por todo o apoio na utilização do HPLC, pelo seu entusiasmo e boa disposição, pela sua disponibilidade e compreensão na resolução de alguns problemas que foram surgindo.

Ao laboratório Ferreira Lapa, principalmente à D. Júlia Barata pela simpatia e pelo auxílio na execução analítica das técnicas físico-químicas e de cromatografia.

A todos aqueles, familiares e amigos, que por estarem sempre tão próximo me deram ânimo e força, e me ajudaram a finalizar mais um capítulo. Em particular, à Smedo e ao João, mais que que amigos, são a família que eu escolhi. À Luisa e ao Eduardo que desde que me lembro sempre me apoiaram e estiveram presentes nos momentos mais difíceis, também eles fazem parte desta minha família do coração.

À Vanda que foi uma ajuda preciosa no Excel e sem a qual teria, sem dúvida, demorado muito mais tempo a terminar este trabalho. Ao Ricardo pela confiança nas minhas capacidades e pela oportunidade que me proporcionou, pelos seus ensinamentos, ligando a teoria à prática de enologia. Ainda pelos momentos descontraídos e sempre muito bem passados na sua companhia.

Aos meus queridos amigos e companheiros de curso, pela partilha, pelo apoio, pelas alegrias, por tudo o que vivemos juntos, em particular à Catarina Dias que me contagia constantemente com a sua paixão pelo rural e pela enologia; à Susana Faia e à Sara Cruz pelos caminhos que percorremos juntas; ao João Baía e ao Dário Cruz, a todos pelas risadas e por serem para mim uma inspiração.

Ainda ao Nuno Martins pela sua grande amizade, pelo companheirismo, pelas risadas, por todo o apoio e pelo seu conhecimento nesse maravilhoso mundo dos vinhos.

À Patrícia Ferreira, pela sua amizade e alegria constantes ao longo deste percurso da enologia e por quem guardo sempre um carinho muito especial. Pelos seus ensinamentos de laboratório e da vida, em geral.

Aos meus padrinhos que sempre me apoiaram em todos níveis e de todas as formas, mesmo estando longe.

Aos meus pais por todo o carinho, preocupação e apoio incondicionais em todos os níveis ao longo da minha vida. Sem eles teria sido muito mais difícil.

Ao Gil por me abrir horizontes, pelo companheirismo e compreensão ao longo desta jornada, ainda pelo apoio fundamental nos momentos mais difíceis.

A todos o meu, Muito Obrigado.

RESUMO

Este estudo teve como objectivo compreender os efeitos de diferentes factores sobre crescimento de leveduras de alteração em vinho tinto e consequente produção de metabolitos usando a metodologia de superfícies de resposta. Foi estudada a combinação dos efeitos de glucose, etanol e anidrido sulfuroso livre sobre o crescimento de várias espécies de leveduras de alteração (*Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*) aplicando o método de superfícies de resposta durante 60 dias, a 25 °C. A composição inicial dos vinhos tintos usados nas experiências variou de 2 – 10 g/L de glucose, 10 – 15% (v/v) de etanol e 0 – 40 mg/L de anidrido sulfuroso livre.

Os resultados obtidos mostraram que a estirpe *Saccharomyces ludwigii* testada foi a mais resistente ao etanol e anidrido sulfuroso livre enquanto a mais susceptível foi a *Dekkera bruxellensis*. A influência da glucose sobre o crescimento não foi estatisticamente significativa, não se verificou nenhuma relação directa entre a produção de 4-etilfenol e consumo de glucose. Além disso, não houve um aumento da susceptibilidade do vinho com elevado teor de glucose ao crescimento de leveduras de alteração, dando maior ênfase à mais frequente das leveduras em vinho, *Dekkera bruxellensis*, imediatamente inibida pelo elevado teor de anidrido sulfuroso e/ou etanol.

Palavras-chave: vinho, leveduras de alteração, glucose, etanol, anidrido sulfuroso livre, 4-etilfenol.

ABSTRACT

This study aimed to understand the effects of different factors on the growth of spoilage yeasts in red wine and consequent production of metabolites using response surface methodology. The combination of the effects of glucose, ethanol and free sulfur dioxide on the growth of various species of yeast change (*Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera / Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*) was studied using the method of response surfaces for 60 days at 25 ° C. The initial composition of red wine used in the experiments ranged 2-10 g/L glucose, 10 - 15% (v/v) ethanol and 0 - 40 mg/L of free sulphur dioxide.

The results showed that the strain *Saccharomyces ludwigii* tested is the most resistant to ethanol and free sulfur dioxide in contrast to the most susceptible, *Dekkera bruxellensis*. The influence of glucose on the growth was not statistically significant, and there was no direct relationship between the production of 4- ethylphenol and glucose consumption. Furthermore, when the cells were inactivated, specially *Dekkera bruxellensis*, by sulphur dioxide and ethanol, glucose didn't increase the wine susceptibility.

Key words: wine, spoilage yeasts, response surface methodology, glucose, sulphur dioxide, ethanol, 4-ethylphenol.

EXTENDED ABSTRACT

The yeasts of the species *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* pose a serious threat to wine industries, as their undesired growth not only, results in formation of objectionable metabolites that develop and intensify during aging, but also negatively impacts activity of the wine is of major concern for wine producers in order to reduce their economical loss. A prior knowledge of the growth pattern and tolerance ability of such spoilage yeasts in wine environment is a necessity to design and effective control measure. The goal of study was to understand growth pattern and tolerance ability of said yeast species in presence of different factors.

Response surface methodology statistical approach was employed to study the effect of several factors, simultaneously, on the cell viability and the production of respective metabolites. Measurements of the variant in cell viability and cell volume during growth kinetics revealed the exact effect of different factors on the cell survivals. Production of metabolites was proportional to the growth rate variation. Different yeast species showed variable growth patterns in presence of different factors. At 25 °C, the most pronounced effect on growth was due to ethanol and sulfur, being fully arrested under 14 or 15 % (v/v) in *Brettanomyces*, while *Zygosaccharomyces* tolerated this concentration of alcohol. The level of residual sugar from 2 to 10 g/L did not increase wine susceptibility to yeast growth of any species. *Saccharomyces ludwigii* was the most resistant strain in this work; fortunately its contamination in wine is very rare due to its low ability to compete with other yeasts. For all strains, the limiting factor for growth inhibition was free sulfur dioxide and ethanol (although on a smaller scale) which was confirmed by the statistical analysis.

The overall results allowed a better understanding of the spoilage yeasts behavior and provided new strategies to prevent their activity in red wines. The information can be useful in controlling the growth of spoilage yeast at certain check-points in either during fermentation or the storage.

The technique of response surface methodology can be a great and very useful tool for winemakers after the optimization and validation of the models, giving rise to comprehensive results, with a rapid analysis of a few samples.

Keywords: wine, spoilage yeasts, 4-ethylphenol, RSM

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Introdução geral.....	1
1.2.	Leveduras de alteração em vinhos	1
1.3.	Espécies.....	2
1.3.1.	Ecologia	9
1.4.	Conceito de susceptibilidade ao ataque microbiano em vinhos	13
1.5.	Alteração do vinho por fenóis voláteis.....	14
1.6.	Controlo microbiológico	17
1.7.	Efeito factores conjuntos	18
1.7.1.	Etanol	18
1.7.2.	Dióxido de enxofre.....	19
1.8.	Metodologia de superfícies de resposta.....	22
1.9.	Enquadramento e objectivos do trabalho.....	23
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1.	Microrganismos	24
2.2.	Condições de crescimento.....	24
2.2.1.	Preparação do Inóculo.....	24
2.2.2.	<i>Preparação dos vinhos</i>	25
2.3.	Avaliação do crescimento	26
2.3.1.	Estudo preliminar em vinho a 12,5% de etanol	26
2.3.2.	Ensaio experimentais para a obtenção de superfícies de resposta.....	27
2.4.	Comparação de resistência das estirpes	28
2.5.	Teste	28
2.6.	Análises químicas.....	29
2.6.1.	Análises dos parâmetros enológicos convencionais	29
2.6.2.	Análise por GC-FID - Quantificação de 4-etilfenol.	29
2.6.3.	Análise por HPLC - Quantificação de açúcares, ácidos e álcoois	30
2.7.	Metodologia das superfícies de resposta.....	32

3.1.	Método estatístico	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1.	Avaliação do crescimento em vinho a 12,5% de etanol	35
4.2.	Avaliação do crescimento em vinhos com diferentes teores de glicose, etanol e sulfuroso livre através da metodologia de superfícies de resposta	36
4.2.1.	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	37
4.2.2.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	43
4.2.3.	<i>Dekkera/Brettanomyces bruxellensis</i>	47
4.2.4.	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	52
4.2.5.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
5.	COMPARAÇÃO DE RESISTÊNCIA ENTRE ESPÉCIES	59
6.	TESTE	61
7.	CONCLUSÕES.....	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9.	ANEXOS.....	76
9.1.	Anexo I - Composição dos meios utilizados.....	77
9.2.	Anexo II - Acertos parâmetros de cada amostra	78
9.3.	Anexo III - Tabelas crescimento.....	79
9.4.	Anexo V - Composição físico - química de cada estirpe	84
9.5.	Anexo VI – Curva de calibração para a determinação da concentração de 4- etilfenol por cromatografia gasosa.	87
9.6.	Anexo VII – 4-Etilfenol gráficos	87
9.7.	Anexo VIII – Curvas de calibração do HPLC para determinação das concentrações dos compostos.....	92
9.8.	Anexo IX – Evolução das concentrações dos compostos por análise de HPLC.....	93
9.9.	Anexo X – Superfícies de resposta de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	98
9.10.	Anexo XI – Superfícies de resposta de <i>Dekkera bruxellensis</i>	99
9.11.	Anexo XII – Superfícies de resposta de <i>Saccharomyces ludwigii</i>	100
9.12.	Anexo XIII – Superfícies de resposta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	101

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Fotografias das leveduras de alteração estudadas em vinho tinto em microscópio óptico.....	3
Figura 1.2. Decomposição do ácido málico por leveduras durante a fermentação maloláctica	5
Figura 1.3. Decomposição do ácido málico por leveduras durante a fermentação alcoólica	5
Figura 1.4. Susceptibilidade dos vinhos à colonização de leveduras	12
Figura 1.6. Ácidos hidroxicinâmicos metabolizados por <i>Dekkera/Brettanomyces</i> spp.	17
Figura 1.7. Esquema dos factores de promoção e controlo das alterações microbianas dos vinhos	18
Figura 2.1. Contagem das unidades formadoras de colónias.....	28
Figura 2.2. Representação esquemática dos componentes que constituem uma análise de GC.	30
Figura 2.3. Representação esquemática dos componentes que constituem uma análise por HPLC.	31
Figura 4.1. Culturabilidade (A) e viabilidade (B) de leveduras de alteração em vinho a 12,5 % de etanol	36
Figura 4.2. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>Z. bailii</i> ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.....	41
Figura 4.3. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>Z. bailii</i> ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de ensaio.	41
Figura 4.4. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. pombe</i> ISA 1190 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.....	45
Figura 4.5. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. pombe</i> ISA 1190 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.	46
Figura 4.6. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. pombe</i> ISA 1190 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.	46
Figura 4.7. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>D. bruxellensis</i> ISA 2211 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.....	50
Figura 4.8. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>D. bruxellensis</i> ISA 2211 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de inoculação.....	50

Figura 4.9. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. ludwigii</i> ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.....	55
Figura 4.10. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. ludwigii</i> ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de inoculação.....	55
Figura 4.11. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. cerevisiae</i> ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.....	58
Figura 4.12. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. cerevisiae</i> ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de inoculação.....	58
Figura 9.1. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>Z. bailii</i> ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.....	98
Figura 9.2. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>Z. bailii</i> ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.....	98
Figura 9.3. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>Z. bailii</i> ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 60 dias de inoculação.....	98
Figura 9.4. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>D. bruxellensis</i> ISA 2211 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.....	99
Figura 9.5. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>D. bruxellensis</i> ISA 2211 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.....	99
Figura 9.6. . Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. ludwigii</i> ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.....	100
Figura 9.7. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. ludwigii</i> ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.....	100
Figura 9.8. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. ludwigii</i> ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 60 dias de inoculação.....	100
Figura 9.9. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de <i>S. cerevisiae</i> ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.....	101

Figura 9.10. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. cerevisiae* ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.....101

Figura 9.11. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. cerevisiae* ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 60 dias de inoculação.....101

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Leveduras de alteração ou de deterioração do vinho	10
Tabela 1.3. Limites de detecção e preferências dos fenóis voláteis no vinho	15
Tabela 2.1. Estirpes em estudo, respectiva espécie e origem.....	24
Tabela 2.2. Composição do vinho base e rectificado	25
Tabela 2.3. Caracterização das amostras de vinho usadas para validação	28
Tabela 2.4. Composição dos vinhos-teste.....	29
Tabela 2.5. Parâmetros de calibração para quantificação de açúcares, ácidos e álcoois.....	31
Tabela 2.6. Relação entre valores reais e codificados dos factores ambientais usados no delineamento DCCR.....	33
Tabela 2.7. Matriz factorial	33
Tabela 4.1. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para cada factor do modelo para <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270, expresso em log UFC/mL	40
Tabela 4.2. Equações ajustadas para <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270	40
Tabela 4.4. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190	44
Tabela 4.5. Equações ajustadas para <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190.....	45
Tabela 4.7. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para <i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211.....	49
Tabela 4.8. Equação dos melhores modelos para <i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211 ...	49
Tabela 4.10. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para <i>Saccharomyces ludwigii</i> ISA 1083.....	54
Tabela 4.11. Equação dos melhores para <i>Saccharomyces ludwigii</i> ISA 1083.....	54
Tabela 4.13. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000	57
Tabela 4.14. Equação dos melhores modelos ajustados para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000	57
Tabela 5.1. Teor de Sulfuroso livre necessário para inibir o crescimento (Log UFC/mL = 1) em vinho com 10 g/L de glucose e 12,5% v/v de etanol	59
Tabela 5.3. Teor de etanol necessário para inibir o crescimento (Log UFC/mL) em vinhos com 10 g/L de glucose e 20 mg/L de sulfuroso livre	60
Tabela 6.1. Teste com vinho A – tinto com 2,7 g/L glucose; 13,6% v/v etanol; 9 mg/L sulfuroso livre (Log UFC/mL).....	61
Tabela 6.2. Teste com vinho B – tinto com 1,8 g/L glucose; 15,3 v/v etanol; 9 mg/L sulfuroso livre (Log UFC/mL).....	61
Tabela 6.3. Teste com vinho C – branco com 2,2 g/L glucose; 12,6 % v/v etanol; 9 mg/L sulfuroso (Log UFC/mL)	62

Tabela 6.4. Teste com vinho D – branco com 6 g/L glucose; 11,6% v/v etanol; 7 mg/L sulfuroso livre (Log UFC/mL).....	62
Tabela 9.1. Culturabilidade <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (Log UFC/ml) ao longo do tempo (dias)	79
Tabela 9.2. Viabilidade das células <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Log UFC/ml) ao longo do tempo (dias).....	80
Tabela 9.3. Viabilidade das células <i>Dekkera bruxellensis</i> (UFC/ml) ao longo do tempo (dias).....	81
Tabela 9.4. Viabilidade das células <i>Saccharomycodes ludwigii</i> (UFC/ml) ao longo do tempo (dias)	82
Tabela 9.5 - Viabilidade das células <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (UFC/ml) ao longo do tempo (dias)	83
Tabela 9.6. Composição físico-química dos vinhos inoculados com <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270.....	84
Tabela 9.7. Composição físico-química dos vinhos inoculados com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000	84
Tabela 9.8. Composição físico-química dos vinhos inoculados com <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190	85
Tabela 9.9. Composição físico-química dos vinhos inoculados com <i>Saccharomycodes ludwigii</i> ISA 1083.....	85
Tabela 9.10. Composição físico-química dos vinhos inoculados com <i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211	86
Tabela 9.11. Resultados de HPLC - <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270.....	93
Tabela 9.12. Resultados de HPLC - <i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211.....	94
Tabela 9.13. Resultados de HPLC - <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190	95
Tabela 9.14. Resultados de HPLC - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000	96
Tabela 9.15. Resultados de HPLC - <i>Saccharomycodes ludwigii</i> ISA 1083.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

DO – Densidade Óptica

GC – Gas Chromatography (cromatografia de gás)

GYP – Glucose yeast peptone

HCl – Ácido clorídrico

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta performance)

IPT - Índice de polifenóis totais

NaOH – Hidróxido de Sódio (Soda cáustica)

rpm – Rotações por minuto

SO₂ – Dióxido de enxofre (Anidrido sulfuroso)

UFC – Unidades formadoras e colónias

YNB – Yeast nitrogen base

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução geral

O vinho é o produto da fermentação de mosto de uva, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O seu processo tecnológico envolve, no entanto, uma diversidade de espécies de leveduras que contribuem de diferentes formas para a qualidade do vinho. Muitas são contaminantes ocasionais provenientes de equipamentos ou das uvas transportadas até à adega e não desempenham qualquer papel durante a vinificação. Contrariamente, existem outras espécies que são uma preocupação permanente devido à aos possíveis efeitos deterioradores conhecidas como leveduras de alteração.

As contaminações do vinho causadas por leveduras são uma das maiores preocupações em enologia moderna. Os efeitos mais comuns são: a formação de véu em e a formação de ácido acético e láctico, em vinhos a granel, a turvação, a formação de sedimentos e a produção de gases, em vinhos engarrafados e, finalmente, aromas e sabores defeituosos em todas as fases de produção de vinhos.

1.2. Leveduras de alteração em vinhos

Em muitos casos, o conceito de leveduras de alteração não é facilmente definido particularmente em alimentos e bebidas fermentados, onde os metabolitos produzidos contribuem para o perfil aromático e gosto do produto final (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Em bebidas fermentadas e particularmente em vinhos, o conceito de leveduras de alteração tem um significado mais complexo do que em alimentos não fermentados, onde qualquer levedura capaz de alterar as suas características sensoriais pode ser considerada “levedura de alteração” (Malfeito-Ferreira, 2010). As leveduras de alteração ou deterioração de alimentos são as que possuem a capacidade de se desenvolver e produzir alterações indesejáveis em alimentos e bebidas (Pitt e Hocking, 1999). No entanto, para os técnicos este conceito só se aplica a leveduras capazes de alterar os alimentos produzidos de acordo com os padrões de boas práticas fabris (GMPs) (Pitt e Hocking, 1999), não obstante a subjectividade dessas práticas. Trata-se de um conceito mais restrito do que o de levedura de contaminação, que são as espécies isoladas de alimentos, mas sem capacidades para o deteriorar.

As leveduras que surgem esporadicamente e não têm capacidade para crescer em vinhos, são designadas adventícias ou inocentes. Por sua vez, as leveduras podem ainda ser subdivididas em leveduras de alteração *sensu lato* e *sensu stricto* (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). O primeiro grupo engloba todas as espécies capazes de alterar as características organolépticas do vinho, independentemente da sua resistência aos processos tecnológicos de estabilização e aos conservantes químicos utilizados na

indústria; o último, refere-se às leveduras que apresentam mecanismos de resistência consideráveis a condições ambientais de “stress”, tornando possível a deterioração de vinhos produzidos segundo as regras de higiene adequadas. A sua actividade está associada a enormes perdas económicas para a indústria alimentar, sendo a sua importância crescente, por um lado devido à introdução de novas tecnologias de esterilização como a filtração através de membranas, degradação enzimática e de novos processos de tratamento térmico e por outro lado, à introdução de novos produtos alimentares, nomeadamente, com baixa concentração de conservantes, pontos a consumir, com baixo teor em calorias, ou com grau alcoólico reduzido. No caso dos produtos alimentares de baixo pH, essa importância acentua-se dado que a contaminação de bactérias é de baixo significado sendo as leveduras a flora contaminante de maior peso e responsável pelas perdas económicas mais significativas (Estevinho, 1995).

1.3. Espécies

A identificação de leveduras de alteração nos vinhos tem sido de elevada importância para os enólogos avaliarem os riscos de futuras contaminações (Du Toit e Pretorius, 2000).

As leveduras associadas a mostos e vinhos podem ser esporogéneas ou não esporogéneas (forma imperfeita). As primeiras produzem ascósporos e as segundas não. Dentro do grupo das leveduras esporogéneas existem as que pertencem à classe taxonómica *Ascomycota*, dentro da ordem *Endomycetas* e incluem as famílias *Spermophoraceae* e *Saccharomycetaceae*. As últimas incluem as subfamílias *Schizosaccharomycetoideae*, *Nadsonioideae*, *Lipomyceoidae* e *Saccharomycetoideae* (Delfini e Formica, 2001). A primeira subfamília, contém o género *Schizosaccharomyces*, a segunda engloba os géneros *Hanseniaspora* e *Saccharomycodes*, e a terceira o género *Lypomyces*. A família *Saccharomycetaceae*, inclui os géneros mais importantes em enologia: o género *Saccharomyces* assim como o *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*. A ordem *Saccharomycetales* também inclui uma levedura importante, *Brettanomyces* (forma imperfeita de *Dekkera*) (Delfini e Formica, 2001).

Entre as espécies deteriorantes incluem-se as representantes dos géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodorotula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Saccharomycodes* e *Kluyveromyces* (Pitt e Hocking, 1999; Thomas e Davenport, 1985). Sponholz (1992) descreveu os problemas resultantes da produção de ésteres e formação de véu por *Hansenula*, *Candida* e *Pichia*, embora tenha considerado *Zygosaccharomyces bailii* e *Brettanomyces* ssp. como as mais perigosas. Kunkee e Bisson (1993) definiram 4 grupos de

leveduras de alteração, com base no grau de perigosidade: i) leveduras de fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*), capazes de refermentar os vinhos doces, ii) *Zygosaccharomyces bailii* provoca refermentações no vinho, iii) leveduras de véu (*Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metchnikowia*, *Debaromyces*) e iv) *Brettanomyces* spp. produz 4-etilfenol. A importância de *Z. bailii* e *Brettanomyces* spp. também foi reconhecida por Boulton, *et al.* (1996) e Fugelsang (1997), que descreveram as suas actividades de alteração pormenorizadamente. *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomycodes ludwigii*, apesar de serem leveduras de alteração muito perigosas (Thomas, 1993) são bastante raras, assumindo uma menor importância (Kunkee e Bisson, 1993; Fulgelsang, 1997).

As leveduras da espécie *Dekkera bruxellensis* são a maior causa de contaminação de vinhos tintos em todo o mundo dada a sua capacidade de produção de grandes quantidades de fenóis voláteis (4-etilfenol e 4-etilguaiacol) (Chatonnet, *et al.*, 1997). As leveduras de contaminação predominantes em bebidas com elevado teor alcoólico são também *Saccharomyces* spp., *Zygosaccharomyces bailii* e *Saccharomycodes ludwigii* (Du Toit e Pretorius, 2000). Recentemente, têm sido desenvolvidas técnicas de identificação rápidas e muito sensíveis, maioritariamente com base em PCR, e têm sido aplicadas na detecção de leveduras de contaminação em vinhos, como PCR, AFLP, RT-PCR, FISH, PCR-RFLP e TGGE (Fernández-Espinar, *et al.*, 2006).

Em seguida, descreve-se cada uma das espécies estudadas. Na figura 1.1 apresentam-se as fotografias captadas no laboratório através de um microscópio óptico.

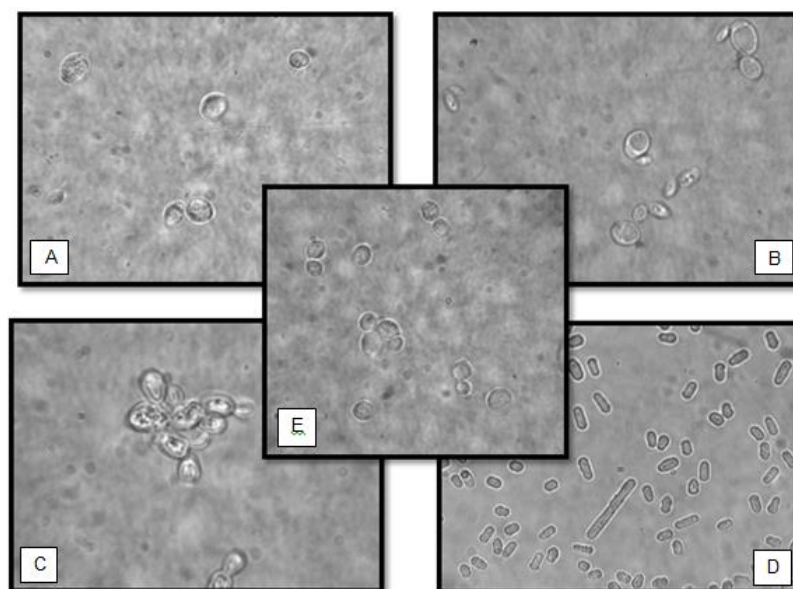


Figura 1.1. Fotografias das leveduras de alteração estudadas em vinho tinto em microscópio óptico. Ampliação 400x. A – *Saccharomycodes ludwigii* ISA1083; B – *Dekkera bruxellensis* ISA 2211; C – *Zygosaccharomyces bailii*; ISA 2270; D – *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190; E – *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000 (captado e editado por Inês Oro)

No que respeita às espécies *D. bruxellensis*, *Z. bailii* e *S. cerevisiae*, consideram-se leveduras de alteração *sensu stricto* e como das mais frequentemente isoladas de vinhos alterados. *S. cerevisiae* parece ser a mais perigosa do que o indicado pelos autores anteriores, uma vez que algumas estirpes, foram isoladas de vinhos brancos secos e parecem mais perigosas do que *Z. bailii*, devido à sua maior tolerância ao ácido sórbico e ao sulfuroso, para valores elevados de etanol (Malfeito-Ferreira *et al.*, 1989). Adicionalmente, algumas estirpes de *S. cerevisiae* estão hoje frequentemente associados à refermentação de vinhos tintos, devido à presença de teores residuais de açúcares fermentescíveis, em vinhos de elevado teor de etanol (> 13% v/v) (Malfeito-Ferreira, 2010). No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo de contaminação apenas quando é encontrado no “sítio errado, na altura errada”, podendo causar refermentações. Esta pode produzir H₂S e odores medicinais, com conotação negativa, devido à formação de fenóis voláteis (vinilfenóis) e devido à descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos libertados por enzimas pectolíticas comerciais (usadas na clarificação do vinho) (Malfeito-Ferreira, 2010).

Zygosaccharomyces bailii

Zygosaccharomyces formalmente conhecida como *Saccharomyces* foi reconhecida pela primeira vez como um género separado em 1984 por Kreger-van Rij na terceira edição de *The Yeast, A taxonomic Study*. Na última edição por Kurtzman & Fell (1998), foram incluídas 8 espécies dentro deste género, das quais apenas quatro foram associadas a mosto e vinho: *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii* e *Zygosaccharomyces florentinus* (Boulton, *et al.*, 1996; Kurtzman e Fell, 1998; Du Toit e Pretorius, 2000). Pertence ao grupo das leveduras com capacidade de fermentação, e é considerada uma levedura perigosa para a estabilidade do vinho. Leveduras de colónias brancas quase hemisféricas de superfície brilhosa, com células largas e elipsóides, ocorrendo isoladas, aos pares ou em curtas cadeias. A formação de tubos de conjugação é típica desta espécie.

Afectam vinhos fortificados ou doces nos quais conseguem crescer e fermentar açúcares mesmo sob elevadas concentrações de etanol e anidrido sulfuroso. Têm também a capacidade de promover a turvação de vinhos engarrafados sob condições de baixa concentração de oxigénio e elevados níveis de conservantes. As células depositam-se no fundo da garrafa, os aglomerados podem ser visíveis em vinhos brancos quando se promove ligeira agitação das garrafas.

A *Zygosaccharomyces* é osmofílica, ou seja, tem a capacidade de crescer em altas concentrações de açúcar e fermentar completamente o mosto de uva. Apresenta

capacidade de crescimento na presença de ácidos fracos utilizados como conservantes, como o sórbico, o benzóico, acético e propiónico, bem como em ambientes com SO_2 (Pitt e Hocking, 1999). Possui uma elevada tolerância ao etanol (< 15 %), mas baixa tolerância a pH ácido (> 2,0), sendo assim, uma levedura difícil de inativar (Thomas e Davenport, 1985) que pode induzir a refermentações do vinho. Esta levedura pode levar a um aumento dos ácidos acético e succínico, a um decréscimo do ácido L-málico, provocando uma redução na acidez total e uma alteração na concentração de ésteres (Du Toit e Pretorius, 2000). A presença de leveduras do género *Zygosaccharomyces* constitui um indicador de futuros problemas de alteração dos vinhos e mostos concentrados (refermentações e turvações) e permite considerar as uvas podres como um dos principais veículos de entrada de leveduras de alteração de vinhos nas adegas. As espécies de *Zygosaccharomyces* fermentam e assimilam relativamente poucos açúcares (Kurtzman e Fell, 1998). A espécie *Z. bailii* é frequentemente relacionada à deterioração de alimentos, causando grandes prejuízos na indústria alimentar. A sua elevada tolerância aos conservantes, em particular aos ácidos fracos (benzóico, sórbico, acético e anidrido sulfuroso), em ambientes de pH relativamente baixo e ricos em açúcares, permite-lhe competir de forma vantajosa com outros microrganismos (Thomas e Davenport, 1985; Fleet, 1992; Déak & Beuchat, 2008).

Algumas das características de *Z. bailii*, aparentemente indesejáveis do ponto de vista da conservação de alimentos, poderão ser exploradas para fins benéficos. É o caso da capacidade de consumo de ácido acético que pode ser utilizada para remover este ácido de vinhos de elevada acidez volátil e permitir a recuperação, pelo menos em parte, de vinhos de reduzido valor comercial.

Schizosaccharomyces pombe

Schizosaccharomyces pombe está associada a alterações no vinho, quando cresce dentro da garrafa, provocando um sedimento no fundo da mesma (Du Toit e Pretorius, 2000; Kunkee e Bisson, 1993; Fugelsang, 1997). Apresentam colónias pequenas de bordos lisos, circulares, brancas e brilhantes. As suas células quando maduras possuem formato elipsóide e algumas vezes aparecem cicatrizes. Caracterizam-se pela multiplicação

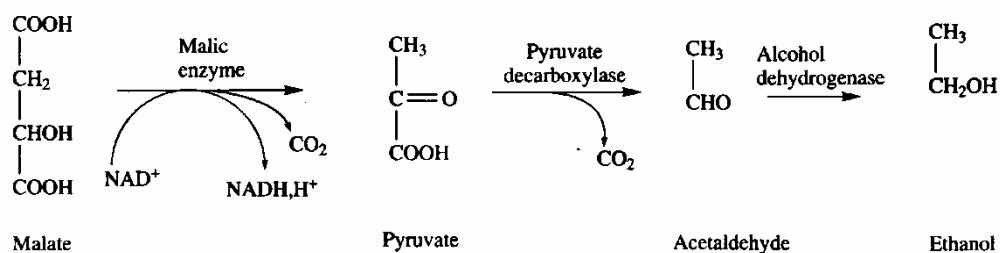


Figura 1.2. Decomposição do ácido málico por leveduras durante a fermentação maloláctica (adaptado de Ribéreau-Gayon, *et. al.*(2006))

vegetativa por fissão lateral e por formarem ascos com quatro ascósporos. São xerofílicas, resistentes a maioria dos conservantes de alimentos como o ácido benzóico (Pitt e Hocking, 1999). De células cilíndricas alongadas de dimensões 3 – 5 x 6 – 16 µm, existem como células individuais ou aos pares. A *Schizosaccharomyces* é ascoporogénica ou esporulada pertencente ao género *Saccharomycetaceae*. Reproduz-se vegetativamente por fissão binária formando uma parede no centro da célula. Pode formar uma pseudomicélio, porém não forma um filme à superfície. Tem um elevado poder fermentativo, capaz de produzir 10 a 12,6 % de álcool em anaerobiose e 13 a 15% com ligeira oxigenação (Peynaud e Sudraud, 1962). A *Schizosaccharomyces pombe* tem a capacidade de metabolizar o ácido málico produzindo etanol e CO₂ (Kluyver, 1914) cujo processo se ilustra na figura 1.2.

Dekkera bruxellensis

Apresentam células elipsóides, fermentam dextrinas, produzem ácido acético a partir da glucose e compostos fenólicos, formando alterações aromáticas em refrigerantes, cervejas e vinhos, sintetizados por suas enzimas extracelulares como pectinesterases e proteases (Pitt e Hocking, 1999).

A *Brettanomyces* é a forma assexuada, e não-esporulada de *Dekkera*. De acordo com Kurtzman e Fell (1998), apenas *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* estão associados a mosto e vinho. Estas leveduras são comumente encontradas na madeira das barricas (Boulton, et al., 1996). Ambas as espécies deste género são capazes de realizar a fermentação alcoólica do mosto, embora muito lentamente. Apesar do crescimento lento em condições enológicas, estas leveduras encontram por vezes condições favoráveis, como é o caso do envelhecimento em barricas quando o teor de nutrientes é limitado, as concentrações de SO₂ são baixas, o pH é elevado e as temperaturas estão geralmente acima de 15 °C (Suárez-Lepe e Iñigo-Leal, 2004; Suárez, et al., 2007). Nestas condições crescem lentamente mas seguramente usam etanol e vestígios de açúcares residuais como fontes de carbono.

As leveduras da espécie *Dekkera bruxellensis*, ou a anamorfa *Brettanomyces bruxellensis*, são responsáveis por sérias perdas económicas na indústria do vinho devido à sua capacidade de produzir etilfenóis (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006) que transmitem defeitos aromáticos descritos como “fenólico”, “estrebaria” ou “suor de cavalo”, causando graves perdas económicas (Suárez, et al., 2007). Durante a última década estas leveduras têm sido cada vez mais estudadas visando compreender a sua habilidade de alteração/contaminação e estabelecer medidas de controlo (Suárez, et al., 2007). O limiar sensorial para os etilfenóis é baixo (Suárez, et al., 2007) e mesmo pequenas quantidades podem reduzir seriamente a qualidade olfactiva dos vinhos; descritores como “fenólico”, “animal”, “suor de cavalo” e “estrebaria” são geralmente usados para descrever a sua

presença (Chatonnet, et al., 1992; Chatonnet, et al., 1993; Rodrigues, et al., 2001). A formação de fenóis voláteis é proporcional ao tamanho da população de *Dekkera/Brettanomyces* (Gerbaux, et al., 2002). A capacidade destas leveduras para produzir etilfenóis é maior quando a concentração de etanol é menor (Suárez, et al., 2007), acima de 15,5% (v/v) são incapazes de produzir estes compostos (Ibeas, et al., 1997). A temperatura durante o envelhecimento em barrica afecta também a produção destes compostos, sendo maior a 18 °C que a 13 °C.

A contaminação ocorre sobretudo durante o armazenamento de vinho, particularmente quando são usadas barricas de carvalhos na produção de vinhos tintos de grande qualidade (geralmente reserva). As barricas de carvalho são particularmente conhecidas por serem um nicho ecológico preferencial das leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* que são agentes de defeitos aromáticos fenólicos descritos como “*medicinal*”, “*estrebaria*”, e “*suor de cavalo*”, devido à produção de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol (Chatonnet, et al., 1995). Por essa razão, deve ser adoptado um cuidado especial na limpeza e desinfecção das barricas. Porém, vinhos tintos jovens em cubas de inox ou engarrafados estão também sujeitos a este tipo de contaminação (Rodrigues, et al., 2001; Renouf, et al., 2007). São capazes de produzir ácido acético em quantidades significativas; dando origem a futuros defeitos organolépticos (Smith, 1998; Freer, 2002; Freer, et al., 2003; Suárez-Lepe & Iñigo-Leal, 2004). Porém, parece depender da quantidade de oxigénio disponível; em condições anaeróbicas a produção é muito pequena (Aguilar-Uscanga, et al., 2003) ou nenhuma (Blondin, et al., 1982; Larue, et al., 1991). É também conhecida a sua produção de tetrahidropirimidinas (aroma descrito como “*chichi de rato*”) e ácidos gordos de cadeia curta (aromas rançosos). São ainda capazes de produzir aminas biogénicas e compostos azotados nocivos à saúde humana (Agnolucci, et al., 2010). Por esta razão esta levedura de alteração pode causar relevantes perdas económicas na indústria vinícola.

Recentemente têm sido desenvolvidos métodos moleculares específicos na identificação de leveduras do género *Brettanomyces*, directamente de vinho (Tessonnière, et al., 2009) e de diferentes castas (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007; Agnolucci, et al., 2007). Além disso, (Agnolucci, et al., 2010) refere ainda que têm sido aplicados diversos métodos moleculares na correlação entre a diversidade genética dos isolados, coleccionados mundialmente, e a sua capacidade de alteração/contaminação, cujos estudos mostraram que: (a) *B. bruxellensis* é a única espécie encontrada em vinhos, (b) está sempre presente nas uvas, (c) que todas as estirpes investigadas até agora têm a capacidade de produzir fenóis voláteis, (d) o nível de produção de fenóis voláteis varia entre estirpes, não está, no entanto, directamente relacionado com a sua diversidade molecular.

O isolamento e caracterização de microrganismos a partir de vinho tem sido normalmente realizado pressupondo que todas as células são capazes de crescer, de se multiplicar e dar origem a colónias (população viável e cultivável, VC) no meio de crescimento. Assim, a densidade da população microbiana viável mas não cultivável (VBNC) não pode ser avaliada. De facto, a passagem ao estado VBNC é uma resposta face a factores de stress como pressão osmótica, temperatura, concentração de oxigénio foi demonstrada células microbianas, particularmente em bactérias. Ainda, segundo Millet & Lonvaud-Funel (2000) e Divol & Lonvaud-Funel (2005) as células VBNC podem recuperar o estado cultivável quando as condições ambientes favoráveis são restabelecidas. A existência deste fenómeno de VNBC em *B. bruxellensis* foi observada por Du Toit, et al. (2005).

