

Quantificação de leveduras do género Brettanomyces/Dekkera em Vinhos de Qualidade

Sílvia Diana Nascimento Pedro

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por

Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho

Professor Adjunto João Verdial Andrade

**Bragança
2014**

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria Letícia Estevinho, da Escola Superior Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança, por me ter motivado a realizar o presente trabalho, bem como por toda a ajuda prestada na realização do trabalho laboratorial e escrito, pela paciência prestada, disponibilidade, ajuda e amizade.

Ao meu co-orientador, Professor Adjunto João Verdial Andrade, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pela disponibilidade e apoio profissional.

Ao Engenheiro Jorge Sá Morais, pela disponibilidade, ajuda e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, D^aArmanda e D^aFátima, Ana Paula e Vanessa, pela ajuda e disponibilidade prestada no laboratório, e também ao pessoal do Laboratório de Agro-Indústrias, D^aCéu, Teresa e Luana, pela ajuda e alegria demonstrada nas minhas visitas ao laboratório.

A todas as minhas amigas de laboratório, Gi, Aline, Andreia e Adriane a quem agradeço a companhia em todos os momentos, o apoio e amizade. Obrigado pelos bons momentos passados, que alegraram os nossos dias e ficarão guardados na memória.

Aos meus amigos de longa data de Oliveira, principalmente à Marlene, Daniela e Marta pela grande amizade ao longo destes anos e pelo apoio sempre demonstrado.

Aos amigos que conheci em Bragança que sempre ficarão na minha memória pelos momentos que vivemos, Márcia, Sílvia, Ricardo e Gil, que apesar de já se encontrarem longe, estão sempre perto e deixarão imensa saudade.

Às minhas amigas, Elsa e Susana, que sempre estiveram presentes, pela amizade e apoio demonstrado, e pelas gargalhadas que demos durante este caminho.

À Filipa e ao Carlinhos pela amizade e alegria que demonstraram ao longo destes dois últimos anos.

Ao Eduardo, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis, pelo carinho, amor e sobretudo por ser o meu melhor amigo e a pessoa mais importante neste percurso.

À minha mãe, por todos os esforços que fez para eu chegar aqui, pela preciosa compreensão e amor incondicional, e porque lhe devo tudo o que sou hoje.

À minha irmã Joana e ao meu irmão Marcos, pelo carinho e amizade. E aos meus sobrinhos, Diana e David, pelos sorrisos e momentos bem passados, que sempre me animaram e pelo carinho que demonstraram ao longo deste percurso.

Aos meus animais de estimação, Íris, Maggie e Pipoca, por todas as brincadeiras e carinho demonstrado, e por serem tão importantes para mim como a minha família. Aos outros animais de estimação que foram também importantes na minha vida, Spencer, Ozzy, Elliot, Laureana, Shaka, Hulk e Tixa.

Todas as pessoas mencionadas contribuíram diretamente ou indiretamente na realização do presente trabalho. Nesse sentido, um muito obrigada por me terem permitido alargar os meus horizontes e me fazerem gostar da vertente da investigação.

A todos os amigos e familiares que não foram citados, mas que, de qualquer forma, me ajudaram e que torcem por mim e estão felizes por mais uma conquista.

A todos, o meu sincero, muito Obrigada!!!

Índice

Resumo vii

Abstract ix

Capítulo 1

Introdução 1

1.1 Vinhos de Qualidade 2

1.2 Leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* 4

1.2.1 Aspetos Históricos 4

1.2.2 Caracterização do género *Brettanomyces/Dekkera* 5

1.2.3 *Brettanomyces/Dekkera* no vinho 6

1.2.4 Detecção e Quantificação da *Brettanomyces/Dekkera* no vinho 8

1.2.5 Controlo da *Brettanomyces/Dekkera* no vinho 10

1.3 Fenóis Voláteis 11

1.3.1 Mecanismos de produção de voláteis por *Brettanomyces/Dekkera* 11

1.3.2 Fatores que afetam a formação de compostos voláteis por *Brettanomyces/Dekkera* 14

1.4 Compostos Biativos do Vinho 15

1.4.1 Compostos Fenólicos 15

1.4.1.1 Compostos Não-Flavonoides 17

1.4.1.2 Compostos Flavonoides 18

1.5 Métodos Analíticos 19

1.5.1 Cromatografia Gasosa 19

1.6 Objetivos 22

Capítulo 2

Material e Métodos 23

2.1 Amostragem 24

2.2 Detecção de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* 25

2.2.1 Isolamento da levedura do género *Brettanomyces/Dekkera* 25

2.2.2 Condições de Crescimento 26

2.2.3	Identificação e Quantificação de <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	26
2.3	Quantificação de Fenóis Voláteis	26
2.3.1	Extração de Fenóis Voláteis	27
2.3.2	Deteção de Fenóis Voláteis	28
2.3.2.1	Preparação das Soluções – Padrão para o GC	28
2.3.2.2	Análise por GC	29
2.3.2.3	Equipamento de GC	29
2.3.2.4	Quantificação de fenóis voláteis	30
2.4	Avaliação das Compostos Bioativos do Vinho	30
2.4.1	Determinação de compostos fenólicos totais	30
2.4.1.1	Preparação da solução de vinho	31
2.4.1.2	Análise de fenóis totais	31
2.4.1.3	Determinação da curva de padrão	31
2.4.2	Determinação de flavonoides totais	31
2.4.2.1	Preparação da solução de vinho	32
2.4.2.2	Análise de flavonoides totais	32
2.4.2.3	Determinação da curva de padrão	32
2.5	Atividade Antioxidante	32
2.5.1	Poder Redutor	33
2.5.1.1	Preparação da solução de vinho	33
2.5.1.2	Análise do Poder Redutor	33
2.5.2	DPPH	34
2.5.2.1	Preparação da solução de vinho	34
2.5.2.2	Análise do DPPH	34
2.6	Análise Estatística	35

Capítulo 3

Resultados e Discussão	36	
3.1	Deteção de leveduras <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	37
3.1.1	Isolamento e Quantificação de <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	37
3.1.2	Identificação da levedura <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	39
3.2	Fenóis Voláteis	40
3.2.1	Deteção de Fenóis Voláteis	40

3.2.2	Quantificação dos Fenóis Voláteis	42
3.2.2.1	Análises microbiológicas e presença de fenóis voláteis.....	44
3.3	Compostos fenólicos e atividade antioxidante do vinho	46
3.3.1	Análise dos compostos fenólicos e flavonoides totais	46
3.3.1.1	Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais de acordo com os resultados microbiológicos	48
3.3.1.2	Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais de acordo com a região produtora dos vinhos	49
3.3.2	Atividade Antioxidante	51
3.3.2.1	Análise da atividade antioxidante com base nos resultados microbiológicos	54
3.3.2.2	Análise da atividade antioxidante de acordo com a região produtora dos vinhos.....	55
3.3.3	Correlações lineares entre os diversos parâmetros estudados	56
3.3.3.1	Correlação entre o teor de fenóis e flavonoides totais	56
3.3.3.2	Correlação entre a atividade antioxidante e fenóis, flavonoides totais e fenóis voláteis	57
3.3.3.3	Correlação entre os fenóis voláteis (4-Etilfenol e 4-Etilguaiacol) e o teor de fenóis, flavonoides totais e a presença de <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	60
 Capítulo 4		
Conclusão e Perspetivas Futuras		61
 Capítulo 5		
Bibliografia.....		64
 Capítulo 6		
Anexos.....		83
Anexo I.....		84
Anexo II.....		85
Anexo III		87
Anexo IV		89
Anexo V.....		92

Resumo

A acumulação de fenóis voláteis em vinhos, principalmente nos de elevada qualidade, tem causado grande preocupação na enologia moderna, sendo considerado, nos dias de hoje, um ponto-chave no controlo da sua qualidade. Os etilfenóis (4-etilfenol e 4-etilguaiaicol) podem ser produzidos nos vinhos na sequência de atividade microbiana dando origem a odores e sabores indesejáveis geralmente descritos como “couro”, “suor a cavalo”, “animal” e “medicinal”. Os principais microrganismos responsáveis pela produção destes compostos são estirpes de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*, mais concretamente *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*, uma grande ameaça na indústria vinícola.

Este trabalho teve como objetivo global a quantificação de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*, a deteção e quantificação dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol por cromatografia gasosa e a correlação destes compostos com a presença destas leveduras no vinho. Em paralelo, avaliaram-se os compostos fenólicos e flavonoides totais, bem como, as propriedades antioxidantes de dezoito amostras de vinho tinto da Região de Trás-os-Montes e da Região do Alto Douro.

Na quantificação das leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* constatou-se que o número de unidades formadoras de colónias variou entre 260 a 440 UFC.mL⁻¹. Em doze amostras de vinho, não se detetaram quaisquer leveduras pertencentes a este género.

Verificou-se que as amostras que apresentaram leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*, também exibiram elevadas concentrações de fenóis voláteis, níveis estes acima dos limites de referência, valores que oscilaram entre 91,45 ± 13,53 µg.L⁻¹ e 351,90 ± 2,43 µg.L⁻¹ para o composto 4-Etilguaiaicol, e entre 469,95 ± 3,90 µg.L⁻¹ e 2847,51 ± 87,20 µg.L⁻¹ para o 4-Etilfenol. Estes resultados revelaram que a presença deste tipo de leveduras afeta diretamente a produção destes metabolitos.

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando como padrão o ácido gálico. Os resultados obtidos variaram de 2,08 mg.mL⁻¹ a 4,22 mg.mL⁻¹. O doseamento de flavonoides totais teve como base um método espectrofotométrico usando o reagente cloreto de alumínio e como padrão, a quercetina. Os valores obtidos oscilaram entre 0,06 e 0,17 mg.mL⁻¹.

Relativamente aos compostos fenólicos, verificou-se que o teor foi influenciado pelo número de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* e pela região produtora do vinho, ao contrário que se constatou para o conteúdo de flavonoides totais.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do Poder Redutor e pelo efeito bloqueador de radicais livres de DPPH. Os resultados obtidos pelo método de DPPH evidenciaram valores de EC_{50} que oscilaram entre $7,78 \pm 0,24 \text{ mL.L}^{-1}$ e $13,89 \pm 0,05 \text{ mL.L}^{-1}$. Pelo método do Poder Redutor obtiveram-se valores mais elevados de EC_{50} , apresentando um valor mínimo de $14,62 \pm 0,09 \text{ mL.L}^{-1}$ e um valor máximo de $30,71 \pm 0,24 \text{ mL.L}^{-1}$.

A atividade antioxidante foi influenciada quer pela região produtora do vinho, quer pela quantidade de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* presente. Os vinhos provenientes da região do Alto Douro foram os que apresentaram maior capacidade antioxidante, com menores valores de EC_{50} .

Os resultados obtidos sugerem que a produção de fenóis voláteis em vinhos é proporcional ao tamanho da população de *Brettanomyces/Dekkera*, evidenciando que *Brettanomyces/Dekkera* pode ser um dos fatores que mais afeta as propriedades sensoriais do vinho, por isso, o controlo do crescimento de *Brettanomyces* é um dos maiores desafios microbiológicos na produção moderna de vinhos, já que o seu crescimento indesejado pode provocar graves perdas económicas.