Saccharomyces ludwigii

A contaminação mais perigosa nos vinhos é devida a espécies *Saccharomyces ludwigii*, esta levedura resiste a teores elevados de SO₂ livre na ordem de 100 mg/L. É uma levedura fermentadora, assim como a *Zygosaccharomyces bailii*, assim como algumas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, são altamente tolerante às difíceis condições de vinho engarrafado, apresentam, no entanto, menor ocorrência de contaminação. Sendo rara nos mostos em fermentação, a contaminação ocorre, normalmente, a partir de mostos amuados pelo SO₂. Estas contaminações tornam-se visíveis em vinhos engarrafados, dando origem a um sedimento de colónias de leveduras, de cor castanha clara. Invertendo a garrafa, verifica-se que se trata de um depósito leve que cai muito lentamente para o gargalo a garrafa. Esta levedura produz altos níveis de acetaldeído e tem sido isolada como uma massa floculenta (Du Toit e Pretorius, 2000). O combate a esta levedura implica uma cuidada desinfecção dos depósitos de alimentação da linha de engarrafamento, dos filtros, e sobretudo, da enchedora (Cardoso, 2005). A *Saccharomyces ludwigii* encontrada em vinhos engarrafados também é altamente tolerante ao etanol e sorbatos (Du Toit e Pretorius, 2000). Possuem células isoladas, ovaladas e com formato de solas de sapato. Fermentam a glucose, frutose, sacarose e rafinose.

Saccharomyces cerevisiae

É o microrganismo mais importante nas fermentações industriais. *Saccharomyces* é considerada o organismo de alteração apenas se encontrado “no sítio e no momento errado” (como numa garrafa de vinho meio doce) causando refermentações (Fleet, 1992; Boulton, et al., 1996). É uma espécie formadora de véu incluída no grupo de espécies com capacidade para desenvolver uma película à superfície do vinho, também algumas estirpes específicas podem ser incluídas no grupo das fermentadoras. Apresentam colónias brancas de margens circulares e superfície brilhante. As suas células são geralmente esféricas a cilíndricas,

ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias. São fermentadoras de diversos açúcares como glucose, galactose, sacarose, maltose e rafinose. É assim um dos agentes de contaminação de vinhos fortificados, particularmente o vinho Xerez. A *S. cerevisiae* é muitas vezes associada à produção de aromas defeituosos no vinho que durante a fermentação pode produzir aromas de redução ou enxofre, resultado de algum desequilíbrio nutricional dos mostos de uva. Os sistemas de enologia modernos que envolvem remontagens em condições anaeróbicas tendem a desenvolver este problema, ao contrário dos antigos sistemas com arejamento do mosto. Se não for tratado a tempo, estes defeitos podem persistir durante o armazenamento e em vinhos engarrafados. É também capaz de produzir fenóis voláteis (vinilfenóis) concedendo aromas medicinais devido à descarboxilação de ácido hidroxicinâmicos livres libertados por enzimas pectolíticas comerciais usadas para clarificar mostos.

É muito útil na produção de etanol em bebidas fermentadas e dióxido de carbono para levedar o pão, porém é também causa de alterações por refermentação após o engarrafamento de vinho, sumos, concentrados de fruta e conservas. Tem a capacidade de crescer a concentrações relativamente elevadas de etanol e baixo pH. As condições ambientais requeridas para restringir o crescimento de *S. cerevisiae* têm sido amplamente estudadas como factores individuais (Henick-Kling, 1988), no entanto, existe relativamente pouca informação sobre a combinação dos factores na inibição do crescimento (Goswell, 1986).

1.3.1. Ecologia

O ambiente, relacionado com a produção de vinhos, pode ser dividido em duas fases principais: a vinha, que é um ecossistema natural adaptado pelo Homem e fortemente influenciado pelas práticas culturais, e a adega, ambiente produzido pelo Homem, necessário à fermentação, armazenamento e engarrafamento de vinhos.

No entanto, apesar de se poderem isolar várias espécies de leveduras durante o processo produtivo apenas algumas implicam um potencial risco de alteração e/ou deterioração do vinho. Na tabela 1.1 encontram-se referidas as espécies de leveduras de alteração ou deterioração do vinho, bem como os metabolitos e efeitos resultantes da sua actividade neste meio.

Ao longo do processo fermentativo as leveduras são afectadas por diversas condições de *stresse* que afectam sucessivamente a sua viabilidade e capacidade fermentativa. Entre estas condições de *stresse* a mais relevante é a elevada concentração de açúcar e baixo pH em mostos, temperatura e, ao longo da fermentação, a acumulação de etanol.

Tabela 1.1. Leveduras de alteração ou de deterioração do vinho mais representativas

Espécies	Problema/Composto	Ocorrência ^a
Espécie oxidativa		
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Produção de fenóis voláteis em vinhos engarrafados ou a granel. Cheiro a suor de cavalo e a rato; aumento da acidez volátil (etilfenol, piridinas, ácido gordos e ácido acético)	A; E; V
Espécies fermentativas		
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Escurecimento e turvação; aroma acetaldeído; refermentação de vinhos fortificados e engarrafados	V; A; E
<i>Saccharomyces</i> sp. (<i>S. cerevisiae</i>)	Escurecimento e turvação; refermentação; produção de compostos de enxofre (redução)	A; E A; E A; E
<i>Zygosaccharomyces</i> sp. (<i>Z. bailii</i>)		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Sedimentos; escurecimento; refermentação Cheiro; perda de acidez fixa; aumento da acidez volátil	

V – vinificação; A – armazenamento; E – engarrafamento (Fonte: Loureiro e Malfeito-Ferreira, 1998)

O conhecimento profundo dos ecossistemas vinha e adega é essencial para determinar a origem das leveduras de alteração, as vias de contaminação, os pontos críticos de infecção e o seu controlo. No caso das leveduras estudadas, os pontos críticos de contaminação são a adega e a linha de engarrafamento.

Adega

As espécies consideradas como as mais perigosas para os vinhos (*Dekkera/Brettanomyces* spp., *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces ludwigii*), raramente são detectadas em estudo de ecologia microbiana realizado em adegas. Apesar dos trabalhos clássicos de van der Walt e van der Kerken (1958, 1961), em *Brettanomyces* spp., Rankine e Pilone (1973) e Minarik (1983), em *Z. bailii*, e Peynaud e Domercq (1955), em *S. ludwigii*, terem demonstrado a sua presença como contaminantes de adega, a maioria dos resultados da literatura aponta para a sua baixa incidência, pelo que não são consideradas como contaminantes típicas de adega. Com efeito, trabalhos recentes têm demonstrado o isolamento de *Dekkera/Brettanomyces* em uvas na adega, na linha de engarrafamento, armazenagem e de engarrafamento (Connet *et al.*, 2002). As leveduras o

género *Zygosaccharomyces*, em particular *Z. bailii*, são raras em uvas, no entanto, a sua presença é conhecida em adegas que produzem vinhos doces ou espumantes utilizando mosto concentrado ou sulfitado (Rankine e Pilone, 1973, Neradt, 1982, Minarik, 1983, Wium *et al*, 1990). O facto de estas leveduras serem particularmente resistente aos conservantes, nomeadamente *Z. bailii* (Thomas e Davenport, 1985), *Z. bisporus* e *Z. rouxii* (Esch, 1992), significa que a adição de doses subletais de conservantes aumenta a sua resistência e capacidade de proliferação. Assim, são boas práticas fabris, adicionar os conservantes mesmo antes do engarrafamento e limitar a circulação de mosto concentrado a bombas e tubagens específicas.

Os habitats naturais de *Z. bailii* são diversos e incluem frutas e exsudados das árvores de fruto (Thomas e Davenport, 1985). Estas leveduras raramente são encontradas como organismo de contaminação em frutos não processados. A sua presença só é relevante nos produtos processados quando a competição com os fungos e bactérias é reduzida por factores ambientais como conservantes, pH e condições de acondicionamento (Thomas e Davenport, 1985). As matérias-primas, durante o seu transporte para um ambiente industrial, podem providenciar uma fonte inicial de infecção para *Z. bailii* e outras leveduras de contaminação que, rapidamente, se espalham para os produtos em processamento e equipamento

Saccharomyces ludwigii também é uma levedura perigosa, mas considerada pouco frequente em adega. É muito tolerante ao sulfuroso, e pode ser observada em adegas onde se utiliza em excesso este conservante e onde se manipula mosto amuado. Thomas (1993) definiu esta espécie como “o pesadelo dos enólogos” pela dificuldade que existe em erradicá-la de vinhos a granel e do ambiente de adega.

Linha de engarrafamento

Em termos microbiológicos, o engarrafamento de vinhos, fase pós fermentativa, é uma operação altamente crítica, pois, com excepção do enchimento a quente, é a última fonte de contaminação antes do vinho sair para o mercado (Du Toit e Pretorius, 2000). As origens mais comuns de contaminação do produto acabado incluem bicos de enchedora, válvulas de diafragma, manómetros e extremidades cegas de filtros esterilizantes (Beech e Davenport, 1983). O contacto com doses sub-letais de conservantes ou a proximidade de um pasteurizador pode induzir a esporulação das leveduras de *Z. bailii*, dando origem a estirpes mais resistentes (Thomas e Davenport, 1985).

É nos vinhos engarrafados que as leveduras de alteração *sensu stricto* se tornam especialmente perigosas. Dada a diferente susceptibilidade à acção microbiana dos vinhos doces e secos, a acção destas leveduras bem a como adopção de medidas apropriadas de

conservação, apenas pode ser correctamente avaliada tendo em conta o tipo de vinho em questão, como representado na figura 1.4. O grau de contaminação depende do tipo de vinho. Em primeiro lugar, o facto de ser tinto ou branco, determina a percepção por parte dos consumidores da alteração devido a turvações e sedimentos. Desta forma, é corrente considerar brancos como mais susceptíveis à alteração, embora Déak e Reichart (1992) afirmem que os brancos secos são menos susceptíveis, que os tintos secos. A microflora é, em regra, diferente da de outros sítios da adega, prevalecendo as leveduras altamente fermentativas e resistentes a conservantes químicos (Rankine e Pilone, 1973; Donnelly, 1977; Poulard, 1978).

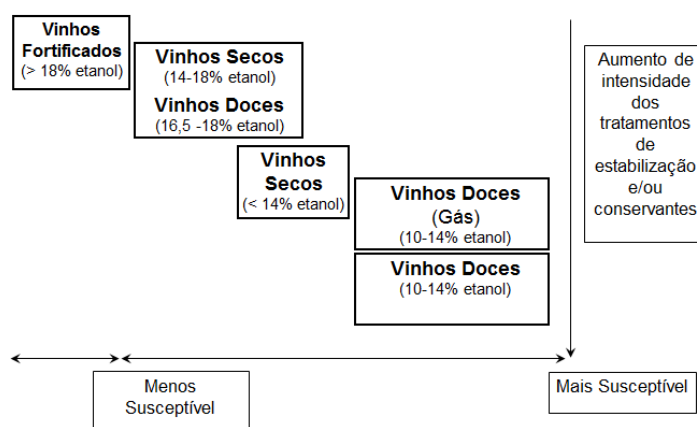


Figura 1.4. Susceptibilidade dos vinhos à colonização de leveduras (adaptado de Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003)).

Assim, nos vinhos doces, sujeitos a maiores cuidados e normalmente com elevada concentração de conservantes, o principal perigo reside na refermentação dos açúcares residuais, enquanto nos vinhos secos reside na formação de turvação e/ou sedimentos granuloso, devido à utilização de substratos respiráveis, tais como ácidos orgânicos (Thomas, 1993) e etanol (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Em vinhos doces, com mosto concentrado, e com elevados teores de sulfuroso e sorbato, a flora é dominada por espécies altamente resistentes aos conservantes e ao baixo a_w , como *Z. bailii*, *S. cerevisiae* e *S. ludwigii* (Rankine e Pilone, 1973; Minarik, 1983; Fleet, 1992). Doses subletais de sulfuroso (Delfini, 1988) e/ou sorbato (Warth, 1986) contribuem para o enriquecimento da flora de adega nestas espécies (pois aumentem as resistências da levedura), em particular, nas linhas de engarrafamento. O mesmo se aplica ao uso de mosto concentrado, fonte de *Zygosaccharomyces* spp. e outras espécies perigosas (Rankine e Pilone, 1973; Thomas e Davenport, 1985; Wium *et al*, 1990). Sendo assim, os factores críticos no engarrafamento são boas condições sanitárias na adega, ausência de oxigénio e uma dosagem correcta de agente antimicrobiano para assegurar um produto estável (Du Toit e Pretorius, 2000).

No que respeita às espécies *D. bruxellensis*, *Z. bailii* e *S. cerevisiae*, consideram-se leveduras de alteração *sensu stricto* e como das mais frequentemente isoladas de vinhos

alterados. *S. cerevisiae* parece ser mais perigosa do que o indicado pelos autores anteriores, uma vez que algumas estirpes, foram isoladas de vinhos brancos secos e parecem mais perigosas do que *Z. bailii*, devido à sua maior tolerância ao ácido sórbico e ao sulfuroso, para valores elevados de etanol (Malfeito-Ferreira, et al., 1989). Adicionalmente, algumas estirpes de *S. cerevisiae* estão hoje frequentemente associadas à refermentação de vinhos tintos, devido à presença de teores residuais de açúcares fermentescíveis em vinhos de elevado teor de etanol (> 13% v/v) (Malfeito-Ferreira, 2010). No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo de contaminação apenas quando é encontrado “no sítio errado e na altura errada”, podendo causar refermentações. Esta pode produzir H₂S e odores medicinais, com conotação negativa, devida à formação de fenóis voláteis (vinilfenóis) e devido à descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos libertados por enzimas pectolíticas comerciais (usadas na clarificação do vinho) (Malfeito-Ferreira, 2010).

Das propriedades intrínsecas dos mostos e vinhos existe uma dualidade entre os factores de *stresse* como o teor de etanol, pH, concentração de CO₂ e °Brix e os nutrientes presentes como açúcares, aminoácidos, vitaminas e concentração de oxigénio que podem contribuir para a robustez do vinho ao ataque microbiano determinando a presença de microrganismos como leveduras e bactérias lácticas e acéticas. Este conceito é essencial para a microbiologia preditiva e definição de critérios microbiológicos.

A manutenção de padrões elevados de higienização, durante as várias etapas de produção de vinho, torna-se essencial para prevenir a sua contaminação. A selecção dos detergentes e desinfectantes, na indústria alimentar, depende de vários factores, como a eficácia de remoção de uma largo espectro de microrganismos, na segurança no seu manuseamento, ou eliminação de resíduos do agente activo, o seu nível de corrosão para as superfícies e o seu efeito na qualidade sensorial do produto (Tristezza *et al*, 2010).

1.4. Conceito de susceptibilidade ao ataque microbiano em vinhos

Na indústria vínica, o objectivo dos enólogos é assegurar que a actividade microbiana contaminante não afecta o produto final e garantir a sua estabilidade ao longo do tempo (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Em enologia, a susceptibilidade de contaminação é afectada por uma série de factores, começando pelo estado sanitário da matéria-prima, o grau de maturação e a composição química das uvas determinando o tipo e o nível de interações microbiológicas. No entanto, as boas práticas de higiene em todos os processos de vinificação bem como na estabilização e engarrafamento é determinante na estabilidade dos vinhos produzidos.

Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003) sugerem que o conceito de susceptibilidade pode ser estudado pré-estabelecendo condições experimentais de resistência de um vinho a um agente de alteração conhecido. Segundo os mesmos, a escolha das espécies com diferentes

capacidades de alteração permitiria obter uma série de resultados para classificar o conceito de susceptibilidade. Muitos foram os autores que estudaram este tema propondo várias hipóteses. Thomas (1983), num trabalho experimental, inoculou 80 estirpes conhecidas em vinhos e obteve uma relação entre os microrganismos usados e a sua capacidade de alteração. No entanto, nada concluiu sobre a susceptibilidade dos vinhos com a sua composição química. Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003) sugerem um modelo que relaciona a susceptibilidade a alguns agentes de alteração como os teores de etanol e açúcar residual. No entanto, tendo em conta o seu carácter redutor, tentaram-se modelos matemáticos que relacionassem a susceptibilidade do vinho com o seu teor alcoólico, pH, oxigénio e níveis de conservantes (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Este esforço verificou-se infrutífero uma vez que a susceptibilidade de um vinho à contaminação tem contornos bastantes diferentes mesmo para vinhos em condições químicas semelhantes.

Em vinificação, a actividade das leveduras é essencial na fermentação, onde existe um elevado número de espécies, bem como de bactérias lácticas e acéticas, pelo que é muito difícil diferenciar a actividade de fermentação da de alteração. Assim compreende-se que seja habitual o despiste destas leveduras durante a fermentação vinária. Durante o armazenamento e engarrafamento, o controlo microbiológico de leveduras de alteração, é prática corrente (Malfeito-Ferreira, 2010).

Níveis aceitáveis de leveduras em vinhos

O Office International de la Vigne e du Vin (OIV) não define níveis máximos de microrganismos em vinhos. A única condição é que o vinho deve ser límpido, o que equivale a possui no máximo $10^4 - 10^5$ UFC/mL (em brancos) para microrganismos que produzem sedimentos finos e menos de $10^2 - 10^3$ UFC/mL, para os que produzem sedimentos floculentos.

1.5. Alteração do vinho por fenóis voláteis

Os fenóis voláteis são um grupo especial de compostos fenólicos com influência no aroma dos vinhos. Os principais fenóis voláteis presentes nos vinhos são: 4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol, 4-etilfenol e 4-etilguaiacol. Os vinilfenóis (4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol) estão presentes em quantidades variáveis nos vinhos brancos e apenas em baixas quantidades nos vinhos tintos. Os etilfenóis (4-etilguaiacol e 4-etilfenol) não se encontram presentes nos vinhos brancos mas encontram-se em concentrações, por vezes elevadas, nos vinhos tintos. Os vinhos rosés apresentam teores em vinil e etilfenóis intermédios (Chatonnet, et al., 1995).

O aumento da exigência dos consumidores também alargou a gama de defeitos ou diminuiu a tolerância em relação a aspectos que não eram, anteriormente, considerados sendo estes maioritariamente devidos a leveduras (e. g. ligeira turvação em vinhos engarrafados, “suor de cavalo”, acetato de etilo). O melhor exemplo deste aumento de importância das leveduras, na alteração de vinhos é ilustrado pelos géneros *Brettanomyces/Dekkera* spp. Um exemplo paradigmático desta situação ocorre na indústria dos vinhos, com a produção de 4-etilfenol por parte destas. Nos vinhos tintos, só se considera a existência de alteração, quando o teor de 4-etilfenol é superior a cerca de 620 µg/L (Chatonnet *et al.*, 1992, 1993). Para níveis inferiores a 400 µg/L, este composto pode contribuir favoravelmente para a complexidade do vinho, através de notas de especiarias, couro ou caça, apreciadas por muitos consumidores. Acima de 620 µg/L os vinhos são claramente penalizados por alguns consumidores, embora continuem a merecer as preferências de muitos outros.

O 4-vilfenol é o composto responsável pelo defeito que confere, nos vinhos brancos, os aromas fenólico e medicinal, sendo a sua presença sempre indesejável. Os aromas conferidos pelo 4-vinilguaiacol podem ter uma conotação positiva (especiaria, floral) ou negativa (fenólico, cravinho) (Chatonnet, *et al.*, 1995). Reduzidos teores de fenóis voláteis contribuem para a complexidade. Acima dos limites de preferência depreciam gravemente os vinhos (tabela

Tabela 1.2. Limites de detecção e preferências dos fenóis voláteis no vinho

	Limites de Detecção (µg/L)	Limites de Preferência (µg/L)
4-etil-guaiacol	140	150
4-etil-fenol	600	650
4-etil-fenol + 4-etil-guaiacol (1:10)	370	426

O 4-etilfenol pode ser usado como indicador químico ou sensorial na detecção de *Dekkera/Brettanomyces* spp. (Boulton, *et al.*, 1996). Para alguns autores mesmo uma pequena quantidade de 4-etilfenol é motivo de rejeição do vinho, mas para outros é visto como uma parte integrante do carácter do vinho tinto, conferindo-lhe complexidade (Loureiro, 1996) ou contribuindo para a tipicidade de alguns vinhos (Dubois, 1994). Os resultados de Chatonnet, *et al* (1990) mostraram que a presença desta molécula é sempre indesejável; se este composto pode efectivamente conferir uma maior complexidade e uma forte intensidade aromática a certos vinhos tintos, é sempre em detrimento da finura, do frutado e da tipicidade varietal. No caso do 4-etilguaiacol, o aumento do carácter fenólico é

mais lento e compensado pela evolução de aromas tipo especiaria e madeira, mais favoravelmente percebidos. A finura e o frutado do vinho não são diminuídos.

A produção de 4-etilfenol por *D. bruxellensis* depende de vários factores como uma fonte de carbono, glucose ou frutose (Barata, et al., 2008), teor de etanol e temperatura (Dias, et al., 2003). Além disso, a taxa de produção está interligada à taxa de crescimento, sendo observados maiores níveis de 4-etilfenol quando atingido maiores valores de biomassa. (Fugelsang e Zoecklein, 2003) encontrou também uma correlação entre a produção de 4-etilfenol e a exposição celular cumulativa, mas o maior aumento da produção de 4-etilfenol foi observado durante a fase de declínio celular, não confirmado por Barata, et al. (2008)

Algumas práticas enológicas podem contribuir para o incremento dos teores de fenóis voláteis em mostos e vinhos. Segundo (Baumes, et al., 1986) a maceração contribui para a extracção de precursores (cumárico e ferrúlico), enquanto Dzhakhua et al., (1978) cit in (Dubois, 1994) acrescentam que a maceração de engaços aumenta o teor em vinilfenóis. Também a aplicação de enzimas pectolíticas pode contribuir, segundo (Dugeley, et al., 1993), para o aumento de ácido cinâmicos através da actividade cinamoíl-esterásica das enzimas comerciais. Estes ácidos podem, durante a fermentação alcoólica, originar vinilfenóis por descarboxilação efectuada por *Saccharomyces cerevisiae*. O estágio em barricas de carvalho também contribui para o aumento do teor de fenóis voláteis (Boidron, et al., 1988; Chatonnet, et al., 1990; Chatonnet, et al., 1993) demonstraram nos seus trabalhos que o aumento do teor de etilfenóis durante o estágio em barricas era tanto maior quanto maior fosse a idade das barricas. No entanto, estes autores demonstraram que os aumentos significativos de etilfenóis são devido à actividade de leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* (Chatonnet, et al., 1995). Estas leveduras produzem fenóis voláteis, utilizando como precursores os ácidos hidroxicinâmicos (ácido p-cumárico e ferrúlico), que são componentes naturais da uva e do vinho (Heresztyn, 1986; Chatonnet, et al., 1995). Chatonnet, et al. (1995) estudaram o mecanismo de síntese de fenóis voláteis, seguindo a evolução do número de células e das concentrações de fenóis voláteis presentes numa cultura de *Brettanomyces intermedia*, à qual se adicionou 100 mg/L de ácido p-cumárico, concluindo que a transformação dos ácidos hidroxicinâmicos nos correspondentes compostos fenólicos, envolve uma sequência de reacções catalisadas por duas enzimas. Numa primeira reacção, a enzima cinamato descarboxilase (CD), descarboxila os ácidos p-cumárico e ferrúlico, resultando na produção de 4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol, respectivamente. Após esta etapa, é induzida a enzima vinilfenol reductase (VFR), que reduz o 4-vinilfenol e o 4-vinilguaiacol a 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, respectivamente (Chatonnet, et al., 1995) (figura 1.5).

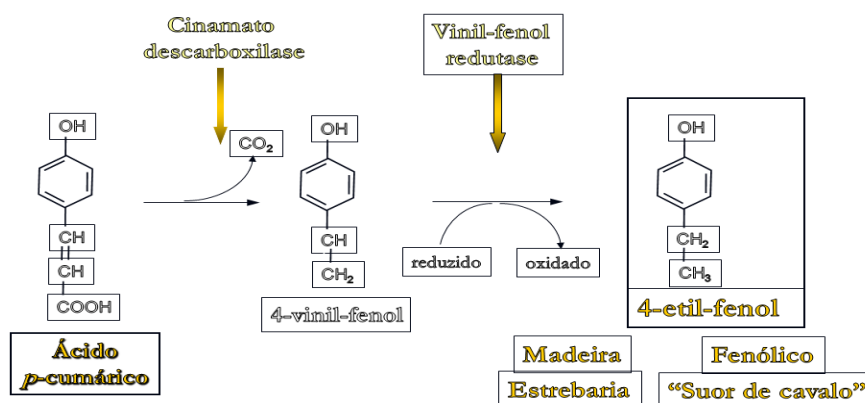


Figura 1.5. Ácidos hidroxicinâmicos metabolizados por *Dekkera/Brettanomyces* spp. (reações de biossíntese dos fenóis voláteis).

1.6. Controlo microbiológico

Os enólogos têm cada vez mais ao dispor medidas para prevenir as actividades de alteração dos microrganismos. O uso de agentes inibitórios ou letais, como conservantes químicos ou tratamentos térmicos. Ainda outras operações que não estão directamente associadas à morte dos microrganismos mas promovem a remoção de parte ou a sua totalidade, como a clarificação, colagem ou filtração. No entanto, todas estas operações devem ser acompanhadas de adequados procedimentos de higienização de forma a prevenir subseqüentes contaminações. Os locais que representam maior risco de contaminação são os equipamentos na adega, tubagens e válvulas, no caso da *Dekkera/Brettanomyces* o nicho ecológico mais importante são barricas de carvalho, dada a natureza porosa da madeira, é mais difícil de higienizar.

Uma boa medida de controlo é a gestão eficiente das fermentações. Uma boa gestão da fermentação alcoólica passar pela sulfitação de mostos e vinhos, inoculação de estirpes eficientes, promovendo a competitividade com a flora indígena e nutrição das leveduras, de forma a evitar amuos de fermentação. O início rápido da FML, para vinhos de risco, inoculação de bactérias. Estabilização eficaz no final a FML com eliminação precoce das borras grossas, adição de SO₂ em quantidade suficiente.

Os pontos críticos de contaminação e/ou controlo são a utilização de uvas podres, final da fermentação maloláctica, estágio, lote final antes do engarrafamento. E ainda vinhos provenientes de outros produtores, rapas do interior de barricas lavadas, água de lavagem de barricas, sempre que a prova do vinho sugira um aroma anormal. O controlo microbiológico inclui a observação microscópica, detecção de actividades celulares recorrendo a meios de cultura específicos e diferenciais (DBDM) métodos moleculares: sondas de PNA, PCR-RFLP da região 5.8 S-ITS do rRNA, tipagem de estirpes por digestão do mtDNA.



Figura 1.6. Esquema dos factores de promoção e controlo das alterações microbianas dos vinhos

1.7. Efeito factores conjuntos

Vários são os factores que condicionam a deterioração de um alimento ou bebida por microrganismos, em geral e por leveduras em particular. Entre estes factores destacam-se: disponibilidade de nutrientes, pH e capacidade tampão, actividade da água (a_w), temperatura, teores de conservantes, teor em açúcar residual, teor alcoólico e o nível de contaminação inicial (Malfeito-Ferreira, et al., 1989).

1.7.1. Etanol

Ao longo de uma fermentação alcoólica o etanol, produto principal da actividade fermentativa da *S. cerevisiae*, pode acumular-se no meio extracelular, exercendo a partir de determinada concentração efeitos negativos sobre a actividade metabólica das leveduras. A tolerância ao etanol depende da espécie e das condições em que decorre a fermentação, nomeadamente, temperatura, composição do meio e presença de O_2 (van Uden, 1989). Segundo Malfeito-Ferreira (2010), a levedura *S. cerevisiae* é menos sensível ao álcool que *D. bruxellensis*, sendo que a concentração máxima para o crescimento da primeira de 17% (v/v) e na segunda 15% (v/v). Assim, o álcool por si só contribui para um menor crescimento de leveduras com maior sensibilidade ao mesmo. Em relação à espécie *Z. bailii* a tolerância ao álcool tem sido observada em casos de refermentações de vinhos (Thomas & Davenport, 1985). Em 1959, Peynaud e Domerq verificaram que *Z. bailii* causou um terço das refermentações acidentas em vinhos com menos de 12% (v/v) de etanol e que era um grande problema nas regiões de vinhos brancos (Thomas & Davenport, 1985).

Se tivermos em conta o facto de que vinhos com mais de 13,5% álcool, possuem normalmente baixos níveis de 4-EF, e que *Dekkera/Brettanomyces* raramente foi isolada de vinho com mais de 14% podemos perceber um pouco o efeito que o álcool exerce sobre a viabilidade desta levedura. Barata, *et al.* verificou que a maioria das estirpes possui uma MIC (concentração mínima inibitória) de 15% de etanol, o que revela bem a capacidade destas leveduras, após um processo de adaptação, tolerarem quantidades elevadas de álcool.

1.7.2. Dióxido de enxofre

O principal conservante usado na indústria é o anidrido sulfuroso (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). Vulgarmente conhecido como anidrido sulfuroso – SO₂, constitui o conservante usado por excelência, de mostos e vinhos, considerado há muito conhecido como um agente microbiano bastante eficaz (Hammond e Carr, 1976). Apesar dos inconvenientes de natureza toxicológica e organoléptica nenhum outro conservante apresenta per se, nem em tão elevado grau, o conjunto de propriedades antioxidante, antidiastásica, antisséptica para além da acção dissolvente que intensifica a maceração, conduzindo a uma maior extracção dos constituintes das partes sólidas do cacho – engaço e películas (Cardoso, 2005).

O composto existe em solução sob três formas. Macris e Markakis (1974) mostraram que o H₂SO₃, conhecido como SO₂ “activo” ou molecular, é responsável pela actividade antimicrobiana. A eficácia da actividade antimicrobiana contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomycodes ludwigii* a baixo pH foi explicada pela descoberta de que das três formas moleculares do sulfito apenas o SO₂ entra nestes organismos (Stratford e Rose, 1986; Stratford, *et al.*, 1987). Quando o SO₂ é adicionado ao vinho, é estabelecido um equilíbrio entre as várias formas moleculares deste composto. Uma parte reage com os compostos de carbonilo dando origem ao bissulfito de carbonilo designado sulfuroso combinado a outra parte é designada SO₂ livre. A maior parte deste SO₂ livre está presente na forma bissulfito HSO₃. A proporção das três formas depende do valor de pH. Para valores de pH abaixo de 1,8, o sulfuroso existe predominantemente como SO₂ livre e para valores acima de 7,2 apresenta-se como SO₃²⁻, para valores intermédios existe como uma proporção variável de ião bissulfito (HSO₃⁻) (King, *et al.*, 1981). A acção antimicrobiana é tanto maior quanto menor for o valor de pH (Wedzicha, 1984), o que explica porque este composto é particularmente eficaz eficácia contra leveduras que, geralmente, crescem melhor no intervalo de pH entre 3,0 – 5,0 (Rose, 1987). Em vinhos, a forma “activa” de SO₂ (H₂SO₃) representa, de acordo com o pH, entre 0,8 e 3,5% do sulfuroso livre. Assim, para ter 1 mg/L de SO₂ activo, são necessárias algumas dezenas de mg/L de sulfuroso livre e umas centenas de SO₂ total.

Na prática, o teor de sulfuroso total é controlado por lei, sendo que muitos lutam para reduzir o nível autorizado. O papel do enólogo é obter um vinho com um teor de SO₂ activo

satisfatório para o menor teor possível de SO₂ total. A fracção combinada resulta da agregação com os constituintes para os quais tem afinidade, como: açúcares e seus derivados - arabinose, glucose, xilose, 5-cetofrutose e ácidos 2-ceto-glucónico e 2,5-diceto-glucónico; etanal (também designado por acetaldeído ou aldeído acético); ácidos cetónicos: ácido pirúvico e ácido α-cetoglutarico (pode diminuir-se a formação destes compostos pela adição de tiamina – 0,5 mg/L) moléculas dicarboniladas: glioxal, metilglioxal e hidroxipropanedial e compostos fenólicos. Concentrações mais elevadas em uvas atacadas de podridão cinzenta; ácido glucónico, galacturónico, glioxílico, oxalacético; antocianas (descoloração dos mostos após sulfitação).

Na prática enológica, os níveis de sulfuroso livre recomendados para o armazenamento do vinho tinto varia de 20 a 30 mg/L (Ribéreau-Gayon, et al., 2006), com condições de pH 3,5, 13% (v/v) de etanol e uma temperatura de 19 °C de armazenamento (Usseglio-Tomasset e Bosia, 1984).

As espécies de leveduras diferem consideravelmente na capacidade de resistência à acção antimicrobiana do sulfito. Considerado o mais comum inibidor de crescimento das leveduras *Dekkera/Brettanomyces* (Suárez, et al., 2007). As estirpes de *S. cerevisiae* que têm sido reconhecidas geralmente como resistentes. Uma levedura que tem sido descrita como a mais resistente é a *Zygosaccharomyces bailii* (Thomas e Davenport, 1985; Warth, 1985). Em 1987, Stratford, et al. atribuiu a maior resistência da *S. ludwigii* quando comparada com a *S. cerevisiae* à capacidade de produção de grandes quantidades de acetaldeído, e à pouca acumulação celular de SO₂.

O anidrido sulfuroso pode ser adicionado como solução aquosa de metabissulfito de potássio (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). (Barata, et al., 2008) mostrou que *S. cerevisiae* é consideravelmente mais tolerante ao metabissulfito de potássio que *D. bruxellensis*. Conterno, et al. (2006) apresentou resultados de tolerância de 35 estirpes de *D. bruxellensis* capazes de crescer num intervalo de 10 a 50 mg/L de anidrido sulfuroso (SO₂), o que se correlaciona com os resultados de Barata, et al. (2008), como se sabe o metabissulfito de potássio tem um rendimento de cerca de 57% de sulfito (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). O intervalo de 100 – 150 mg/L de metabissulfito de potássio corresponde a cerca de 33 – 50 mg/L de anidrido sulfuroso livre que a 3,50 pH é equivalente a 0,66 – 1,0 mg/L da forma molecular activa (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Este intervalo está em concordância com o valor estimado no ensaio em adega de Barata, et al. (2008) que sugere que o valor médio de 1 mg/L de anidrido sulfuroso molecular para prevenir o aparecimento e crescimento de *D. bruxellensis* em barricas para envelhecimento de vinho.

Não obstante, existem ainda questões não claramente compreendidas, o efeito real dos conservativos na inactivação da população de *D. bruxellensis* em vinhos. No entanto, as

informações sobre seu efeito em *D. bruxellensis* inactivação são muitas vezes contraditórias. Esta levedura é maioritariamente recuperada de vinhos não protegidos com anidrido sulfuroso (Heresztyn, 1986) e alguns autores referem a sua sensibilidade/susceptibilidade a valores acima de 30 mg/L (Gerbaux, et al., 2002; Chatonnet, et al., 1992; Chatonnet, et al., 1993). Outros afirmam que deve ser considerada como resistente (van der Walt e van der Kerken, 1961; Gaia, 1987; Ciolfi, 1991) e já foi detectado crescimento sob mais de 30 mg/L de sulfuroso livre (Froudière & Larue, 1989). Esta controvérsia resulta provavelmente da falta de estudos sob situações comparáveis e a variabilidade de comportamento das estirpes. Apesar desta controvérsia, nos vinhos australianos os níveis de sulfuroso livre têm aumentado nos últimos anos provavelmente devido à adopção de medidas rigorosas de controlo de *Dekkera/Brettanomyces* (Godden e Gishen, 2005). Estes autores estabeleceram uma possível ligação entre este facto e a diminuição da concentração média de 4-etilfenol observada durante o período entre 1996-2002. Dias, et al. (2003) mostrou que não há produção de 4-etilfenol na ausência de crescimento da população de *D. bruxellensis*, portanto da sua inactivação resulta a não produção deste fenol.

Estudos sobre a disseminação, acompanhamento e controlo das populações de *D. bruxellensis* mostraram que estas leveduras são normalmente os contaminantes em menor proporção em ambientes de adega (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006). Contudo, são os contaminantes mais comuns em vinhos tintos particularmente quando os vinhos não estão bem protegidos com anidrido sulfuroso (Barata, et al., 2008). Estes autores mostraram que são necessários níveis relativamente elevados deste preservativo para inactivar o crescimento de populações de *D. bruxellensis*. A opção de aumentar o uso de anidrido sulfuroso não está em concordância com as exigências dos consumidores de diminuir os níveis de preservativos em alimentos e bebidas e, portanto, é necessário estudar o efeito de outros factores sobre a actividade das leveduras. (Barata, et al., 2008) caracterizaram vários factores que determinam a produção de fenóis voláteis em condições enológicas, como a influencia de uma fonte de carbono ou teor de etanol (Dias, et al., 2003). No entanto, outros aspectos não foram ainda esclarecidos, particularmente os que dizem respeito à relação entre o crescimento celular e a taxa de produção de 4-etilfenol em vinhos tintos. A compreensão desta relação poderá vir a ser particularmente importante uma vez que, em adega, a erradicação total destas leveduras ainda não é garantida.

As leveduras mais resistentes ao etanol são *S. cerevisiae* e as mais resistentes ao SO₂ são *Z. bailii*. Este facto parece reflectir diferentes mecanismos de tolerância e demonstra a importância do estudo da combinação de efeitos dos agentes antimicrobianos. É notável que as estirpes mais resistentes a esta combinação de efeitos é *S. cerevisiae*, que salienta/enfatiza a influência do etanol sobre a sobrevivência/resistência da levedura (Malfeito-Ferreira, et al., 1989).

1.8. Metodologia de superfícies de resposta

Tradicionalmente, o estudo microbiológico tem sido conduzido pela monitorização da influência de um factor de cada vez na resposta experimental, modificando apenas um factor enquanto os outros se mantem a nível constante. A maior desvantagem é que não inclui os efeitos interactivos entre as variáveis estudadas, como consequência esta técnica não retracta completamente os efeitos. Tornou-se assim necessário o desenvolvimento de métodos mais precisos e abrangentes.

A metodologia das superfícies de resposta é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas dedicadas à avaliação da relação existente entre um grupo de factores experimentais de controlo e as respostas de medição, de acordo com uma ou mais variáveis seleccionadas de modo a optimizar a resposta e obter um modelo o mais realístico possível (Montgomery, 1996). Para tal, são usadas funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema em estudo e, consequentemente, analisar as condições experimentais até conseguir a sua optimização (Bezerra, et al., 2008).

A maior vantagem desta metodologia é diminuir o número de ensaios experimentais necessários para avaliar os múltiplos parâmetros e as suas interacções, explorando várias condições operatórias de um processo com a mesma precisão da abordagem clássica.

1.9. Enquadramento e objectivos do trabalho

As leveduras de alteração representam uma ameaça de grande significado na indústria vinícola, causando perdas de elevado custo. Constitui um problema e uma preocupação para os técnicos da indústria dos vinhos, pois está associado à depreciação da qualidade com conseqüentes perdas económicas. Torna-se necessário compreender as condições ideais de crescimentos das leveduras, os factores mais relevantes e a sua interacção.

O presente trabalho teve, como objectivo principal, contribuir para o estudo das condições de crescimento de várias espécies de leveduras de contaminação comumente encontradas em vinhos, a sua resistência ou susceptibilidade aos factores etanol e anidrido sulfuroso e sua interacção, e a glucose como fonte de carbono.

Para tal, executaram-se ensaios de crescimento em diversos tipos de vinho – com concentrações diferentes de glucose, etanol e anidrido sulfuroso livre – de modo a avaliar o comportamento das estirpes *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270, *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190, *Saccharomyces ludwigii* ISA 1083, *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 e *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000 através do método de superfícies de resposta durante 60 dias, a 25°C. O comportamento destas estirpes foi comparado com o de um fermento utilizado em enologia (*Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000). Os estudos foram dirigidos de modo a aproximar os vinhos estudados às condições observadas regularmente em vinhos comerciais, desde vinhos secos a vinhos com teores residuais de açúcares o que corresponde a um teor de glucose entre 2 – 10 g/L; o teor alcoólico variou entre 10 – 15% (v/v) de etanol e anidrido sulfuroso livre correspondente a valores entre 0 – 40 mg/L.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Neste estudo foi utilizado um conjunto de estirpes pertencentes à colecção de leveduras do Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia que se encontram descritas na tabela 2.1. As espécies foram escolhidas devido ao seu potencial de alteração de vinhos.

Tabela 2.1. Estirpes em estudo, respectiva espécie e origem.

Estirpe ISA ^a	Espécie	Fonte/Origem
1000	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inóculo comercial (Fermivin [®]) ^b , IGC ^c 4072
1083	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Sedimento em vinho licoroso branco
1190	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CECT ^d 1375
2270	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Uvas com podridão ácida
2211	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Vinho tinto (Douro, Portugal)

^a ISA (Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal).

^b Fermivin[®] (DSM, Delft, Netherlands).

^c IGC (Gulbenkian Institute of Science, Oeiras, Portugal).

^d CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valência, Espanha).

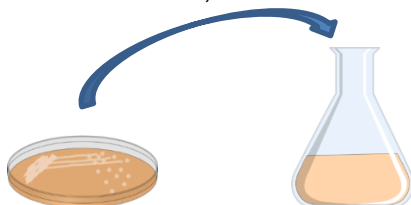
As leveduras foram mantidas em tubos de meio sólido inclinado GYP (20 g/L de glucose (Copam, Loures, Portugal), 5 g/L de extracto de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 10 g/L peptona (Biokar) e 20 g/L agar (Iberagar, Coima, Portugal), a pH 6,0), a 4-5 °C, sendo renovadas mensalmente, por repicagem. No caso das leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* adicionou-se 5 g/L de carbonato de cálcio (Merck, Darmstadt, Alemanha) ao meio, de modo a neutralizar o máximo possível o ácido acético produzido, que pode ser tóxico, limitando significativamente a viabilidade das células. O meio foi colocado em tubos de 16 mm (aproximadamente 5 ml por tubo) e esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Após a esterilização os tubos foram imediatamente colocados a 10° de inclinação por forma até à completa solidificação do meio.

2.2. Condições de crescimento

2.2.1. Preparação do Inóculo

Foi preparada uma suspensão concentrada a partir de uma ansada de culturas frescas, aproximadamente, 5 dias de incubação em câmara termostaticada a 25 °C em meio GYP (Anexo I). A suspensão foi distribuída por balões de Erlenmeyer esterilizados de 250 mL, com 100 mL de meio líquido YNB (Anexo II), de modo a permitir o arejamento adequado da cultura, e mantida em agitador orbital (Gallenkamp) a 120 rpm, a 25 °C. O crescimento foi seguido ao longo do tempo por turbidimetria a 640 nm (DO_{640nm}) em espectrofotómetro

(Boeco S-20 VIS & S-22 UV/VIS, Alemanha). Uma vez atingida a fase exponencial de crescimento, equivalente a um valor de DO_{640nm} entre 0,3 e 0,5, efectuou-se a inoculação das amostras, pelo mesmo procedimento em todos os ensaios de crescimento, de forma a obter uma concentração inicial entre $10^4 - 10^6$ CFU/ml. Para conhecer o volume de suspensão a adicionar, fizeram-se contagens de células viáveis através do microscópio pelo método de viabilidade com azul-de-metileno, com recurso a um hemocitómetro.



2.2.2. Preparação dos vinhos

Durante este trabalho usou-se um vinho tinto em todos os ensaios experimentais. A sua composição físico-química foi determinada pelos métodos analíticos referidos em 2.4.1., e apresentada na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Composição do vinho base e rectificado

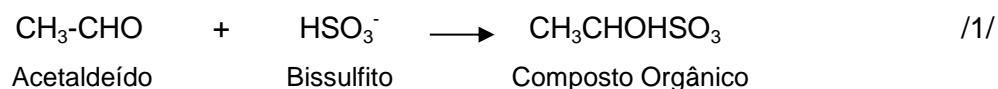
Parâmetro químico	Método	Inicial	Rectificado
Teor alcoólico volumétrico a 20 °C (%)	NP 2143	12,5	16,1
Acidez total em ácido tartárico (g/l)	NP 2139	5,0	5,0
Acidez fixa em ácido tartárico (g/l)	NP 2141	4,2	4,0
Acidez volátil corrigida em ácido acético (g/l)	NP 2140	0,56	0,61
pH	Potenciometria	3,40	3,5
Anidrido sulfuroso livre (mg/l)	NP 2220	32	9
Anidrido sulfuroso total (mg/l)	NP 2220	86	50
Açúcares (g/l)	NP 2223	1,9	1,9
Índice de fenóis totais	NP 2280	58,9	57,6
Intensidade da cor	Glories, 1984	0,753	0,761
Tonalidade da cor	Glories, 1984	0,868	0,909

O meio usado no estudo preliminar em 2.3.1. teve origem no vinho tinto cedido, ao qual se procedeu apenas à neutralização do teor de sulfuroso livre e acerto de pH a 3,5.

Para os ensaios relativos à construção de superfícies de resposta (em 2.3.2.), foi necessário corrigir os teores de glucose, etanol e anidrido sulfuroso livre das 17 amostras. Foi preparado um vinho tinto base, facilitando os ajustes necessários, com teor alcoólico de 16% v/v, pH 3,5 e um teor de anidrido sulfuroso livre igual ou inferior a 10 mg/L. A sua composição é apresentada na tabela 2.2, como vinho rectificado.

Acerto de parâmetros

Primeiramente, corrigiu-se o teor de SO₂ livre combinando o anidrido sulfuroso com uma solução de acetaldeído (Fluka) a um concentração de 2 mg/mL de forma a neutralizar o SO₂ livre (Ribéreau-Gayon, et al., 2006) conforme a seguinte reacção irreversível:



De seguida, elevou-se o teor alcoólico até 16 %(v/v), adicionando etanol a 95 %(v/v) de pureza. O pH de todas as amostras foi acertado a 3,5, com recurso a um potenciómetro (Radiometer), usando uma soluções de NaOH (Merck, Darmstadt, Alemanha) ou HCl a 1 M (Merck), no caso de se pretender aumentar ou diminuir o valor de pH.

A partir deste vinho tinto base, preparam-se as 17 amostras relativas à construção das superfícies de resposta com teores apresentados na matriz factorial (tabela 2.7), em que cada linha representa uma amostra. Para corrigir o teor de álcool de cada amostra usou-se uma solução de ácido tartárico com uma concentração de 5 g/L para diluir o vinho de forma a não alterar a acidez total. A concentração de glucose foi alterada por adição de glucose (Copam) a cada amostra, consoante a matriz factorial já referida. Para o acerto do teor de anidrido sulfuroso livre usaram-se soluções de metabissulfito de potássio (MK) nas concentrações 5,04; 12,60; 20,16 e 25,2 mg/mL consoante o SO₂ livre final de cada amostra, respectivamente, 8, 20, 32 ou 40 mg/mL. Uma vez que também o índice de polifenóis totais foi alterado após a diluição, a correcção deste parâmetro foi conseguida pela adição directa de tanino enológico. Utilizou-se o Tanisouple (Spindal AEB, Viseu, Portugal), um tanino elágico, com uma dose de utilização recomendada entre 5 e 40 g/hL. Todos os acertos realizados encontram-se no Anexo II. No final realizou-se uma esterilização do vinho por filtração, utilizando uma membrana de acetato de celulose de 0.22 µm e 47 mm de diâmetro (Milipore), de forma a retirar qualquer tipo de contaminantes do vinho. A manipulação das amostras foi sempre realizada em câmaras de fluxo contínuo em condições de assepsia de modo a garantir a não contaminação das mesmas.

2.3. Avaliação do crescimento

2.3.1. Estudo preliminar em vinho a 12,5% de etanol

Tendo em vista o principal objectivo deste trabalho, o estudo do comportamento de diferentes espécies de leveduras em condições “standard” a fim de avaliar o seu potencial de alteração, revelou-se importante fazer um estudo preliminar de um dos principais factores de stress microbiano: o etanol. Como tal, procedeu-se a um ensaio de crescimento em vinho com 12,5% de etanol, de forma a observar o comportamento de cada espécie.

Foram estudadas as estirpes *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii* e *Dekkera bruxellensis*. Para este fim usou-se o vinho tinto base filtrado apresentado em 2.2.2., após correcções de pH a 3,5, teor alcoólico a 12,5 % (v/v) e remoção do sulfuroso livre. Cada amostra de 100 mL foi acondicionada num balão de Erlenmeyer de 100 mL rolhado com batoques de borracha perfurados por uma agulha hipodérmica com algodão, de modo a minimizar o contacto com o ar e perdas por evaporação, mas permitindo a libertação de gás, eventualmente, produzido. Durante o ensaio experimental, os balões foram mantidos em câmara termostatizada a 25 °C, sem agitação.

Inoculação

O inóculo descrito em 2.2.1 foi centrifugado (Centrifuge 5415 D) durante 7 minutos a 4 000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se o sedimento concentrado num volume conhecido de Solução de Ringer, de modo a retirar todo meio YNB e lavar as células através de uma segunda centrifugação. Tendo sempre em atenção a homogeneidade da suspensão, de forma a introduzir em todas as amostras a mesma concentração inicial de células, no volume (1 mL) de inóculo adicionado (Figura). Todos os procedimentos após a filtração das amostras foram realizados em condições de assepsia, em câmaras de fluxo, de modo a impedir ou minimizar a contaminação.

O crescimento microbiano foi acompanhado por contagem de unidade formadoras de colónias (UFC/mL) em placas sólidas de GYP, através do método da gota (25 µL), espalhamento com um volume de 100 µL, ambos em duplicado. As células metabolicamente activas foram estimadas pelo método de contagem de células viáveis com azul-de-metileno (Merck) num hemocitómetro.

2.3.2. Ensaio experimental para a obtenção de superfícies de resposta

Para este fim, foi preparado um conjunto de 17 amostras de 100 mL de vinho tinto filtrado, para cada estirpe, com pH inicial de 3,5 e composição variável de glucose, etanol e SO₂ livre, como descrito na Tabela 2.7. Matriz factorial, combinações dos factores Glucose, Etanol e Sulfuroso Livre da matriz factorial, onde cada linha corresponde a uma amostra. Tal como no ensaio experimental descrito em 2.3.1. os balões de Erlenmeyer de 100 mL com rolhas de borracha, foram mantidos em câmara termostatizada a 25 °C, sem agitação orbital, durante 60 dias. As rolhas foram, igualmente, perfuradas por agulhas hipodérmicas com algodão.

A inoculação foi realizada pelo procedimento já descrito em 2.3.1.

O desenvolvimento celular foi acompanhado por contagem de unidades formadoras de colónias (UFC/mL) pelo método da gota (20 μ L) ou espalhamento (100 μ L) em placas de meio GYP, em duplicado. No final do ensaio, filtrou-se o volume total das amostras, nalguns casos, foi necessário recorrer à filtração de volume variável conhecido durante o ensaio experimental. Todas as operações foram conduzidas em ambiente de assepsia em câmaras de fluxo contínuo. No caso particular da *Dekkera bruxellensis*, a viabilidade das células foi acompanhada pelo estudo dos fenóis voláteis produzidos, nomeadamente o 4-etilfenol.

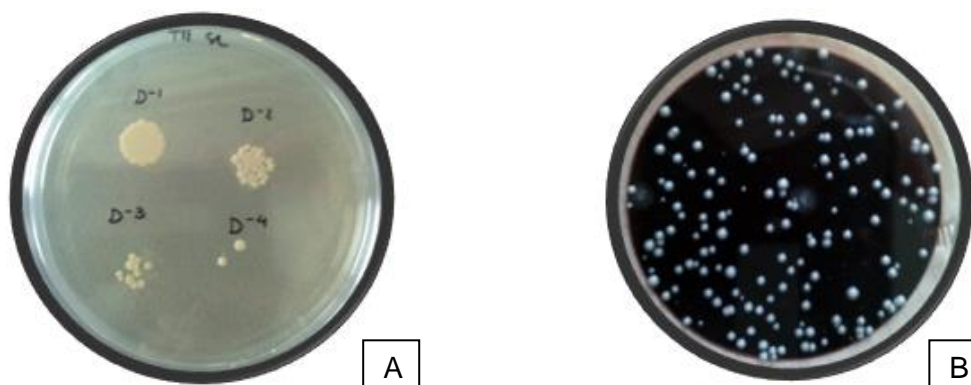


Figura 2.1. Contagem das unidades formadoras de colónias. A – Método da gota com várias diluições na mesma placa. B – Filtração de 10 mL de vinho tinto

2.4. Comparação de resistência das estirpes

Após a obtenção dos modelos e das suas equações polinomiais foram calculadas as quantidades necessárias dos factores mais significativos para reduzir biomassa celular de cada estirpe a 1 log UFC/mL. Foram elaborados quadros comparativos da resistência das estirpes ao longo do tempo.

2.5. Teste

Utilizaram-se, ainda, 2 amostras de vinhos tintos e 2 amostras de vinhos brancos, das regiões do Vinho Verde, Alentejo e Bairrada, para confrontar com os resultados obtidos a fim de validar o modelo ajustado. A caracterização dos vinhos e sua composição apresentam-se nas tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente.

Tabela 2.3. Caracterização das amostras de vinho usadas para validação

Amostras	Castas	Ano	Região
A	Aragonez e Syrah	2010	Alentejo
B	Cabernet Sauvignon e Castelão da Bairrada	2004	Bairrada
C	Antão Vaz, Viogner, Verdelho, Sauvignon Blanc	2010	Alentejo
D	Trajadura, Alvarinho, Loureiro	2009	Vinhos Verdes

Não foram corrigidos quaisquer parâmetros, excepto a neutralização do SO₂ livre e o ajustamento do pH 3,5, de forma a avaliar o desenvolvimento celular em vinhos nas suas condições elementares. Foi acompanhado o desenvolvimento celular através de contagens de colónias, expressas em Log UFC/mL.

Tabela 2.4. Composição dos vinhos-teste (validação)

Parâmetro químico	Método	A	B	C	D
Teor alcoólico volumétrico a 20 °C (%)	NP 2143	13,6	15,3	12,6	11,6
Acidez total em ácido tartárico (g/L)	NP 2139	5,0	4,7	5,1	6
Acidez fixa em ácido tartárico (g/L)	NP 2141	4,4	3,8	4,7	5,8
Acidez volátil corrigida em ácido acético (g/L)	NP 2140	0,52	0,72	0,33	0,16
pH	Potenciometria	3,50	3,50	3,50	3,50
Anidrido sulfuroso livre (mg/L)	NP 2220	9	10	9	7
Anidrido sulfuroso total (mg/L)	NP 2220	93	78	105	114
Açúcares (g/L)	NP 2223	2,7	1,8	2,2	6
Índice de fenóis totais	NP 2280	55,9	56,8	8,89	7,8
Intensidade da cor	Glories,1984	9,54	12,9	1,19	0,96
Tonalidade da cor	Glories, 1984	0,834	1,127	-	-
Brilho (%)		54,15	29,89	-	-

2.6. Análises químicas

2.6.1. Análises dos parâmetros enológicos convencionais

Foram realizadas diversas análises químicas aos vinhos no laboratório Ferreira Lapa. Os resultados encontram-se discriminados na Tabela 2.2. Composição do vinho base e rectificado, segundo as Normas Portuguesas correspondentes a cada método adoptado.

As medições relativas à cor dos vinhos foram executadas segundo os procedimentos de Glories (1984) e Glories (1984 a), usando um espectrofotómetro para medir a absorvância a 420, 520 e 620 nm usando uma célula de quartzo com 1 mm de comprimento. Foram registadas a intensidade e tonalidade da cor.

2.6.2. Análise por GC-FID - Quantificação de 4-etilfenol.

A extracção do 4-etilfenol consiste na separação da fase orgânica que é recolhida para análise por cromatografia de gás, efectuada conforme o protocolo descrito por Rodrigues *et al.* (2001). As extracções foram realizadas em 6 momentos diferentes: 5, 15,

20, 30, 45 e 60 dias após a inoculação. Resumidamente, os fenóis voláteis foram extraídos com uma solução de éter-hexano (1:1) (éter dimetílico, Merck e hexano, Merck) de 50 mL da amostra diluída (1:2) depois de ajustar a pH 8 com NaOH (Merck). Para a quantificação foi adicionado 0,5 mL de uma solução de 3,4-dimetilfenol (100 ppm diluído a 75% de etanol) como padrão interno, e 0,05 mL de uma solução de 4-etilfenol para facilitar a sua identificação num GC-FID (Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama) Varian CP-3800 com COMBIPAL equipado com uma coluna Restek Stabilwax[®] (30 m; 0,25 mm ID; 0,25 µm espessura da membrana/película).

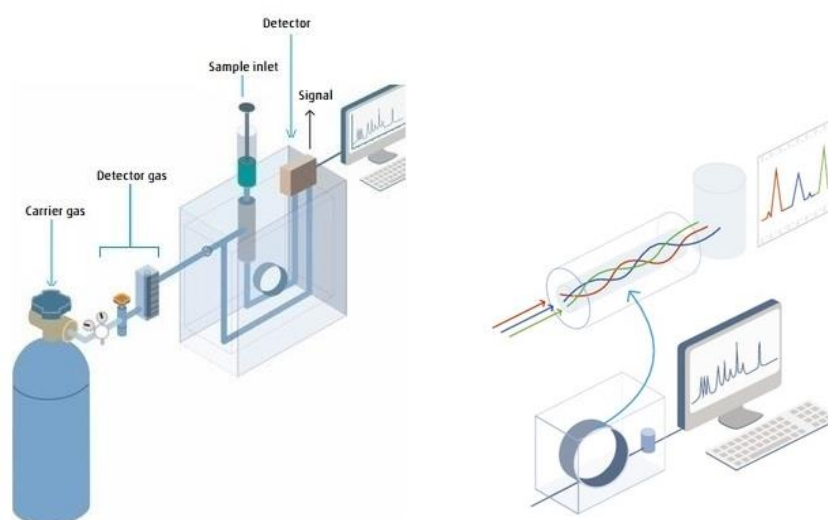


Figura 2.2. Representação esquemática dos componentes que constituem uma análise de GC.

Ao cromatógrafo está acoplado um computador equipado com o software Galaxie GC Worldstation WS para Windows (Varian) que permite a obtenção dos dados. O cromatógrafo foi calibrado com soluções padrão de concentrações conhecidas e as amostras injectadas em duplicado. As condições do programa foram as seguintes: temperatura inicial de 50 °C, elevando a temperatura a 10 °C min⁻¹, a segunda temperatura de 215 °C, com segundo aumento a 20 °C min⁻¹ e temperatura final 250 °C durante 10 min. As temperaturas do injetor e detector foram, respectivamente, 230 e 250 °C. Foi usado hidrogénio (H₂) como gás de arrastamento a 76,5 kPa (2,0 mL/min). O volume de amostra injectado foi 2 µL.

2.6.3. Análise por HPLC - Quantificação de açúcares, ácidos e álcoois

A análise por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) foi realizada em 4 momentos do processo experimental, antes da inoculação correspondente ao dia 0, ao fim de 15, 30 e 60 dias, momento em que se considerou o fim do procedimento experimental. Por HPLC foram quantificados os compostos considerados importantes para avaliar o tipo de metabolismo das leveduras e a sua evolução durante o processo de crescimento celular.

Os constituintes analisados foram: ácido cítrico, ácido tartárico, glucose, frutose, ácido succínico, ácido láctico, glicerol, ácido acético e o etanol.



Figura 2.3. Representação esquemática dos componentes que constituem uma análise por HPLC.

Para esta análise foi retirado 1 mL de cada amostra para tubos de Eppendorf, mantidos a -18°C . Após descongelação das amostras, foram removidas as células e proteínas provenientes do crescimento celular, após separação por centrifugação a 1200 rpm durante 10 minutos (Centrifuge 5415 D). O líquido translúcido obtido foi filtrado com seringas (Inserpor) e filtros de celulose de 0,2, 13 mm (Firilabo) e transferido para vials rigorosamente identificados. Foram injectados 20 μL do filtrado, em duplicado, para quantificação e integração, num sistema constituído por uma bomba isocrática (Waters 501), uma coluna com separação por troca iónica e exclusão por tamanho (8,0 x 300 mm, SH 1011, Shodex) mantida a 60°C e um detector de índice de refração (Waters 486, Waters Corporation, Milford, MA). Como fase móvel utilizou-se uma solução de H_2SO_4 (2,5 mM), a 0,6 mL/min de caudal, preparada com água MiliQ e previamente filtrada em membrana de 0,22 μm (Milipore) e desgaseificada em bomba de vácuo e ultra-sons (P-Selecta).

Tabela 2.5. Parâmetros de calibração para quantificação de açúcares, ácidos e álcoois

Composto	TR (minutos)	Equação	r^2
Ácido Cítrico	10,36	$y = 2 \times 10^{-5}x + 1.846$	1
Ácido Tartárico	10,78	$y = 2 \times 10^{-5}x + 2.571$	0.99
Glucose	11,57	$y = 2 \times 10^{-5}x + 2.728$	0.999
Ácido málico	11,82	$y = 2 \times 10^{-5}x + 2.636$	1
Frutose	12,28	$y = 2 \times 10^{-5}x + 2.726$	1
Ácido Succínico	13,85	$y = 3 \times 10^{-5}x + 1.754$	1
Ácido Láctico	14,87	$y = 4 \times 10^{-5}x + 3.549$	1
Glicerol	15,36	$y = 3 \times 10^{-5}x + 12.02$	1
Ácido Acético	16,87	$y = 3 \times 10^{-5}x + 1.754$	1
Etanol	22,74	$y = 7 \times 10^{-5}x + 123.1$	1

TR tempo de retenção; r^2 coeficiente de determinação

Os resultados foram processados utilizando o software Empower Pro para Windows que permitiu efectuar de forma imediata a integração das áreas dos picos cromatográficos. Esta quantificação foi efectuada com base na construção de rectas de calibração (Anexo VII), para cada um dos referidos compostos, obtidas a partir de soluções padrão com concentrações conhecidas.

2.7. Metodologia das superfícies de resposta

Para avaliar o padrão de crescimento das leveduras de alteração em vinho foi usada a metodologia de superfícies de resposta. Com base em informações colhidas de leituras bibliográficas e a partir de ensaios prévios, foram definidas como variáveis independentes os teores de glucose (g/L), etanol (% v/v) e anidrido sulfuroso livre (mg/L). O efeito dos três factores sobre o crescimento das leveduras foi estudado usando um delineamento composto central rotacional (DCCR) com três repetições no centro, de forma a proporcionar uma estimativa da falta de ajustamento do modelo estatístico linear obtido (Montgomery, 1996).

O delineamento foi gerado através do software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) e os níveis das variáveis ambientais foram estabelecidos numa gama de condições representativas dos vinhos presentes no mercado.

O delineamento composto central rotacional completo, baseia-se em três princípios de um delineamento experimental ideal (Meilgaard, et al., 1991):

1. num delineamento factorial completo 2^n , onde n é o número de variáveis testadas,
2. n_0 , números de pontos centrais (com todos os factores no nível 0) e,
3. pontos-estrela no eixo de cada variável experimental a uma distância a $\pm 1,68$ do centro do delineamento (i.e. pontos com uma distância axial de $\pm \alpha$ dos pontos centrais, para um factor, enquanto os restantes dois factores se situam no nível 0).

Nota: Estes pontos-estrela possibilitam considerar a rotatividade do delineamento, permitindo extrair a mesma quantidade de informação (e consequentemente fazer predições com a mesma precisão) em todas as direcções da superfície ajustada (Myers & Montgomery, 2002).

O número total de pontos do delineamento foram $N = 2^n + 2n + n_0$, neste caso 17 tratamentos. As relações entre os níveis codificados e reais são apresentadas na tabela 2.6 cujos valores resultam da aplicação das seguintes equações.

$$(\pm w) = \frac{\frac{(MAX-MIN)}{2}}{\alpha} \quad (0) = MIN + \frac{MAX-MIN}{2} \quad (\pm 1) = (0) \pm w$$

O delineamento experimental completo foi realizado de forma independente para cada levedura e monitorizado ao longo de 60 dias.

Tabela 2.6. Relação entre valores reais e codificados dos factores ambientais usados no delineamento DCCR

Variáveis Independentes	Níveis				
	Estrela	Valor mínimo	Centro	Valor máximo	Estrela
	-1,68	-1	0	1	1,68
Glucose (X_1) (g/L)	2	3,6	6	8,4	10
Etanol (X_2) (%)	12,5	11	10	14	15
SO ₂ livre (X_3) (mg/L)	0	8	20	32	40

A variável dependente seleccionada foi a culturabilidade (UFC/mL). As variáveis independentes escolhidas foram a glucose, X_1 (g/L); etanol, X_2 (% v/v); sulfuroso livre, X_3 (mg/L). A matriz factorial resultante da combinação das variáveis independentes para a construção do modelo final é apresentada na tabela 2.7.

Tabela 2.7. Matriz factorial, combinações dos factores Glucose, Etanol e Sulfuroso Livre

Amostra	Variáveis codificadas			Variáveis originais			
	X_1	X_2	X_3	Glucose (g/L)	Etanol (%)	SO ₂ livre (g/L)	
Delineamento factorial	1	-1	-1	-1	3,6	11,0	8
	2	1	-1	-1	8,4	11,0	8
	3	-1	1	-1	3,6	14,0	8
	4	1	1	-1	8,4	14,0	8
	5	-1	-1	1	3,6	11,0	32
	6	1	-1	1	8,4	11,0	32
	7	-1	1	1	3,6	14,0	32
	8	1	1	1	8,4	14,0	32
Pontos axiais ou estrela	9	-1,68	0	0	2,0	12,5	20
	10	1,68	0	0	10	12,5	20
	11	0	-1,68	0	6	10	20
	12	0	1,68	0	6	15	20
	13	0	0	-1,68	6	12,5	0
	14	0	0	1,68	6	12,5	40
Repetições do Ponto Central	15	0	0	0	6	12,5	20
	16	0	0	0	6	12,5	20
	17	0	0	0	6	12,5	20

Os dados de contagem de colónias foram ajustados a equações polinomiais de segundo grau através de uma regressão linear múltipla, segundo o critério dos mínimos quadrados, para descrever os efeitos lineares e quadráticos e das interações das variáveis.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_3 X_3 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon$$

\uparrow
 Efeito
linear

\uparrow
 Efeito
quadrático

\uparrow
 Efeito da
interação

onde y é o parâmetro modelado (crescimento, em UFC/mL), β_0 é termo de intercepção, β_i são os coeficientes a serem estimados durante o ajustamento das superfícies de resposta (β_1 é o coeficiente para o efeito linear de X_1 , β_{11} para o efeito quadrático de X_1 , β_{12} para a interação entre variáveis X_1 e X_2 , e assim por diante) e ε é o termo para erro. X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis – os factores ambientais glucose (G), etanol (E) e sulfuroso livre (S), respectivamente.

3.1. Método estatístico

Os resultados dos 17 ensaios do delineamento composto centra e rotacional foram analisados usando o software *Statistica 7.0* (Statsoft, EUA). Foram analisados os efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) dos factores, assim como o efeito das suas interações lineares pela análise de variância (ANOVA).

Os gráficos tridimensionais e os respectivos gráficos de contorno foram obtidos com base no efeito nos níveis de dois parâmetros e as suas interações na culturabilidade das leveduras mantendo o terceiro parâmetro nas suas concentrações óptimas.

Aos modelos ajustados aplicou-se empiricamente o algoritmo de exclusão sequencial de modo a simplificar o modelo até obter um submodelo estatisticamente mais significativo. Este procedimento visa excluir sequencialmente uma variável, a partir de um modelo inicial completo com vários preditores, cujo teste à estimativa do coeficiente β_i dá menor significância estatística com base no *p-value*. Reajustando sequencialmente o submodelo originado e, repetindo o procedimento até não existirem variáveis candidatas a sair. A qualidade do ajustamento do submodelo final foi avaliada pelos coeficientes de determinação (R^2) e o ajustado (R^2_a) (Weisberg, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leveduras de alteração *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* foram escolhidas neste trabalho experimental por serem as leveduras de alteração que aparecem mais frequentemente em vinho após a sua fermentação (ex. no engarrafamento) e que podem causar impacto sensorial e organoléptico.

4.1. Avaliação do crescimento em vinho a 12,5% de etanol

Dada a importância do teor alcoólico do vinho na inibição do crescimento da população microbiana tornou-se essencial realizar um estudo preliminar inoculando as estirpes em monocultura em vinho tinto com 12,5% de etanol, correspondente ao nível 0 - ponto central - usado no delineamento experimental da matriz factorial. Este estudo teve como objectivo a avaliação da susceptibilidade/resistência individual de cada uma das leveduras de alteração *Z. bailii* ISA 2270, *D. bruxellensis* ISA 2211, *S. pombe* ISA 1190 e *S. ludwigii* ISA 1083 através observação da culturabilidade e viabilidade por métodos de contagem de colónias em placa e observação microscópica com azul-de-metileno.

Os resultados deste ensaio estão representados na figura 3.1. A partir da observação dos gráficos foi possível denotar a grande similaridade de comportamento das estirpes face ao etanol ao longo de todo o ensaio. Após um período inicial de adaptação ao meio, todas as estirpes recuperaram ou mantiveram a população microbiana, com tendência a cessar o seu crescimento ao fim de 24 – 48h. Após o quarto dia todas elas apresentaram o mesmo comportamento de diminuição da população. Em todos os casos a população aumenta de 10^4 UFC/mL, umas de forma mais acentuada que outras durante os dois primeiros dias de inoculação, sendo que o maior crescimento corresponde à *S. ludwigii* (até próximo de 10^6) começando então a diminuir até atingir os valores da população inicial de 10^4 UFC/mL no quarto dia. Ao fim do quinto dia todas as leveduras apresentam o mesmo número de unidades formadoras de colónias (10^3 UFC/mL) diminuindo ligeiramente até ao décimo quinto dia correspondente ao final do ensaio.

Apesar de todas as estirpes apresentarem o mesmo comportamento perante o etanol podemos distingui-las em termos de resistência/susceptibilidade. Assim da mais susceptível para a mais resistente temos *D. bruxellensis* ISA 2211, *Z. bailii* ISA 2270, *S. pombe* ISA 1190 e *S. ludwigii* ISA 1083.

Pode-se considerar o primeiro dia como período de adaptação ao etanol, verifica-se que a estirpe mais resistente foi a *S. ludwigii*, que apresentou uma população 10^6 , que

apesar da diminuição de uma potência ao fim de 24h, manteve-se estável até ao terceiro dia. A *D. bruxellensis* foi considerada a estirpe mais susceptível, no entanto, apresentou uma rápida adaptação ao fim de 24h. A *S. pombe* apresentou um comportamento bastante similar à *Z. bailii*, tendo contudo uma maior resistência, verificando-se um crescimento populacional entre as 24 e 48h.

No entanto, ao comparar a viabilidade celular foi possível observar maior número de células viáveis desde o início do ensaio com tendência a aumentar até ao quinto dia a partir do qual se tornaram incontáveis nas diluições usadas.

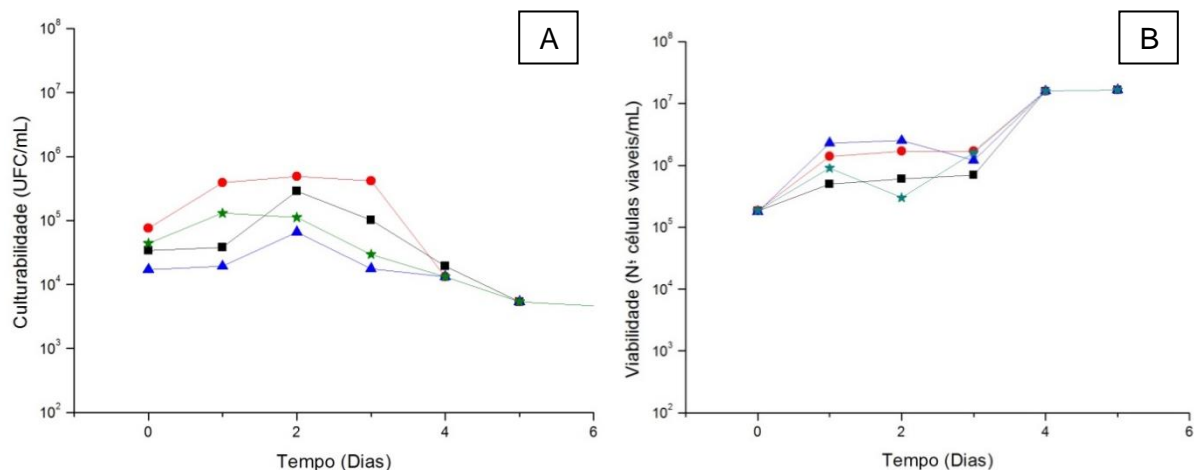


Figura 4.1. Cultivabilidade (A) e viabilidade (B) de leveduras de alteração em vinho a 12,5 % de etanol (—■—) *S. pombe*, (—●—) *S. ludwigii*, (—▲—) *B. bruxellensis*, (—★—) *Z. bailii*

Estes resultados revelaram que o etanol não inibe o crescimento das estirpes de leveduras após 48h de adaptação a 12,5 % de etanol. Demonstrando um decréscimo muito acentuado do número de colónias ao fim de 4 dias, até 10³ UFC/mL correspondente à adaptação ao meio e voltando à população inicial 10⁴ UFC/mL a qual se manteve até ao final de 15 dias de ensaio. Foi possível visualizar um grande aumento do número de células viáveis, de 10⁵ células/mL iniciais até 10⁷ células viáveis/mL ao fim de 5 dias, a partir do qual não se apresentam resultados por ter sido impossível proceder à contagem das células nas diluições adoptadas.

4.2. Avaliação do crescimento em vinhos com diferentes teores de glucose, etanol e sulfuroso livre através da metodologia de superfícies de resposta

Os efeitos dos teores de glucose, etanol e sulfuroso livre sobre o crescimento das leveduras estudadas foram obtidos pelo método das superfícies de resposta, através de um delineamento composto central e rotacional pelo RSM. Para a análise dos dados foram utilizados os resultados da contagem de colónias dos ensaios de cada estirpe, apresentados em logaritmo de base 10 dos valores médios de UFC/mL, que se podem encontrar no Anexo III. Por serem muito extensos não foram incluídos neste capítulo de resultados. No software

Statistica 7.0 foram calculados os efeitos lineares e quadráticos dos factores estudados assim como as suas interacções lineares e a significância de cada um deles. Para cada conjunto de dados experimentais, foi gerado um modelo a partir do qual se construíram superfícies de resposta a 4-dimensões. O algoritmo de pesquisa sequencial utilizado não garante a identificação do “melhor submodelo”. Apenas identifica de forma que não é computacionalmente muito pesada, submodelos que se presume serem “bons”. Devem ser usados com bom senso e cruzados com outras considerações (como por exemplo, o custo ou dificuldade de obtenção de cada variável, ou o papel que a teoria relativa ao problema em questão reserva a cada preditor). A análise estatística ANOVA foi realizada ao nível de significância $\alpha = 0,05$, isto é a um nível de confiança de 95%. Usando como referência o valor de prova fixado 0,05 acima do qual o efeito do factor analisado não é significativo.

Os efeitos lineares dos factores permitem fazer uma relação directa entre o sinal do parâmetro associado e o resultado sobre a variável resposta. Podem ser interpretados como o aumento ou diminuição (dependendo do sinal positivo ou negativo) da resposta quando o factor altera em uma unidade. Se positivo, o efeito poderá ser coadjuvante ao crescimento, se pelo contrário for negativo, o factor exerce um efeito inibitório sobre a variável resposta. Quanto aos efeitos quadráticos, dão origem a superfícies que poderão ser côncavas se o parâmetro for positivo ou convexas quando o parâmetro é negativo.