Palavra-chave: *Brettanomyces/Dekkera*; 4-Etilfenol; 4-Etilguaiacol; fenóis totais; flavonoides totais, atividade antioxidante.

Abstract

The accumulation of volatile phenols in wine, especially in those who have a high quality, has been the cause of great concern in modern enology, being considered, nowadays, a key point in the control of wine quality. Ethylphenols (4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol) may be produced in wine, due to microorganisms activity, causing undesirable odours and flavours commonly described as “leather”, “horse sweat”, “animal” and “medicinal”. The main microorganisms which are responsible for the production of these compounds are strains of yeast *Brettanomyces/Dekkera*, more specifically *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*, a major threat in the wine industry.

The main goal of this work is the quantification of strains of yeast *Brettanomyces/Dekkera*, the detection and quantification of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol compounds through gas chromatography and to correlate them with the presence of yeast contamination of this kind in the wine. At the same time, the total content of flavonoids and phenolic compounds as well as antioxidant properties have been studied, in eighteen samples of Trás-os-Montes and Alto Douro red wine.

Regarding the quantification of yeast *Brettanomyces/Dekkera* the results shown that the number of Colony-forming unit ranged between 260 to 440 CFU.mL⁻¹. Twelve wine samples did not show presence of this kind of yeasts.

It was found that the samples that show the presence of strains of yeast *Brettanomyces/Dekkera*, also revealed high concentrations of volatile phenols, levels above the reference range. This concentrations varied between amongst $91,45 \pm 13,53 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $351,90 \pm 2,43 \mu\text{g.L}^{-1}$ for the compound 4-ethylguaiacol and between $469,95 \pm 3,90 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $2847,51 \pm 87,20 \mu\text{g.L}^{-1}$ for 4-ethylphenol. These results show that the presence of this kind of yeast affects directly the production of these metabolites.

The phenolic compounds were determined by Folin-Ciocalteu method using the gallic acid as a standard. The values of this determination fluctuate between $2,08 \text{ mg.mL}^{-1}$ to $4,22 \text{ mg.mL}^{-1}$. The assay of total flavonoids was based on the spectrophotometric method using the reagent aluminum chloride and as standard compound, quercetina. The values obtained ranged from $0,06$ to $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$. The results showed that the presence of *Brettanomyces/Dekkera* and the region of production of the wine influence the phenolic compounds content, unlike what was found in the total flavonoids.

The antioxidant activity was evaluated by the method of reducing power and the blocking effect of free radicals of DPPH. The DPPH showed EC_{50} values of $7,78 \pm 0,24$ mL.L⁻¹ and $13,89 \pm 0,05$ mL.L⁻¹. The reducing power method showed higher EC_{50} values, with a maximum value of $14,62 \pm 0,09$ mL.L⁻¹ and a minimum of $30,71 \pm 0,24$ mL.L⁻¹.

The antioxidant activity was influenced either by the region of production, or by the number of yeast *Brettanomyces/Dekkera*. The wines from the Alto Douro region were the ones that revealed the higher antioxidant activity, with smaller EC_{50} values.

The results obtained in this work suggest that the volatile phenols production in wines is proportional to the size of the *Brettanomyces/Dekkera* population. This yeast is one of the biggest factor that affects the organoleptic properties of wine, therefore, the growth control of *Brettanomyces* is one of the main challenges in the modern production of wines, since its undesirables growth can cause great economical losses.

Key-words: *Brettanomyces/Dekkera*; 4-ethylphenol; 4-ethylguaiacol; total phenols; total flavonoids; antioxidant activity.

Índice de Tabelas

Tabela 1. Concentrações de Fenólicos Totais (mg Ácido Gálico.mL ⁻¹).....	16
Tabela 2. Amostragem (Região, Ano de Produção e Produtor).	25
Tabela 3. Concentrações (µg.L ⁻¹) das Soluções-Padrão.	29
Tabela 4. Programas de Operação na análise por Cromatografia Gasosa.	29
Tabela 5. Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos nas amostras de vinho.37	
Tabela 6. Tempo de retenção para os fenóis voláteis e padrão interno, obtidos por cromatografia gasosa.	40
Tabela 7. Valor das concentrações de 4-Etilguaiacol e 4-Etilfenol (µg.L ⁻¹) obtidos nos dois grupos de amostras.....	44
Tabela 8. Teor de fenóis e flavonoides totais nas amostras de vinho de acordo com os resultados microbiológicos.	49
Tabela 9. Teor de fenóis e flavonoides totais nas amostras de vinho de acordo com a região produtora.....	50
Tabela 10. Atividade antioxidante para as amostras de vinho de acordo com as análises microbiológicas.	54
Tabela 11. Atividade antioxidante para as amostras de vinho de acordo com a região produtora.....	55
Tabela 12. Matriz de correlação entre o teor de fenóis e flavonoides totais.	57
Tabela 13. Matriz de correlação entre a atividade antioxidante e o teor de fenóis, flavonoides totais e os compostos voláteis.	59
Tabela 14. Matriz de correlação entre os fenóis voláteis e o teor de fenóis, flavonoides totais e a contagem microbiana.	59
Tabela 15. Valor obtido para os compostos voláteis nas amostras de vinho analisadas.	89
Tabela 16. Concentrações de fenóis e flavonoides totais nas amostras de vinho analisadas.....	90
Tabela 17. Valores obtidos para a atividade antioxidante determinados pelo método DPPH e pelo Poder Redutor [mL.L ⁻¹] para as amostras de vinho.....	91

Índice de Figuras

Figura 1. Principais países produtores de vinho em 2012.....	2
Figura 2. Evolução da produção nacional de vinho de 2002 até 2012, em milhares de toneladas.....	2
Figura 3. Morfologia das células da estirpe <i>Brettanomyces</i>	6
Figura 4. Mecanismo de formação de etilfenóis por <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	11
Figura 5. Estrutura química dos principais ácidos fenólicos ¹	18
Figura 6. Estrutura química dos flavonoides.....	19
Figura 7. Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás.....	20
Figura 8. Regiões Vitivinícolas das amostras.....	24
Figura 9. Amostra de vinho.....	28
Figura 10. Amostra de vinho tratada com éter-hexano.....	28
Figura 11. Fração orgânica da amostra de vinho.....	28
Figura 12. Cromatógrafo Gasoso com Detetor de Ionização por Chama (FID).....	30
Figura 13. Representação da percentagem de vinhos em que se detetaram <i>Brettanomyces/Dekkera</i> prováveis.....	38
Figura 14. Observação macroscópica e microscópica da levedura <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	39
Figura 15. Cromatograma obtido do Nível 5 usado na curva de calibração.....	41
Figura 16. Cromatograma obtido da amostra B5.....	41
Figura 17. Concentração de 4-Etilguaiaicol e 4-Etilfenol [$\mu\text{g.L}^{-1}$] nas amostras de vinho.....	42
Figura 18. Concentração de fenóis totais (mg de Ácido Gálico (GAE). mL^{-1} de vinho) nas amostras de vinho.....	47
Figura 19. Concentração de flavonoides totais (mg de Quercetina (Q). mL^{-1} de vinho) nas amostras de vinho.....	47
Figura 20. Valores de EC_{50} determinados pelo método DPPH e Poder Redutor nas amostras de vinho.....	53
Figura 21. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e o conteúdo de flavonoides.....	92
Figura 22. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os valores obtidos de EC_{50} pelo ensaio antioxidante DPPH.....	92
Figura 23. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os 4-Etilguaiaicol....	93

Figura 24. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os valores obtidos de EC ₅₀ pelo ensaio antioxidante Poder Redutor.	93
Figura 25. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os 4-Etilfenol.	93
Figura 26. Correlação estabelecida entre contagem microbiana e o conteúdo de 4-Etilguaicol.	93
Figura 27. Correlação estabelecida entre contagem microbiana e o conteúdo de 4-Etilfenol.	93

Lista de Abreviaturas

FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
WLD	WL Differential Medium
GC	Cromatografia Gasosa
NaOH	Hidróxido de Sódio
Na₂CO₃	Carbonato de Sódio
AlCl₃	Cloreto de Alumínio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC₅₀	Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH
UFC	Unidades formadoras de Colónias
UFC.mL⁻¹	Unidades formadoras de Colónias por Mililitro
mL	Mililitros
mg	Miligramas
µg	Microgramas
µL	Microlitros
g	Gramas
µg.L⁻¹	Microgramas por Litro
mL.L⁻¹	Mililitros por Litro
mg.L⁻¹	Miligramas por Litro
mg.mL⁻¹	Miligramas por Mililitro
GAE	Equivalente em miligramas de ácido gálico por mililitro de vinho
Q	Quercetina



Capítulo 1

Introdução



1.1 Vinhos de Qualidade

A produção de vinho encontra-se espalhada por todo o mundo. Segundo a FAO ^[1], a França e Itália foram os maiores produtores de vinho em 2012 (Figura 1). Apesar de Portugal não constar entre os grandes produtores mundiais, a produção total de vinho nacional é bastante relevante face à de outros géneros alimentícios.

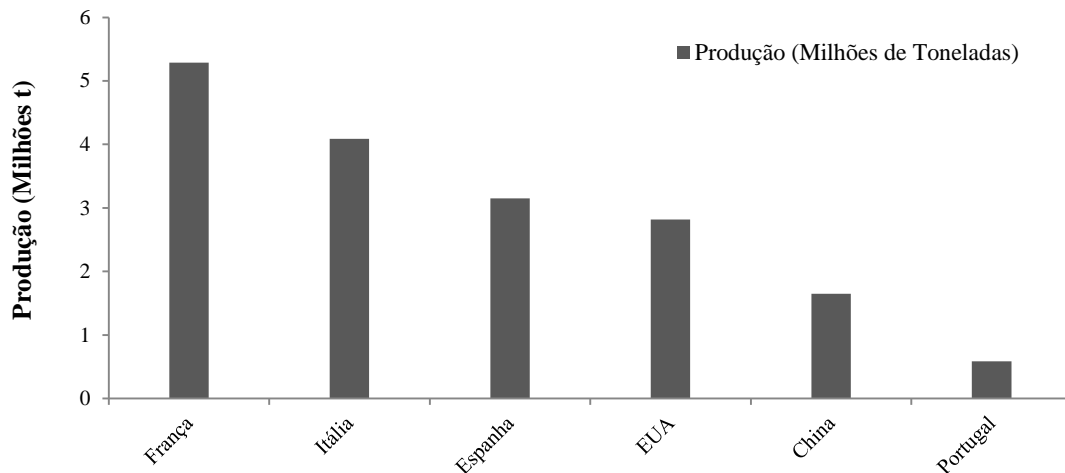


Figura 1. Principais países produtores de vinho em 2012, adaptado da FAOSTAT (2014).

Na última década verificou-se um decréscimo na produção deste produto, no entanto, o ano de 2010 foi um ano de franca recuperação para níveis próximos dos obtidos anteriormente a 2006. Em 2011 constatou-se uma nova baixa na produção, porém no ano de 2012 voltou a haver um aumento da produção e é expectável que a produção continue a aumentar progressivamente nos próximos anos (Figura 2).



Figura 2. Evolução da produção nacional de vinho de 2002 até 2012, em milhares de toneladas, adaptado da FAOSTAT (2014).

O vinho é uma bebida muito apreciada em todo o mundo, desde os tempos mais longínquos, poucos produtos agrícolas são tão universais, tornando-se uma bebida comum nas diferentes culturas.

Com a globalização do vinho, há que considerá-lo como um produto de elevado interesse económico e cultural, sendo crescente a exigência por parte dos consumidores tanto a nível da qualidade como a nível da estabilidade do produto.

Segundo a Comunidade Europeia, o vinho é uma bebida obtida unicamente pela fermentação alcoólica, de uvas frescas, esmagadas, ou não, ou de mostos de uvas ^[2].

Portugal devido às suas condições edafo-climáticas, é por excelência um país produtor de vinhos com características e qualidades únicas reconhecidas em todo o mundo.

O conceito de qualidade do vinho muitas vezes muda com a experiência, sendo definido de diversas maneiras. A qualidade do vinho pode ser avaliada em termos de subtilidade e complexidade, potencial de envelhecimento, expressão varietal, entre outros.

Muitos investigadores referem que é mais fácil reconhecer a qualidade de um vinho do que defini-la ^[3].

Vinhos de qualidade, independentemente de como são definidos, resultam da confluência de diversos atributos, incluindo essencialmente a qualidade da uva, o clima, o solo e a região produtora. Mas para além destes fatores naturais, também o vitivicultor tem um papel fundamental na definição das características específicas de um vinho, através da escolha das castas, dos métodos de cultura, de vinificação, de conservação, de envelhecimento ^[3]. O conjunto destas características tem possibilitado a produção de vinhos de alta qualidade e tipicidade únicas.

Muito provavelmente devido à variedade de condições edafo-climáticas existente no território nacional, Portugal encontra-se entre países com maior variedade de castas (Touriga Nacional, Tinta Cão, Aragonês, entre outras), sendo que a grande parte destas apresentam um elevado padrão de qualidade, potenciando vinhos com características próprias e de elevada qualidade.

1.2 Leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*

1.2.1 Aspetos Históricos

O nome “*Brettanomyces*” foi introduzido em 1904 por N.Hjelte Claussen de New Carlsberg Brewery para descrever especificamente a levedura utilizada na produção da cerveja inglesa “Stock Beer”, mais concretamente isolada da segunda fermentação lenta desta cerveja ^[4,5].

Os sabores produzidos por esta levedura tornaram-se característicos das cervejas britânicas da época, e por isso a sua designação derivou da relação próxima entre a levedura e o preparado industrial britânico, sendo o nome *Brettanomyces* uma alusão ao termo “British” ^[6,7].

A levedura *Brettanomyces spp.* pode ser encontrada quer em vinhos quer em cervejas de aromas fortes, produzidas de forma tradicional, a qual pode já se encontrar presente ou ser adicionada durante a fermentação, sendo responsável pelo sabor e aromas tradicionais deste tipo de cerveja.

O seu género tornou-se reconhecido em 1920s quando uma levedura semelhante foi isolada a partir da Cerveja Lambic da Bélgica ^[4,5].

Nas décadas de 1950 e 1960 a levedura foi identificada como *Brettanomyces spp.* sendo também isolada em vinhos provenientes de França, África do Sul e Itália ^[8,9]. Só a partir dos anos de 1980s e 1990s é que se verificou que esta levedura tinha capacidade de transmitir aromas característicos ao vinho ^[4,5].

A ocorrência de *Brettanomyces* em vinhos foi reportada em países como Portugal, Alemanha, África do Sul, França, Espanha, Inglaterra, Nova Zelândia, Austrália, Brasil, Uzbequistão e Estados Unidos ^[10].

Na Argentina foi também detetada a presença destas leveduras em mostos durante a fermentação e antes do engarrafamento ^[11]. Licker *et al.* (1998) ^[10] referem a ocorrência de *Brettanomyces*, pela primeira vez em Jura, França, em 1955.

O género *Brettanomyces* foi considerado como anamorfo ou imperfeito, até ao momento em que van der Walt e van Kerken em 1960, relataram a formação de ascósporos nas leveduras, mais concretamente em espécies de *B.bruxellensis* ^[6,7]. Em 1964, van der Walt propôs o nome *Dekkera* para este género, caracterizado por apresentar uma forma perfeita ou telemorfo e duas espécies: *D.bruxellensis* e

D.intermedia ^[12], considerando-se *Bretanomyces spp.* como a forma não esporulada do género *Dekkera*, no entanto, esta diferenciação não era clara.

Desde então, têm ocorrido várias mudanças taxonómicas nestas leveduras. Van der Walt (1984) ^[13] referenciou a existência de nove espécies de *Brettanomyces* (*B.abstinensis*, *B.anomalus*, *B.bruxellensis*, *B.curtersianus*, *B.curtesii*, *B.intermedius*, *B.lambicus* e *B.naardenensis*) e duas espécies de *Dekkera* (*D.bruxellensis* e *D.internedia*). Barnett *et al.* (1990) ^[14] identificaram quatro espécies de *Dekkera*: *D.anomala*, *D.bruxellensis*, *D.curtersianus* e *D.naardenensis*, agrupando *Brettanomyces* igualmente em quatro espécies.

Atualmente, são aceites cinco espécies pertencentes ao género *Brettanomyces/Dekkera*: *B.anomalus*, *B.bruxellensis*/*D.bruxellensis*, *B.custersianus*, *B.naardensis* e *B.nanus* ^[15], sendo *B.bruxellensis* entre todas as espécies a que mais impacto tem nos vinhos ^[6,7,9].

Diferentes autores relatam a presença de *Brettanomyces* em diferentes ambientes, desde vinhos, adegas, cervejas, fábricas de cidra, tequila e chás. Ela pode ser encontrada nestes ambientes bem como nos produtos finais devido tanto à capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo como de iniciar o crescimento em produtos acabados e armazenados ^[6].

1.2.2 Caracterização do género *Brettanomyces/Dekkera*

Estas leveduras de contaminação são conhecidas em enologia por provocar graves defeitos olfativos, que determinam a deterioração do vinho ^[16]. Na maioria das vezes consideradas deteriorantes, são leveduras que fazem parte da microbiota de outros produtos, como a cerveja, sidra, refrigerante ^[17].

Brettanomyces/Dekkera bruxellensis entre todas as espécies é referida como a que provoca mais impacto na qualidade do vinho, podendo ser isolada quer da superfície de uvas quer de barricas de madeira durante o armazenamento ou o envelhecimento dos vinhos ^[18-20].

B.bruxellensis apresenta uma forma oval ou elíptica com dimensões típicas de 2 a 7 µm e reproduz-se por gemulação ^[21] (Figura 3). Quanto à morfologia pode variar desde a forma elíptica à forma ramificada após alguns meses de incubação.

A sua fisiologia tem sido bastante estudada devido à grande capacidade de produção de compostos aromáticos não desejáveis e também à sua possibilidade de

realizar o efeito de Custer, que consiste no impedimento da fermentação alcoólica em condições de anaerobiose, produzindo grandes concentrações de ácido acético [4,22,23].



Figura 3. Morfologia das células da estirpe *Brettanomyces*
(Fonte: Suárez *et al.*, 2007) [16].

A presença de *Brettanomyces* em vinhos é comum quando estes são fermentados ou envelhecidos em barricas de carvalho [24].

Tal como referido anteriormente, foram encontrados em todo o mundo subtipos genéticos semelhantes de *B.bruxellensis*, sugerindo que esta levedura se espalhou geograficamente, provavelmente devido ao comércio internacional de sumo de uva, de barricas, e equipamentos. No entanto, podem também ter sugerido independentemente adaptações genéticas idênticas devido a condições de “stress” semelhantes nos ambientes de vinificação [20].

1.2.3 *Brettanomyces/Dekkera* no vinho

B. bruxellensis é uma levedura de crescimento lento, pouco exigente nutricionalmente e depende de fontes de carbono específicas, podendo crescer utilizando a glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e trealose [25,26].

Estas leveduras podem ser encontradas em qualquer uma das fases de vinificação, no entanto, devido à elevada tolerância ao etanol (*Brettanomyces* pode tolerar entre 14,0 a 14,5 % (v/v) [27]), a baixos níveis de açúcares e, ao, facto das barricas de madeira poderem ser uma fonte de contaminação, está mais frequentemente associada ao

envelhecimento dos vinhos, fermentações alcoólicas paradas ou lentas e também à fermentação malolática [28,29].

Apresenta uma temperatura ótima de crescimento de 25°C a 32°C, sendo capaz de crescer numa gama que varia entre 10°C e 37°C. No entanto, alguns autores relataram uma perda completa de viabilidade se as amostras forem submetidas a 36°C durante 12 horas [9,30,31].

Devido à produção de ácido acético, *Brettanomyces* pode abrandar o crescimento de outras leveduras nomeadamente, *Saccharomyces sp.* [32].

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

As variedades de *Vitis vinifera* de vinhos tintos que contenham um teor mais elevado de precursores fenólicos são as mais suscetíveis a uma posterior contaminação dos vinhos por *Brettanomyces*. Por outro lado, as variedades de uvas com baixo teor em compostos fenólicos (caso do *Pinot Noir*) apresentam, geralmente, níveis de ácido p-cumárico mais baixos, levando a que a levedura tenha menos substrato para a produção de 4-etilfenol [5]. A fermentação malolática é considerada um período de grande vulnerabilidade por estar associada a baixos níveis de dióxido de enxofre livre na presença de açúcares residuais [7].

O crescimento lento de *B.bruxellensis* contribuiu para que os vinhos envelhecidos em madeiras por longos períodos de tempo se tornem mais suscetíveis à sua influência [16]. Como os vinhos tintos de alta qualidade são, vulgarmente, envelhecidos em barricas de madeira por tempo prolongado, o risco de serem contaminados por *Brettanomyces* aumenta. Esta pode ser, encontrada na madeira até uma profundidade de 8 milímetros na madeira [33].

Brettanomyces é mais frequentemente isolada em vinhos tintos do que em vinhos brancos. A perda de viabilidade, e consequentemente a não proliferação em vinhos brancos, deve-se essencialmente à eficácia do dióxido de enxofre para valores de pH baixos [27] e também ao facto das variedades de uvas usadas para a elaboração de vinhos brancos apresentarem menores teores de precursores fenólicos [34].

A produção dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaiacol por *B.bruxellensis* é o principal fator que afeta as propriedades sensoriais do vinho [23]. Pequenas diferenças nas concentrações de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol podem ser detetados pelos consumidores e quantificados por provadores treinados [35].

A presença da *Brettanomyces* pode ser considerada como positiva ou negativa, dependendo da concentração, mas também da expectativa de um vinho em particular, mais concretamente, em baixas concentrações os compostos fenólicos podem contribuir para a complexidade do aroma do vinho, mas em altas concentrações podem agravar o aroma do vinho e contribuindo com sabores desagradáveis ^[36].