O desempenho do modelo foi verificado pela estimação dos coeficientes de regressão. O coeficiente de determinação, R^2 indica-nos a percentagem de variabilidade da resposta que pode ser explicada pelo modelo (varia entre 0 e 1). Os valores relativamente elevados e próximos do R^2 e o coeficiente de determinação R^2_a indicam um bom ajustamento do modelo aos modelos experimentais de crescimento das leveduras

A determinação da viabilidade das estirpes, nos diferentes ensaios, foi acompanhada pela avaliação dos metabolitos produzidos ou consumidos no final do processo. Para se obter uma base correcta de comparação foi realizada uma análise aos compostos que inicialmente compunham os ensaios. Os resultados desta análise, por serem muito extensos, encontram-se no Anexo IX.

4.2.1. *Zygosaccharomyces bailii*

Os resultados experimentais dos 17 ensaios do Delineamento Composto Central e Rotacional foram analisados estatisticamente através do programa Statistica 7.0. e são apresentados na tabela 8.1 do Anexo III. Os efeitos lineares e quadráticos dos factores, assim como as suas interacções lineares, sobre o crescimento celular são apresentados na tabela 4.1. As superfícies a 4 dimensões, descritas por equações polinomiais de segundo

grau em função dos factores com efeitos significativos sobre a resposta, ou os factores cujo efeito não pode ser ignorado apesar de não ser estatisticamente significativo, foram ajustadas aos dados experimentais em diferentes momentos de incubação. Os elevados valores de R^2 e R^2_a indicam um bom ajustamento dos modelos aos resultados experimentais (tabela 4.2).

Como foram obtidas superfícies de resposta a 4 dimensões em função dos três factores estudados, as superfícies tiveram de ser representadas em dois gráficos tridimensionais em função de dois factores mantendo o terceiro constante e com um valor central (sulfuroso livre, 20 mg/L; glucose 6 g/L; etanol, 12,5 % v/v). Os gráficos das superfícies de resposta do crescimento celular nos dias 2 e 30 em função do anidrido sulfuroso livre, etanol e glucose são representados nas figuras 4.2 e 4.3, respectivamente.

O sulfuroso livre foi o único factor com efeito linear negativo no dia 2, e mantendo-se como factor inibidor ao longo do ensaio, responsável pela morte imediata acima de 32 mg/L (tabela 7.1, Anexo III) como ilustram as curvaturas na figura 4.2 e ainda no Anexo X. Uma resposta similar foi observada no dia 5 (Anexo X). No dia 30, o sulfuroso livre, apesar de não ser um factor estatisticamente significativo (p -value > 0,05), exerce um efeito quadrático positivo importante como é possível observar pela superfície côncava na figura 4.3. É de notar que o teor de sulfuroso livre analisado no dia 60 de incubação é tão diminuto que o seu efeito pode ser considerado nulo. O efeito inibitório do sulfuroso observado no dia 30, deve-se apenas à inibição nos anteriores dias de incubação (tabela 8.1, Anexo III). Ainda estatisticamente significativo, ao nível de significância $\alpha = 0,05$, é o efeito da interacção linear etanol e sulfuroso nos dias 2, 15 e 30 de incubação. O etanol exerceu um efeito linear negativo a partir do dia 15 até ao final do ensaio estatisticamente significativo (p -value = 0). A glucose não exerceu um efeito linear estatisticamente significativo ao longo de todo o ensaio como se pode confirmar nas figuras 4.2 e 4.3.

De uma forma geral, os ensaios com uma exposição de sulfuroso livre acima de 20 mg/L, apresentaram morte imediata das colónias sem posterior recuperação de crescimento. A 20 mg/L, ou menos, houve uma diminuição gradual de colónias ao longo do ensaio chegando a valores de Log UFC/mL inferiores a 1 (tabela 8.1, Anexo III). O efeito do etanol sobre o crescimento foi ligeiramente inibitório actuando de forma gradual. Mesmo à concentração máxima (15% v/v) só ao final de 20 dias de incubação se consegue a morte celular (Log UFC/mL <1,00) como se pode observar na tabela 8.1 do Anexo III. No que respeita ao efeito da glucose, foi observado um efeito quadrático negativo somente nos primeiros momentos de incubação (dias 2 e 5) como apresentado na tabela 4.1. Analisando a tabela 8.1 do Anexo III, a glucose parece ter um efeito coadjuvante sobre o crescimento quando se mantêm os teores de etanol e sulfuroso a um nível central, atenuando os efeitos

letais destes compostos. Quando comparamos os ensaios correspondentes aos níveis mínimo e máximo de glucose, observa-se um retardamento na morte celular no ensaio 10 que ocorre apenas ao 20º dia relativamente ao 9 com log UFC 1 logo ao 3º dia de incubação.

Entre os três factores estudados o sulfuroso mostrou ser o efeito mais significativo na inactivação celular imediata, o que foi matematicamente confirmado pelo efeito linear negativo na culturabilidade da população observado no segundo dia de inoculação. Os modelos polinomiais de segunda ordem, estabelecidos pelo delineamento composto central e rotacional, foram bem ajustados aos dados experimentais (tabela 4.2). A equação obtida para o dia 60 apresenta um R^2 mais baixo, o que significa que o modelo apenas explica 76% dos dados experimentais. Tendo em consideração que os coeficientes de determinação dos modelos são razoavelmente elevados, podemos dizer que os modelos são muito bons isto é que há uma rejeição clara da hipótese de o modelo ser inútil. Ao longo do tempo o R^2 diminui, segundo este coeficiente, 98% do modelo dia 2 é explicado pelos regressores presentes, isto é, apenas 2% da variabilidade de y (crescimento populacional) não pode ser explicado ou descrito pela variabilidade de x (factores).

Tabela 4.1. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para cada factor do modelo para *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270, expresso em log UFC/mL

Factor	Dia 2		Dia 5		Dia 15		Dia 30		Dia 60	
	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p
Glucose g/L (L)	0,12	0,42	0,34	0,19	0,35	0,20	-0,03	0,93 ^b	0,36	0,37
Glucose g/L (Q)	-0,48	0,01 ^a	-0,91	0,01 ^a	-0,54	0,08	-0,14	0,69 ^b	-0,29	0,59 ^b
Etanol % (L)	0,68	0,00 ^a	0,07	0,82 ^b	-1,32	0,00 ^a	-1,98	0,00 ^a	-1,53	0,00 ^a
Etanol % (Q)	-0,44	0,02 ^a	-0,37	0,20	0,68	0,03 ^a	1,54	0,00 ^a	1,45	0,02 ^a
SO ₂ mg/L (L)	-2,34	0,00 ^a	-2,72	0,00 ^a	-1,68	0,00 ^a	-1,17	0,00 ^a	-0,18	0,71 ^b
SO ₂ mg/L (Q)	-1,22	0,00 ^a	-0,77	0,01 ^a	0,07	0,83 ^b	0,35	0,20	-0,29	0,59 ^b
Glucose x Etanol	0,04	0,86 ^b	0,00	0,99 ^b	-0,03	0,94 ^b	0,05	0,90 ^b	-0,14	0,82 ^b
Glucose x SO ₂	0,06	0,80 ^b	-0,02	0,96 ^b	-0,18	0,66 ^b	0,05	0,90 ^b	-0,62	0,24
Etanol x SO ₂	0,95	0,00 ^a	0,08	0,85 ^b	1,29	0,00 ^a	1,46	0,00 ^a	0,71	0,18

^a coeficientes significativos (valor p ≤ 0,05); ^b factores eliminados do modelo final

Tabela 4.2. Equações ajustadas pelo RSM para *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270

Tempo	Equação Modelo	R ²	R _a
Dia 2	Log UFC = -8,633 + 0,535[G] - 0,042[G] ² + 2,158[E] - 0,099[E] ² - 0,264[S] - 0,004[S] ² + 0,027[E][S]	0,98	0,96
Dia 5	Log UFC = 1,696 + 0,924[G] - 0,071[G] ² + 0,001[E] ² - 0,020[S] - 0,002[S] ²	0,92	0,88
Dia 15	Log UFC = 39,867 + 0,642[G] - 0,047[G] ² - 5,004[E] + 0,153[E] ² - 0,528[S] + 0,037[E][S]	0,91	0,85
Dia 30	Log UFC = 75,616 - 10,216[E] + 0,349[E] ² - 0,615[S] + 0,001[S] ² + 0,041[E][S]	0,93	0,90
Dia 60	Log UFC = 57,869 + 0,348[G] - 8,815[E] + 0,327[E] ² - 0,014[G][S] + 0,010[E][S]	0,76	0,64

[G] = glucose (g/L); [E] = etanol (% v/v); [S] = sulfuroso livre (mg/L)

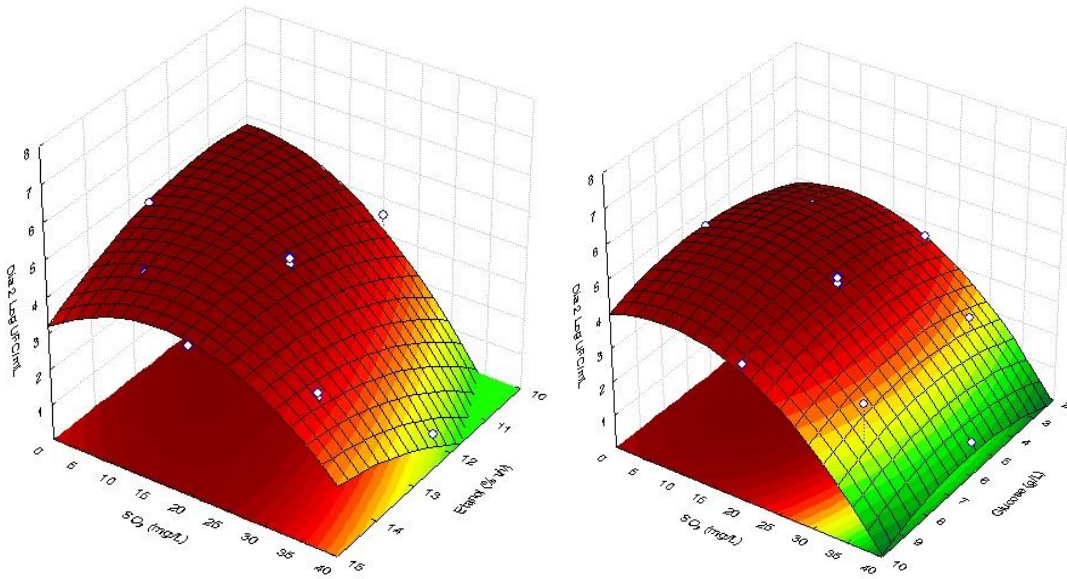


Figura 4.2. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *Z. bailii* ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.

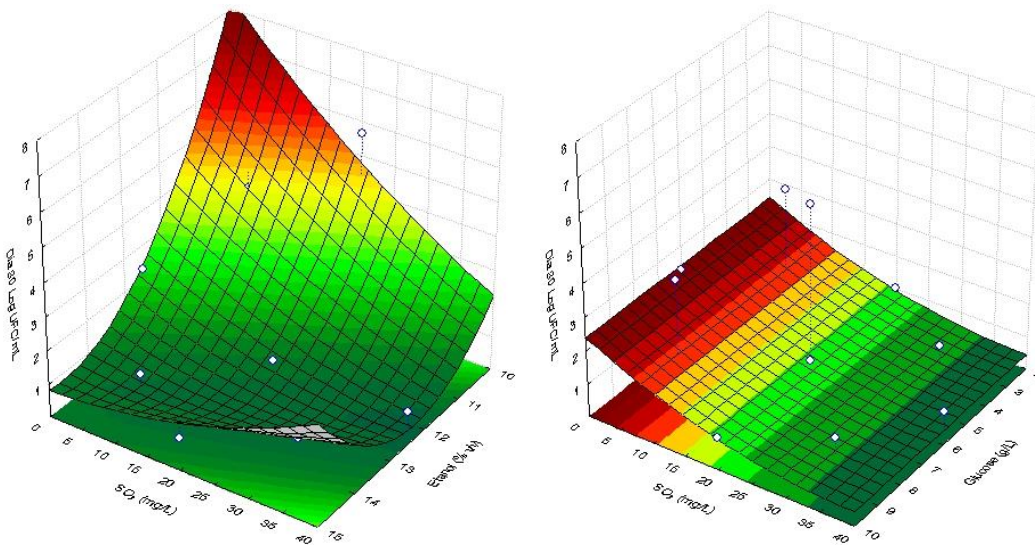


Figura 4.3. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *Z. bailii* ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de ensaio.

Quanto à composição físico-química, observou-se de uma geral a diminuição da acidez volátil, o que se pode confirmar através dos resultados da análise por HPLC na tabela 8.1 do Anexo IX em que se observa um consumo de ácido acético (tabela 8.11 do Anexo IX). Também o teor de sulfuroso livre diminuiu em todos os casos, que pode ter sido combinado com outros compostos como a glucose, tendo em conta o aumento de sulfuroso total verificado nalguns casos ou poderá ter-se perdido por evaporação (volatilização). Quanto à cor do vinho, observou-se um acastanhamento no final do ensaio e perda de

intensidade da cor, formando depósito em todos os casos. De notar que os resultados das análises físico-químicas no final dos ensaios apresentam maior percentagem de erro associado, uma vez que o volume de vinho foi muito menor que o inicial, e por isso necessário proceder à diluição das amostras.

A partir das tabelas de resultados do HPLC foi possível observar nitidamente o consumo de frutose em todas as amostras assim como o consumo de ácido acético, como já foi referido. Parece não ter havido consumo de glucose mantendo-se semelhante ao inicial assim como o teor de etanol e ácidos cítrico e tartárico.

4.2.2. *Schizosaccharomyces pombe*

Para a *Schizosaccharomyces pombe* apenas se conseguiram obter bons modelos em dois momentos iniciais da incubação, nomeadamente os dias 2, 5. Ainda para o dia 15 conseguiu-se obter um modelo razoável com um R^2 de 0,73.

Em vinhos com elevadas concentrações de etanol e sulfuroso livre, o sulfuroso demonstrou ser o factor com efeito mais significativo na inactivação celular conduzindo à morte populacional, o que foi estatisticamente confirmado pelo efeito linear negativo bastante significativo, ao nível de significância $\alpha = 0,05$, (tabela 4.4) sobre o crescimento populacional ao fim de 7 dias de inoculação (tabela 8.2 do Anexo III). A superfície de resposta que representa o crescimento celular em função do SO_2 e etanol (figura 3.5) ilustrou a contribuição dominante do efeito quadrático positivo do SO_2 no modelo. O efeito inibitório do sulfuroso livre é bastante significativo (p -value = 0) ao longo de todo o ensaio, em que *S. pombe* demonstrou uma diminuição da população na presença de concentrações inibitórias de sulfuroso livre (32 mg/L). A morte celular imediata foi apenas verificada nas amostras com elevado teor de sulfuroso (40 mg/L), em que não houve recuperação do crescimento mesmo após um período de 30 a 60 dias, em que a concentração de sulfuroso livre foi relativamente próxima de 0 (tabela 6.8).

S. pombe e *S. cerevisiae* mostraram mais resistência a conservantes como DMDC e anidrido sulfuroso comparativamente a outras leveduras de alteração (Costa, et al., 2008). *S. cerevisiae* parece sobreviver devido à sua indução ao estado viável mas não cultivável, como foi já observado por (Divol e Lonvaud-Funel, 2005) em fermentações de mostos botritizados. Além disso, não foi ainda demonstrado o estado viável mas não cultivável em *S. pombe* o que foi confirmado pelo não consumo de glucose até ao final do ensaio experimental (tabela 6.13 do Anexo IX). Contrariamente ao esperado, a glucose não favoreceu o crescimento da população, representando um factor de stresse com ligeiro efeito inibitório, perdendo, porém, a sua magnitude ao longo do tempo, o que foi confirmado estatisticamente pela ANOVA.

Na tabela 4.4, é possível observar os efeitos lineares negativos da glucose ao longo dos 15 dias estudados. Podemos afirmar com 90% de confiança que exerce um efeito inibitório nos dias 2 e 5 (p -value < 0,10). A superfície de resposta do crescimento populacional em função da glucose e do sulfuroso mostra um efeito quadrático da glucose, exibindo uma forma côncava nos dias 2 e 5 (figuras 4.4 e 4.5). O efeito linear negativo do etanol sobre o crescimento mostrou que o aumento da sua concentração conduz à morte celular a partir do dia 15, momento em que se torna estatisticamente significativo. O efeito do etanol não foi imediato como no caso do sulfuroso, mas lento, mantendo-se até ao final do ensaio experimental sem recuperação populacional. Todos estes factores mostraram um

efeito linear negativo. Nas três amostras relativas aos controlos, com todos os factores ao nível 0, isto é, a 6 g/L de glucose, 12% etanol e 20 mg/L SO₂, não houve crescimento o que nos leva a concluir a não reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 4.3. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190

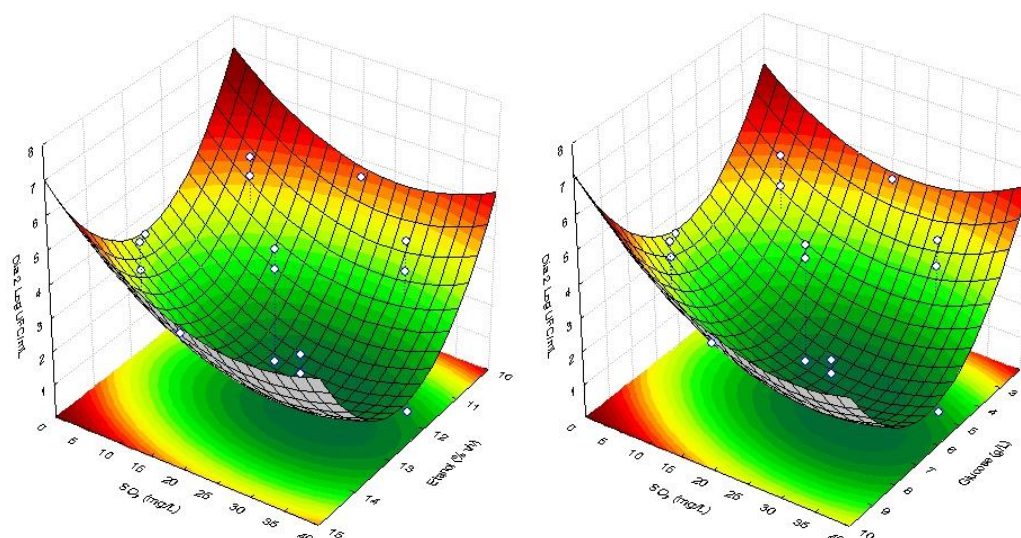
Factor	Log UFC/mL Dia 2		Log UFC/mL Dia 5		Log UFC/mL Dia 15	
	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p
Glucose g/L (L)	-0,33	0,10	-1,19	0,07	-0,35	0,58 ^b
Glucose g/L (Q)	2,36	0,00 ^a	2,06	0,01 ^a	1,22	0,04 ^a
Etanol % (L)	-0,34	0,09	-0,60	0,32	-1,27	0,03 ^a
Etanol % (Q)	2,50	0,00 ^a	2,21	0,01 ^a	1,01	0,08
SO ₂ mg/L (L)	-1,30	0,00 ^a	-1,47	0,03 ^a	-1,70	0,01 ^a
SO ₂ mg/L (Q)	1,02	0,00 ^a	0,42	0,52	0,22	0,75 ^b
Glucose x Etanol	0,44	0,09	0,62	0,42	0,02	0,98 ^b
Glucose x SO ₂	-0,43	0,10	-1,38	0,10	-0,04	0,96 ^b
Etanol x SO ₂	-0,18	0,45	-0,27	0,74 ^b	1,31	0,07

^a coeficientes significativos (valor p ≤ 0,05); ^b factores eliminados do modelo final

Tabela 4.4. Equações ajustadas para *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190

Tempo	Equação do Modelo	R ²	R _a
Dia 2	$\text{Log UFC} = 103,783 - 3,197[\mathbf{G}] + 0,209[\mathbf{G}]^2 - 14,535[\mathbf{E}] + 0,566[\mathbf{E}]^2 - 0,091[\mathbf{S}] + 0,004[\mathbf{S}]^2 + 0,062[\mathbf{G}][\mathbf{E}] - 0,008[\mathbf{G}][\mathbf{S}] - 0,005[\mathbf{E}][\mathbf{S}]$	0,98	0,95
Dia 5	$\text{Log UFC} = 94,997 - 3,049[\mathbf{G}] + 0,182[\mathbf{G}]^2 - 13,208[\mathbf{E}] + 0,499[\mathbf{E}]^2 + 0,026[\mathbf{S}] + 0,002[\mathbf{S}]^2 + 0,088[\mathbf{G}][\mathbf{E}] - 0,024[\mathbf{G}][\mathbf{S}]$	0,82	0,64
Dia 15	$\text{Log UFC} = 43,409 - 0,002[\mathbf{G}]^2 - 5,260[\mathbf{E}] + 0,164[\mathbf{E}]^2 - 0,534[\mathbf{S}] + 0,037[\mathbf{E}][\mathbf{S}]$	0,73	0,61

[G] = glucose (g/L); [E] = etanol (% v/v); [S] = sulfuroso livre (mg/L)

Figura 4.4. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. pombe* ISA 1190 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.

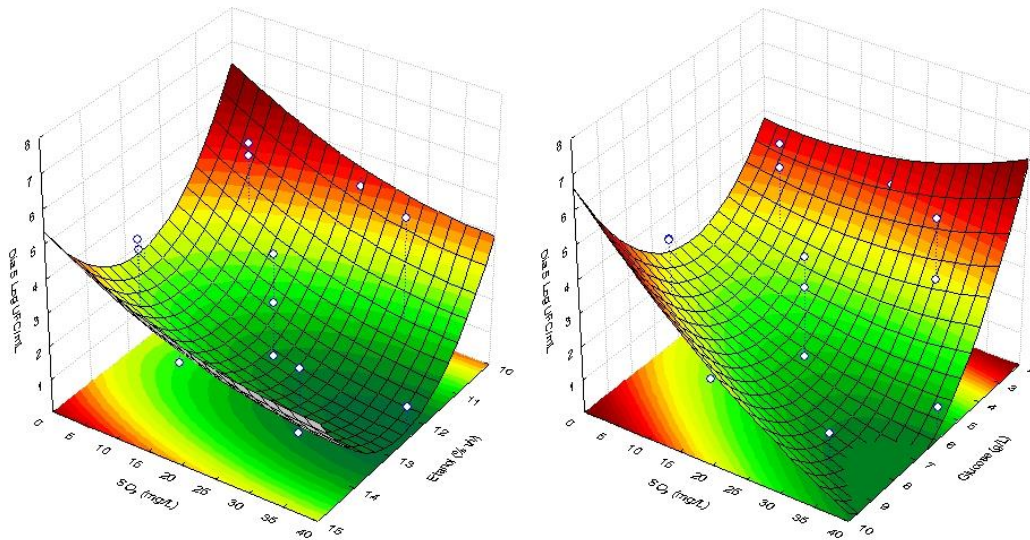


Figura 4.5. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. pombe* ISA 1190 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.

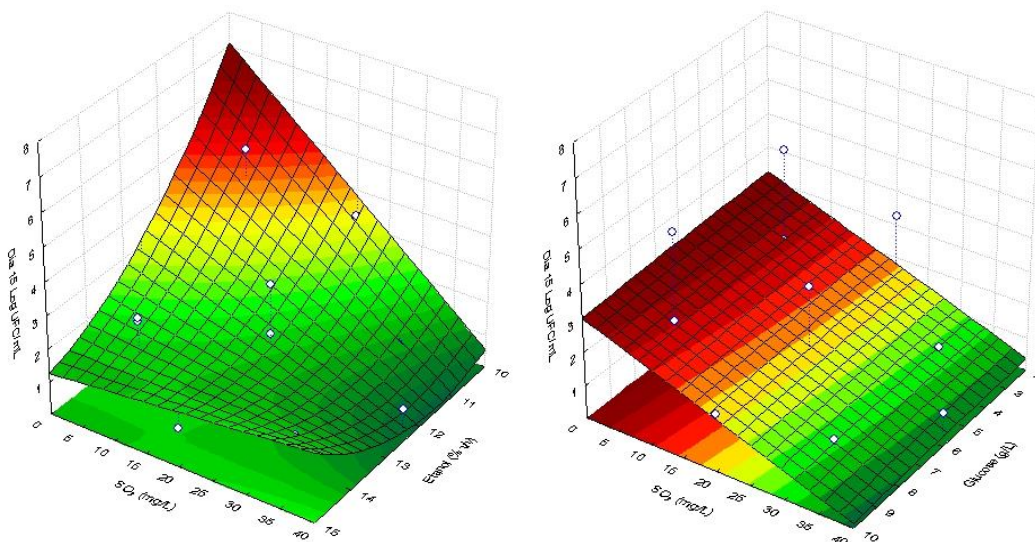


Figura 4.6. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. pombe* ISA 1190 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.

A actividade *S. pombe* no vinho levou à redução dos ácidos málico e tartárico. Uma vez que o vinho experimental usado não possuía um nível detectável de ácido málico, não foi possível medir alterações deste composto. No entanto, observou-se uma alteração de 55 – 70% do ácido tartárico ao fim de 30 dias. (Gao & Fleet, 1995) observou uma redução de 23% de ácido tartárico, dependendo da estirpe. Ainda (Snow & Gallander, 1979) observou em vários vinhos fermentados por *Schizosaccharomyces* uma redução média da acidez total de 33% devido à degradação dos ácidos málico e tartárico. Além disso, foi observada uma redução de 30 a 60% sob condições permissíveis ao crescimento. Além da degradação dos

ácidos málico e tartárico, o principal efeito negativo de *Schizosaccharomyces* é a elevada produção de ácido acético durante a fermentação alcoólica (Benito, et al., 2012). No entanto, não foi observado nenhum aumento da concentração de ácido acético durante os 60 dias de incubação. Pelo contrário, houve uma redução até 80%. Os ácidos que afectam o pH do vinho são o málico, láctico, tartárico, acético e cítrico, sendo que o pH do normalmente varia de 2,8 a 4,0 (Kalathenos, et al., 1995). O género *Schizosaccharomyces* possui propriedades metabólicas interessantes que podem ser usadas na produção de vinho branco. No entanto, dada a produção de ácido acético, a utilização de *Schizosaccharomyces* não é adpotada uma vez que leva à formação de defeitos aromáticos (Benito, et al., 2013).

4.2.3. Dekkera/Brettanomyces bruxellensis

As tabelas 4.7 e 4.8 mostram os efeitos de cada factor sobre o crescimento e as equações das superfícies de respostas ajustadas aos dados experimentais, respectivamente. Foram incluídos nas equações dos modelos os efeitos significativos ($p < 0,05$) e os efeitos com intervalo de confiança menor que o seu desvio padrão. Entre os três factores estudados o sulfuroso mostrou ser o efeito mais significativo na inactivação celular imediata, o que foi matematicamente confirmado pelo efeito linear negativo na culturabilidade da população observado no segundo dia de inoculação. Os modelos polinomiais de segunda ordem, estabelecidos pelo delineamento, foram bem ajustados aos dados experimentais com R^2 's bastante elevados (tabela 4.8), em que nunca menos do que 81% e até 92% da variabilidade dos resultados é explicada pelas equações dos modelos.

Pela observação da tabela da culturabilidade da estirpe (tabela 8.3, Anexo III) podemos observar que os controlos estudados revelaram diferentes comportamentos, o que nos leva a concluir a não reprodutibilidade dos resultados.

Comparando com as restantes estirpes estudadas, revelou-se a estirpe mais susceptível. É uma estirpe particularmente sensível ao sulfuroso sendo imediatamente inibida quando usadas concentrações de 20 mg/L de sulfuroso livre. A análise de variância realizada sobre os dados da culturabilidade de *D. bruxellensis* mostraram pequenos valores dos valores de prova ($p < 0,001$) do efeito linear negativo do sulfuroso livre, apontando para um efeito inibidor bastante significativo a 99% de confiança.

Houve crescimento da população a 8 mg/L de sulfuroso, no entanto apenas nos balões com 11% de etanol. Assim existe uma interacção dos factores, sulfuroso e etanol, na inibição da estirpe. Assim as condições ideais verificadas são vinhos com teores de etanol entre 11 a 12,5% e sulfuroso inferior a 20 mg/L, sendo que só se verificou crescimento em balões com 8 mg/L de sulfuroso livre e, para o máximo de etanol apresentado foi usado

vinho adição de sulfuroso o que pode levar a crer que as células de *Dekkera* não crescem em vinhos com mais de 11% etanol.

Estatisticamente, foi possível confirmar que a glucose não teve efeito sobre o crescimento assim como as interações dos outros factores com a glucose. O sulfuroso tem um grande impacto na inibição celular, mas o seu efeito vai diminuindo ao longo do tempo, facto que pode ser explicado pela combinação do sulfuroso livre com outros compostos ou a sua volatilização. Ao longo do tempo vai aumentando a intensidade do efeito de etanol acompanhado por uma significância cada vez maior, ou seja, obtivemos maiores estimativas para os parâmetros linear e quadrático e respectivos valores de prova. A resistência ao etanol e sulfuroso depende da estripe e fase de crescimento (Agnolucci, et al., 2010), da composição do vinho e teor de nutrientes.

Em vinhos tintos observou-se morte na fase inicial e um crescimento sequencial também descrito por Grbin & Henschke (2000) e Du Toit, et al. (2005). Fugelsang e Zoecklein (2003) não denotaram a existência de uma fase inicial de morte, provavelmente porque a contagens de viáveis foi determinada semanalmente. O mecanismo fisiológico por detrás da fase inicial de morte pode ser metabolicamente diferente do da fase final de morte devido à proporção significativamente maior de células metabolicamente activas, evidenciando a presença de populações activas mas não cultiváveis na fase final de declínio.

Tabela 4.5. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para *Dekkera bruxellensis* ISA 2211

Factor	Dia 2		Dia 5		Dia 15		Dia 30		Dia 60	
	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p
Glucose g/L (L)	-0,79	0,17	-0,06	0,91 ^b	-0,07	0,91 ^b	-0,06	0,92 ^b	0,00	0,99 ^b
Glucose g/L (Q)	1,27	0,05	-0,96	0,11	-2,26	0,00 ^a	-3,31	0,00 ^a	-2,99	0,00 ^a
Etanol % (L)	-0,74	0,19	-1,47	0,01 ^a	-1,35	0,02 ^a	-1,52	0,01 ^a	-1,50	0,01 ^a
Etanol % (Q)	0,11	0,89	-0,50	0,38	-2,26	0,00 ^a	3,31	0,00 ^a	-2,99	0,00 ^a
SO ₂ mg/L (L)	-1,86	0,01 ^a	-2,57	0,00 ^a	-2,52	0,00 ^a	-2,75	0,00 ^a	-2,64	0,00 ^a
SO ₂ mg/L (Q)	1,96	0,00 ^a	1,09	0,08	-0,59	0,32	-1,55	0,03 ^a	-1,35	0,05 ^a
Glucose x Etanol	0,44	0,54 ^b	0,10	0,89 ^b	0,12	0,88 ^b	0,11	0,90 ^b	0,00	0,99 ^b
Glucose x SO ₂	0,09	0,91 ^b	0,10	0,89 ^b	0,12	0,88 ^b	0,11	0,90 ^b	0,00	0,99 ^b
Etanol x SO ₂	1,92	0,02 ^a	1,96	0,01 ^a	2,31	0,00 ^a	2,59	0,00 ^a	2,57	0,00 ^a

^a Coeficientes significativos (valor p ≤ 0,05); ^b factores eliminados do modelo ajustado

Tabela 4.6. Equação dos melhores modelos ajustados para *Dekkera bruxellensis* ISA 2211

Tempo	Equação Modelo	R ²	R _a
Dia 2	Log UFC = 27,137 – 1,516[G] + 0,113[G] ² – 1,335[E] – 1,034[S] + 0,007[S] ² + 0,054[E][S]	0,81	0,68
Dia 5	Log UFC = 21,976 – 0,003[G] ² – 0,975[E] – 0,025[E] ² – 1,008[S] + 0,005[S] ² + 0,055[E][S]	0,88	0,81
Dia 15	Log UFC = -19,718 – 0,006[G] ² + 5,813[E] – 0,303[E] ² – 0,970[S] + 0,001[S] ² + 0,065[E][S]	0,90	0,83
Dia 30	Log UFC = -38,623 – 0,009[G] ² + 9,103[E] – 0,443[E] ² – 1,004[S] – 0,001[S] ² + 0,073[E][S]	0,92	0,87
Dia 60	Log UFC = -32,174 – 0,007[G] ² + 8,008[E] – 0,399[E] ² – 1,000[S] + 0,073[E][S]	0,91	0,84

[G] = glucose (g/L); [E] = etanol (% v/v); [S] = sulfuroso livre (mg/L)

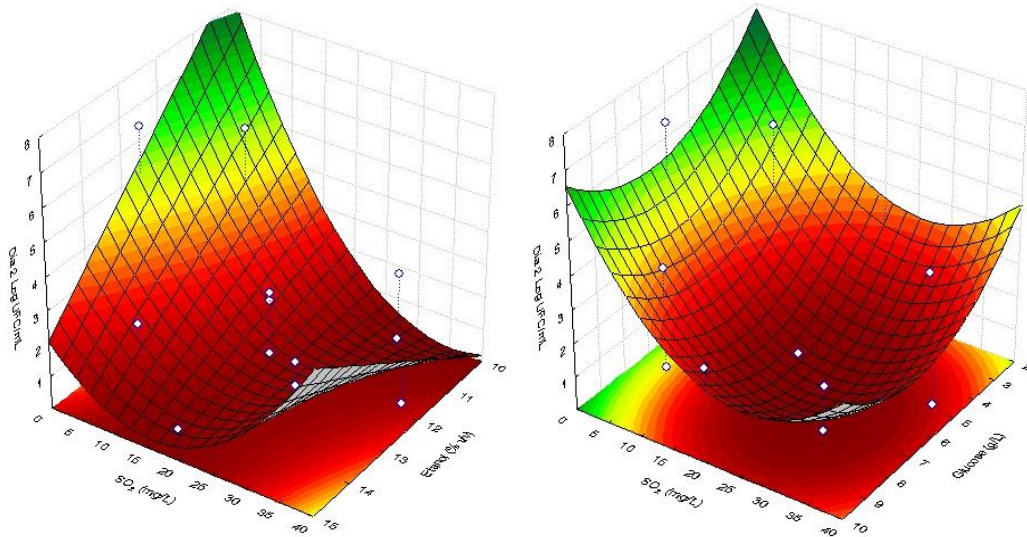


Figura 4.7. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *D. bruxellensis* ISA 2211 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.

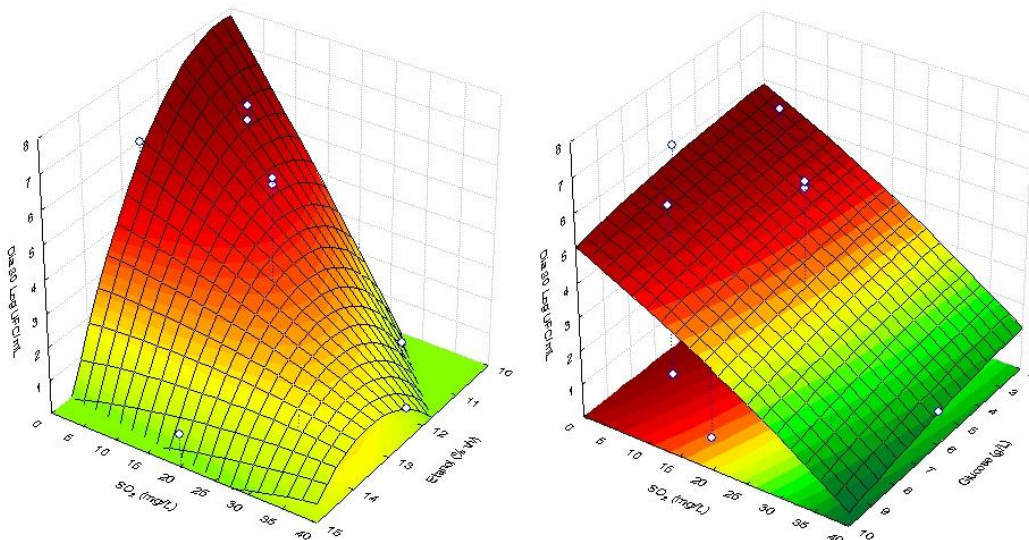


Figura 4.8. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *D. bruxellensis* ISA 2211 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de inoculação.

Os gráficos das superfícies de resposta do crescimento celular em função do sulfuroso e glucose (figuras 4.7 e 4.8, e ainda no Anexo XI) ilustram a contribuição dominante do efeito quadrático do sulfuroso para o modelo, mostrando que o aumento do teor de sulfuroso promove o decréscimo da população de *Dekkera/Brettanomyces* assim como o etanol, deste modo a interação destes dois factores influencia o crescimento. Até ao final do ensaio, a morte populacional e consequentemente a produção de 4-etilfenol foram significativamente dependentes do teor de sulfuroso (efeitos linear e quadrático). O tipo de configuração das superfícies de resposta mantém-se do dia 15 ao 60, superfícies

convexas no caso de SO₂ vs etanol, quanto maior o teor de etanol e sulfuroso menor a população de *Dekkera bruxellensis*, sendo o limite de crescimento a 20 mg/L e 11-12,5% etanol confirmando o que já foi dito anteriormente, a glucose confirma-se sem efeito nos gráficos, excepto para o dia 2 apresentando uma superfície côncava. Também neste dia a superfície de resposta tem uma configuração côncava e portanto diferentes dos restantes para etanol e sulfuroso apresentando um leve crescimento no máximo dos parâmetros, possivelmente devido ao período de adaptação.

Ao contrário das estirpes *Z. bailii* e *S. pombe*, o R² dos modelos vão aumentando ao longo do tempo, sendo que os melhores modelos são os referentes aos dias 30 e 60.

Os resultados demonstram que o aumento do grau alcoólico contribui para uma rápida morte celular de *Dekkera*, ocorreu sempre morte celular rápida nos vinhos com 14% etanol e que vinhos com baixos teores de álcool e sulfuroso são altamente susceptíveis ao crescimento de *Dekkera*.