Na maioria das regiões produtoras de vinhos foram isoladas estirpes de *Brettanomyces* ^[25]. Chatonnet *et al.* (1992) ^[27], Loureiro & Malfeito-Ferreira (2003) ^[34] verificaram que 25% dos vinhos tintos analisados continham o composto 4-etilfenol em níveis superiores ao limite ($620 \mu\text{g.L}^{-1}$) acima do qual o vinho é normalmente rejeitado pelos consumidores.

Vários investigadores sugeriram que o controlo do crescimento de *Brettanomyces* é o maior desafio microbiológico na produção moderna de vinhos, já que o seu crescimento indesejado provoca graves perdas económicas ^[37,38].

1.2.4 Detecção e Quantificação da *Brettanomyces/Dekkera* no vinho

A deteção e quantificação de *B.bruxellensis* no vinho e nas potenciais fontes de contaminação deste é de extrema importância devido à sua capacidade de deterioração e, conseqüentemente, às perdas económicas para a indústria do vinho. A deteção desta levedura deve ser realizada de forma rápida, de modo a que os enólogos possam agir prontamente e consigam evitar um nível de deterioração elevado, minimizando custos com o tratamento do vinho contaminado.

A ausência de *B. bruxellensis* deve ser averiguada regularmente durante o armazenamento, pois apenas a presença de uma célula viável por garrafa pode danificar o produto caso seja armazenado durante o período de tempo necessário para a multiplicação das leveduras ^[39]. O isolamento da *B.bruxellensis* a partir do vinho é bastante difícil, devido à baixa taxa de crescimento (15 a 20 dias), especialmente quando este se encontra contaminado com outras leveduras ^[6,7,40,41].

O método mais adequado e reproduzível para a deteção e quantificação é através de análises microbiológicas, mais concretamente o crescimento em placa em meio de cultura adequado ^[42].

Para a deteção de leveduras de deterioração, têm sido desenvolvidos meios seletivos e/ou diferenciais, nos quais se varia o tipo e concentração de agentes antimicrobianos seletivos e as fontes de carbono, de forma a inibir o crescimento de

outros microrganismos ^[43]. Estes meios contêm os compostos específicos utilizados para seleccionar ou indicar a presença da *Brettanomyces spp.* em conjunto com compostos essenciais para o seu crescimento, como vitaminas ^[44]; etanol por esta levedura ser tolerante ^[45]; cloranfenicol com o intuito de prevenir o crescimento bacteriano ^[46]; cicloheximida para prevenir o crescimento de *Saccharomyces* em doses a partir de 20 até 100 mg.L⁻¹ em conjunto com o ácido p-cumárico, como precursor de 4-etilfenol ^[15,41,46]; e verde de bromocresol utilizado como indicador da acidificação do meio ^[41]. Entre eles destaca-se o meio YPG (Yeast Peptone Glucose) ao qual se adiciona ácido p-cumárico e o meio WLD (WL Diferencial), com a adição da cicloheximida com o objetivo de favorecer o crescimento da *Brettanomyces* ^[6-9, 47].

Recentemente, foi proposto o meio DBDM (*Dekkera/Brettanomyces* Differential Medium), que permite recuperar *Brettanomyces* a partir de vinhos onde estas leveduras se encontrem em concentrações baixas, sendo as restantes leveduras de contaminação inibidas ^[41].

Assim, o uso de meios de cultura seletivos e longos períodos de incubação são essenciais para a sua recuperação. Sendo já isolada a partir de uvas ^[48,49], equipamento e ambiente em adegas ^[50]. É dominante em vinhos tintos engarrafados, como produtora de etilfenóis devido à sua capacidade de permanecer viável por longos períodos de tempo bem como pela aptidão em proliferar quando as condições de “stress” diminuem ^[51].

B. bruxellensis pode ser encontrada em qualquer fase de produção de vinhos, e pode também permanecer em estado viável mas não cultivável ou em estado dormente, em vinhos, por longo período de tempo. A presença de *Brettanomyces* pode ser detetada desde cedo, direta ou indiretamente através da análise dos seus metabolitos, visto que, os metabolitos voláteis podem estar presentes mesmo quando a presença das células da levedura são indetetáveis ou minimamente detetáveis.

Couto *et al.* (2005) ^[52] desenvolveram um método de deteção baseado no crescimento em meio de cultura líquido, bastante sensível e simples de ser usado em adegas. Depois da inoculação com vinho, o crescimento é monitorizado através da inspeção visual da turbidez do meio bem como, por análises olfativas periódicas. Os vinhos contaminados por *Brettanomyces* desenvolvem uma visível turbidez e aroma a 4-etilfenol, facilmente detetado pelo odor. Em caso positivo, o tempo que leva até ao aparecimento de resultados permite ter uma ideia do nível de contaminação.

Os métodos clássicos de microbiologia, como cultura em placa e em caldo ou características morfológicas não são suficientes por si só para a identificação de

Brettanomyces spp., daí que tenham que ser combinados com outras técnicas como microscopia fluorescente, polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase), cromatografia gasosa, sistemas API, espectrometria de massa ou análise sensorial com painel treinado ^[16].

Em relação à cromatografia gasosa é considerada uma técnica precisa, mas em contrapartida é demorada. Esta técnica é frequentemente combinada com a espectrometria de massa (GCMS) ou com outros métodos olfativos para a identificação volátil ^[53].

1.2.5 Controlo da *Brettanomyces/Dekkera* no vinho

O enólogo dispõe de uma série de medidas com o objetivo de prevenir a contaminação dos vinhos. Estas medidas compreendem desde o uso de substâncias que inibem ou destroem os microrganismos, como tratamentos químicos (uso de dióxido de enxofre e dicarbonato dimetilico, etc) ou tratamentos térmicos. Outras alternativas, como a clarificação ou filtração, embora não possuam efeito letal, constituem uma alternativa para diminuir ou eliminar a presença de possíveis microrganismos contaminantes. Todas estas medidas devem ser acompanhadas por rigorosos processos de limpeza, a fim de prevenir contaminação das superfícies da adega bem como dos equipamentos. Além disso há que averiguar se o próprio vinho não apresenta um ambiente favorável ao crescimento microbiológico ^[54].

As características intrínsecas que cada vinho apresenta determinam a eficiência das medidas de controlo aplicadas. Por exemplo, um vinho que apresente um elevado teor em etanol torna-se menos suscetível de ser alvo de contaminações, ao contrário, o baixo teor em nutrientes estimula o crescimento microbiano ^[54].

Como a levedura *B. bruxellensis* é o principal organismo responsável pela contaminação em garrafa, muitos esforços têm sido concentrados na aplicação de medidas de controlo e minimização dos seus efeitos ^[51], apesar disso ainda não é possível eliminá-la completamente, pois trata-se de uma levedura pertencente à flora natural do processo de vinificação. Como a deterioração causada por espécie é inevitável em condições que favorecem a sua proliferação, as medidas de controlo têm de ser empregues em toda a linha de produção, desde a vinha até ao engarrafamento. Estas medidas centram-se tanto no controlo da presença e crescimento de *B.*

bruxellensis como no controlo da presença de precursores para a produção de aromas fenólicos no produto final.

1.3 Fenóis Voláteis

1.3.1 Mecanismos de produção de voláteis por *Brettanomyces/Dekkera*

Geralmente a deteção dos aromas produzidos por *Brettanomyces* ocorre durante a maturação dos vinhos em barricas de madeira [55]. Na produção destes aromas, está envolvida a ação de duas enzimas, as quais atuam produzindo os ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, ferúlico ou caféico). Estes ácidos fenólicos, organoleticamente não apresentam nenhum sabor ou odor em particular, no entanto são precursores para a formação de fenóis voláteis (vinilfenóis e etilfenóis) que afetam fortemente a qualidade sensorial do vinho.

Primeiramente, a enzima hidroxicinamato descarboxilase transforma os ácidos hidroxicinâmicos em hidroxiestirenos, ou vinilfenóis [56], que serão posteriormente reduzidos a derivados etil pela enzima vinilfenol redutase produzindo assim os etilfenóis (Figura 4) [28]. O ácido p-cumárico e ferúlico são descarboxilados a 4-vinilfenol e 4-vinilguaiaicol pela enzima hidroxicinamato descarboxilase e em seguida estes compostos são reduzidos a 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol por ação da enzima vinilfenol redutase [6-9,16,57,58] (Figura 4).

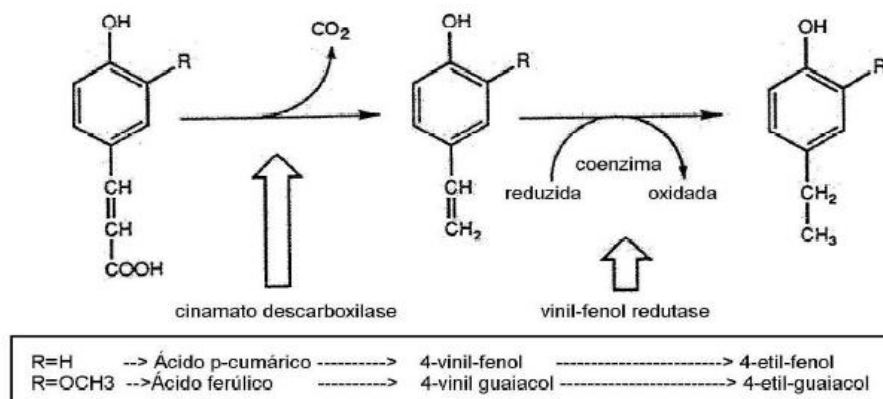


Figura 4. Mecanismo de formação de etilfenóis por *Brettanomyces/Dekkera* (adaptado de Chatonnet *et al.*, 1992) [34].

Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes nas uvas e são extraídos para o suco principalmente, no processo de maceração, alguns podem ser convertidos em derivados de vinilfenol e etilfenol, dependendo da população microbiana ^[57,58].

Existem algumas espécies de bactérias capazes de danificar os ácidos hidroxicinâmicos por uma via metabólica diferentes. Esta via alternativa foi pela primeira vez descrita por Whitin e Carr (1959) ^[59] e consiste igualmente numa reação de dois passos. O primeiro passo consiste na redução do ácido hidroxicinâmico por ação da enzima ácido fenólico redutase, sendo o segundo passo uma reação de descarboxilação que transforma o ácido fenólico previamente reduzido em etilfenóis. A principal diferença entre as duas vias é o tipo de compostos intermediários produzidos ^[60,61]. Esta última via leva à produção de ácidos fenilpropiónicos como compostos intermediários em vez de vinilfenóis, que podem futuramente ser descarboxilados aos correspondentes etilfenóis ^[60].

Ambas as vias metabólicas coexistem em alguns microrganismos. Por exemplo algumas bactérias do ácido láctico são capazes de produzir etilfenóis através da primeira via e são também capazes de produzi-los pela via alternativa ^[62,63]. Neste sentido, entre estes microrganismos parece existir uma concorrência entre as duas vias, e a produção de fenóis voláteis, quer pela primeira, ou pela segunda ou até mesmo por ambas depende da concentração inicial dos ácidos hidroxicinâmicos ou da mistura deles ^[60,64].

Existem outras espécies de leveduras competentes de reduzir o ácido p-cumárico a 4-vinilfenol, no entanto apenas *B.bruxellensis* tem a capacidade para reduzir o composto 4-vinilfenol a compostos aromáticos, 4-etilfenol ou 4-etilguaiacol em grandes quantidades ^[65].

A enzima responsável pela descarboxilação encontra-se presente num elevado número de bactérias, fungos, e outras leveduras, no entanto a enzima responsável pela redução, encontra-se apenas presente nas espécies, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomala*, *Pichia guillermondii*, *Candida versatilis*, *Candida halophila* e *Candida manniotfaciens* ^[28,56,65,66].

Inicialmente pensava-se que a presença de fenóis voláteis nos vinhos era devida à presença de bactérias do ácido láctico, de facto, elas são capazes de produzir quantidades significativas de vinilfenóis, mas em contexto enológico apenas produzem pequenas quantidades ^[16]. Existem outras leveduras presentes nos vinhos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Torulaspora spp.* e *Zygosaccharomyces spp.*

que apresentam também a capacidade de produzirem 4-vinilfenol mas não de reduzir este composto em 4-etilfenol ^[28].

Vinhos contaminados por *Brettanomyces*, além do caráter fenólico, que concede aromas desagradáveis, podem também apresentar coloração indesejada, que podem resultar da atividade glicosídica ou da formação de complexos vinilfenol-piranoantocianinas ^[7].

Vinhos afetados por *Brettanomyces* têm vários descritores sensoriais como “picante”, “smoky”, “couro”, “animal”, sendo o mais conhecidos “suor a cavalo” ^[6,8]. Para além dos odores, os fenóis voláteis em concentrações elevadas também afetam o paladar com um aumento na adstringência e amargura descrito como sabor metálico ^[6].

A concentração dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaiacol que afetam negativamente o aroma do vinho variam entre 620 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 140 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com o limiar de perceção de 426 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (para uma mistura de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol na proporção 10:1 em vinhos tintos) ^[34]. O 4-etilfenol e o 4-etilguaiacol estão presentes em concentrações e razões variáveis, sujeitando da variedade de uva usada na elaboração e do tipo de vinho. Em média, eles aparecem numa proporção de 10 para 1 respetivamente, o que corresponde aproximadamente à razão dos respetivos precursores, ácido p-cumárico e ácido ferúlico ^[34,67].

Estudos recentes demonstram que *B. bruxellensis* pode não ser o único organismo responsável pela produção de 4-etilguaiacol e 4-etilfenol e que nem todas as estirpes desta espécie têm a capacidade de produzir estes compostos. Um estudo conduzido por Conterno *et al.* (2006) ^[25], demonstrou que 20% das estirpes de *Brettanomyces* não são produtoras de fenóis voláteis. Outros organismos como *Pediococcus pentasaceus* e *Lactobacillus brevis* parecem ter a capacidade de descarboxilar o ácido p-cumárico em 4-vinilfenol, mas poucas espécies, como a *Brettanomyces* e *Lactobacillus plantarum* são capazes de produzir etilfenóis ^[65]. Couto *et al.* (2006) ^[61], verificaram que 37% das bactérias lácticas testadas produtoras de ácidos foram capazes de produzir fenóis voláteis (apesar de que apenas 9% produziram 4-etilfenol como produto final).

O que distingue *Brettanomyces* dos outros organismos é a produção relativamente elevada de etilfenóis. Por exemplo, *Pichia guilliermondii* é capaz de converter o ácido p-cumárico em 4-etilfenol em sumo de uva, em equipamentos enológicos, mas em vinhos a conversão é muito reduzida ^[28], o que torna a levedura *Dekkera/Brettanomyces* a principal responsável pelo aparecimento do caráter fenólico em vinhos ^[23,68].

A formação do “caráter Brett” é influenciada pela estirpe, pelo pH do vinho, pela quantidade de nutrientes presentes no mosto, e pelo estado de contaminação da adega e equipamentos ^[67]. A quantidade de azoto fermentável é mais importante na produção de aromas desagradáveis, do que a quantidade de açúcares residuais ^[69]. Também a indução da produção de aromas desagradáveis pelo ácido p-cumárico parece ser superior à dos outros precursores, como o ácido ferúlico, no entanto este efeito varia consoante a estirpe em questão ^[70].

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

A formação de fenóis voláteis no vinho depende da presença de precursores e é proporcional ao tamanho da população de *Brettanomyces/Dekkera* ^[16,71]. De acordo com o descrito por Gerbeau *et al.* (2000) ^[71] diferentes estirpes de *B. bruxellensis* variam na sua capacidade para produzir fenóis voláteis, embora esta seja sempre maior quando as concentrações de álcool são inferiores, mais concretamente inferior a 12% v/v, e quando a temperatura dos vinhos se encontra mais elevada do que o normal (13°C), isto é, temperaturas superiores a 18°C. Pouca importância é atribuída ao pH do vinho ou à presença de açúcares residuais no que diz respeito à produção de compostos voláteis ^[16].

A intensidade, a temperatura de maceração e o uso de enzimas pectolíticas têm sido estudadas como possíveis fatores que condicionam a formação de fenóis voláteis por *Brettanomyces* a partir dos ácidos hidroxicinâmicos libertados das cascas da uva ^[72].

O crescimento de *Brettanomyces* em meio sintético contendo *Saccharomyces cerevisiae* autolisada também tem sido avaliado ^[73]. Nestas condições, verificou-se que as leveduras contaminantes cresceram facilmente, mesmo na presença de concentrações de glucose <150 mg.L⁻¹. No entanto, a quantidade de etilfenol formada foi menor do que esperado, provavelmente devido à absorção dos compostos fenólicos por fragmentos da parede celular.

O uso de barris de madeira pode aumentar a presença de *Brettanomyces* em vinhos, por estes serem difíceis de limpar e não esterilizáveis. Adicionalmente, a reutilização frequente destes barris e o uso de técnicas de micro-oxigenação para acelerar a maturação do vinho, facilita a polimerização de pigmentos e a modificação do perfil aromático de vinho, resultando na proliferação de *Brettanomyces* ^[32,74,75].

1.4 Compostos Biativos do Vinho

O vinho tem merecido particular atenção por parte dos investigadores de todo o mundo, devido às suas propriedades biológicas, nomeadamente, atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-proliferativa, anti-inflamatória, anti-ateroscleróticas, anti-cancerígena e anti-fúngica ^[76-84].

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Entre as frutas, a uva (*Vitis vinífera L.*) é uma das principais fontes de compostos fenólicos.

1.4.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos revestem-se de grande importância em enologia uma vez que estão relacionados, direta ou indiretamente com a qualidade dos vinhos, pois deles depende a sua coloração, sabor, adstringência ou amargor, assim como são responsáveis pelas diferenças entre uvas, vinhos tintos e brancos, pela presença ou ausência de antocianinas ^[85,86].

Estes compostos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos, incluindo seus grupos funcionais ^[78,87].

Estas moléculas são sintetizadas em diferentes partes das uvas e são extraídas durante o processamento do vinho. Existem três fatores que influenciam a presença de compostos fenólicos no vinho e conseqüentemente, as suas propriedades organolépticas: a transformação do substrato previamente presente na uva que pode ser enzimática; a atividade microbiana de algumas leveduras que podem converter substâncias não fenólicas em compostos fenólicos; e por fim o contacto com a madeira das barricas onde os fenóis podem ser progressivamente eluídos da madeira ^[85,86].

O conteúdo fenólico dos vinhos está dependente de diferentes características como variedade da uva, grau de maturação, o local, solo e condições ambientais em que a uva se desenvolve ^[82,83]. Está também condicionado pelas técnicas de vinificação ^[83,84], bem como pelos métodos de envelhecimento dos vinhos ^[84].

Durante o processamento do vinho há parâmetros que podem ter influência na extração dos compostos fenólicos, em particular a prensagem, o tempo, a temperatura de maceração e o teor em etanol. Devido a todos estes fatores o conteúdo em compostos fenólicos é dos fatores mais variáveis de vinho para vinho ^[85,86].

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos tendo em conta a similaridade das suas cadeias de átomos de carbono, os não-flavonoides que incluem os ácidos fenólicos, aldeídos e álcoois; e os flavonoides que compreendem as antocianinas, flavonóis e flavanóis ^[85,88].

Tabela 1. Concentrações de Fenólicos Totais (mg Ácido Gálico.mL⁻¹).

Fenólicos totais			
(mg.mL⁻¹ equivalentes de Ácido Gálico)			
Mínimo	Máximo	Autores	Ano
1,262	2,389	Villano <i>et al.</i> ^[89]	2004
2,123	3,183	Katalinic <i>et al.</i> ^[90]	2004
1,724	1,936	Paixão <i>et al.</i> ^[91]	2007
1,400	3,400	Stasko <i>et al.</i> ^[92]	2008
2,082	3,184	Roussis <i>et al.</i> ^[93]	2008
1,775	3,014	Rivero-Pérez <i>et al.</i> ^[94]	2008
2,170	2,420	Lorenzo <i>et al.</i> ^[95]	2008
2,280	3,730	DiMajo <i>et al.</i> ^[96]	2008
1,402	3,130	Li <i>et al.</i> ^[97]	2009
3,200	5,900	Lucena <i>et al.</i> ^[98]	2010
1,147	2,984	Versari <i>et al.</i> ^[99]	2010
1,042	1,959	Granato <i>et al.</i> ^[100]	2010
1,244	3,188	Chira <i>et al.</i> ^[101]	2011
1,984	2,161	Ginjom <i>et al.</i> ^[102]	2011
1,012	3,264	Seruga <i>et al.</i> ^[103]	2011
0,554	2,669	Vrcek <i>et al.</i> ^[104]	2011
2,288	2,813	Gris <i>et al.</i> ^[105]	2013

1.4.1.1 Compostos Não-Flavonoides

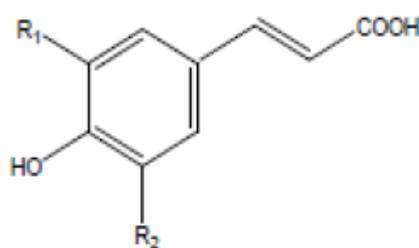
Os compostos não-flavonoides correspondem aos compostos fenólicos mais simples, mais concretamente os ácidos fenólicos, aldeídos e álcoois, sendo que no vinho os compostos fenólicos não-flavonoides predominantes são ácidos fenólicos.

Os ácidos fenólicos provêm de diferentes partes da uva e são extraídos durante a maceração no processamento do vinho. Os dois maiores subgrupos de ácidos fenólicos são os ácidos hidroxibenzoicos e os ácidos hidroxicinâmicos, os quais se encontram presentes em concentrações na ordem de 100-200 mg.L⁻¹ em vinhos tintos e 10-20 mg.L⁻¹ em vinhos brancos [78].

Os ácidos hidroxibenzoicos apresentam uma estrutura do tipo C₆-C₁ derivada diretamente do ácido benzóico [85]. A substituição do anel de benzeno é responsável pelas diferenças existentes entre os ácidos que têm sido identificados no vinho (Figura 5).