Pela observação da tabela 8.12 do Anexo IX de resultados do HPLC constatou-se um consumo de açúcares, e um ligeiro aumento de glicerol e etanol. Através dos resultados das análises físico-químicas aos vinhos, verificou-se um aumento da acidez volátil nos balões onde houve crescimento populacional, e nos restantes manteve-se ou houve uma redução. O pH manteve-se ao longo de todo o ensaio.

A partir da observação dos gráficos referentes aos fenóis voláteis, nomeadamente ao 4-etilfenol, uma vez que não foram detectados outros compostos, só foi detectado nos balões 1, 2, 6, 13, 14, 15, 16 e 17. De facto, os balões 1, 2 e 13 correspondem àqueles onde houve sempre população microbiana. Quanto aos balões 6 e 15 a produção de 4-etilfenol não foi significativa uma vez que não chega ao limiar de detecção (< 600 ppb). No caso do balão 16 temos uma produção até 1000 ppb de 4-etilfenol, exactamente nos tempos em que houve crescimento.

A análise dos resultados referentes aos ensaios 14 e 17 parecem indicar que as leveduras entram num estado fisiológico designado como “viável mas não cultivável”, caracterizado pela incapacidade das células se dividirem no meio de cultura, embora continuem vivas e mantendo alguma actividade celular e metabólica (Millet e Lonvaud-Funel, 2000). Confrontando os gráficos 4-EF no Anexo VII e os resultados de HPLC - consumo de glucose, produção de etanol e glicerol na tabela 8.12, denota-se que não houve crescimento (inibição imediata), mas para além da produção de 4-etilfenol na ordem de 1000 e 600 ppb, respectivamente, verificou-se consumo de glucose, ácido succínico e ácido láctico entre 30 e 60 dias, assim como consumo de ácido acético, e pequena produção de

etanol. Seria necessário recorrer a outros testes como o FISH para confirmar esta suposição.

O sulfuroso é um factor químico de stresse que se tem demonstrado induzir as estirpes de *Dekkera* ao estado “viável mas não cultivável” em vinho (Agnolucci, et al., 2010; Du Toit, et al., 2005). A rápida actividade antimicrobiana do anidrido sulfuroso em *B. bruxellensis* foi bem descrita por (Du Toit, et al., 2005), que observou o estado VBNC em vinho com 0,25 - 0,8 mg/L de SO₂ molecular, o que corresponde a aproximadamente a 7,5 – 24 mg/L de SO₂ livre. Contrariamente (Barata, et al., 2008), ao analisar uma variedade de estirpes de *B. bruxellensis*, não observou a existência de populações activas mas não cultiváveis após a adição de SO₂ ao vinho.

A dificuldade em obter resultados de comportamento comparáveis com vinhos laboratoriais equivalentes corresponde à observação empírica que alguns vinhos, com etanol semelhante e valores de pH, parece ser mais vulnerável à contaminação de levedura que outros. Em particular, vinhos brancos induzem completamente morte celular quando realizados em paralelos com vinhos tintos (Barata, et al., 2008). Ainda, a ausência do defeito “*suor de cavalo*” em vinhos brancos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006) pode ser explicado pela sua resistência ao crescimento de *D. bruxellensis*. O crescimento em vinhos brancos só pode ser alcançado reduzindo o teor alcoólico ou elevando o pH para valores irreais.

4.2.4. *Saccharomyces ludwigii*

De todas, revelou ser a estirpe mais resistente. Devido à sua grande capacidade de adaptação e resistência, alguns modelos não foram facilmente ajustados aos dados experimentais por terem associados coeficientes de determinação muito baixos. Os modelos obtidos para os dias 5, 15 e 30 não são considerados bons modelos, uma vez que tanto os coeficientes R² serem muito pequenos, existe ainda, uma grande diferença entre R² e R²_a

Os três controlos idênticos revelaram a reprodutibilidade dos resultados, todos eles com uma redução inicial da população mas com capacidade de recuperação bastante rápida, houve porém um controlo mais resistente (17). Resistente tanto ao etanol como ao sulfuroso, quando em concentrações individuais elevadas. No entanto, quando se conjugaram elevados teores dos dois compostos houve uma inibição imediata, mas com capacidade de recuperação (14% etanol e 32 mg/L sulfuroso). A 15% de etanol e 20 mg/L houve inibição ao fim de 3 mas recuperou o crescimento ao 7º dia. Embora na validação revelou-se susceptível em vinho com 15,3% de etanol.

Assim como já foi dito anteriormente, confirmou-se pelo tratamento estatístico e superfícies de resposta obtidas que o sulfuroso exerce um grande efeito nos primeiros dias de inoculação, perdendo o seu efeito inibidor ao longo do tempo de ensaio, como se pode observar na tabela 4.10 e nas figuras das superfícies de resposta (figuras 4.9, 4.10 e Anexo XII), no dia 2 apresenta uma superfície ligeiramente côncava passando a linear negativa e com um declive cada vez menos pronunciado. O etanol foi o efeito com algum significado e com maior impacto sobre a população microbiana nos dias 5 e 60. A glucose não produz qualquer efeito sobre o crescimento da microbiota.

Quanto ao resultado das análises físico-químicas cuja tabela se apresenta no anexo V, não foi possível avaliar a diferença de pH devido a uma avaria do potenciômetro. No entanto, foi possível observar uma pequena redução da acidez volátil, ou seja, houve consumo do ácido acético confirmado nos resultados do HPLC (Anexo), assim como de ácido cítrico, tartárico e láctico para além da glucose acompanhada de uma ligeira produção de etanol.

Tabela 4.7. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para *Saccharomyces ludwigii* ISA 1083

Factor	Log UFC/mL Dia 2		Log UFC/mL Dia 5		Log UFC/mL Dia 15		Log UFC/mL Dia 30		Log UFC/mL Dia 60	
	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p
Glucose g/L(L)	0,05	0,93 ^b	0,434	0,63 ^b	-0,63	0,45	-0,08	0,79 ^b	-0,24	0,35
Glucose g/L(Q)	-1,69	0,00 ^a	-1,64	0,08	-0,59	0,56 ^b	0,31	0,26	0,15	0,65 ^b
Etanol %(L)	-0,79	0,09	-1,78	0,03 ^a	-1,02	0,24	-0,53	0,05	-0,83	0,01 ^a
Etanol %(Q)	0,45	0,37	-0,69	0,44	-0,61	0,49	0,09	0,80 ^b	0,11	0,75 ^b
SO ₂ mg/L(L)	-3,87	0,00 ^a	-3,50	0,00 ^a	-1,22	0,17	0,49	0,07	0,29	0,27
SO ₂ mg/L(Q)	-0,03	0,97 ^b	-0,61	0,49	-0,18	0,89 ^b	0,38	0,17	0,02	0,96 ^b
Glucose x Etanol	-0,14	0,86 ^b	-0,19	0,87 ^b	0,46	0,74 ^b	0,27	0,40	0,61	0,09
Glucose x SO ₂	0,04	0,95 ^b	-0,27	0,82 ^b	-2,60	0,03 ^a	0,09	0,82 ^b	0,36	0,30
Etanol x SO ₂	0,615	0,30	0,42	0,72 ^b	-0,21	0,88 ^b	-0,37	0,25	-0,80	0,03 ^a

^a Coeficientes significativos (valor p ≤ 0,05); ^b factores eliminados do modelo ajustado

Tabela 4.8. Equação dos melhores modelos ajustados para *Saccharomyces ludwigii* ISA 1083

Tempo	Equação Modelo	R ²	R _a
Dia 2	Log UFC = 46,975 – 0,004[G] ² – 5,897[E] + 0,211[E] ² – 0,380[S] + 0,017[E][S]	0,91	0,76
Dia 5	Log UFC = 14,781 + 0,004[G] ² – 0,712[E] + 0,005[E] ² – 0,162[S]	0,68	0,57
Dia 15	Log UFC = -15,743 + 0,787[G] + 3,096[E] – 0,138[E] ² + 0,225[S] – 0,046[G][S]	0,55	0,20
Dia 30	Log UFC = 4,699 + 0,013[G] ² + 0,116[E] + 0,106[S] + 0,001[S] ² – 0,014[G][E] – 0,011[E][S]	0,62	0,40
Dia 60	Log UFC = 10,608 - 1,260[G] - 0,347[E] + 0,257[S] + 0,087[G][E] + 0,006[G][S] - 0,023[E][S]	0,71	0,53

[G] = glucose (g/L); [E] = etanol (% v/v); [S] = sulfuroso livre (mg/L)

Da observação das superfícies de resposta, confirmou-se o efeito linear negativo do anidrido sulfuroso livre até ao 5º dia. O efeito linear do etanol sempre negativo ao longo de todo o ensaio experimental.

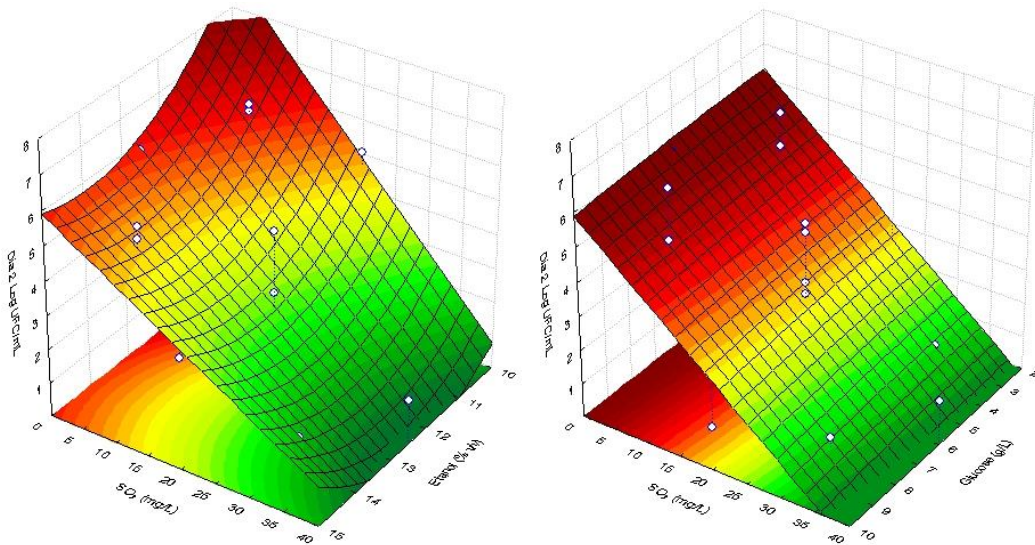


Figura 4.9. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. ludwigii* ISA 1083 em função de glicose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.

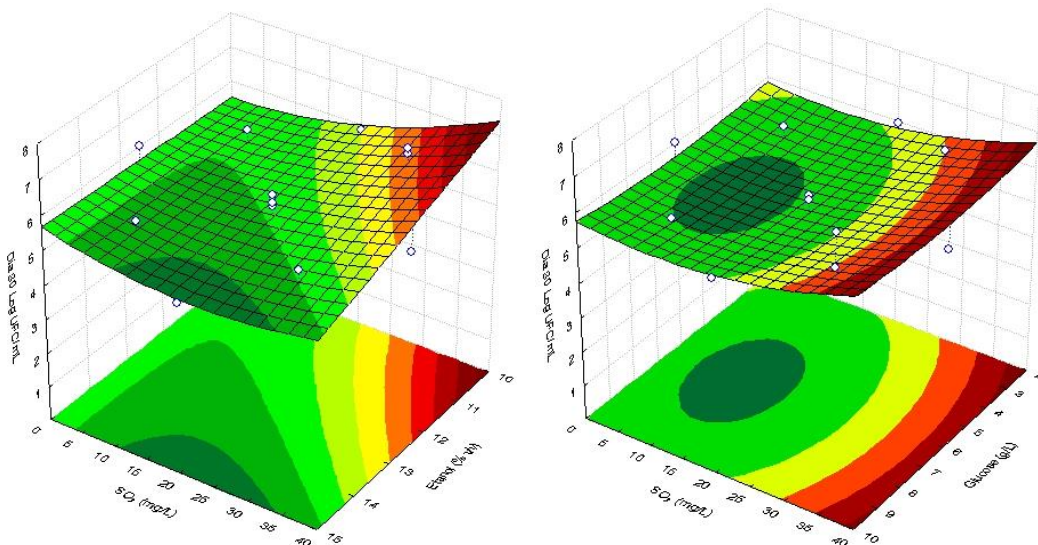


Figura 4.10. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. ludwigii* ISA 1083 em função de glicose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de inoculação.

4.2.5. *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* revelou-se susceptível em vinho com mais de 20 mg/L de sulfuroso e 12,5% de etanol independentemente do teor de glucose, isto é, não representa um factor nutricional a ter em consideração. Pela observação da tabela 8.5 do Anexo III com os resultados populacionais é possível concluir que para os parâmetros máximos testados existe morte imediata 40 mg/L de sulfuroso livre, 15% de etanol e 10 g/L de glucose. Ao longo do tempo, o etanol foi um factor que se foi tornando bastante significativo estatisticamente (tabela 4.13). Pelo contrário, o efeito do sulfuroso tem grande significado estatístico no início do ensaio experimental ($p = 0$) até aos dias 30 e 60, facto que pode ser explicado pelo efeito de combinação do sulfuroso com outros compostos ou volatilização, como foi já referido para outras leveduras.

O efeito linear negativo do etanol pode ser observado nas superfícies de resposta apresentadas nas figuras 4.11 e 4.12, assim como o seu efeito quadrático positivo dando origem a superfícies côncavas, assim como o sulfuroso. É igualmente possível observar a perda de efeito do sulfuroso ao longo do tempo nas mesmas figuras e Anexo XIII. *S. cerevisiae*, usada em fermentações vinárias, é relativamente mais tolerante ao etanol e anidrido sulfuroso que *D. bruxellensis*. Existem estirpes mais sensíveis ao etanol (em presença de 8% (v/v) de etanol). Esta maior susceptibilidade pode explicar a ausência destas espécies em vinhos, como sugerido por (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Conterno, et al. (2006) mostrou também que 35 estirpes de *D. bruxellensis* cresceram na presença de 10% (v/v) de etanol, mas não foram testadas concentrações mais elevadas. Acredita-se que a tolerância ao etanol é o principal factor limitante ao crescimento da levedura em vinhos. Quanto à *D. bruxellensis*, os resultados de (Barata, et al., 2008) em meio sintético indicaram entre 14,5 até 15% (v/v) pode ser considerado o nível máximo que permite a sua proliferação em vinhos. Embora, não tenha sido possível o crescimento de células em vinhos ajustados a 14% (v/v) de etanol e pH 3,50 em condições laboratoriais, observaram crescimento em vinho comercial com 13,8% (v/v) e pH 3,42 em barricas de carvalho. O que sugere que em condições de adega as células estão melhor adaptadas a possíveis ambientes de stresse. Em geral, estes valores de tolerância estão de acordo com a ausência de *D. bruxellensis* isoladas de vinhos tintos com maior teor de etanol e de vinhos fortificados (como revisto por Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003)). Esta observação também em concordância com a experiencia empírica de vinho sherry em que aumentando o etanol para 15% (v/v) previne o crescimento de *D. bruxellensis* mas permite o desenvolvimentos das estirpes da levedura formadora de véu *S. cerevisiae* (Ibeas, et al., 1997). Assim, embora relativamente tolerante ao etanol, *D. bruxellensis* deve ser considerada como mais sensível que *S. cerevisiae*.

Tabela 4.9. Resumo das estimativas e valores de prova (p) para factor do modelo para *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000

Factor	Log UFC/mL Dia 2		Log UFC/mL Dia 5		Log UFC/mL Dia 15		Log UFC/mL Dia 30		Log UFC/mL Dia 60	
	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p	Estimativa	Valor p
Glucose g/L(L)	0,02	0,97 ^b	-0,10	0,90 ^b	-0,56	0,18	-0,04	0,95 ^b	0,17	0,76
Glucose g/L(Q)	0,60	0,35	0,29	0,75 ^b	0,22	0,69 ^b	0,66	0,28	0,69	0,22
Etanol %(L)	-0,75	0,16	-1,75	0,01 ^a	-2,36	0,00 ^a	-3,11	0,00 ^a	-2,73	0,00
Etanol %(Q)	1,39	0,04 ^a	2,06	0,01 ^a	1,25	0,02 ^a	1,57	0,02 ^a	1,94	0,00
SO ₂ mg/L(L)	-3,90	0,00 ^a	-3,80	0,00 ^a	-2,10	0,00 ^a	-0,89	0,09	0,82	0,09
SO ₂ mg/L(Q)	2,11	0,01 ^a	1,70	0,02 ^a	1,43	0,01 ^a	1,22	0,06	0,47	0,39
Glucose x Etanol	0,07	0,93 ^b	-0,22	0,81 ^b	0,55	0,29	0,79	0,23	-0,04	0,96
Glucose x SO ₂	-0,16	0,85 ^b	0,16	0,86 ^b	-0,11	0,85 ^b	-0,35	0,65 ^b	0,04	0,96
Etanol x SO ₂	0,21	0,81 ^b	0,74	0,32	1,13	0,05	0,14	0,86 ^b	-0,35	0,64

^a Coeficientes significativos (valor p ≤ 0,05); ^b factores eliminados do modelo ajustado

Tabela 4.10. Equação dos melhores modelos ajustados para *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000

Tempo	Equação Modelo	R ²	R _a
Dia 2	Log UFC = 50,728 + 0,002[G] ² - 6,712[E] + 0,258[E] ² - 0,428[S] + 0,007[S] ²	0,89	0,83
Dia 5	Log UFC = 92,232 - 12,663[E] + 0,466[E] ² - 0,664[S] + 0,006[S] ² + 0,021[E][S]	0,88	0,82
Dia 15	Log UFC = 73,618 - 1,097[G] - 8,970[E] + 0,283[E] ² - 0,690[S] + 0,005[S] ² + 0,078[G][E] + 0,032[E][S]	0,92	0,86
Dia 30	Log UFC = 64,432 + 0,017[G] ² - 8,696[E] + 0,310[E] ² - 0,182[S] + 0,004[S] ² - 0,016[G][E]	0,86	0,77
Dia 60	Log UFC = 71,480 + 0,005[G] ² - 10,370[E] + 0,378[E] ² + 0,005[S] + 0,001[S] ²	0,85	0,78

[G] = glucose (g/L); [E] = etanol (% v/v); [S] = sulfuroso livre (mg/L)

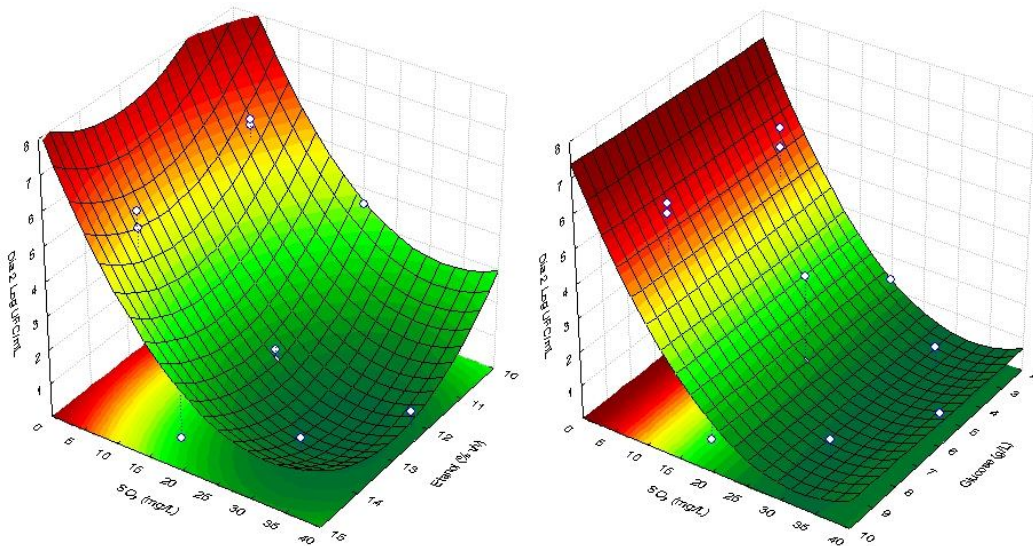


Figura 4.11. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. cerevisiae* ISA 1000 em função de glicose, etanol e sulfuroso livre, no segundo dia de inoculação.

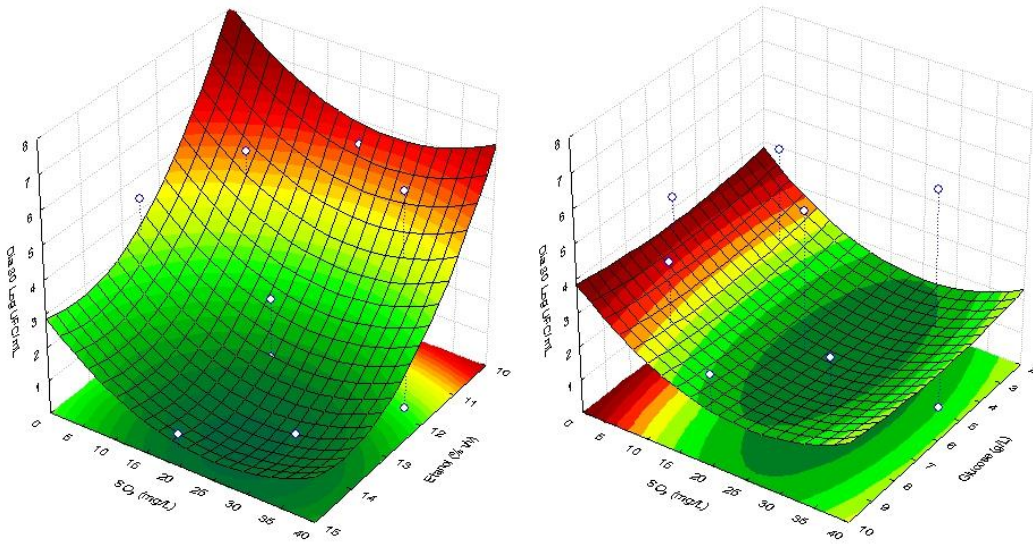


Figura 4.12. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. cerevisiae* ISA 1000 em função de glicose, etanol e sulfuroso livre, após 30 dias de inoculação.

5. COMPARAÇÃO DE RESISTÊNCIA ENTRE ESPÉCIES

A partir das equações obtidas pelos modelos ajustados aos dados experimentais foi possível comparar a resistência de cada estirpe ao etanol e sulfuroso (factores com efeitos mais significativos estatisticamente). Recorrendo apenas à substituição das variáveis por valores considerados de forma a obter um $\log \text{ UFC/mL} = 1$, isto é, qual o valor necessário para levar à inactivação celular de cada estirpe.

Nas tabelas seguintes estão representados os resultados da aferição. Foram substituídos os parâmetros pelos seguintes valores:

$\log \text{ UFC/mL} = 1$; Glucose = 10; Sulfuroso Livre = 20; Etanol = 12,5% v/v

consoante o parâmetro a avaliar.

É de notar que as equações polinomiais de segundo grau, muitas vezes originam duas respostas possíveis, resultado da sua natureza quadrática. Nas tabelas são apresentados os resultados que parecem fazer algum sentido e que se aplicam às hipóteses apresentadas. Sendo no final, um resultado de aplicabilidade matemática e poderá dar origem a grandes diferenças quando aplicados a casos reais. Ainda não são apresentados resultados no caso de não existir solução da equação.

Interpretando os resultados, de uma forma geral, quanto maior foi o teor necessário do factor a aferir maior é a resistência às condições do meio.

Tabela 5.1. Teor de Sulfuroso livre necessário para inibir o crescimento ($\log \text{ UFC/mL} = 1$) em vinho com 10 g/L de glucose e 12,5% v/v de etanol

	2	5	15	30	60
<i>Z. bailii</i>	38,17	34,00	29,67	85,59	83,68
<i>S. pombe</i>	-	44,88	29,15	-	-
<i>D. bruxellensis</i>	-	21,53	31,84	32,60	44,37
<i>S. ludwigii</i>	28,84	37,42	35,17	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	47,05	59,55	-	-	-

Pela observação dos resultados da tabela 5.1 podemos confirmar que os modelos obtidos para o dia 30 e 60 não se ajustam de uma forma satisfatória os dados do efeito do sulfuroso. Como foi explicado anteriormente, este composto poder-se-á ter combinado ou volatilizado de forma que o modelo exibirá sempre um teor superior ao que seria realmente necessário. A obtenção de bons resultados depende também do bom ajustamento do modelo sugerido pelo R^2 .

Assim como podemos observar, os resultados relativos à *Saccharomyces ludwigii* não são próximos dos esperados, o que pode ser explicado pelo valor de R^2 relativamente baixo. Os modelos explicam apenas 50-60% da variabilidade da resposta pode ser descrita pelos factores estudados, isto é, 40-50% dos resultados podem-se dever ao efeito de outros factores.

Contudo, podemos concluir que será sempre necessário maior teor de sulfuroso para inibir o crescimento celular no início da contaminação. A *D. bruxellensis* confirma-se como a mais susceptível, sendo necessário adicionar menor teor de sulfuroso para a sua inactivação celular, relativamente às restantes leveduras. A *Z. bailii*, *S. pombe* e *S. cerevisiae* revelam-se, como esperado, mais resistentes ao etanol.

5.2. Teor de etanol necessário para inibir o crescimento (Log UFC/mL) em vinhos com 10 g/L de glucose e 20 mg/L de sulfuroso livre

	2	5	15	30	60
<i>Z. bailii</i>	19,15	-	-	14,69	-
<i>S. pombe</i>	-	-	-	-	-
<i>D. bruxellensis</i>	17,24	12,84	13,91	14,03	14,26
<i>S. ludwigii</i>	-	17,52	16,46	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	13,5	14,68	15	-

No caso de resistência ao sulfuroso, conclui-se que a *S. ludwigii* é a mais resistente, sendo necessário mais teor de etanol para inibir o seu crescimento em vinhos com 20 mg/L. A *Dekkera bruxellensis* continua a revelar-se como a mais susceptível. A *Z. bailii* assim como a *S. pombe* são bastante resistentes ao sulfuroso.

Também nesta tabela podemos observar que é necessário maior teor inicial para inactivar as células em todas as leveduras, à excepção da *S. cerevisiae*.

6. TESTE

As observações resultantes do teste realizado com 4 vinhos nas suas condições elementares encontram-se nas tabelas 5.1 a 5.4. Os resultados das contagens de colônias em placas são apresentados em Log UFC/mL.

Para tipo de vinho analisado é apresentada uma tabela onde podemos observar e comparar o comportamento de cada estirpe. De forma geral, confirma-se a resistência da *Saccharomyces ludwigii* ao etanol cuja inativação celular apenas ocorre em vinho tinto com 15,3% v/v o fim de 5 dias (tabela 5.2) e a susceptibilidade da *Dekkera bruxellensis* que não cresceu em nenhum tipo de vinho branco ou tinto. Se por um lado confirmamos que a *D. bruxellensis* é uma levedura sensível uma vez que ocorreu sempre morte imediata, por outro não nos foi possível através deste teste validar os modelos obtidos. Os vinhos que poderiam reunir as condições necessárias ao crescimento de *Dekkera bruxellensis* seriam o C e D, pela gama de teores de etanol e anidrido sulfuroso que apresentam, mas trata-se de vinho branco em ambos os casos, e pela bibliografia constata-se que é raro o crescimento neste tipo de produto.

6.1. Teste vinho A – tinto com 2,7 g/L glucose; 13,6% v/v etanol; 9 mg/L sulfuroso livre (Log UFC/mL)

	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
Z.b.	4,76	4,50	4,47	4,26	4,13	4,08	3,23	3,28	2,04	<1,00	<1,00	<1,00
S.p.	4,58	4,53	4,42	4,36	4,34	4,07	3,92	3,57	2,85	<1,00	<1,00	<1,00
D.b.	5,29	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.l.	4,82	4,73	4,51	4,38	4,63	4,15	4,10	4,31	4,20	4,05	4,15	5,50
S.c.	4,99	5,07	4,95	4,69	5,18	4,08	3,08	1,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

6.2. Teste vinho B – tinto com 1,8 g/L glucose; 15,3 v/v etanol; 9 mg/L sulfuroso livre (Log UFC/mL)

	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
Z.b.	4,62	4,28	2,78	2,90	2,30	2,78	2,06	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.p.	4,53	3,58	3,98	<1,00	2,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
D.b.	5,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.l.	4,96	4,53	3,83	3,60	3,81	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.c.	5,12	3,95	4,35	4,28	<1,00	3,08	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

A *Z. bailii* e *S. cerevisiae* mostraram maior susceptibilidade nas amostras de vinho branco. Os resultados apresentados na tabela 6.2 mostraram que a *Z. bailii* demonstra maior resistência ao efeito do etanol que a *S. ludwigii*, ao contrário do que se esperava.

6.3. Teste vinho C – branco com 2,2 g/L glucose; 12,6 % v/v etanol; 9 mg/L sulfuroso (Log UFC/mL)

	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
Z.b.	4,82	3,91	<1,00	2,90	3,08	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.p.	4,48	3,26	3,70	<1,00	<1,00	2,78	1,81	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
D.b.	5,28	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.l.	4,91	4,37	4,15	4,10	3,86	3,38	3,37	4,12	4,88	4,49	4,29	5,00
S.c.	5,07	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

6.4. Teste vinho D – branco com 6 g/L glucose; 11,6% v/v etanol; 7 mg/L sulfuroso livre (Log UFC/mL)

	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
Z.b.	4,75	4,27	4,34	4,16	4,16	2,30	1,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.p.	4,62	4,02	4,25	3,08	<1,00	3,98	2,77	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
D.b.	5,37	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
S.l.	4,97	4,51	3,92	3,99	3,76	3,76	4,16	5,80	5,71	5,43	5,38	5,52
S.c.	5,15	3,99	3,78	3,68	3,53	3,20	2,15	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

A partir destes dados podemos concluir que os modelos obtidos para todas as leveduras são optimistas face à realidade. Resolvendo as equações em ordem a y, a resposta é superior aos valores observados, tanto nas amostras do delineamento como nos vinhos usados no teste. No entanto, existem vários factores que inibem o crescimento das leveduras e conduzem à sua inactivação celular. Ainda a interacção destes factores reduzem a capacidade de proliferação das leveduras nos vinhos.

7. CONCLUSÕES

A abordagem da metodologia das superfícies de resposta visou explicar o comportamento das leveduras de alteração em função do anidrido sulfuroso, etanol e glucose através de um delineamento composto central rotacional.

Observando as estimativas ou efeitos dos diferentes factores relativamente ao crescimento das leveduras em estudo foi possível concluir que estas são significativamente inibidas pelo efeito do sulfuroso e etanol assim como pela interacção destes factores.

Comparando os resultados de crescimento obtidos, foi possível concluir que a *S. ludwigii* foi a mais resistente aos factores inibidores sulfuroso e etanol. A *D. bruxellensis* revelou-se a mais susceptível das leveduras apesar de ter demonstrado uma capacidade de resistência progressivamente maior ao longo do tempo. Demonstrou ainda uma grande diversidade de comportamentos. Foi possível observar tal como Du Toit, *et al.* (2005) a existência populações de células activas mas não cultiváveis após a adição de anidrido sulfuroso em ensaios com *Dekkera bruxellensis*. A glucose não favoreceu o crescimento das leveduras, tenho ainda revelado capacidades inibitórias acima de 8,4 g/L.

Ao contrário de Du Toit, *et al.* (2005) que recomenda que se mantenha um teor de 20 – 35 mg/L de sulfuroso livre em vinho a granel para prevenir o crescimento de *D. bruxellensis*, a partir dos resultados obtidos aconselha-se assim como Ribéreau-Gayon, *et al.* (2006) aconselha-se um nível mínimo de 30 mg/L de sulfitos livre a pH 3,5 para eliminar células viáveis de *D. bruxellensis*, ou mesmo até como Barata, *et al.* (2008) que sugere uma concentração de anidrido sulfuroso superior para evitar o crescimento celular. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de se terem usado populações de leveduras adaptadas a vinho, a razões de contaminação relativamente elevadas (aproximadamente 10^6 UFC/mL) em condições semi-aeróbias em frascos de Erlenmeyer. Assim, o nível de 1 mg/L de sulfito molecular deve ser considerada como um critério para utilização de anidrido sulfuroso quando os enólogos se confrontam com um grande crescimento de *D. bruxellensis* e corresponde à experiência em adega na prevenção de infecções graves. Para evitar o desenvolvimento celular das restantes estirpes deve ser mantida a dose de anidrido sulfuroso recomendado acima. No entanto, para *S. ludwigii* a estirpe mais resistente neste trabalho, como já foi referido, deve-se elevar a concentração de sulfuroso ou combinar com teores elevados de etanol. Uma vez que é bastante resistente poderá ser necessário proceder a outras técnicas de tratamento, como o tratamento, térmico por exemplo, num raro caso de contaminação.

É essencial adoptar um método de acompanhamento regular das leveduras de alteração para construir um historial de contaminação, mesmo quando os resultados

microbianos de controlo são nulos, porque o crescimento pode iniciar-se quando as condições se tornam favoráveis, principalmente no caso de contaminação com *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. O mecanismo fisiológico subjacente a este recurso não é ainda conhecido. Uscanga, *et al.* (2000) admitiu a hipótese de que a sua sobrevivência era um resultado de excepcional resistência a condições mínimas de nutrientes. Os resultados confirmam os de Barata, *et al.* (2008) de que *D. bruxellensis* não é mais resistente que *S. cerevisiae* aos principais inibidores como etanol e anidrido sulfuroso e assim, provavelmente, os mecanismos subjacentes à capacidade de sobrevivência a ambientes pobres em nutrientes é a chave para explicar a sua proliferação quando o meio envolvente se torna menos stressante.

A técnica de metodologia de resposta revelou ser uma técnica bastante vantajosa, dando origem a resultados bastante abrangentes, rápidos que exigem a análise de poucas amostras. É uma ferramenta bastante útil para enólogos, depois da validação e optimização dos modelos.

É ainda necessário confirmar estes resultados, de forma a conduzir a modelos mais precisos e aplicáveis nas práticas enológicas. Deverão ainda ser adoptadas outras técnicas de FISH de forma a confirmar os estados “viável mas não cultivável” da *Dekkera bruxellensis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., Nuti, M., 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 143 (1-2), pp. 76-80.

Agnolucci, M., Scarano, S., Rea, F., Toffanin, A., Nuti, M., 2007. Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed Sangiovese grapes by real time PCR. *Italian Journal of Food Science*, Volume 19 (2), pp. 153-164.

Aguilar-Uscanga, M. G., Délia, M.-L., Strehaiano, P., 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 61 (2), pp. 157-162.

Arneborg, N., Jespersen, L., Jakobsen, M., 2000. Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Archives of Microbiology*, Volume 174 (1-2), pp. 125-128.

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*, Volume 121 (2), pp. 201-207.

Barata, A., Pagliara, D., Piccinino, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Research*, Volume 8 (7), pp. 1097-1102.

Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S., Drawert, F., 1986. Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 37 (9), pp. 927-943.

Beech, F. W., Davenport, R. R., 1983. New prospects and problems in the beverage industry. In: T. A. Roberts, F. A. Skinner, edits. *Food Microbiology: advances and prospects*. London: The Society for Applied Bacteriology Symposium Series N° 11. Academic Press, pp. 241-256.

Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Palmero, D., Suárez-Lepe, J.A., 2013. Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *European Food Research Technology*, Volume 236 (1), pp. 29-36.

Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A., 2012. New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, Volume 47 (10), pp. 2101-2108.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, Volume 76 (5), pp. 965-977.

Bisson, L. F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 50 (1), pp. 107-119.

Blackburn, C., 2006. *Food spoilage microorganisms*. Cambridge: Woodhead.

Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P., 1982. A study of cellobiose fermentation by *Dekkera* strain. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 24 (9), pp. 2031-2037.

Boekhout, T., Robert, V., Smith, M. T., Stalpers, J., Yarrow, D., Boer, P. D., Gijswijt, G., Kurtzman C. P., Fell, J. W., Gueho, E., Guillot, J., Roberts, I., 2002. *Yeasts of the World - Morphology, physiology, sequences and identification*. s.l.:UNESCO Publishing.

Boidron, J. N., Chatonnet, P., Pons, M., 1988. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, Volume 22 (4), pp. 275-294.

Boulton, B., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R., 1996. *Principles and Practices of Winemaking*. New York: Chapman and Hall.

Box, G., Behnken, D., 1960. Some new three level desing for the study of quantitative variables. *Technometrics*, Volume 2 (4), pp. 455-475.

Buchanan, R., Stahl, H., Whiting, R., 1989. Effects and interaction of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Protection*, Volume 52 (12), pp. 844-851.

Cardoso, A., 2005. O SO₂ na vinificação de tintos. In: *Tecnologia dos vinhos tintos*. Coimbra: Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, pp. 107-119.

Charpentier, C., Feuillat, M., 1993. Yeast autolysis. In: G. H., Fleet, ed. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur, Switzerland: Hardwood Academic Publishers, pp. 225-242.

Chatonnet, P., Boidron, J., Dubourdieu, D., 1993. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barrique sur le teneur en acide et en ethylphenols. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, Volume 27 (4), pp. 277-298.

Chatonnet, P., Boidron, J. N., Pons, M., 1990. Élevage des vin rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sciences des Aliments*, Volume 10 (3), pp. 565-587.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., 1995. The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 46 (4), pp. 463-468.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Lavigne, V., 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of Science of Food and Agriculture*, Volume 62 (2), pp. 191-202.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The Origin of Ethylphenols in Wines. *Journal of Science of Food and Agriculture*, Volume 60 (2), pp. 165-178.

Chatonnet, P., Viala, C., Dubourdieu, D., 1997. Influence of polyphenolic compounds of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 48 (4), pp. 443-448.

Ciolfi, G., 1991. Ecologia dei lieviti vinari. *Vinid'Italia*, Volume 33, pp. 41-46.