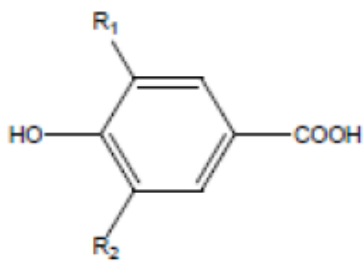
Vários ácidos hidroxicinâmicos de estrutura C₆-C₃, têm sido identificados em vinhos e uvas onde aparecem principalmente sob a forma combinada, esterificados com açúcares ou ácidos orgânicos, principalmente o ácido tartárico. Os ésteres tartáricos de ácidos hidroxicinâmicos (ácido caftárico, coutárico e fertárico) podem ser hidrolisados na presença de pectinas metil esterases, dando origem aos ácidos cafeico, p-cumárico e ferúlico [78,86].

Ácidos Hidroxicinâmicos C₆-C₃



- Ácido *p*-cumárico: R₁= R₂= H
- Ácido cafeico: R₁= OH; R₂= H
- Ácido ferúlico: R₁= OCH₃; R₂= H
- Ácido sinápico: R₁= R₂= OCH₃

Ácidos Hidroxibenzoicos C₆-C₁



Ácido *p*- hidroxibenzoico: R₁= R₂= H

Ácido protocatéquico: R₁= OH; R₂= H

Ácido vanílico: R₁= OCH₃; R₂= H

Ácido gálico: R₁= R₂= OH

Ácido siríngico: R₁= R₂= OCH₃

Figura 5. Estrutura química dos principais ácidos fenólicos (Moreno-Arribas, 2009) ^[87].

Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos das células da película e da polpa, sob a forma de ésteres tartáricos. Estes compostos apresentam um papel fundamental nas oxidações que conduzem ao acastanhamento dos mostos e dos vinhos ^[106]. Os ácidos fenólicos que se encontram distribuídos na casca e na polpa da uva, diminuem com o amadurecimento, podendo ser utilizados para a discriminação de variedades ^[107].

Organolepticamente, os ácidos fenólicos não apresentam nenhum sabor ou odor particular, ou seja, não influenciam de forma direta o gosto dos vinhos, no entanto são precursores para a formação de fenóis voláteis (vinilfenóis e etilfenóis) que afetam fortemente a qualidade sensorial do produto.

1.4.1.2 Compostos Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos que se caracterizam por apresentarem um esqueleto básico e comum C₆-C₃-C₆, tem dois anéis fenólicos substituídos (anel A e B) e um heterocíclico oxigenado (anel C) (Figura 6) ^[108-110].

Esta classe de compostos fenólicos pode-se dividir em famílias que se distinguem pelo grau de oxidação do anel pirano: flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanóis, antocianinas, proantocianidinas e flavononas ^[110].

Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos deve-se a esta família de compostos que se encontram nas grainhas, na polpa e na película das uvas. De todos eles, as antocianinas, os flavanóis e as proantocianidinas, são quantitativamente os mais importantes.

Os flavonoides têm despertado um crescente interesse por se ter verificado uma relação inversa entre o seu consumo e o risco de doenças crónicas não-transmissíveis como o cancro e doenças cardiovasculares ^[111,112].

Entre os vários flavonoides associados ao vinho, os mais abundantes são, os flavonóis. Entre eles destacam-se a quercetina, miricetina, e campferol, tendo sido atribuído a estes compostos atividade antioxidante e anti-histamínica ^[113]. A quercetina está também associada ao combate de doenças crónicas ^[114].

As antocianinas têm grande interesse nutricional por apresentarem atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-viral, anti-bacteriana e antitumoral. Evidenciam também efeitos positivos na indução de produção de insulina em células pancreáticas isoladas e proteção de neurónios frente aos efeitos destrutivos do álcool ^[115-117].

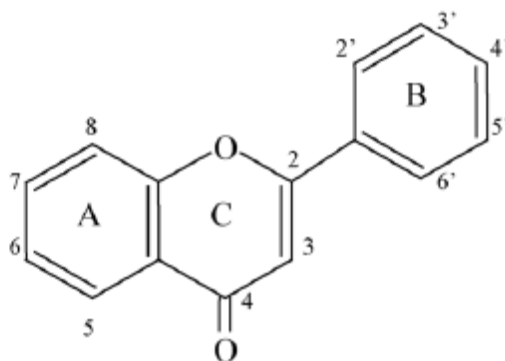


Figura 6. Estrutura química dos flavonoides (Cushmie *et al.*, 2005) ^[118].

1.5 Métodos Analíticos

1.5.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é uma técnica de separação e análise de misturas por interação dos seus componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Na cromatografia gasosa, a amostra é injetada no topo de uma coluna cromatográfica que contém a fase estacionária, onde ocorre a separação da mistura. As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas na fase móvel e passam por um detetor que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material separado. A fase móvel, neste caso o gás de arraste, deve apresentar algumas características como, ser quimicamente inerte (não interagir nem com a amostra, nem com a fase estacionária), ser puro (isento de impurezas que possam contaminar a amostra ou gerar ruído no sinal) e ser compatível

com o detetor. Os gases de arraste geralmente mais utilizados são o hélio, o azoto, e o hidrogénio ^[119,120].

A Figura 7 ilustra os componentes básicos de um equipamento para cromatografia gasosa.

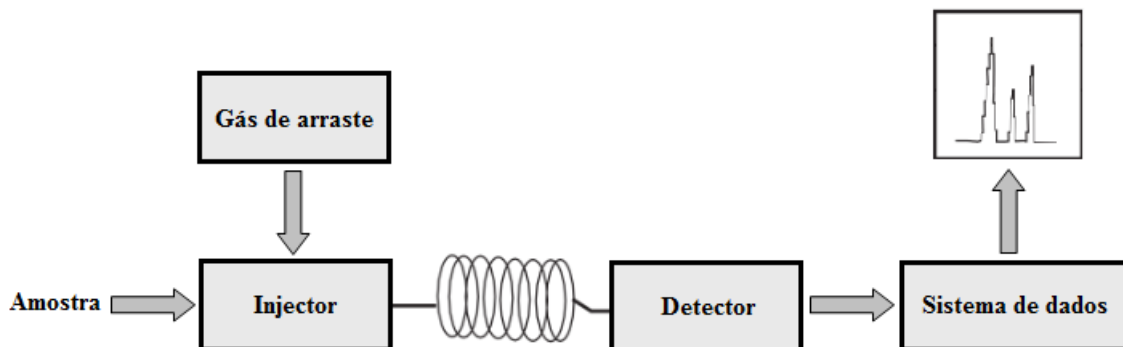


Figura 7. Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás.

A injeção da amostra deve ser instantânea de modo a evitar a diminuição da eficiência da coluna e a temperatura do injetor deve estar 50°C acima da temperatura de ebulição do componente menos volátil. A ponta da agulha da micro seringa é introduzida no início da coluna e a amostra injetada é instantaneamente vaporizada sendo forçada pelo gás de arraste a fluir pela coluna ^[119,120].

A fase estacionária deve apresentar características próximas dos solutos que vão ser separados, ter seletividade, ser quimicamente inerte relativamente à amostra, ter volatilidade baixa, ter estabilidade térmica, ser pouco viscosa e pura.

O detetor é o dispositivo que indica e quantifica os compostos separados pela coluna, examinando continuamente o material e gerando um sinal na passagem de substâncias que não sejam o gás de arraste. Este deve ter uma resposta rápida e linear, ser altamente sensível, ter boa estabilidade durante grandes intervalos de tempo e responder a uma grande variedade de compostos ^[119,120].

A cromatografia gasosa foi usada por vinícolas ou laboratórios externos para a deteção e quantificação da atividade de deterioração provocada por *Brettanomyces*, nomeadamente o composto químico 4-etilfenol.

Esta técnica é um método de cromatografia para a deteção de compostos voláteis. O método permite a separação dos compostos presentes numa amostra uma vez que alguns compostos eluem mais rapidamente do que outros, apresentando cada composto um tempo de retenção diferente. A intensidade medida por cada um dos compostos é

proporcional à sua concentração. Deste modo, o método GC pode detetar e quantificar fenóis voláteis de uma amostra após a extração de fenóis do vinho.

Tanto quanto sabemos, a levedura *Brettanomyces* é o único microrganismo que cresce em vinhos produzindo altas concentrações de 4-etilfenol. Consequentemente, as análises cromatográficas de um vinho podem atuar como um indicador para a sua presença ou presença anterior.

A deteção de fenóis voláteis tem resultados mais rápidos do que as contagens em placas, mas é habitual encontrar vinhos com elevados teores de fenóis voláteis e ausência de crescimento em meio de cultura. Estes resultados podem ser explicados pelo facto, destas leveduras se apresentarem num estado viável mas não cultivável (VBNC) ou pela perda de viabilidade, após a produção de etilfenol. Por outro lado, os baixos níveis de etilfenol com resultados positivos na contagem em placas indicam uma séria ameaça para a qualidade do vinho exigindo uma intervenção rápida ^[6,121,122].

A principal desvantagem deste método é não ser adequado para a deteção preventiva. Muitas vezes, quando os fenóis são detetados, pode já ser tarde demais para evitar que o vinho se estrague.

1.6 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi quantificar leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* em vinhos de qualidade e detetar e quantificar a presença de 4-etilfenol e 4-etilguaicol (compostos que levam à depreciação do vinho), por cromatografia gasosa. Adicionalmente, foram também determinados os fenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante de várias amostras de vinho.

Como objetivos específicos podem-se considerar:

- * Quantificar leveduras pertencentes ao género *Brettanomyces/Dekkera* em vinhos;
- * Detetar e quantificar a presença de fenóis voláteis;
- * Correlacionar os teores de 4-etilfenol e 4-etilguaicol com a presença de leveduras de contaminação pertencentes ao género *Brettanomyces/Dekkera*;
- * Determinar os teores em fenóis e flavonoides totais;
- * Determinar a atividade antioxidante das amostras de vinho e verificar se esta se correlaciona com o teor de fenóis e flavonoides totais;
- * Verificar se a presença das leveduras de contaminação do género *Brettanomyces/Dekkera* influencia o teor de fenóis e flavonoides totais, bem como, a influência destas sobre a atividade antioxidante das amostras de vinho;
- * Averiguar se a região de proveniência das amostras de vinho condiciona o teor de fenóis e flavonoides totais, bem como, a sua atividade antioxidante.



Capítulo 2

Material e Métodos



Neste capítulo apresenta-se a origem e o tratamento efetuado na preparação da amostra para analisar, os reagentes e os equipamentos utilizados no trabalho, bem como, os procedimentos e as condições experimentais usadas na avaliação do vinho.

2.1 Amostragem

Neste estudo foram analisadas um total de 18 amostras de Vinho Tinto proveniente de zonas distintas de Portugal; 12 amostras foram obtidas de um só produtor, da Região do Alto Douro; as restantes 6 foram adquiridas de diferentes produtores da Região de Trás-os-Montes e da Região do Alto Douro. Os vinhos foram obtidos de mistura de castas.

As amostras foram guardadas no frigorífico até serem analisados.

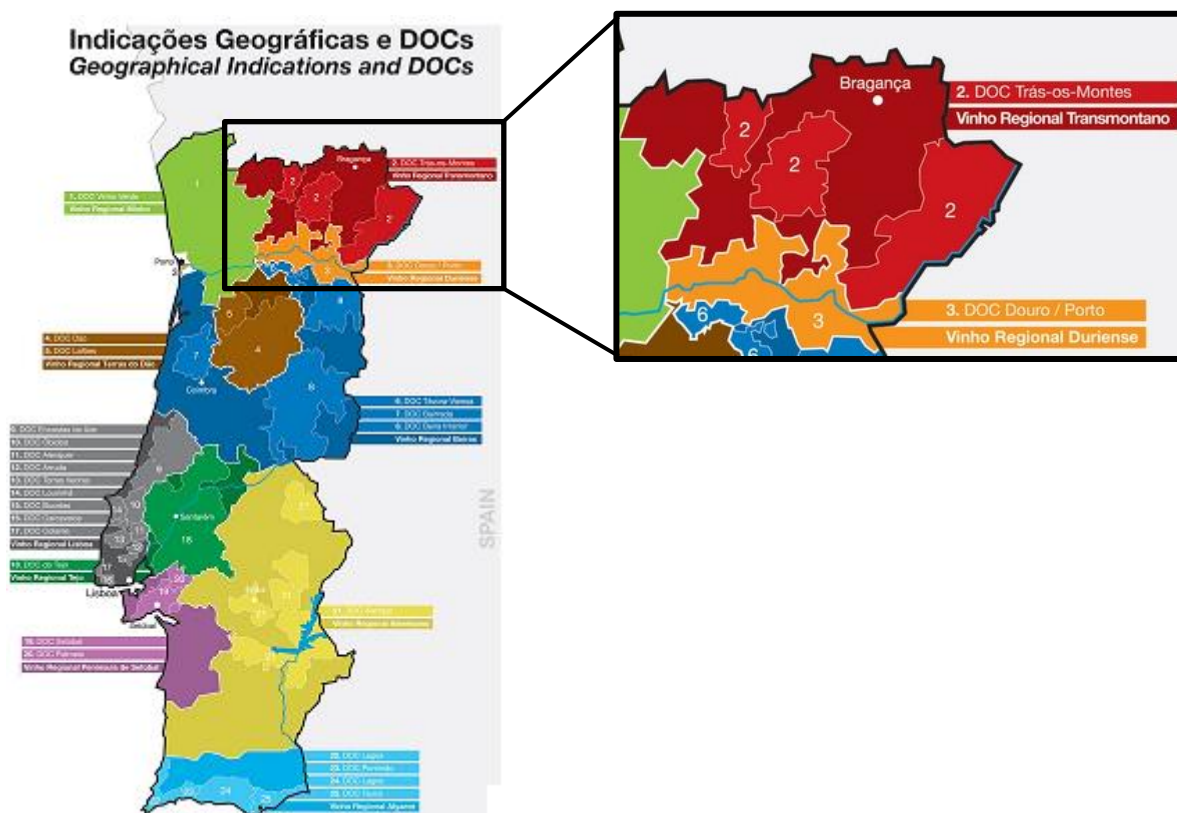


Figura 8. Regiões Vitivinícolas das amostras (Fonte: <http://www.ccdn.pt/fotoseditor2importedwww.ccr-norte.pt/regnorthemapnorte>).

Tabela 2. Amostragem (Região, Ano de Produção e Produtor).

Referência do Vinho	Região Proveniente	Ano de Produção	Produtor
A1	DOP Douro	2012	Produtor 1
A2	DOP Douro	2012	Produtor 1
A22	DOP Douro	2012	Produtor 1
A23	DOP Douro	2012	Produtor 1
A25	DOP Douro	2012	Produtor 1
A37	DOP Douro	2012	Produtor 1
A38	DOP Douro	2012	Produtor 1
A47	DOP Douro	2012	Produtor 1
A48	DOP Douro	2012	Produtor 1
A55	DOP Douro	2012	Produtor 1
A59	DOP Douro	2012	Produtor 1
A60	DOP Douro	2012	Produtor 1
B4	DOP Trás-os-Montes	2012	Produtor 2
B5	DOP Trás-os-Montes	2012	Produtor 2
B6	DOP Douro	2013	Produtor 3
B9	DOP Douro	2012	Adega Cooperativa
B11	DOP Douro	2012	Adega Cooperativa
B13	DOP Trás-os-Montes	2013	Produtor 2

2.2 Detecção de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*

A deteção da levedura *Brettanomyces/Dekkera* foi efetuada de acordo com o descrito por Couto *et al.* (2005) ^[123].

2.2.1 Isolamento da levedura do género *Brettanomyces/Dekkera*

Utilizou-se o meio de cultura WL Differential Medium (Difco) (80 g.L⁻¹ do meio, 100 mg.L⁻¹ de cicloheximida (Sigma), 10 mg.L⁻¹ de ácido p-cumárico (Sigma) e 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol (Sigma)) de acordo com o descrito por Couto *et al.* (2005) ^[123].

A esterilização do meio foi efetuada em frascos numa autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos, à exceção da cicloheximida, ácido p-cumárico e cloranfenicol que foram esterilizados por filtração através de membrana de 0,22 µm.

O meio foi transferido, em ambiente estéril, para placas de vidro estéreis.

2.2.2 Condições de Crescimento

Todas as amostras de vinhos (100 µL) foram inoculadas por espalhamento em placas de vidro estéreis contendo aproximadamente 25 mL do meio WLD e incubadas a 25°C durante 12 dias.

2.2.3 Identificação e Quantificação de *Brettanomyces/Dekkera*

Consideraram-se *Brettanomyces/Dekkeras* prováveis, os microrganismos que apresentaram colónias de cor branca ou creme, mudando frequentemente para verde com o aumento do tempo de incubação. Adicionalmente, a cor do meio passa de verde azulado para amarelo (devido à acidificação do meio) e, as placas apresentam um cheiro fenolado (resultante da produção de fenóis voláteis) ^[124].

Após a obtenção e contagem das leveduras que apresentaram as características próprias das *Brettanomyces/Dekkera* nas placas com o meio WLD, selecionaram-se algumas colónias isoladas e repicaram-se para placas com meio de levedura (Anexo I), para obtenção de culturas puras. Após 2 dias de incubação a 25°C foram observadas as características macroscópicas e microscópicas das colónias e dos isolados.

2.3 Quantificação de Fenóis Voláteis

Com o objetivo de determinar a quantidade de fenóis voláteis presentes nas amostras de vinho em estudo, procedeu-se em primeiro lugar à extração dos fenóis voláteis segundo o protocolo descrito por Bertrand (1981) ^[125], e posteriormente à quantificação por Cromatografia Gasosa.

2.3.1 Extração de Fenóis Voláteis

A realização da extração dos fenóis voláteis para cada amostra foi efetuada em duplicado.

Inicialmente foi preparada uma solução de 50:50 (v/v) de éter dietílico: n-hexano.

A extração dos fenóis voláteis foi realizada com a adição da mistura dos solventes de extração acima referida à amostra (50 mL de vinho).

Primeiramente, o pH foi ajustado a 8 ($\pm 0,005$) com uma solução de NaOH, recorrendo a um potenciómetro (HI 8417 Hanna Instruments). Posteriormente adicionou-se à amostra 0,5 mL de 3,4-dimetilfenol (padrão interno) (Anexo II).

O processo de extração foi efetuado em três fases sucessivas de 4, 2 e 2 mL da mistura éter dietílico-hexano para se extrair a maior quantidade possível de fenóis voláteis. Antes de cada extração a amostra foi transferida para um Erlenmeyer (previamente lavado com metanol e seco) e colocada por um período de 5 minutos em agitação.

A mistura que continha a amostra foi colocada numa ampola de decantação (previamente lavada com metanol e seca), deixando-a repousar durante 5 minutos antes de proceder à extração. Após a primeira extração (4 mL), recuperou-se a fase inorgânica (fase aquosa) para o mesmo Erlenmeyer e a fase orgânica que permanecia no topo da ampola foi recolhida ao longo das três extrações para um frasco (previamente lavado com metanol e seco). A fase inorgânica recuperada foi submetida a mais duas extrações mediante adição de 2 mL da mistura dos solventes.

Após as três extrações e reunidas as respetivas fases orgânicas, pipetou-se cuidadosamente com uma micropipeta a fase transparente (sobrenadante). Esta fase foi filtrada (seringa + filtro descartável de nylon 0,2 μm de Whatman) para um vial identificado, e de seguida guardou-se no congelador até ao momento da injeção no cromatógrafo.



Figura 9. Amostra de vinho.

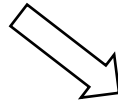


Figura 10. Amostra de vinho tratada com éter-hexano.

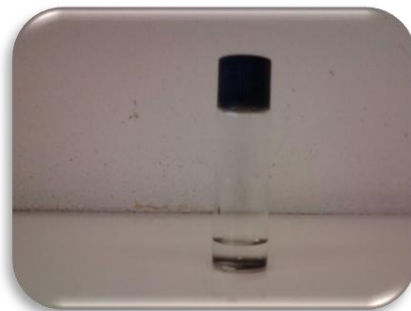


Figura 11. Fração orgânica da amostra de vinho.



2.3.2 Detecção de Fenóis Voláteis

2.3.2.1 Preparação das Soluções – Padrão para o GC

Para analisar os fenóis voláteis das amostras por Cromatografia Gasosa foi necessário inicialmente preparar as soluções-padrão de 3,4-Dimetilfenol (Padrão Interno), 4-Etilfenol e 4-Etilguaiacol (Anexo II).

As curvas de calibração foram preparadas com diferentes concentrações das soluções padrão, obtendo-se as seguintes concentrações finais:

Tabela 3. Concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$) das Soluções-Padrão.

Solução Padrão	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
	4-Etilguaicol	4-Etilfenol
Com 1mL da solução de referência	61,054	174,244
Com 2mL da solução de referência	122,108	348,488
Com 4mL da solução de referência	244,216	696,976
Com 7,5mL da solução de referência	457,905	1306,830
Com 15mL da solução de referência	915,810	2613,660

2.3.2.2 Análise por GC

Na análise das soluções por cromatografia gasosa utilizou-se os seguintes três processos:

Tabela 4. Programas de Operação na análise por Cromatografia Gasosa.

Programa 1	Programa 2	Programa 3
T_{inicial} : 35°C	-	-
Tempo de isotérmica: 30 s	Tempo de isotérmica: 1 min	Tempo de isotérmica: 5 min
T_{final} : 50°C	T_{final} : 100°C	T_{final} : 230°C
Rácio: 40°C/min	Rácio: 14°C/min	Rácio: 6°C/min

2.3.2.3 Equipamento de GC

As amostras e soluções-padrão foram analisadas num Cromatógrafo Gasoso, modelo GC1000 equipado com Detetor de Ionização por Chama (FID).