Cole, M., Keenan, M., 1987. Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii*, and its implications in weak-acid resistance. *Yeast*, Volume 3 (1), pp. 23-32.

Conterno, L., Joseph, C., Arvik, T., Henick-Kling, T., Bisson, L., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 57 (2), pp. 139-147.

Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, Volume 25 (2), pp. 422-427.

Déak, T., Beuchat, L., 2007. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. 2nd ed. EUA: CRC Press.

Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, Loureiro, V., 2003. Identification of yeast isolated from wine-related environment and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*, Volume 20 (5), pp. 567-574.

Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, Volume 20, pp. 377-384.

Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 99 (1), pp. 85-93.

Du Toit, M., Pretorius, I. S., 2000. Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature's Own Arsenal - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, Volume 21, pp. 74-96.

Du Toit, W., Pretorius, I., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 98 (4), pp. 862-871.

Dubois, P., 1994. Les arômes des vins et leurs défauts. *Revue Française d'Oenologie*, Volume 34 (135), pp. 27-40.

Dugeley, I., Gunata, Z., Sapis, J. C., Baumes, R., Bayonove, C., 1993. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 41 (11), pp. 2092-2096.

Edlin, D., Narbad, A., Gasson, M., Dickinson J., Lloyd, D., 1998. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 22 (4), pp. 232-239.

Estevinho, M., 1996. *Zygosaccharomyces bailii* a ambientes extremos: estudos da toxicidade e da utilização do ácido acético e de outros ácidos monocarboxílicos. PhD Thesis, Braga, Portugal: Universidade do Minho.

Fernandes, L., Côrte-Real, M., Loureiro, V., Loureiro-Dias, M. C., Leão, C., 1997. Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid. *Lett. Appl. Microbiol.*, Volume 25 (4), pp. 249-253.

Fernández-Espinar, M., Martorell, O., de Llanos, R. e Querol, A., 2006. Molecular methods to identify and characterized yeast in food and beverages. In: A. Querol e G. Fleet, ed. *Yeast in Food and Beverages*. Germany: Springer-Verlag, pp. 55-82.

Fleet, G., 1992. Spoilage yeasts. *Crti. Rev. Biotechnol.*, Volume 12 (1-2), pp. 1-44.

Fleet, G., 1998. Microbiology of alcoholic beverages. In: B. Wood, ed. *Microbiology of Fermented Foods*. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, pp. 217-262.

Fleet, G., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 86, pp. 11-22.

Fleet, G., Prakitchaiwattana, C., Beh, A., Heard, G., 2002. The yeast ecology of wine grapes. In: Ciani. M. ed. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Kerala, India: Reasearch Signpost, pp. 1-17.

Freer, S., 2002. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeast. *World Journal of Microbial Biotechnology*, Volume 18 (3), pp. 271-275.

Freer, S., Dien, B., Matsuda, S., 2003. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeast under conditions of constant pH. *World Journal of Microbial Biotechnology*, Volume 19 (1), pp. 101-105.

Froudière, I. e Larue, F., 1989. *Conditions de survie de Brettanomyces (Dekkera) dans le mout de raisin et le vin*. Dunod, Bordeaux, France, Séances du Symposium International d'Oenologie, pp. 297-303.

Fugelsang, K., Charles, E., 2007. *Wine Microbiology*. 2nd ed. s.l.:Springer.

Fugelsang, K., Zoecklein, B., 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noit (*Vitis vinifera* L.) wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 54 (4), pp. 294-300.

Gaia, P., 1987. Caracterizzazione tassonomica ed enologica de lieviti anomali fonte di inquinamento dei vini. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, Volume 18, pp. 290-305.

Gao, C., Fleet, G., 1995. Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology*, Volume 12, pp. 65-71.

Gerbaux, V., Vincent, B., Bertrand, A., 2002. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of valitle phenols in Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 53 (2), pp. 131-137.

Gibson, A., Bratchell, N., Roberts, T., 1988. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 6 (2), pp. 155-178.

Glories, Y., 1984 a. *La couleur des vins rouges II*. s.l., Connaissance de la vigne et du vin, pp. 253-271.

Glories, Y., 1984. *La couleur des vins rouges I*. s.l., Conn. Vigne Vin, pp. 195-217.

Godden, P., Gishen, M., 2005. Trends in the composition of Australian wine. *The Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, Volume 20 (5), pp. 21-46.

González-Arenzana, L., Santamaría, P., López, R., Garijo, P., Gutiérrez, A., Garde-Cerdán, T., López-Alfaro, I., 2013. Microwave technology as a new tool to improve microbiological control of oak barrels: a preliminary study. *Food Control*, Volume 30 (2), pp. 536-539.

Goswell, W., 1986. Chapter 3. Microbiology of table wines. In: R. R., ed. *Developments in Food Microbiology*. New York: Elsevier Applied Science, pp. 21-67.

Grbin, P., Henschke, P., 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Volume 6 (3), pp. 255-262.

Guilloux-Benatier, M., Chassagne, D., Alexandre, H., Charpentier, C., Feuillat, M., 2001. Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of *Brettanomyces/Dekkera* in wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, Volume 35, pp. 157-164.

Hammond, S., Carr, J., 1976. The antimicrobial activity of SO₂ with particular reference to fermented and non-fermented fruit juices. In: F. S., W. Hugo, ed. *Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes*. London: Academic Press, pp. 89-110.

Henick-Kling, T., 1988. Yeast and bacteria control in winemaking. In: H. L. a. J. J., ed. *Wine analysis*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 276-316.

Henschke, P., 1997. Yeast Sugar Metabolism. In: *Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. s.l.:Technologic Publishing CO, pp. 527-546.

Heresztyn, T., 1986. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology*, Volume 146 (1), pp. 96-98.

Ibeas, J., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J., 1997. Effects of ethanol and temperature on the biological aging of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 48 (1), pp. 71-74.

Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, I., 2003. The occurrence of non-Saccharomyces cerevisiar yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, Volume 24 (2), pp. 35-42.

Kalathenos, P., Sutherland, J., Roberts, T., 1995. Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acis present in wine. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 78 (3), pp. 245-250.

Khuri, A., Cornell, J., 1987. *Response Surfaces*. New York: Marcel Dekker Inc..

King, A., Pointing, J., Sanshuck, D., Jackson, R., Mihara, K., 1981. Factors affecting death of yeast by sulphur dioxide. *Journal of Food Protection*, Volume 44 (2), pp. 92-97.

Kluyver, A., 1914. *Biochemische suikerbepalingen*. PhD Thesis, Delft, Netherlands: Deft University of Technology.

Kunkee, R., Bisson, L., 1993. Wine-making yeasts. In: *The Yeasts*. 2^a ed. Londres: Academic Press, pp. 69-127.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier.

Larue, F., Rozes, N. Froudière, I. Couty, C., Parreira, G.P., 1991. Incidence du développement de Dekkera/Brettanomyces dans les mouts et les vins. *Journal Internationale du Science de Vigne et du Vin*, Volume 25, pp. 149-165.

Loureiro, V., 1996. Subtilezas aromáticas dos vinhos de qualidade. *Revista dos Vinhos*, Volume 75, pp. 42-46.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 86 (1-2), pp. 23-50.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2006. Spoilage activities of Dekkera/Brettanomyces spp.. In: C. Blackburn, ed. *Food Spoilage Microorganisms*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, pp. 354-398.

Macris, B., Markakis, P., 1974. Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Journal of Science of Food and Agriculture*, Volume 25 (1), pp. 21-29.

Malfeito-Ferreira, M., 1990. *Ecologia, Fisiologia e Controlo Microbiológico de Leveduras de Alteração de Alimentos. Síntese bibliográfica apresentada para provas de aptidão pedagógica e capacidade científica*, Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.

Malfeito-Ferreira, M., 2010. Yeasts and wine-off-flavours: a technological perspective. *Ann Microbiol*, Volume 61 (1), pp. 95-102.

Malfeito-Ferreira, M., Lopes, J., Loureiro, V., 1989. *Infecting yeasts in Portuguese bottled white-wines*. Leuven, Belgium, s.n.

Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N., Loureiro, V., 2001. The influence of oxygen on the "horse sweet taint" in red wines. *Italian Food and Beverage Technology*, Volume 24, pp. 34-38.

Marko, S. Dormedy, E., Fugelsang, K., Dormedy, D., Gump, B., Wample, R., 2005. Analyses of oak volatiles by gas-chromatography-mass spectrometry after ozone sanitation. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 56 (1), pp. 46-51.

McClure, P., Baranvi, J., Boogard, E., Kelly, T., Roberts, T., 1993. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 19, (3) pp. 161-178.

Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T., 1991. Advanced Statistical Methods. In: U. Florida, ed. *Sensory evaluation techniques*. s.l.:2, pp. 275-304.

Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, Volume 30 (2), pp. 136-141.

Montgomery, D. C., 1996. *Introduction to statistical quality control*. 3 ed. New York, EUA: s.n.

Morata, A., Benito, S., Loira, I., Palomero, F., González, M., Suárez-Lepe, J., 2012. Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during fermentation of red must. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 159 (1), pp. 47-53.

Myers, R., Montgomery, D., 2002. *Response Surface Methodology*. 2ª ed. Nova Iorque: Wiley & Sons, Inc.

Nickerson, W., Carroll, W., 1945. On the metabolism of *Zygosaccharomyces*. *Archives of Biochemistry*, Volume 7, pp. 257-271.

Peynaud, E., Domerq, S., 1959. A review of microbiological problems in winemaking in France. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 10 (2), pp. 69-77.

Peynaud, E., Sudraud, P., 1962. Utilisation de l'effet désacidifiant des *Schizosaccharomyces* en vinification de raisin acides. *Annual Technology Agriculture*, Volume 13, pp. 306-328.

Piper, P., Calderon, C., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, Volume 147 (10), pp. 2635-2642.

Pitt, J., Hocking, A., 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Sydney Australia: Academic Press.

Pitt, J., Hocking, A., 1999. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed ed. s.l.:Aspen Publishers: Gaithersburg M. D..

Porter, G., Lewis, A., Barnes, M., Williams, R., 2011. Evaluation of high power ultrasound porous cleaning efficacy in American oak wine barrels using X-ray tomography. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Volume 12 (4), pp. 509-514.

Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of the grape berries. *Microbiological Research*, Volume 162 (2), pp. 154-167.

Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Coulon, J., 2007. The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, Volume 41 (3), pp. 161-173.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd.

Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces* spp.. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 90 (4), pp. 588-599.

Rose, A., 1987. Responses to the chemical environment. In: A. H. R., J. S. Harrison, ed. *The Yeasts*. London: Academic Press, pp. 5-40.

Schmid, F., Grbin, P., Yap, A., Jirandel, V., 2011. Relative efficiency of high-pressure hot water and high-power ultrasonics for wine barrel sanitation. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 62 (4), pp. 519-526.

Shimizu, K., 1993. Killer yeasts. In: G. Fleet, ed. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur, Switzerland: Hardwood Academic Publishers, pp. 243-264.

Smith, M., 1998. Dekkera van der Walt/Brettanomyces Kufferath and van Laer. In: C. Kurtzman, J. Fell, edits. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier, pp. 174-177/450-453.

Snow, P., Gallander, J., 1979. Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 30 (1), pp. 45-48.

Sousa, M., Miranda, L., Côrte-Real, M., Leão, C., 1996. Transport of acetic-acid in *Zygosaccharomyces bailii* - effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments. *Applied Environmental Microbiology*, Volume 62 (9), pp. 3152-35127.

Sousa, M., Rodrigues, F., Côrte-Real, M., Leão, C., 1998. Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, Volume 144 (3), pp. 665-670.

Sponholz, W., 1992. Wine Spoilage by Microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. s.l.:Hardwood Academic Publishers, pp. 395-419.

Sponholz, W., 1993. Wine spoilage by microorganisms. In: G. Fleet, ed. *Wine Microbiology and biotechnology*. Chur, Switzerland: Hardwood Academic Publishers, pp. 395-420.

Stratford, M., Morgan, P., Rose, A., 1987. Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ludwigii*. *Journal of General Microbiology*, Volume 133, pp. 2173-2179.

Stratford, M., Rose, A., 1986. Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, Volume 132 (1), pp. 1-6.

Suárez-Lepe, J., Iñigo-Leal, B., 2004. *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación*. Madrid: Mundi Prensa.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, Volume 102, pp. 10-21.

Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., Remize, F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 129, pp. 237-243.

Thomas, D., 1983. *Susceptibility of wines to yeast spoilage*. Long Ashton Report, UK: University of Bristol.

Thomas, D., 1993. Yeasts as Spoilage Organisms in Beverages. In: *The Yeasts*. 2^a ed. London: Academic Press, pp. 517-561.

Thomas, D., Davenport, R., 1985. *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, Volume 2, pp. 157-275.

Uscanga, M., Delia, M., Strehaiano, P., 2000. Nutricional requirements of *Brettanomyces bruxellensis* growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, Volume 46 (11), pp. 1046-1050.

Usseglio-Tomasset, L., Bosia, P., 1984. La prima costante di dissociazione dell'ácido solforoso. *Vini d'Italia*, Volume 5, pp. 7-14.

van der Walt, J., van der Kerken, A., 1961. The wine yeasts of the Cape. Part V. Studies on the occurrence of *Brettanomyces schanderlii*. *Antonie Leeuwenhoek*, Volume 27, pp. 81-90.

van Uden, N., 1989. Alcohol toxicity in yeasts and bacteria. pp. 77-89.

Warth, A., 1985. Resistance of yeast species to benzoic acid and sorbic acid and to sulphur dioxide. *Journal of Food Protection*, Volume 564-569, p. 48.

Wedzicha, B., 1984. *Chemistry of Sulphur Dioxide in Foods*. London: Elsevier Applied Science Publishers.

Weeks, C., 1969. Production of sulphur dioxide-binding compounds and of sulphur dioxide by two *Saccharomyces* yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 20, pp. 32-39.

Weisberg, S., 1985. *Applied Linear Regression*. 2nd ed ed. New York: Wiley.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I - Composição dos meios utilizados

Meio GYP

Componentes	Quantidade (g)
Extracto de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, França)	5
Peptona (Biokar)	5
Glucose (Copam, Loures)	20
Agar-agar (Iberagar, Coima)	20
Água desmineralizada	1000 ml
Esterilização a 121 °C, 15 min e arrefecimento em banho termostático a 50 °C (P-Selecta, Barcelona, Espanha).	

Meio YNB (Yeast Nitrogen Base, base para classificação de leveduras)

Componentes	Quantidade (g)
YNB (Difco, EUA)	6,7
Glucose	20
Etanol	10 %
Água desmineralizada	1000 ml
Esterilização por filtração com membrana de acetato de celulose de porosidade 0,22 µm e 47 mm de diâmetro (Milipore, Massachusetts, EUA), após ajuste pH a 3,5 (± 0,05), por adição de uma solução de HCl (1 M).	

9.2. Anexo II - Acertos parâmetros de cada amostra

Valores finais				Acertos											
Amostra	Glucose (g/L)	Etanol % (v/v)	Sulfuroso livre (mg/L)	Aumento Glucose (g/L)	Adições				IPT Provável	Aumento IPT	Tanino a adicionar (g/l)	Adição			
					Vinho Base (mL)	Sol. Ác. Tartárico (5 g/L)	Glucose (g)	Solução MK (mg/mL)				Tanino (g)			
								5,04	12,60	20,16	25,2				
1	3,6	11,01	8	1,7	71,80	32,20	0,213	1				39,39	14,27	0,95	0,100
2	8,4	11,01	8	6,5	71,80	32,20	0,813	1				39,39	14,27	0,95	0,100
3	3,6	13,99	8	1,7	91,24	12,76	0,213	1				50,05	3,61	0,27	0,029
4	8,4	13,99	8	6,5	91,24	12,76	0,813	1				50,05	3,61	0,27	0,029
5	3,6	11,01	32	1,7	71,80	32,20	0,213			1		39,39	14,27	0,95	0,100
6	8,4	11,01	32	6,5	71,80	32,20	0,813			1		39,39	14,27	0,95	0,100
7	3,6	13,99	32	1,7	91,24	12,76	0,213			1		50,05	3,61	0,27	0,029
8	8,4	13,99	32	6,5	91,24	12,76	0,813			1		50,05	3,61	0,27	0,029
9	2	12,5	20	0,1	81,52	22,48	0,013		1			44,72	8,94	0,61	0,064
10	10	12,5	20	8,1	81,52	22,48	1,013		1			44,72	8,94	0,61	0,064
11	6	10	20	4,1	65,22	38,78	0,513		1			35,78	17,89	1,18	0,124
12	6	15	20	4,1	97,83	6,17	0,513		1			53,66			
13	6	12,5	0	4,1	81,52	22,48	0,513					44,72	8,94	0,61	0,064
14	6	12,5	40	4,1	81,52	22,48	0,513			1		44,72	8,94	0,61	0,064
15	6	12,5	20	4,1	81,52	22,48	0,513		1			44,72	8,94	0,61	0,064
16	6	12,5	20	4,1	81,52	22,48	0,513		1			44,72	8,94	0,61	0,064
17	6	12,5	20	4,1	81,52	22,48	0,513		1			44,72	8,94	0,61	0,064

9.3. Anexo III - Tabelas crescimento

Tabela 9.1. Culturabilidade *Zygosaccharomyces bailii* (Log UFC/ml) ao longo do tempo (dias)

	Glucose	Etanol	SO ₂ livre	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
1	3,6	11,0	8	4,42	4,17	4,51	4,44	4,39	4,31	4,44	4,15	3,82	3,69	4,02	1,26
2	8,4	11,0	8	4,44	4,35	4,44	4,44	4,44	4,36	4,38	4,28	4,26	3,76	3,82	2,78
3	3,6	14,0	8	4,37	4,76	4,42	4,34	4,27	4,17	4,00	2,90	1,30	<1,00	<1,00	<1,00
4	8,4	14,0	8	4,34	4,37	4,39	4,44	4,28	4,20	3,99	3,20	1,60	<1,00	<1,00	1,07
5	3,6	11,0	32	4,68	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
6	8,4	11,0	32	4,46	2,90	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
7	3,6	14,0	32	4,48	3,68	2,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
8	8,4	14,0	32	4,52	3,58	2,90	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
9	2,0	12,5	20	4,49	3,89	3,56	<1,00	1,90	1,78	1,65	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
10	10	12,5	20	4,54	4,25	4,03	3,20	3,33	3,09	3,13	2,88	2,00	<1,00	<1,00	<1,00
11	6	10	20	4,49	4,81	3,53	2,60	3,05	2,97	2,86	3,66	4,35	4,93	5,63	5,53
12	6	15	20	4,50	4,30	4,18	3,51	3,58	3,45	3,35	2,98	2,08	<1,00	<1,00	<1,00
13	6	12,5	0	4,63	4,46	4,51	4,52	4,32	4,27	4,31	4,00	3,66	2,45	2,26	<1,00
14	6	12,5	40	4,43	3,53	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
15	6	12,5	20	4,49	4,43	4,41	4,18	4,06	3,82	3,65	3,31	2,48	<1,00	<1,00	<1,00
16	6	12,5	20	4,56	4,42	4,21	3,73	3,53	3,41	2,72	1,90	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
17	6	12,5	20	4,51	4,40	4,36	4,10	3,93	3,81	3,63	3,28	2,26	<1,00	<1,00	<1,00
A	2,7	13,6	9	4,76	4,50	4,47	4,26	4,13	4,08	3,23	3,28	2,04	<1,00	<1,00	<1,00
B	1,8	15,3	10	4,62	4,28	2,78	2,90	2,30	2,78	2,06	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
C	2,2	12,6	9	4,82	3,91	<1,00	2,90	3,08	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
D	6	11,6	7	4,75	4,27	4,34	4,16	4,16	2,30	1,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

Tabela 9.2. Viabilidade das células *Schizosaccharomyces pombe* (Log UFC/ml) ao longo do tempo (dias)

	Glucose	Etanol	SO ₂ livre	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
1	3,6	11,0	8	6,44	5,47	5,56	5,08	4,78	5,28	5,28	5,23	5,28	5,20	5,07	3,58
2	8,4	11,0	8	6,51	5,40	5,38	4,52	5,70	4,79	4,90	5,08	5,55	5,23	5,20	5,72
3	3,6	14,0	8	6,56	5,42	5,27	4,16	2,30	4,51	4,58	4,58	3,51	2,54	2,26	6,00
4	8,4	14,0	8	6,58	5,49	5,43	4,97	4,79	4,77	4,87	4,54	3,58	2,66	1,81	<1,00
5	3,6	11,0	32	6,51	5,44	3,92	4,23	4,83	4,60	4,72	1,30	1,48	<1,00	5,00	6,37
6	8,4	11,0	32	6,53	5,46	3,79	3,30	3,89	2,60	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
7	3,6	14,0	32	6,52	5,61	3,83	3,45	4,38	3,00	2,90	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
8	8,4	14,0	32	6,53	5,36	3,48	2,90	3,13	3,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	3,64
9	2,0	12,5	20	6,63	5,49	4,72	4,39	4,02	3,97	4,06	3,76	2,60	3,26	2,00	2,80
10	10	12,5	20	6,65	5,42	4,30	3,78	3,20	2,78	2,60	2,60	1,74	1,74	1,40	2,19
11	6	10	20	6,84	5,47	4,67	4,48	4,38	4,26	3,98	3,89	3,72	3,23	2,30	5,81
12	6	15	20	6,41	5,54	4,38	4,09	3,90	3,56	3,08	2,78	1,18	1,18	<1,00	<1,00
13	6	12,5	0	6,56	5,32	3,79	3,38	3,82	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
14	6	12,5	40	6,54	5,60	<1,00	<1,00	1,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
15	6	12,5	20	6,54	5,40	<1,00	<1,00	2,27	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
16	6	12,5	20	6,58	5,24	<1,00	<1,00	1,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
17	6	12,5	20	6,55	5,60	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
A	2,7	13,6	9	5,29	4,58	4,53	4,42	4,36	4,34	4,07	3,92	3,57	2,85	<1,00	<1,00
B	1,8	15,3	10	5,30	4,53	3,58	3,98	<1,00	2,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
C	2,2	12,6	9	5,28	4,48	3,26	3,70	<1,00	<1,00	2,78	1,81	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
D	6	11,6	7	5,37	4,62	4,02	4,25	3,08	<1,00	3,98	2,77	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

Tabela 9.3. Viabilidade das células *Dekkera bruxellensis* (UFC/ml) ao longo do tempo (dias)

	Glucose	Etanol	SO ₂ livre	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
1	3,6	11,0	8	6,44	5,10	5,72	6,44	5,73	5,12	5,36	5,08	5,86	6,13	6,40	6,14
2	8,4	11,0	8	6,51	3,98	3,95	4,52	5,29	4,70	4,67	4,94	5,39	5,51	5,97	6,12
3	3,6	14,0	8	6,56	<1,00	2,30	2,88	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
4	8,4	14,0	8	6,58	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
5	3,6	11,0	32	6,51	<1,00	3,00	3,25	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
6	8,4	11,0	32	6,53	<1,00	<1,00	2,34	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
7	3,6	14,0	32	6,52	<1,00	3,00	2,60	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
8	8,4	14,0	32	6,53	<1,00	2,30	2,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
9	2,0	12,5	20	6,63	<1,00	2,60	2,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
10	10	12,5	20	6,65	<1,00	2,83	2,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
11	6	10	20	6,84	<1,00	<1,00	2,38	<1,00	2,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
12	6	15	20	6,41	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
13	6	12,5	0	6,56	6,45	6,38	6,56	6,82	6,78	5,79	5,60	5,73	5,65	5,98	5,62
14	6	12,5	40	6,54	<1,00	<1,00	2,38	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
15	6	12,5	20	6,54	<1,00	<1,00	2,75	<1,00	3,45	3,96	4,59	5,20	6,19	6,07	5,30
16	6	12,5	20	6,58	<1,00	<1,00	2,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	3,90	6,51	6,26	6,13
17	6	12,5	20	6,55	<1,00	<1,00	3,20	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
A	2,7	13,6	9	5,29	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
B	1,8	15,3	10	5,30	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
C	2,2	12,6	9	5,28	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
D	6	11,6	7	5,37	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

Tabela 9.4. Viabilidade das células *Saccharomyces ludwigii* (UFC/ml) ao longo do tempo (dias)

	Glucose	Etanol	SO ₂ livre	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
1	3,6	11,0	8	5,64	5,73	6,25	6,20	6,18	6,12	5,87	5,62	5,81	5,41	5,83	6,15
2	8,4	11,0	8	5,61	5,91	6,44	6,20	6,37	6,44	6,33	5,92	5,79	5,30	5,13	4,41
3	3,6	14,0	8	5,67	5,29	5,29	4,97	5,01	5,66	4,98	5,15	5,30	4,95	5,05	5,34
4	8,4	14,0	8	5,66	4,92	4,93	4,88	4,78	4,81	4,85	5,09	5,82	6,03	5,58	5,08
5	3,6	11,0	32	5,62	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	2,01	4,48	5,56	6,60	6,86	6,73	7,16
6	8,4	11,0	32	5,50	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	6,89	6,38
7	3,6	14,0	32	5,52	1,30	<1,00	1,30	1,17	1,60	2,02	2,84	5,30	5,66	5,89	5,00
8	8,4	14,0	32	5,60	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	2,02	1,73	<1,00	5,81	5,90	5,20
9	2,0	12,5	20	5,57	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	1,30	<1,00	3,51	5,69	5,93	5,15
10	10	12,5	20	5,54	1,60	1,30	2,15	3,35	4,03	5,91	6,55	6,52	5,76	5,61	5,68
11	6	10	20	5,53	4,19	5,05	6,08	6,15	6,72	6,48	6,42	6,22	6,03	5,85	6,00
12	6	15	20	5,54	1,60	3,30	<1,00	<1,00	<1,00	3,51	1,20	3,12	4,10	4,97	4,70
13	6	12,5	0	5,52	5,60	5,75	5,86	5,92	5,91	5,86	5,73	5,45	5,72	6,02	5,45
14	6	12,5	40	5,48	3,30	1,30	<1,00	1,60	2,04	3,00	4,90	5,75	5,82	5,73	5,00
15	6	12,5	20	5,42	1,30	<1,00	1,60	1,30	<1,00	2,92	3,94	5,60	5,78	5,43	5,73
16	6	12,5	20	5,90	2,97	2,96	2,85	3,56	4,50	4,82	5,62	5,68	5,18	5,73	5,38
17	6	12,5	20	5,93	4,53	4,78	5,41	5,41	5,46	4,99	5,32	5,38	4,82	5,06	4,98
A	2,7	13,6	9	4,82	4,73	4,51	4,38	4,63	4,15	4,10	4,31	4,20	4,05	4,15	5,50
B	1,8	15,3	10	4,96	4,53	3,83	3,60	3,81	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
C	2,2	12,6	9	4,91	4,37	4,15	4,10	3,86	3,38	3,37	4,12	4,88	4,49	4,29	5,00
D	6	11,6	7	4,97	4,51	3,92	3,99	3,76	3,76	4,16	5,80	5,71	5,43	5,38	5,52

Tabela 9.5 - Viabilidade das células *Saccharomyces cerevisiae* (UFC/ml) ao longo do tempo (dias)

	Glucose	Etanol	SO ₂ livre	0	1	2	3	4	5	7	11	15	20	30	60
1	3,6	11,0	8	5,72	5,91	5,85	6,01	6,11	6,34	6,39	6,01	5,66	5,78	5,09	3,58
2	8,4	11,0	8	5,86	5,86	6,03	6,37	6,36	6,47	5,97	5,72	4,78	4,62	4,21	3,58
3	3,6	14,0	8	5,51	5,41	5,28	4,53	4,61	5,31	4,76	4,73	2,30	1,54	<1,00	<1,00
4	8,4	14,0	8	5,66	5,60	5,75	5,39	4,82	4,53	4,19	3,95	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
5	3,6	11,0	32	5,64	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	1,54	2,56	3,63	5,28	5,52	5,24
6	8,4	11,0	32	5,75	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	3,23	5,40
7	3,6	14,0	32	5,85	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	2,05
8	8,4	14,0	32	5,73	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	2,05
9	2,0	12,5	20	5,72	4,30	1,30	1,18	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
10	10	12,5	20	5,70	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	1,60	<1,00	2,72	1,60
11	6	10	20	5,62	4,60	3,53	5,60	6,20	6,36	6,73	6,29	4,78	5,10	5,28	5,14
12	6	15	20	5,60	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
13	6	12,5	0	5,68	5,51	5,58	5,60	5,73	5,35	5,35	5,60	5,30	5,64	4,30	<1,00
14	6	12,5	40	5,56	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
15	6	12,5	20	5,51	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
16	6	12,5	20	5,86	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	1,18
17	6	12,5	20	5,98	<1,00	<1,00	1,30	<1,00	<1,00	1,30	<1,00	1,18	1,65	1,81	2,20
A	2,7	13,6	9	4,99	5,07	4,95	4,69	5,18	4,08	3,08	1,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
B	1,8	15,3	10	5,12	3,95	4,35	4,28	<1,00	3,08	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
C	2,2	12,6	9	5,07	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
D	6	11,6	7	5,15	3,99	3,78	3,68	3,53	3,20	2,15	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

9.4. Anexo V - Composição físico - química de cada estirpe

Tabela 9.6. Composição físico-química dos vinhos inoculados com *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270

<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270			Final 60 dias																
Parâmetro químico	Inicial	Ajustado	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	
Acidez volátil corrigida em ácido acético (g/l)	0,64	0,62	0,48	0,42	0,66	0,60	0,54	0,54	0,30	0,24	0,27	0,24	0,27	0,30	0,30	0,33	0,30	0,30	
pH	3,50	3,59	3,31	3,30	3,55	3,52	3,30	3,30	3,55	3,55	3,42	3,20	3,42	3,45	3,44	3,45	3,46	3,44	
Anidrido sulfuroso livre (mg/l)	10	9	4	4	5	5	5	6	3	7	6	6	7	6	6	6	6	6	
Anidrido sulfuroso total (mg/l)	38	38	31	34	4	45	51	48	56	59	54	43	47	47	60	49	50	48	
Índice de fenóis totais	—————	54,3	36,6	40,1	47,9	49,0	53,3	51,1	50,0	51,6	51,4	49,7	41,6	49,3	50,0	53,1	49,2	49,7	
Intensidade da cor	—————	—————	0,482	0,517	0,804	0,829	0,781	0,763	0,839	0,853	0,825	0,638	0,704	0,739	0,797	0,835	0,813	0,801	
Tonalidade da cor	—————	—————	1,140	1,077	1,166	1,147	1,136	1,104	1,148	1,117	1,12	0,919	1,099	1,167	1,118	1,136	1,103	1,108	
Brilho (%)	—————	—————	29,5	33,03	28,92	30,2	31,67	33,33	30,48	33,47	32,14	42,95	33,44	29,25	32,45	31,39	33,19	32,89	

Tabela 9.7. Composição físico-química dos vinhos inoculados com *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000		Final 60 dias																	
Parâmetro químico	Ajustado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Acidez volátil corrigida em ácido acético (g/l)	0,69	0,48	0,49	0,55	0,61	0,58	0,49	0,56	0,56	0,55	0,49	0,49	0,56	0,55	0,56	0,56	0,56	0,56	
pH	3,44	3,51	3,50	3,50	3,49	3,50	3,49	3,47	3,47	3,49	3,48	3,52	3,49	3,50	3,46	3,46	0,35	0,35	
Anidrido sulfuroso livre (mg/l)	9	6	10	6	10	8	10	13	10	16	6	13	26	6	10	10	6	6	
Anidrido sulfuroso total (mg/l)	78	42	45	45	42	46	45	45	45	45	42	48	58	35	42	45	35	45	
Índice de fenóis totais	56,3	36,5	39,9	37,8	40,4	44,2	47,9	48,0	47,1	45	47,9	42,4	48,1	38,4	49,6	47,4	47,8	47,7	
Intensidade da cor	0,750	0,425	0,549	0,572	0,646	0,576	0,667	0,793	0,805	0,673	0,801	0,523	0,875	0,565	0,836	0,838	0,833	0,765	
Tonalidade da cor	1,150	0,964	0,909	0,940	0,963	0,903	0,907	0,951	0,954	1,040	1,014	0,909	0,938	0,996	0,951	0,997	1,000	1,012	
Brilho (%)	—————	39,32	41,93	42,08	40,88	42,94	43,45	41,67	41,51	37,08	37,82	41,94	42,24	38,34	41,43	38,86	38,64	38,16	

Tabela 9.8. Composição físico-química dos vinhos inoculados com *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190

<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190		Final 60 dias																
Parâmetro químico	Ajustado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Acidez volátil corrigida em ácido acético (g/l)	0,58	0,42	0,21	0,45	0,45	0,20	0,45	0,52	0,46	0,34	0,40	0,33	0,52	0,40	0,40	0,40	0,39	0,45
pH	3,50	3,52	3,54	3,53	3,53	3,53	3,52	3,51	3,49	3,51	3,48	3,48	3,49	2,20	2,35	2,15	2,15	2,30
Anidrido sulfuroso livre (mg/l)	9	7	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6
Anidrido sulfuroso total (mg/l)	44	36	31	30	33	36	33	27	35	28	33	31	32	31	32	30	31	32
Índice de fenóis totais	57,6	49,0	47,1	44,9	50,1	64,0	65,3	48,4	54,8	37,8	41,0	32,8	52,1	62,9	63,0	57,1	61,4	62,6
Intensidade da cor	0,764	0,772	0,661	0,804	0,950	0,818	0,848	0,907	0,925	0,637	0,745	0,596	1,141	1,033	1,156	0,942	1,107	1,073
Tonalidade da cor	0,828	1,030	0,946	0,940	0,947	<1,00 ₁	1,043	0,897	0,906	0,888	0,894	0,856	0,764	0,903	0,762	0,783	0,765	0,764
Brilho (%)	————	35,8	39,09	39,86	40,55	36,7	35,41	43,54	41,69	42,76	43,27	45,07	43,51	55,07	54,86	52,69	55,22	54,88

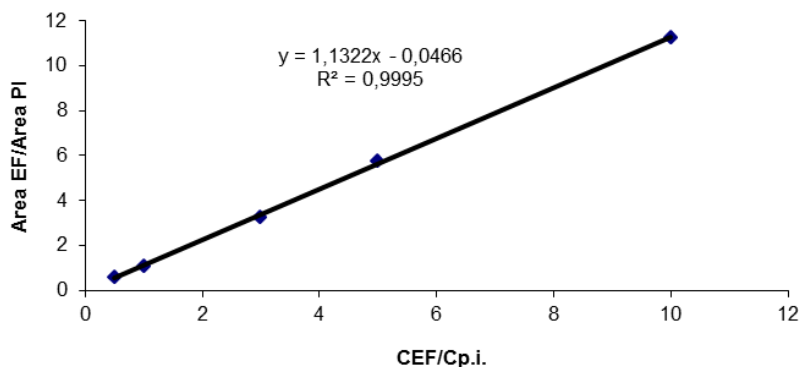
Tabela 9.9. Composição físico-química dos vinhos inoculados com *Saccharomyces ludwigii* ISA 1083

<i>Saccharomyces ludwigii</i> ISA 1083			Final 60 dias															
Parâmetro químico	Inicial	Ajustado	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Acidez volátil corrigida em ácido acético (g/l)	0,56	0,58	0,58	0,40	0,41	0,38	0,25	0,42	————	————	0,45	0,29	0,47	0,41	0,33	0,41	0,40	0,40
pH	3,40	3,50	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————
Anidrido sulfuroso livre (mg/l)	32	9	13	11	10	10	————	11	11	10	8	8	————	————	12	10	10	10
Anidrido sulfuroso total (mg/l)	86	44	170	101	56	68	————	72	80	51	75	68	————	————	78	54	52	68
Índice de fenóis totais	58,9	57,6	41,0	46,8	42,6	45,1	45,2	44,6	48,2	————	44,9	42,0	————	37,9	48,0	46,3	42,1	43,0
Intensidade da cor	0,753	0,764	0,539	0,709	0,710	0,817	0,685	0,774	0,850	0,852	0,734	0,511	————	0,514	0,802	0,688	0,627	0,616
Tonalidade da cor	0,868	0,828	0,903	0,788	0,870	0,842	0,842	0,878	0,855	0,856	0,842	0,860	————	0,907	0,821	0,864	0,864	0,862
Brilho (%)	————	————	40,89	48,42	42,75	44,44	45,9	42,5	44,01	44,03	44,84	44,42	————	41,56	45,84	43,83	43,73	43,61

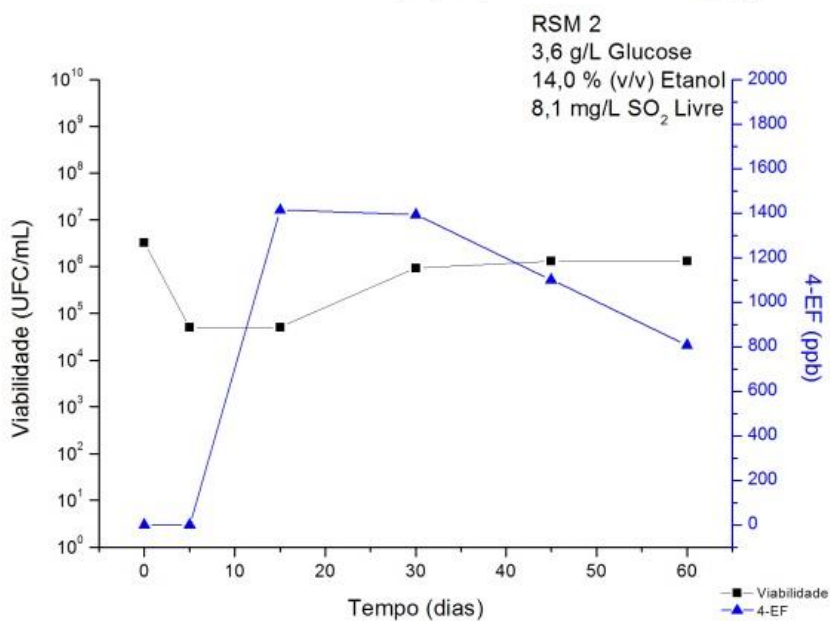
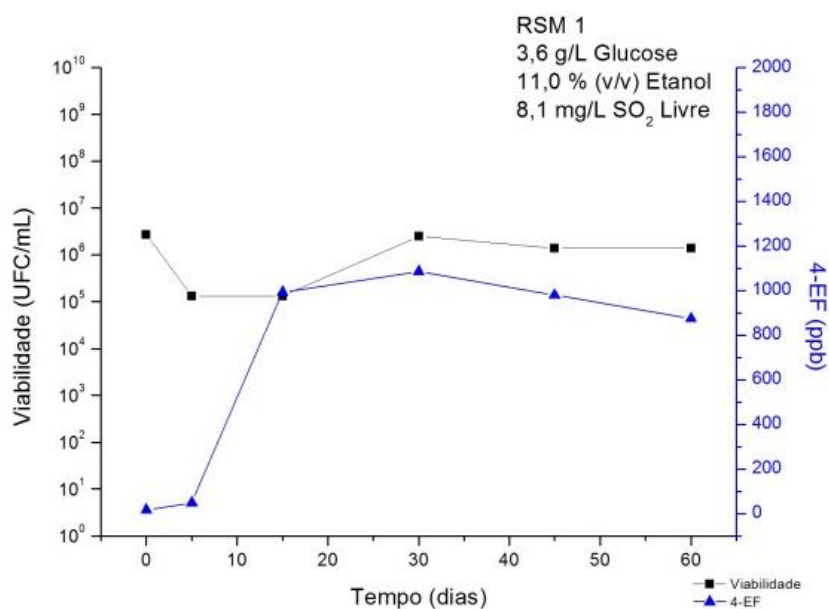
Tabela 9.10. Composição físico-química dos vinhos inoculados com *Dekkera bruxellensis* ISA 2211

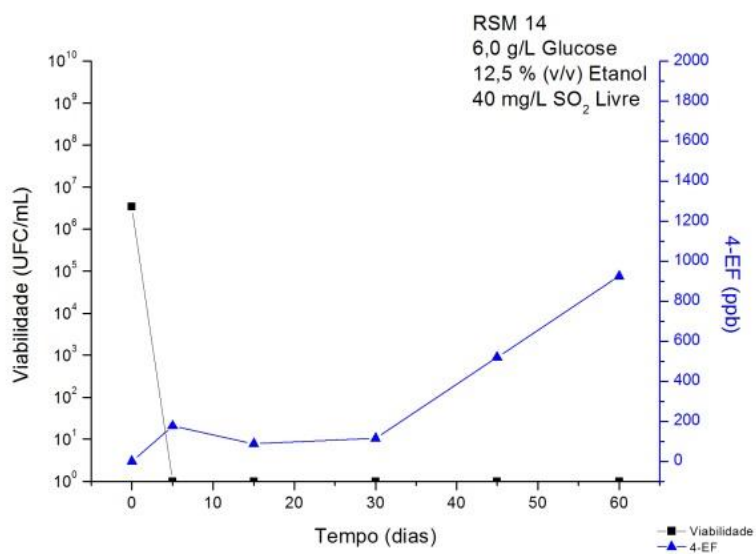
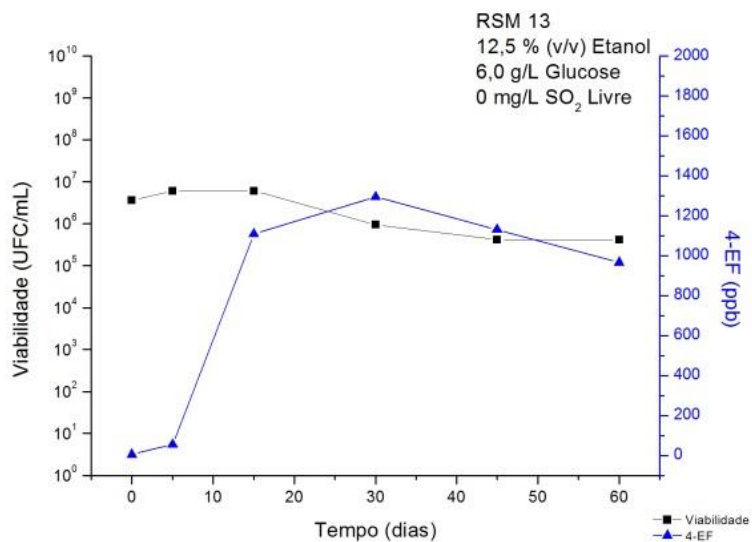
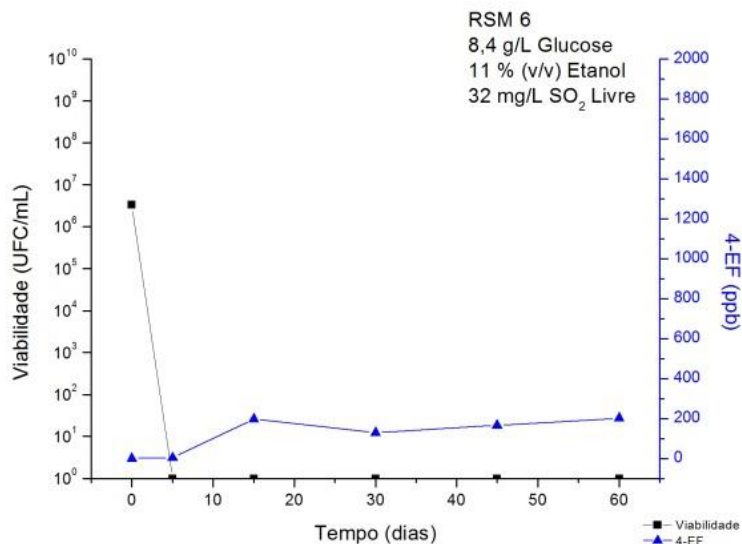
<i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211		Final 60 dias																
Parâmetro químico	Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Acidez volátil corrigida em ácido acético (g/L)	0,58	1,05	0,92	0,51	0,54	0,48	0,38	0,48	0,44	0,45	0,40	0,34	0,51	1,05	0,57	0,57	0,96	0,43
pH	3,50	3,52	3,49	3,48	3,49	3,48	3,50	3,49	3,48	3,48	3,49	2,23	2,26	3,54	3,48	3,48	3,81	3,48
Anidrido sulfuroso livre (mg/L)	9	6	8	6	8	8	11	10	8	7	6	8	7	7	6	8	8	6
Anidrido sulfuroso total (mg/L)	44	46	45	45	52	65	49	53	48	45	47	46	53	42	44	53	44	43
Índice de fenóis totais	57,6	49,7	49,4	49,1	49,0	53,4	37,8	53,7	47,1	56,9	60,8	62,3	51,7	41,6	42,3	38,2	40,8	42,6
Intensidade da cor	0,764	0,64	0,657	0,755	0,693	0,722	0,622	0,829	0,786	0,714	0,762	0,724	1,103	0,712	0,723	0,598	0,691	0,737
Tonalidade da cor	0,828	0,983	0,916	1,027	0,99	1,073	0,975	0,997	0,956	1,058	1,072	0,855	0,681	0,885	0,871	0,840	0,876	0,894
Brilho (%)	—	39,66	43,34	37,98	39,65	35,03	40,49	39,47	41,74	35,94	35,24	51,09	59,74	44,99	43,12	46,18	45,62	44,71

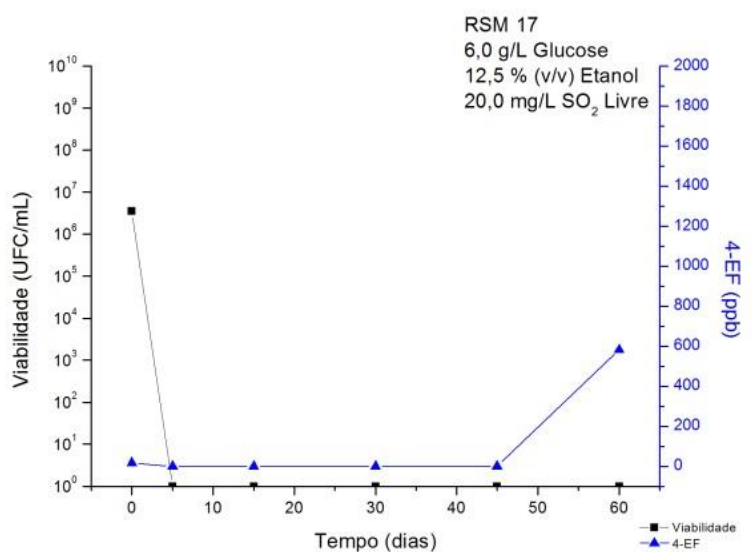
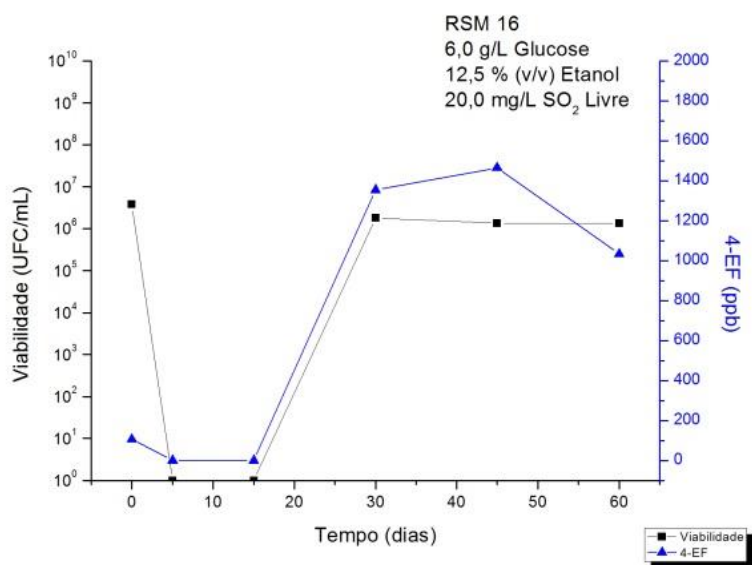
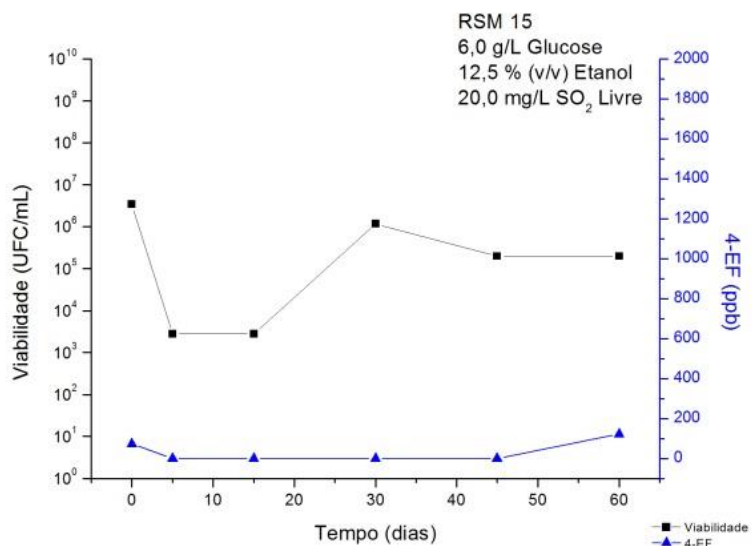
9.5. Anexo VI – Curva de calibração para a determinação da concentração de 4-etilfenol por cromatografia gasosa.

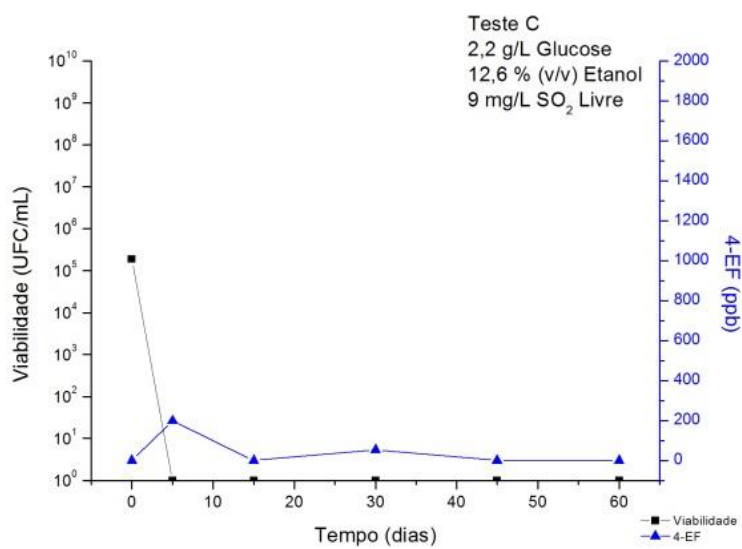
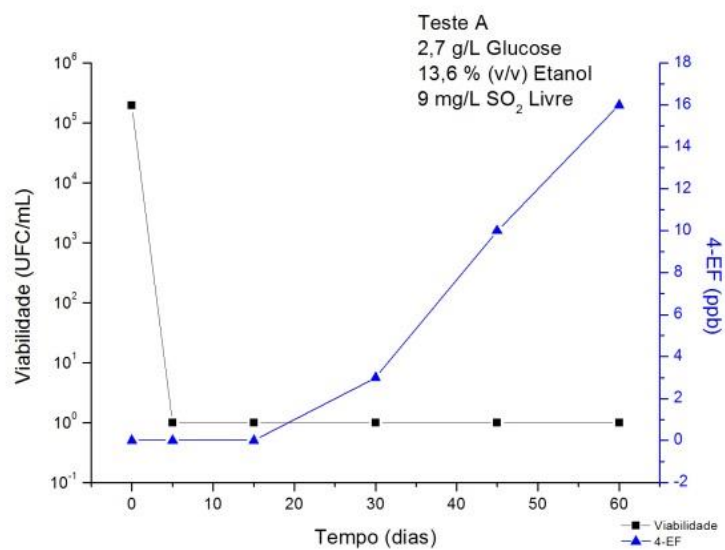


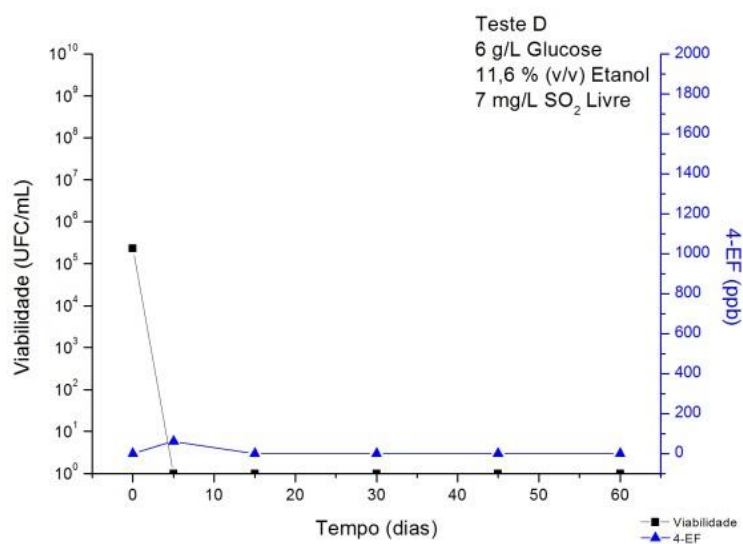
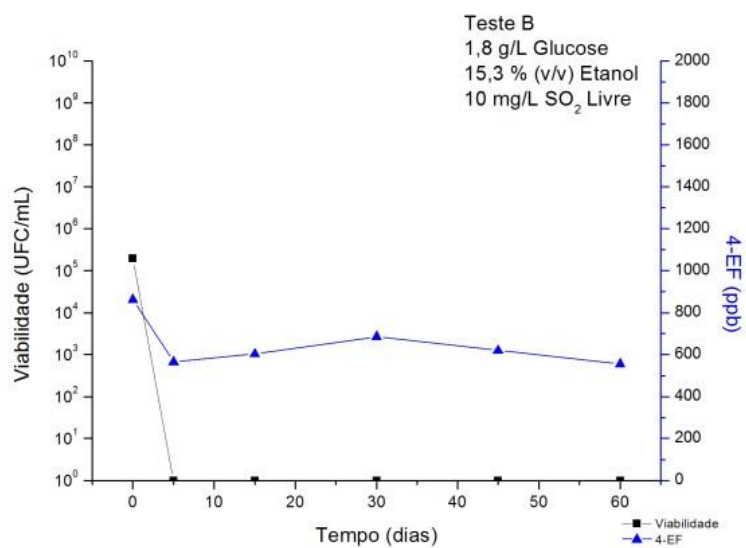
9.6. Anexo VII – 4-Etilfenol gráficos



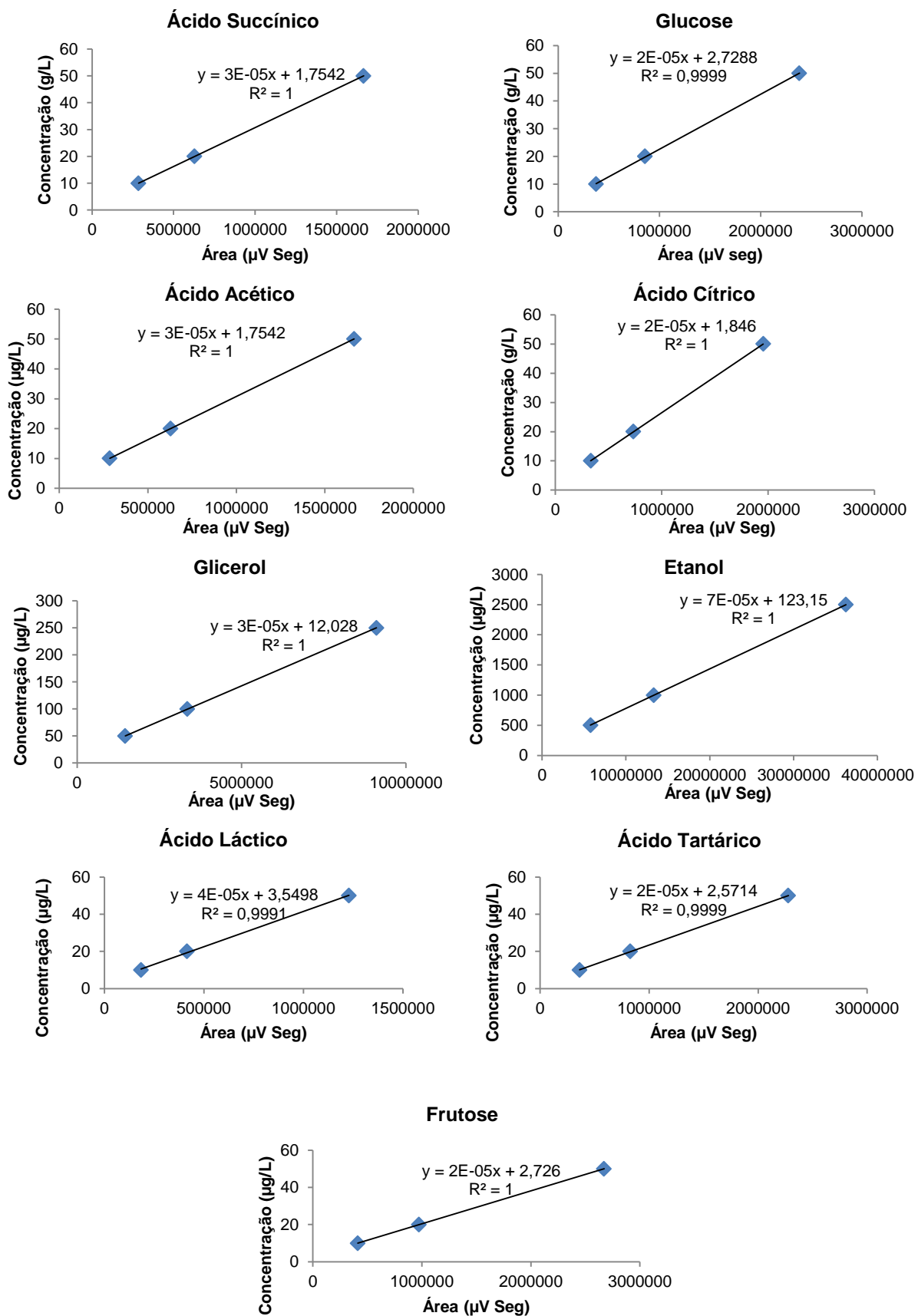








9.7. Anexo VIII – Curvas de calibração do HPLC para determinação das concentrações dos compostos.



9.8. Anexo IX – Evolução das concentrações dos compostos por análise de HPLC

Tabela 9.11. Resultados de HPLC - *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270

Amostra	Condição inicial	Tempo	Ác. Cítrico	Ác. Tartárico	Glucose	Frutose	Á. Succínico	Ác. Láctico	Glicerol	Ác. Acético	Etanol
1		0	0,429	1,819	3,566	0,533	1,087	2,254	7,202	0,360	10,676
	G - 3,6	15	0,428	3,347	3,631	0,591	1,100	1,933	7,265	0,355	10,445
	E - 11	30	0,347	0,944	2,842	0,208	0,268	0,702	4,596	0,132	11,162
	S - 8	60	0,372	1,328	3,734	0,775	0,811	0,331	1,150	1,090	7,690
2		0	0,584	1,953	8,333	0,672	0,944	1,866	6,871	0,320	10,390
	G - 8,4	15	0,577	3,322	2,683	0,616	1,088	1,902	7,020	0,329	10,304
	E - 11	30	0,539	1,185	5,686	-	0,807	1,125	4,737	0,161	10,079
	S - 8	60	0,379	0,984	5,301	-	0,843	0,848	4,351	0,120	10,127
3		0	0,559	0,933	3,566	0,662	1,240	2,488	9,050	0,497	13,080
	G - 3,6	15	0,485	1,474	3,570	0,663	1,365	2,396	8,995	0,413	12,841
	E - 14	30	0,485	0,876	2,823	0,191	0,347	0,910	5,879	0,176	14,329
	S - 8	60	0,369	0,557	2,750	-	0,843	0,854	6,589	0,120	14,106
4		0	0,664	1,113	8,344	0,563	1,173	2,342	8,580	0,433	13,202
	G - 8,4	15	0,602	1,483	8,363	0,700	1,313	2,319	8,705	0,396	12,484
	E - 14	30	0,704	1,147	5,777	-	1,098	1,541	6,154	0,348	13,606
	S - 8	60	0,652	1,241	8,937	-	1,236	1,211	9,743	0,149	13,626
5		0	0,476	1,390	3,588	0,632	0,943	1,905	7,047	0,326	10,317
	G - 3,6	15	0,182	2,393	3,451	0,172	0,672	1,740	7,043	0,325	10,139
	E - 11	30	0,145	0,786	2,789	-	0,264	0,728	4,463	0,158	10,376
	S - 32	60	0,462	1,040	6,263	-	0,791	0,959	7,043	0,138	10,881
6		0	0,586	1,421	8,242	0,664	0,922	1,840	6,799	0,316	10,392
	G - 8,4	15	0,499	1,600	5,741	-	0,806	1,163	4,838	0,133	10,637
	E - 11	30	0,582	1,121	5,751	-	0,904	1,288	4,990	0,301	10,640
	S - 32	60	0,542	1,181	8,726	-	0,996	1,057	7,702	0,152	9,952
7		0	0,538	1,227	3,622	0,639	1,173	2,371	8,816	0,388	12,999
	G - 3,6	15	0,165	1,144	3,463	0,189	0,821	2,165	8,850	0,376	12,690
	E - 14	30	0,673	1,280	2,970	-	1,115	1,853	6,458	0,361	10,893
	S - 32	60	0,627	1,316	3,894	-	1,272	1,388	10,205	0,177	11,534
8		0	0,595	1,098	8,377	0,816	1,187	2,358	8,611	0,443	12,872
	G - 8,4	15	0,656	1,548	8,627	0,700	1,360	2,364	8,904	0,409	12,889
	E - 14	30	0,681	1,156	5,772	-	1,102	1,962	6,158	0,354	12,644
	S - 32	60	0,644	1,151	3,597	-	1,110	0,783	7,835	0,184	12,381
9		0	0,395	1,349	1,970	0,475	0,954	2,108	8,080	0,374	11,300
	G - 2,0	15	0,264	1,950	1,988	0,607	1,228	2,176	8,188	0,375	12,238
	E - 12,5	30	0,588	1,315	2,051	0,609	1,016	1,823	5,861	0,337	10,521
	S - 20	60	0,630	1,200	1,948	0,128	0,385	1,737	3,401	0,139	11,368
10		0	0,596	1,421	10,032	0,758	1,069	2,119	7,719	0,400	10,740
	G - 10	15	0,333	1,843	10,312	0,365	0,976	1,961	7,844	0,351	10,707
	E - 12,5	30	0,637	1,349	7,034	-	1,057	1,837	5,749	0,337	9,089
	S - 20	60	0,590	1,116	10,595	-	1,122	1,237	5,366	0,172	11,197
11		0	0,476	1,825	6,088	0,610	0,876	1,737	6,386	0,305	8,610
	G - 6	15	0,384	3,290	6,111	0,531	0,861	1,650	6,522	0,305	9,149
	E - 10	30	0,496	1,301	3,283	-	0,898	1,017	3,110	0,169	9,998
	S - 20	60	0,361	1,269	2,666	-	0,687	0,769	4,862	0,120	10,569
12		0	0,514	1,488	5,506	0,652	1,058	2,129	7,864	0,356	10,823
	G - 6	15	0,317	2,132	5,645	0,567	1,089	2,067	8,145	0,365	10,641
	E - 15	30	0,604	1,223	4,315	-	1,038	1,858	5,712	0,376	12,212
	S - 20	60	0,530	1,221	5,814	-	1,025	1,210	5,494	0,186	11,325
13		0	0,549	1,516	6,071	0,635	1,118	2,227	8,100	0,422	10,423
	G - 6	15	0,281	2,222	6,184	0,578	1,091	2,072	8,150	0,371	11,343
	E - 12,5	30	0,381	0,852	4,287	-	0,784	1,443	5,469	0,259	11,552
	S - 0	60	0,565	1,226	4,063	-	1,074	1,270	5,580	0,190	11,100
14		0	0,561	1,371	5,942	0,653	1,033	2,082	7,689	0,532	10,531
	G - 6	15	0,353	1,489	6,114	0,472	0,880	1,873	7,946	0,343	11,089
	E - 12,5	30	0,371	0,876	4,348	-	0,801	1,439	5,497	0,282	11,941
	S - 40	60	0,574	1,290	3,829	-	1,109	1,324	5,620	0,190	11,528
15		0	0,538	1,474	6,137	0,601	1,051	2,107	7,857	0,383	10,980
	G - 6	15	0,487	1,619	6,240	0,570	1,077	2,025	8,131	0,392	11,434
	E - 12,5	30	0,370	0,897	4,396	-	0,802	1,444	5,519	0,281	11,822
	S - 20	60	0,591	1,307	3,952	-	1,182	1,424	5,994	0,211	10,459
16		0	0,284	1,908	6,259	0,627	1,232	2,138	8,067	0,395	12,849
	G - 6	15	0,460	1,632	6,211	0,640	1,189	2,088	7,998	0,404	12,372
	E - 12,5	30	0,598	1,154	4,487	-	1,065	1,771	5,746	0,354	11,481
	S - 20	60	0,559	1,165	3,822	-	1,094	1,353	5,691	0,213	12,738
17		0	0,595	1,872	6,310	0,627	1,234	2,148	8,085	0,402	12,125
	G - 6	15	0,473	1,684	6,226	0,561	1,046	1,977	7,952	0,385	11,154
	E - 12,5	30	0,581	1,238	4,113	-	1,363	1,841	5,873	0,385	11,213
	S - 20	60	0,540	1,195	3,469	-	0,983	1,244	5,636	0,214	10,922

Tabela 9.12. Resultados de HPLC - *Dekkera bruxellensis* ISA 2211

Amostra	Condição inicial	Tempo	Ác. Cítrico	Ác. Tartárico	Glucose	Frutose	Á. Succínico	Ác. Láctico	Glicerol	Ác. Acético	Etanol
1		0	0,706	3,420	3,514	0,763	1,510	1,510	7,510	0,431	10,559
	G - 3,6	15	0,393	2,873	1,187	0,237	1,343	1,343	7,081	0,310	10,030
	E - 11	30	0,366	2,234	0,371	0,120	0,395	0,395	7,320	0,144	10,795
	S - 8	60	0,395	1,464	0,737	0,124	0,299	0,299	7,333	0,310	10,626
2		0	0,754	3,288	9,353	0,511	1,506	1,506	7,523	0,420	10,716
	G - 8,4	15	0,371	2,621	0,330	0,109	1,197	1,197	6,829	0,268	10,782
	E - 11	30	0,237	1,574	1,130	0,346	0,452	0,452	7,515	0,130	11,849
	S - 8	60	0,378	1,565	1,995	0,364	0,540	0,540	8,108	0,293	11,724
3		0	0,825	2,871	3,601	0,615	1,819	1,819	9,243	0,502	13,921
	G - 3,6	15	0,524	1,991	1,124	0,423	1,739	1,739	8,692	0,383	13,909
	E - 14	30	0,684	1,340	2,109	-	0,756	0,756	9,685	0,130	14,590
	S - 8	60	0,757	1,511	2,431	0,339	1,026	1,026	10,203	0,214	14,446
4		0	0,860	2,597	10,016	0,631	1,866	1,866	9,496	0,517	13,826
	G - 8,4	15	0,540	2,018	1,094	0,430	1,769	1,769	8,795	0,392	13,840
	E - 14	30	1,206	1,674	4,980	-	0,953	0,953	9,930	0,148	14,329
	S - 8	60	0,758	1,608	2,113	0,346	0,973	0,973	10,424	0,285	14,998
5		0	0,740	3,290	3,347	0,848	1,485	1,485	7,416	0,433	11,702
	G - 3,6	15	0,246	2,563	2,278	0,361	1,209	1,209	6,771	0,313	11,126
	E - 11	30	0,364	2,166	2,174	-	0,658	0,658	7,533	0,123	11,185
	S - 32	60	0,367	1,515	2,004	0,194	0,496	0,496	7,353	0,118	11,245
6		0	0,699	3,338	9,517	0,513	1,516	1,516	7,629	0,405	10,514
	G - 8,4	15	0,497	3,215	7,435	0,215	1,354	1,354	6,498	0,344	10,537
	E - 11	30	0,368	1,651	4,636	-	0,669	0,669	7,664	0,121	10,906
	S - 32	60	0,371	1,413	4,644	0,195	0,498	0,498	7,460	0,110	11,092
7		0	0,537	1,155	2,928	0,604	1,791	1,791	8,945	0,380	14,362
	G - 3,6	15	0,564	1,206	2,577	0,453	1,717	1,717	8,431	0,407	13,815
	E - 14	30	0,702	1,091	2,588	-	0,793	0,793	9,447	0,136	15,146
	S - 32	60	0,753	1,537	3,224	0,335	1,058	1,058	10,117	0,216	14,154
8		0	0,519	1,167	1,053	0,806	1,778	1,778	8,886	0,392	13,510
	G - 8,4	15	0,592	1,219	7,923	0,721	1,774	1,774	8,708	0,428	13,561
	E - 14	30	0,353	0,922	0,729	0,127	0,645	0,645	9,399	0,166	13,851
	S - 32	60	0,358	1,367	1,313	0,217	0,985	0,985	9,833	0,207	14,021
9		0	0,492	2,900	0,965	0,741	1,641	1,641	8,156	0,375	12,322
	G - 2,0	15	0,509	2,182	0,897	0,408	1,564	1,564	7,674	0,376	12,234
	E - 12,5	30	0,191	1,295	0,940	0,116	0,584	0,584	8,535	0,114	11,629
	S - 20	60	0,657	1,627	0,580	0,289	0,873	0,873	8,891	0,146	12,882
10		0	0,538	3,234	11,390	0,254	1,654	1,654	8,222	0,380	12,293
	G - 10	15	0,562	2,198	9,661	0,238	1,586	1,586	7,760	0,378	11,957
	E - 12,5	30	0,632	1,431	11,127	-	0,849	0,849	8,644	0,136	11,030
	S - 20	60	0,605	1,508	1,862	0,203	0,519	0,519	7,213	0,200	13,230
11		0	0,985	3,583	5,152	0,829	1,277	1,277	6,167	0,306	9,896
	G - 6	15	0,436	3,350	5,106	0,809	1,261	1,261	6,130	0,306	9,332
	E - 10	30	0,856	1,687	3,475	0,272	0,619	0,619	6,674	0,190	9,460
	S - 20	60	0,609	1,710	3,531	0,340	0,670	0,670	6,880	0,131	9,124
12		0	1,395	3,328	6,019	1,197	1,850	1,850	9,467	0,388	15,341
	G - 6	15	0,913	1,781	5,925	0,272	1,936	1,936	9,552	0,446	15,352
	E - 15	30	1,217	1,725	4,367	0,337	0,914	0,914	10,125	0,134	14,737
	S - 20	60	1,261	1,649	4,456	0,431	1,001	1,001	10,308	0,155	14,678
13		0	0,497	2,963	5,950	0,385	1,642	1,642	8,182	0,367	12,725
	G - 6	15	1,202	3,427	5,537	0,227	1,566	1,566	7,881	0,396	12,803
	E - 12,5	30	0,334	1,048	1,260	0,237	0,608	0,608	8,499	0,210	13,331
	S - 0	60	0,414	1,542	1,194	0,384	1,115	1,115	9,715	0,433	12,973
14		0	0,430	2,136	5,387	0,236	1,494	1,494	7,884	0,336	12,864
	G - 6	15	1,163	3,301	5,439	0,222	1,510	1,510	7,565	0,376	12,485
	E - 12,5	30	0,656	1,496	3,571	-	1,084	1,084	8,900	0,157	12,567
	S - 40	60	0,631	1,493	2,771	0,371	0,967	0,967	9,282	0,237	13,117
15		0	0,540	3,254	6,054	0,409	1,660	1,660	8,327	0,365	12,107
	G - 6	15	1,197	3,367	5,559	0,225	1,556	1,556	7,870	0,382	12,446
	E - 12,5	30	0,730	1,443	3,108	-	1,017	1,017	8,763	0,157	12,695
	S - 20	60	0,580	1,503	2,740	0,384	1,082	1,082	9,142	0,227	12,498
16		0	0,427	2,388	5,430	0,380	1,489	1,489	7,875	0,332	12,507
	G - 6	15	1,173	3,308	5,440	0,218	1,505	1,505	7,671	0,371	12,816
	E - 12,5	30	0,434	1,285	2,284	-	0,930	0,930	8,861	0,213	12,903
	S - 20	60	0,413	1,258	1,767	0,380	0,820	0,820	9,043	0,352	12,164
17		0	0,371	2,744	5,416	0,395	1,467	1,467	8,245	0,325	12,196
	G - 6	15	0,525	2,380	5,545	0,223	1,592	1,592	7,830	0,385	11,956
	E - 12,5	30	0,466	1,423	4,200	-	1,076	1,076	8,853	0,283	12,367
	S - 20	60	0,541	1,349	2,310	0,296	0,776	0,776	8,704	0,135	13,162

Tabela 9.13. Resultados de HPLC - *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190

Amostra	Condição inicial	Tempo	Ác. Cítrico	Ác. Tartárico	Glucose	Frutose	Á. Succínico	Ác. Láctico	Glicerol	Ác. Acético	Etanol
1		0	0,475	3,264	3,149	0,368	0,861	1,459	7,130	0,321	10,903
	G - 3,6	15	0,521	0,309	2,689	0,390	0,170	1,371	6,441	0,345	9,953
	E - 11	30	0,555	2,215	1,227	-	0,632	0,589	7,647	0,119	11,079
	S - 8	60	0,322	1,659	1,180	0,261	0,221	0,392	7,546	0,121	10,972
2		0	0,440	3,235	8,692	0,381	0,734	1,405	7,196	0,309	11,138
	G - 8,4	15	0,618	0,700	4,302	0,567	0,297	1,541	6,734	0,310	11,090
	E - 11	30	0,825	2,642	1,584	-	0,865	0,676	7,786	0,118	11,455
	S - 8	60	0,174	1,328	1,342	0,364	0,237	0,346	7,261	0,167	11,440
3		0	0,551	3,433	3,432	0,449	1,063	1,797	8,850	0,375	13,893
	G - 3,6	15	0,781	0,988	2,578	0,344	0,747	0,695	10,433	0,350	13,601
	E - 14	30	0,977	1,340	1,785	0,322	0,763	0,722	4,890	0,131	14,628
	S - 8	60	1,139	2,956	0,608	-	1,149	0,854	9,635	0,139	14,384
4		0	0,580	3,367	9,000	0,450	1,066	1,804	8,929	0,375	13,928
	G - 8,4	15	0,750	0,999	8,770	0,331	0,685	0,616	10,022	0,337	13,564
	E - 14	30	1,195	1,325	9,996	0,170	1,087	0,891	9,749	0,140	14,038
	S - 8	60	1,051	2,545	2,965	-	0,736	0,672	9,724	0,133	14,495
5		0	0,488	3,351	3,021	0,367	0,863	1,454	7,079	0,325	11,015
	G - 3,6	15	0,636	0,758	2,490	0,264	0,513	0,461	7,674	0,269	11,168
	E - 11	30	0,383	1,159	1,212	0,416	0,292	0,438	7,393	0,115	11,200
	S - 32	60	0,466	1,771	1,364	0,461	0,226	0,353	7,295	0,132	11,290
6		0	0,365	2,943	7,936	0,100	0,559	1,266	6,909	0,306	10,737
	G - 8,4	15	0,614	0,760	8,317	0,268	0,513	0,454	7,866	0,258	10,796
	E - 11	30	0,571	1,161	8,910	-	0,592	0,634	7,524	0,128	11,145
	S - 32	60	0,583	1,771	1,501	0,377	0,599	0,604	7,717	0,129	11,772
7		0	0,554	3,453	3,793	0,455	1,080	1,844	9,094	0,378	13,855
	G - 3,6	15	0,497	0,568	2,256	0,236	0,442	0,500	9,908	0,313	13,586
	E - 14	30	1,190	1,350	2,093	-	1,099	0,953	9,827	0,149	13,843
	S - 32	60	1,167	2,036	2,213	-	1,146	0,993	10,338	0,141	13,786
8		0	0,573	3,295	9,311	0,477	1,075	1,808	8,962	0,377	13,655
	G - 8,4	15	0,679	0,824	3,943	0,196	0,282	4,370	10,004	0,205	13,351
	E - 14	30	0,348	1,234	4,257	-	0,671	0,687	9,507	0,130	13,816
	S - 32	60	1,211	2,021	3,873	-	1,175	0,973	10,025	0,145	14,663
9		0	1,182	3,093	1,796	0,551	1,141	1,646	8,304	0,450	12,312
	G - 2,0	15	0,684	0,788	1,148	-	0,241	0,419	9,272	0,299	12,153
	E - 12,5	30	0,198	0,951	0,779	0,547	0,401	0,548	8,361	0,144	12,742
	S - 20	60	0,358	0,420	1,488	0,317	0,313	0,462	8,245	0,161	12,286
10		0	1,195	3,015	11,073	0,550	1,136	1,640	8,219	0,453	12,225
	G - 10	15	0,788	1,694	9,717	0,196	0,254	0,411	8,798	0,296	12,333
	E - 12,5	30	0,633	1,017	10,873	0,167	0,686	0,695	8,600	0,128	12,652
	S - 20	60	0,184	1,423	1,912	-	0,324	0,465	8,339	0,117	12,268
11		0	0,957	3,458	6,351	0,452	0,930	1,352	6,722	0,380	9,994
	G - 6	15	0,723	3,204	5,226	0,492	0,697	0,558	6,864	0,238	8,601
	E - 10	30	0,561	1,413	1,561	0,619	0,325	0,504	7,024	0,109	10,074
	S - 20	60	0,427	1,636	1,621	0,396	0,276	0,535	7,046	0,122	9,934
12		0	1,516	2,290	6,559	0,679	1,402	20,160	10,204	0,532	14,705
	G - 6	15	1,022	3,063	6,726	0,579	0,677	0,826	11,214	0,302	14,139
	E - 15	30	1,313	1,253	8,103	-	1,183	0,102	10,558	0,155	14,726
	S - 20	60	1,223	1,892	3,791	-	1,177	1,062	4,605	0,159	14,273
13		0	1,237	3,605	6,139	0,592	1,179	1,659	8,485	0,476	12,286
	G - 6	15	0,633	0,707	2,387	0,795	0,301	0,364	9,142	0,358	11,698
	E - 12,5	30	1,137	1,948	7,850	0,359	1,085	0,842	9,140	0,146	11,935
	S - 0	60	1,134	1,858	3,968	0,422	1,134	0,862	9,116	0,149	12,034
14		0	1,237	3,587	6,130	0,584	1,167	1,652	8,398	0,466	12,548
	G - 6	15	0,753	1,785	5,833	0,189	0,243	0,423	9,169	0,286	12,198
	E - 12,5	30	1,113	1,548	7,747	0,331	0,998	0,874	8,827	0,151	12,774
	S - 40	60	1,089	1,678	3,723	0,373	1,027	0,879	8,712	0,154	12,576
15		0	1,224	3,511	6,172	0,592	1,157	1,622	8,314	0,460	12,687
	G - 6	15	0,771	2,406	3,395	-	0,248	0,427	9,495	0,254	11,879
	E - 12,5	30	1,087	1,920	3,849	0,365	1,044	0,850	8,912	0,154	12,751
	S - 20	60	1,043	1,886	3,877	0,393	0,983	0,772	8,663	0,126	12,460
16		0	1,220	3,557	6,901	0,587	1,151	1,617	8,318	0,463	12,772
	G - 6	15	0,867	2,213	6,595	0,338	0,466	1,589	9,630	0,289	12,190
	E - 12,5	30	1,114	1,921	3,930	0,367	1,060	0,834	8,953	0,149	12,929
	S - 20	60	1,080	1,929	3,957	0,397	1,011	0,792	8,785	0,092	12,520
17		0	1,223	3,508	6,849	0,576	1,141	1,607	8,229	0,464	12,277
	G - 6	15	0,864	3,066	6,340	-	0,942	0,690	9,234	0,272	12,038
	E - 12,5	30	1,140	1,621	3,634	0,331	1,033	0,820	8,949	0,148	11,661
	S - 20	60	1,102	1,903	4,004	0,354	0,976	0,839	8,887	0,117	10,905

Tabela 9.14. Resultados de HPLC - *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000

Amostra	Condição inicial	Tempo	Ác. Cítrico	Ác. Tartárico	Glucose	Frutose	Á. Succínico	Ác. Láctico	Glicerol	Ác. Acético	Etanol
1		0	0,699	2,869	3,794	0,566	0,302	1,819	7,197	0,327	11,177
	G - 3,6	15	0,577	0,604	3,797	0,368	0,218	1,486	6,617	0,318	10,596
	E - 11	30	0,393	1,837	2,258	0,530	0,799	1,199	8,167	0,273	12,168
	S - 8	60	0,359	1,511	1,538	0,415	0,496	0,572	7,899	0,217	12,069
2		0	0,888	1,966	8,196	-	0,675	0,975	7,788	0,122	11,598
	G - 8,4	15	0,610	0,658	4,039	0,396	0,231	1,637	7,103	0,331	11,537
	E - 11	30	0,425	1,772	3,378	0,684	0,845	1,300	8,647	0,273	12,389
	S - 8	60	0,318	1,372	1,750	0,568	0,224	0,369	7,714	0,138	11,428
3		0	0,658	2,029	3,909	0,623	0,344	2,453	9,134	0,398	14,337
	G - 3,6	15	0,607	2,036	3,050	0,526	0,329	2,087	8,920	0,380	13,907
	E - 14	30	0,487	1,622	2,162	-	1,012	1,598	10,529	0,312	14,984
	S - 8	60	0,219	0,645	1,587	-	0,366	0,656	9,591	0,160	14,129
4		0	1,014	2,147	9,329	0,774	0,457	2,569	9,402	0,410	13,830
	G - 8,4	15	0,916	2,656	8,261	0,708	0,392	2,188	8,898	0,387	13,699
	E - 14	30	0,833	1,508	4,661	-	0,989	1,579	10,324	0,316	14,960
	S - 8	60	0,235	0,627	1,268	-	0,371	0,735	9,661	0,147	13,520
5		0	0,740	2,366	3,795	0,558	3,020	1,888	7,215	0,330	11,438
	G - 3,6	15	0,493	3,007	3,407	0,481	0,260	1,729	7,056	0,325	11,009
	E - 11	30	0,400	1,769	3,362	0,581	0,916	1,282	8,479	0,274	11,807
	S - 32	60	0,426	1,731	1,551	0,520	0,754	1,042	8,178	0,146	11,149
6		0	0,783	2,245	8,593	0,566	0,303	1,885	7,259	0,329	10,786
	G - 8,4	15	0,736	3,028	8,492	0,575	0,312	1,731	7,170	0,326	11,680
	E - 11	30	0,399	1,830	5,117	-	0,823	1,289	8,491	0,274	11,733
	S - 32	60	0,461	1,613	1,541	548,000	0,871	1,119	8,559	0,290	11,075
7		0	1,043	2,311	4,474	0,776	0,463	2,468	9,594	0,417	13,942
	G - 3,6	15	0,935	2,815	4,310	0,763	0,445	2,296	9,323	0,403	13,994
	E - 14	30	0,470	1,569	2,439	-	1,027	1,558	10,310	0,302	14,768
	S - 32	60	0,757	1,022	1,974	-	0,694	1,088	10,014	0,246	14,470
8		0	1,028	2,199	9,157	0,767	0,447	2,310	10,313	0,403	13,708
	G - 8,4	15	0,919	2,732	8,792	0,751	0,430	2,206	9,096	0,393	13,954
	E - 14	30	0,468	1,536	4,869	-	1,016	1,550	10,188	0,315	14,824
	S - 32	60	0,752	0,964	5,074	-	0,684	9,130	9,880	0,239	14,490
9		0	0,800	0,955	3,116	1,643	1,027	0,619	10,291	0,375	12,169
	G - 2,0	15	0,833	3,627	1,621	0,676	0,374	2,045	8,434	0,369	12,421
	E - 12,5	30	0,318	1,211	1,129	0,120	0,301	0,726	8,499	0,146	13,209
	S - 20	60	0,529	1,132	0,954	0,145	0,317	0,631	8,737	0,145	12,803
10		0	0,988	1,630	9,912	-	0,720	1,077	8,600	0,132	13,400
	G - 10	15	0,586	2,435	9,925	0,549	0,279	1,877	8,150	0,356	13,307
	E - 12,5	30	0,443	1,649	7,135	-	0,911	1,404	9,233	0,294	12,840
	S - 20	60	0,205	0,872	4,972	-	0,310	0,617	8,611	0,154	13,024
11		0	0,711	2,518	5,815	-	0,734	0,439	7,843	0,307	10,250
	G - 6	15	0,581	3,359	4,166	0,382	0,219	1,508	7,235	0,308	10,545
	E - 10	30	0,305	1,770	2,015	0,870	0,619	0,956	7,311	0,155	10,997
	S - 20	60	0,446	1,633	1,539	0,475	0,687	0,889	7,514	0,143	9,756
12		0	1,125	2,436	7,160	-	1,192	0,697	12,266	0,419	14,668
	G - 6	15	1,008	2,679	6,926	0,388	0,977	0,673	11,792	0,436	15,332
	E - 15	30	1,338	1,459	4,715	0,167	1,125	1,699	11,153	0,344	15,489
	S - 20	60	1,388	1,136	3,412	-	1,089	1,404	11,021	0,339	15,554
13		0	0,887	2,321	6,712	-	1,043	0,602	10,120	0,367	12,621
	G - 6	15	0,881	3,619	1,460	-	1,028	0,603	10,037	0,383	12,761
	E - 12,5	30	1,116	1,812	1,465	-	1,109	1,397	9,658	0,327	13,778
	S - 0	60	0,928	1,407	1,330	0,612	0,945	1,202	9,541	0,326	13,468
14		0	0,955	2,273	6,723	-	1,025	0,619	10,267	0,365	12,663
	G - 6	15	0,854	2,789	6,489	-	1,008	0,593	9,773	0,352	12,309
	E - 12,5	30	0,410	1,789	4,187	-	0,920	1,368	9,136	0,242	13,498
	S - 40	60	1,088	1,528	4,193	-	0,868	1,097	9,053	0,224	13,211
15		0	0,935	2,258	6,636	-	1,010	0,600	10,059	0,359	12,273
	G - 6	15	0,895	2,836	6,709	-	1,001	0,592	10,027	0,360	12,327
	E - 12,5	30	0,800	1,774	4,152	-	0,996	1,443	9,303	0,315	13,106
	S - 20	60	1,107	1,594	4,305	-	0,907	1,145	9,218	0,329	13,311
16		0	0,923	2,316	6,891	-	1,018	0,600	10,417	0,365	12,396
	G - 6	15	0,859	2,705	6,522	-	0,994	0,585	9,692	0,350	12,099
	E - 12,5	30	0,313	1,855	4,098	-	1,016	1,409	9,385	0,265	12,824
	S - 20	60	0,214	0,823	3,055	-	0,669	8,722	8,722	0,144	12,240
17		0	0,933	2,358	6,825	-	1,037	0,616	10,323	0,371	12,326
	G - 6	15	0,887	2,793	6,524	0,515	0,651	0,606	9,879	0,361	12,437
	E - 12,5	30	0,791	1,900	3,820	-	1,088	1,390	8,971	0,309	12,971
	S - 20	60	0,971	1,755	3,884	-	0,969	1,378	10,740	0,311	12,341

Tabela 9.15. Resultados de HPLC - *Saccharomyces ludwigii* ISA 1083

Amostra	Condição inicial	Tempo	Ác. Cítrico	Ác. Tartárico	Glucose	Frutose	Á. Succínico	Ác. Láctico	Glicerol	Ác. Acético	Etanol
1		0	0,430	3,059	4,286	-	1,018	1,443	7,115	0,318	11,386
	G - 3,6	15	0,495	2,989	2,136	0,355	0,830	1,336	6,908	0,303	12,292
	E - 11	30	0,439	1,137	1,450	0,506	0,241	0,298	7,078	0,112	13,352
	S - 8	60	0,856	1,105	1,090	0,463	0,802	0,581	7,148	0,094	12,450
2		0	0,448	3,440	9,034	-	1,003	1,412	6,937	0,316	11,483
	G - 8,4	15	0,535	3,454	2,001	0,368	0,886	1,366	7,004	0,339	11,337
	E - 11	30	0,350	1,376	1,598	0,530	0,231	0,252	6,631	0,539	12,891
	S - 8	60	0,769	1,177	1,498	0,657	0,247	-	6,839	1,268	12,502
3		0	1,122	2,915	3,994	0,363	1,009	1,696	8,986	0,365	13,746
	G - 3,6	15	0,556	1,894	2,348	0,448	1,079	1,763	8,936	0,382	14,934
	E - 14	30	0,508	1,519	2,060	0,302	0,931	0,446	6,602	0,224	16,330
	S - 8	60	1,021	1,485	1,938	-	0,875	0,792	9,150	0,330	14,978
4		0	1,329	3,065	10,200	-	1,287	1,818	9,022	0,380	14,162
	G - 8,4	15	0,594	1,720	5,161	0,416	1,012	1,651	8,473	0,362	14,880
	E - 14	30	0,541	1,129	1,503	0,210	0,677	0,861	9,570	0,212	16,402
	S - 8	60	1,076	1,469	0,605	0,129	1,030	0,901	9,453	0,171	15,181
5		0	0,299	3,043	3,115	-	0,792	1,352	7,103	0,304	11,265
	G - 3,6	15	0,493	3,378	1,528	0,645	0,847	1,381	6,899	0,288	11,536
	E - 11	30	0,427	1,538	1,883	0,254	0,734	0,935	7,434	0,200	12,809
	S - 32	60	0,990	1,574	1,554	0,318	1,142	0,883	4,454	0,175	11,739
6		0	0,460	3,358	9,118	-	1,000	1,416	6,966	0,316	11,184
	G - 8,4	15	0,502	3,285	8,919	0,374	0,832	1,423	6,873	0,306	11,377
	E - 11	30	0,446	1,548	2,995	0,271	0,781	1,057	8,022	0,147	12,430
	S - 32	60	0,909	1,389	1,749	0,271	0,908	0,719	7,492	0,100	11,875
7		0	0,804	2,329	2,721	0,337	0,672	1,476	8,421	0,327	14,464
	G - 3,6	15	0,572	1,773	2,703	0,444	1,044	1,798	8,801	0,370	14,366
	E - 14	30	0,496	1,526	2,040	0,299	0,916	1,133	9,705	0,168	16,037
	S - 32	60	1,083	1,441	1,947	-	1,119	0,958	9,619	0,166	15,234
8		0	1,358	2,643	10,164	-	1,305	1,843	9,144	0,386	14,194
	G - 8,4	15	0,583	1,689	9,538	0,450	1,040	1,776	8,737	0,365	14,456
	E - 14	30	0,504	1,493	3,366	0,298	0,930	1,288	9,891	0,174	15,509
	S - 32	60	1,156	1,568	2,073	-	1,248	1,427	10,026	0,273	14,980
9		0	0,294	2,661	0,601	0,420	0,661	1,425	7,939	0,313	12,326
	G - 2,0	15	0,637	1,761	2,001	0,401	0,939	1,612	7,812	0,331	12,716
	E - 12,5	30	0,448	1,425	1,838	0,275	0,824	1,115	8,616	0,174	14,528
	S - 20	60	1,022	1,327	1,824	-	1,169	1,102	8,769	0,358	14,213
10		0	0,510	3,230	11,446	-	1,187	1,671	8,203	0,356	12,324
	G - 10	15	0,397	2,480	0,740	0,120	0,659	1,381	7,619	0,297	13,298
	E - 12,5	30	0,459	1,485	1,858	0,271	0,905	1,205	9,045	0,167	14,329
	S - 20	60	0,991	1,351	1,736	0,219	0,905	0,958	8,601	0,165	13,657
11		0	0,443	3,702	6,542	-	0,960	1,350	6,616	0,307	9,779
	G - 6	15	0,314	2,929	0,562	0,112	0,526	1,081	6,029	0,244	11,080
	E - 10	30	0,512	1,460	3,559	0,300	1,032	1,430	6,068	0,250	16,874
	S - 20	60	0,786	1,540	1,807	0,219	0,807	0,725	6,540	0,195	11,345
12		0	0,307	1,550	6,305	0,462	1,043	1,761	9,366	0,376	15,431
	G - 6	15	0,584	1,462	5,721	0,455	1,094	1,850	9,204	0,381	16,037
	E - 15	30	0,344	1,803	2,777	0,226	0,650	0,828	6,834	0,189	11,834
	S - 20	60	1,164	1,488	2,227	-	1,105	1,284	10,351	0,181	16,002
13		0	0,512	2,268	6,350	0,396	0,925	1,557	7,425	0,335	12,355
	G - 6	15	0,359	2,454	0,311	0,117	0,638	1,339	7,540	0,327	12,873
	E - 12,5	30	0,526	1,488	4,231	0,328	1,080	1,530	10,668	0,310	16,792
	S - 0	60	1,011	1,347	3,114	0,240	1,208	0,955	8,793	0,323	13,350
14		0	0,500	1,743	6,052	0,363	0,846	1,466	7,116	0,306	12,636
	G - 6	15	0,467	2,570	0,775	0,258	0,793	1,464	7,739	0,310	13,523
	E - 12,5	30	0,368	1,715	0,689	0,267	0,896	1,114	8,582	0,179	13,783
	S - 40	60	1,021	1,470	0,606	251,000	1,076	0,905	8,961	0,149	14,137
15		0	0,735	1,819	6,360	0,384	0,900	1,551	7,574	0,317	12,368
	G - 6	15	0,538	2,984	4,919	0,219	0,928	1,547	7,752	0,330	13,320
	E - 12,5	30	0,437	1,635	3,129	0,268	0,862	1,164	9,037	0,156	13,029
	S - 20	60	1,020	1,459	1,826	0,165	1,064	1,052	8,900	0,169	12,795
16		0	0,669	1,430	6,486	-	0,746	0,991	8,436	0,126	12,508
	G - 6	15	0,371	2,449	0,541	0,117	0,644	1,371	7,748	0,318	12,344
	E - 12,5	30	0,445	1,613	3,209	0,286	0,934	1,266	9,417	0,184	13,601
	S - 20	60	1,001	1,357	3,031	0,235	1,038	0,852	8,752	0,169	12,672
17		0	0,551	1,986	6,116	0,410	0,961	1,661	8,004	0,352	12,836
	G - 6	15	0,372	2,525	0,512	0,118	0,653	1,374	7,847	0,328	12,609
	E - 12,5	30	0,418	1,857	7,260	0,288	0,921	1,224	9,115	0,234	13,753
	S - 20	60	0,968	1,389	0,589	0,217	1,021	0,859	8,572	0,163	14,087

9.9. Anexo X – Superfícies de resposta de *Zygosaccharomyces bailii*

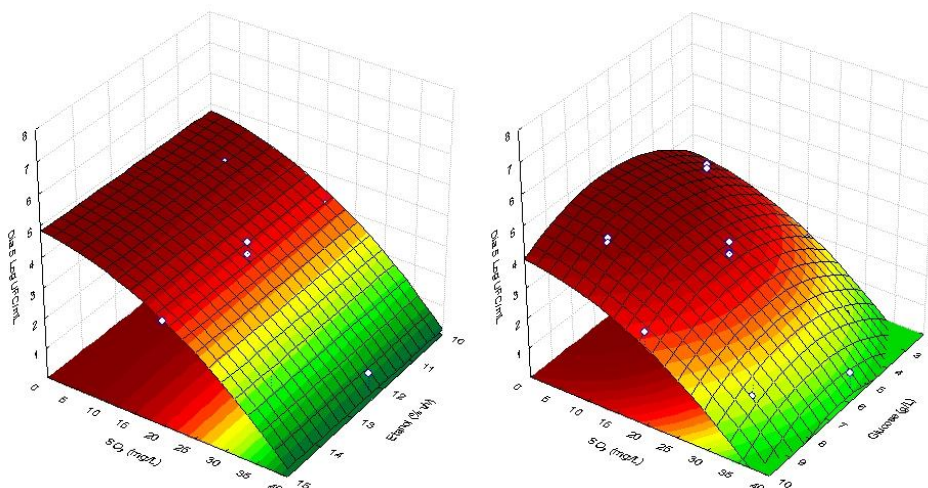


Figura 9.1. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *Z. bailii* ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.

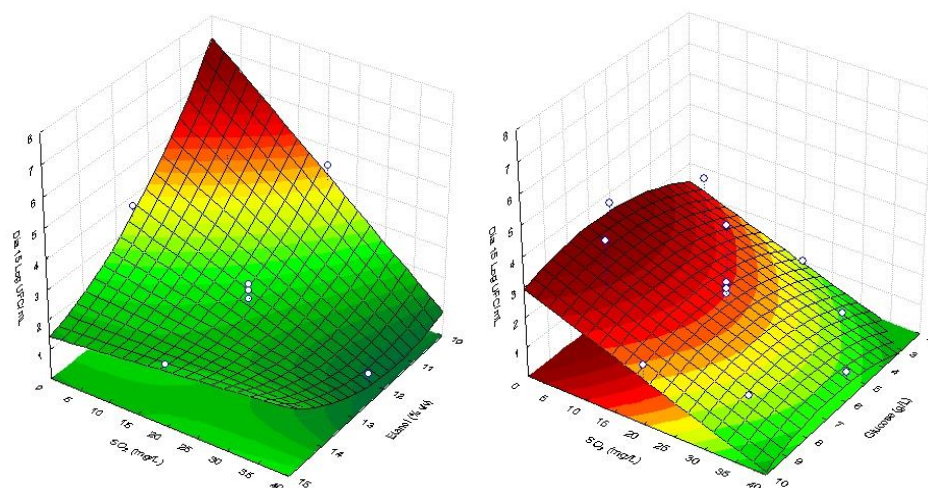


Figura 9.2. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *Z. bailii* ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.

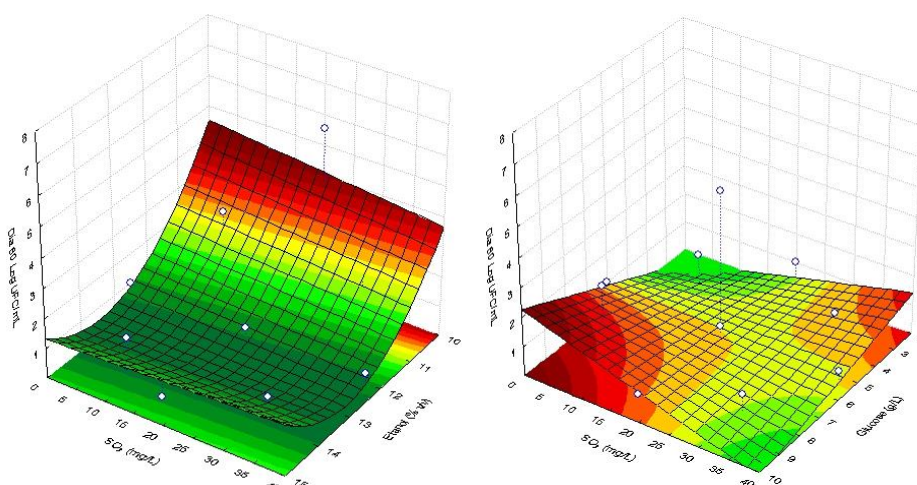


Figura 9.3. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *Z. bailii* ISA 2270 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 60 dias de inoculação.

9.10. Anexo XI – Superfícies de resposta de *Dekkera bruxellensis*

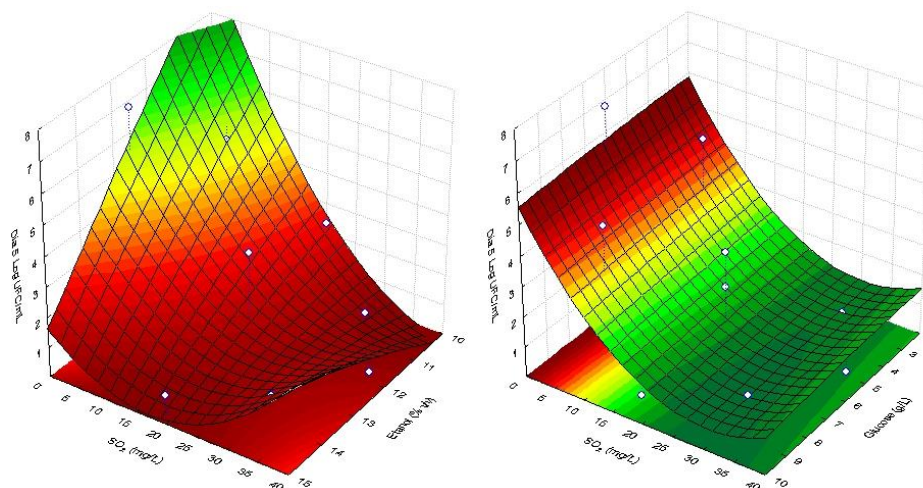


Figura 9.4. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *D. bruxellensis* ISA 2211 em função de glicose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.

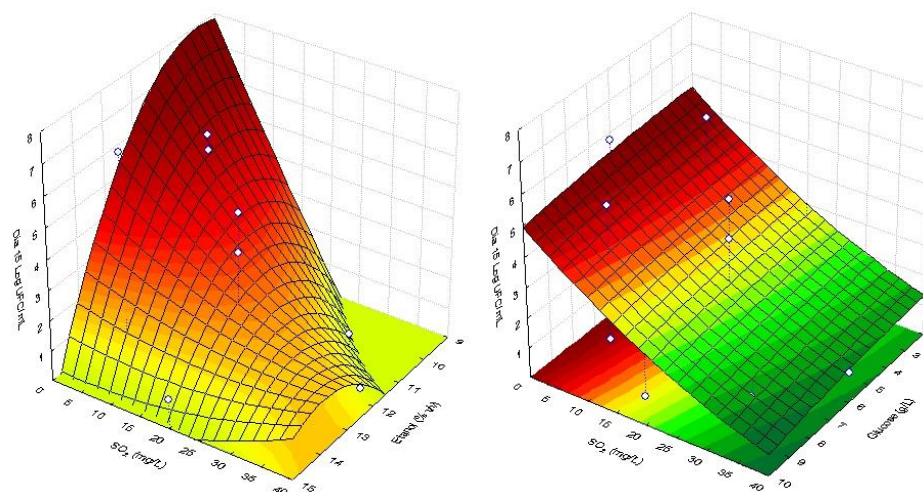


Figura 9.5. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *D. bruxellensis* ISA 2211 em função de glicose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.

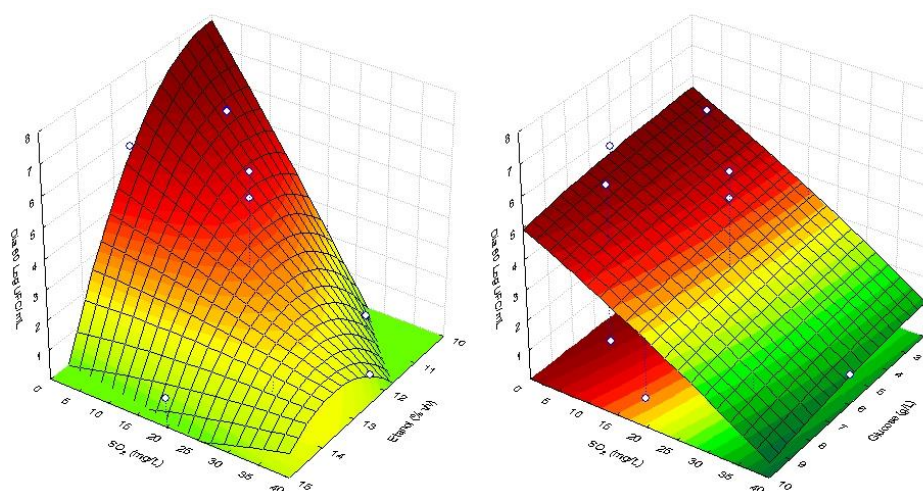


Figura 9.6. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *D. bruxellensis* ISA 2211 em função de glicose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.

9.11. Anexo XII – Superfícies de resposta de *Saccharomyces ludwigii*

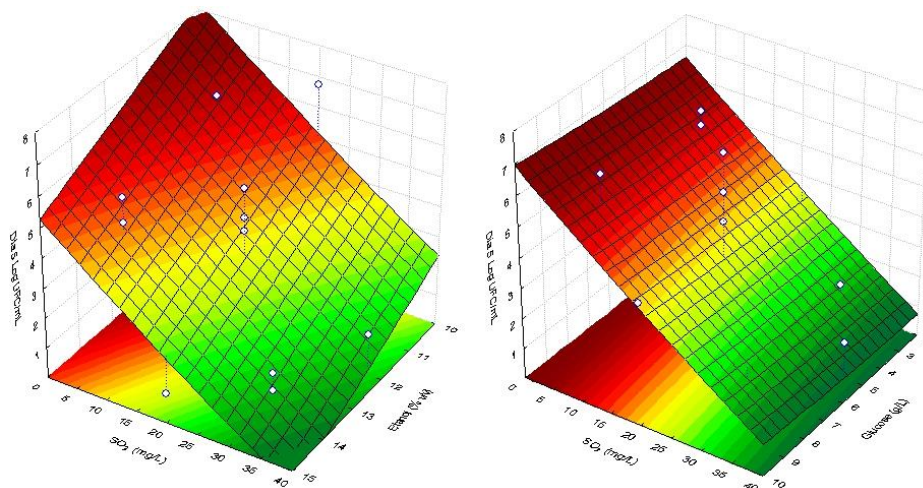


Figura 9.6. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. ludwigii* ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação.

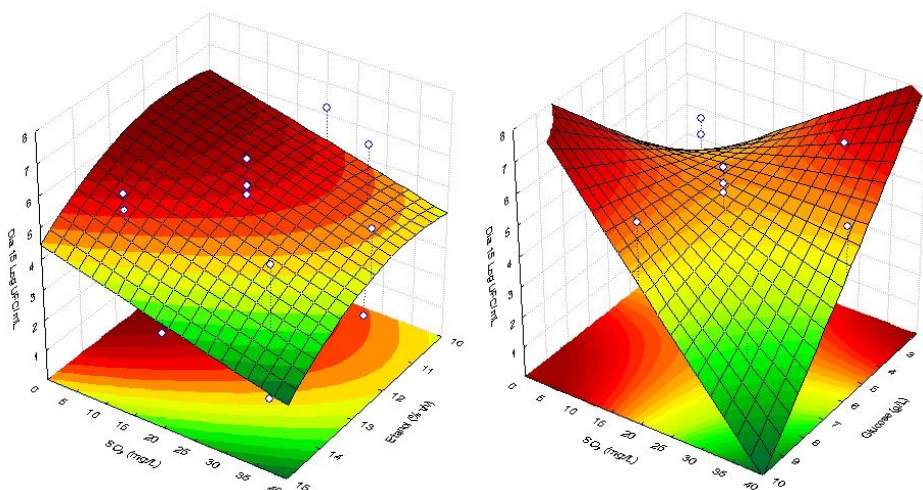


Figura 9.7. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. ludwigii* ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação.

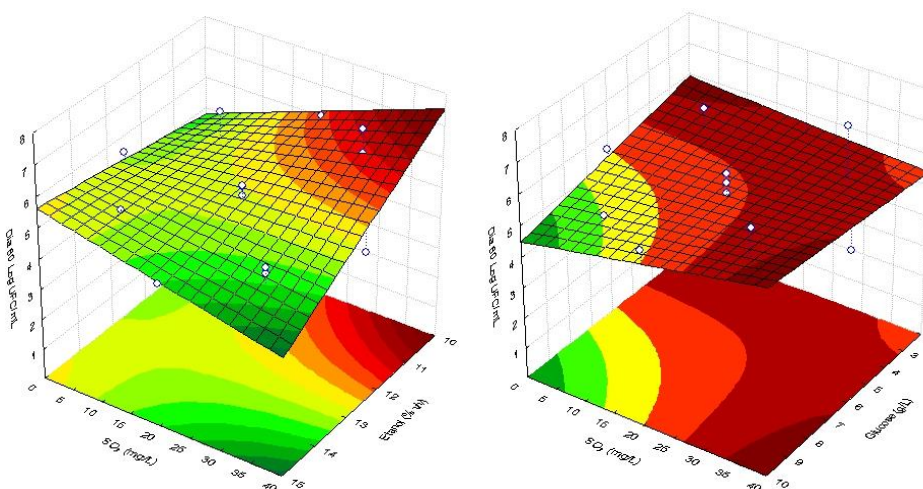


Figura 9.8. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. ludwigii* ISA 1083 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 60 dias de inoculação

9.12. Anexo XIII – Superfícies de resposta de *Saccharomyces cerevisiae*

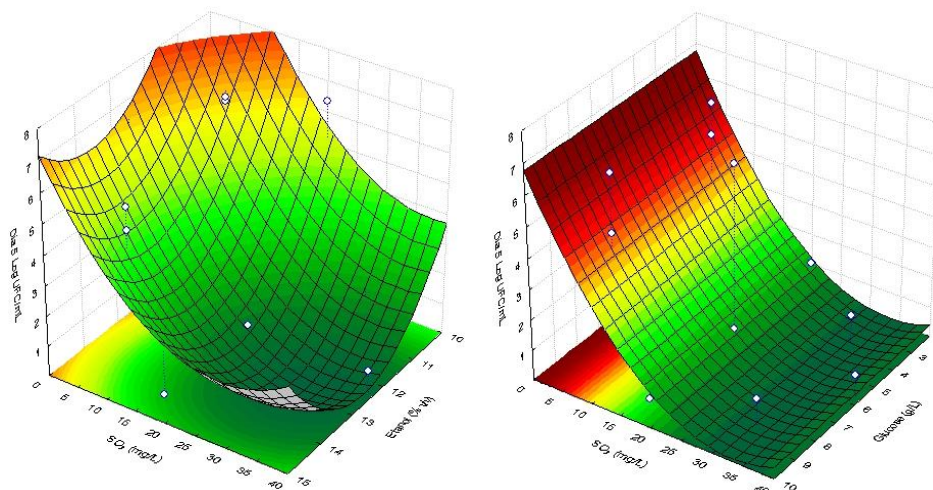


Figura 9.9. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. cerevisiae* ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 5 dias de inoculação

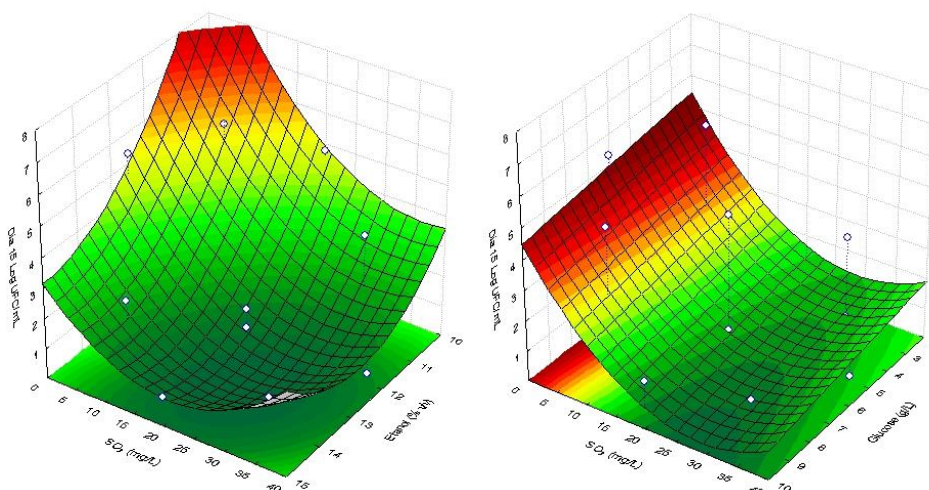


Figura 9.10. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. cerevisiae* ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 15 dias de inoculação

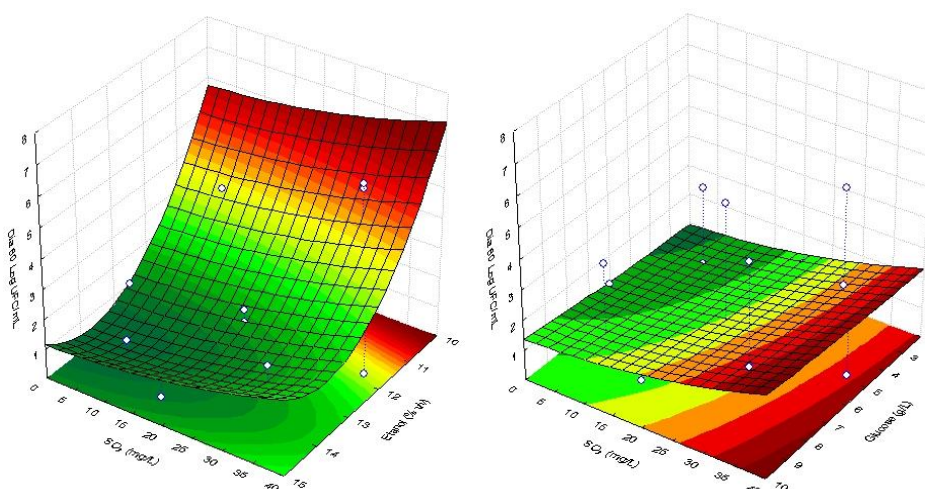


Figura 9.11. Superfícies de resposta ajustadas do crescimento populacional de *S. cerevisiae* ISA 1000 em função de glucose, etanol e sulfuroso livre, após 60 dias de inoculação