A coluna usada foi do tipo DB-WAX, com dimensões 29 m de comprimento por 0,316 mm diâmetro por 0,5 μm espessura do filme. Foi injetado 1 μL de amostra num injetor aquecido a 250°C, com tempo de splitless de 30 segundos e fluxo de splitless com uma razão 1:7 (28,6 mL/min).

O gás transportador foi o hidrogénio, a um, fluxo de 4,2 mL/min (0,6 bar).



Figura 12. Cromatógrafo Gasoso com Detetor de Ionização por Chama (FID).

2.3.2.4 Quantificação de fenóis voláteis

Na aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o software DataApexClarity, versão. 4.0.00.681. A identificação dos picos correspondentes ao 4-Etilguaiaicol, 4-Etilfenol e 3,4-Dimetilfenol foi feita com base nos tempos de retenção relativos das soluções-padrão.

A quantificação dos fenóis voláteis foi efetuada recorrendo a uma reta de calibração obtida a partir de concentrações crescentes das soluções-padrão, mantendo constante a concentração do padrão interno.

2.4 Avaliação das Compostos Bioativos do Vinho

Os fenóis totais e os flavonoides totais foram quantificados por métodos espectrofotométricos que se baseiam em reações colorimétricas entre os compostos a quantificar e reagentes específicos.

2.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi efetuado utilizando o método de Folin-Ciocalteu de acordo com o descrito por Singleton *et al.* (1999) ^[126].

2.4.1.1 Preparação da solução de vinho

Num balão volumétrico de 20 mL colocaram-se 2 mL de vinho aferido com água desionizada, e deste preparado retirou-se 2 mL para outro balão volumétrico de 10 mL e aferiu-se com água desionizada.

2.4.1.2 Análise de fenóis totais

Na análise dos fenóis totais do vinho (análise efetuada em triplicado) misturou-se 0,5 mL da solução preparada anteriormente, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10%, e 2 mL de carbonato de sódio - Na_2CO_3 (75 g.L^{-1}) (Anexo III).

A solução resultante ficou a repousar ao abrigo da luz durante 2 horas, à temperatura ambiente, e foi medida a sua absorvância a 760 nm no espectrofotómetro de ultravioleta visível (VWR, modelo UV-3100PC).

2.4.1.3 Determinação da curva de padrão

Para a obtenção da curva de calibração para a análise dos fenóis totais, o composto padrão utilizado foi o ácido gálico (AG).

A solução-mãe foi preparada por pesagem de 0,1 g de ácido gálico e dissolvidos em 100 mL de água desionizada apresentando assim uma concentração de 1 g.L^{-1} . As concentrações usadas variam entre 20 a 160 mg.L^{-1} , sendo obtidas por medição dos volumes 0,5, 0,6, 0,75, 1, 2, 3 e 4 mL da solução-mãe em balões volumétricos de 25 mL, que foram aferidos com água desionizada.

O branco foi preparado com 0,5 mL de água desionizada e os restantes reagentes utilizados para a amostra (2,5 mL de Folin-Ciocalteu e 2 mL de Na_2CO_3).

Após decorridas 2 horas ao escuro, foram efetuadas as leituras a 760 nm.

2.4.2 Determinação de flavonoides totais

Na determinação de flavonoides totais usou-se o Método de Woisky & Salatino (1998) ^[127].

2.4.2.1 Preparação da solução de vinho

A preparação da solução de vinho para esta análise foi efetuada medindo 2 mL de vinho para um balão volumétrico de 20 mL aferido com água desionizada.

2.4.2.2 Análise de flavonoides totais

A análise dos flavonoides totais nas amostras de vinho foi feita por mistura de 2,5 mL da solução de vinho, com 2,5 mL de AlCl_3 a 2% (esta solução foi feita em triplicado).

A solução preparada ficou em repouso ao abrigo da luz durante 1 hora, à temperatura ambiente, e de seguida mediu-se a absorvância a 420 nm.

2.4.2.3 Determinação da curva de padrão

Na determinação da curva de calibração para a análise dos flavonoides totais usou-se como composto padrão a quercetina (Q).

Para a preparação da solução-mãe, pesaram-se 0,1 g de quercetina para um balão volumétrico de 100 mL que foi aferido com etanol com uma concentração final de 1 g.L^{-1} .

As concentrações usadas variam entre 1 a 50 mg.L^{-1} e foram obtidas por medição dos volumes 0,1 mL para um balão volumétrico de 100 mL, 0,1 e 0,2 mL em balões volumétricos de 50 mL, 0,2, 0,4, 0,5, 0,75 e 1 mL para balões volumétricos de 15 mL e 1 mL para um balão volumétrico de 20 mL, sendo todos os balões volumétricos aferidos com etanol.

O branco foi preparado com 2,5 mL de etanol e 2,5 mL do reagente AlCl_3 . Ao fim de 1 hora de repouso ao escuro foram efetuadas as leituras a 420 nm.

2.5 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das amostras foi analisada por dois métodos químicos diferentes: o método do Poder Redutor descrito de acordo com Berker *et al.* (2007) ^[128] e a avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com Hatano *et al.* (1988) ^[129].

2.5.1 Poder Redutor

2.5.1.1 Preparação da solução de vinho

Para analisar o Poder Redutor, preparou-se uma solução mãe de vinho medindo 5 mL de vinho, para um balão de 20 mL que foi aferido com água desionizada.

Antes da realização da análise do Poder Redutor foram preparadas diferentes concentrações variando entre 0,25 e 40,00 mL.L⁻¹ de vinho, apresentando uma coloração amarela mudando para verde-azulado em função do poder redutor das soluções testadas.

As concentrações utilizadas foram obtidas por medição dos volumes da solução mãe de vinho: 0,05, 0,2, 0,8, 1,6 e 2 mL para balões volumétricos de 50 mL; 1,2, 2, 2,8 e 3,2 mL para balões volumétricos de 20 mL, aferindo todas as soluções com água desionizada.

2.5.1.2 Análise do Poder Redutor

Para avaliar o Poder Redutor das amostras de vinho, mediu-se 1 mL de cada solução para tubos de ensaio, adicionando-se posteriormente, 2,5 mL do tampão de fosfato de sódio a 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1% (p/v).

Seguidamente, os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 50°C, durante 20 minutos. Após o arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 mL de TCA (Tricloroacético) a 10% (p/v), e agitou-se vigorosamente no vortex.

Posteriormente, retirou-se 2,5 mL do sobrenadante para novos tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 2,5 mL de água desionizada e 0,5 mL de cloreto de ferro a 0,1% (p/v). Os tubos de ensaio foram agitados no vortex e, após o repouso de 2 minutos, foram medidas as absorvâncias das soluções a 700 nm no espectrofotómetro.

A concentração de vinho correspondente a 0,5 de absorvância (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico das absorvâncias obtidas em função das concentrações de vinho.

2.5.2 DPPH

2.5.2.1 Preparação da solução de vinho

A preparação da solução desta metodologia foi efetuada conforme o descrito na seção 2.5.1.1.

2.5.2.2 Análise do DPPH

Na avaliação do efeito bloqueador de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), utilizaram-se as mesmas concentrações de vinho usado na metodologia anterior.

Neste ensaio, transferiram-se 0,3 mL das várias concentrações de vinho para tubos de ensaio e 2,7 mL do reagente DPPH. Os tubos de ensaio foram agitados vigorosamente e colocados a repousar no escuro à temperatura ambiente durante 60 minutos.

A redução do radical de DPPH foi medida através da leitura da absorvância a 517 nm. O efeito bloqueador foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito Bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{A}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100,$$

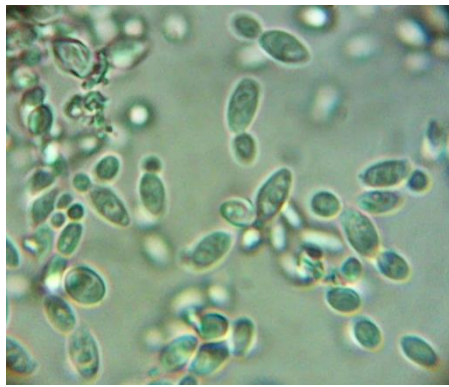
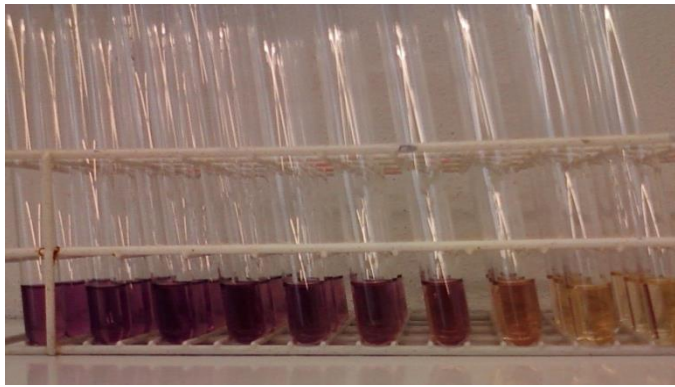
em que A_{A} é a absorvância da solução da amostra e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de amostra a que corresponde 50% de inibição (EC_{50}) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de vinho.

2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL), versão 21.0.

O pressuposto da distribuição normal da variável dependente foi avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk ($n < 50$), e o pressuposto da homogeneidade de variâncias foi validado pelo teste de Levene. Como os pressupostos da normalidade e homogeneidade de variância foram cumpridos, foi aplicado o teste paramétrico de *t-student* e consideraram-se estatisticamente significativos cujo valor de p foram inferiores ou iguais a 0,05, como descrito em Maroco (2003) ^[130]. Este teste foi aplicado com o intuito de verificar se existiam diferenças significativas entre os dois grupos designados de acordo com as análises microbiológicas e também, se subsistiam diferenças entre as regiões produtoras do vinho.

Para avaliar as correlações entre os vários parâmetros utilizou-se o teste de Pearson, analisando os coeficientes de correlação de cada parâmetro.



Capítulo 3

Resultados e Discussão



3.1 Detecção de leveduras *Brettanomyces/Dekkera*

3.1.1 Isolamento e Quantificação de *Brettanomyces/Dekkera*

Para verificar se os diversos vinhos estavam contaminados pela levedura *Brettanomyces/Dekkera* utilizou-se o meio de cultura WLD (WL Differential Medium), sendo considerados resultados positivos os casos em que se verificou crescimento e mudança de cor do meio (de verde azulado para amarelo, devido à presença do verde bromocresol e consequentemente acidificação do meio), mudança de cor branca ou creme das colónias para esverdeadas com o aumento do tempo de incubação e apresentação de cheiro fenolado, consequência da produção de fenóis voláteis (Tabela 5).

Tabela 5. Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos nas amostras de vinho.

Amostra	Tempo de crescimento (dias)	Mudança de cor das colónias	Mudança de cor do meio	Cheiro Fenolado	UFC.mL ⁻¹
A1	n.c	-	-	-	<10
A2	n.c	-	-	-	<10
A22	n.c	-	-	-	<10
A23	n.c	-	-	-	<10
A25	n.c	-	-	-	<10
A37	n.c	-	-	-	<10
A38	n.c	-	-	-	<10
A43	n.c	-	-	-	<10
A47	n.c	-	-	-	<10
A55	n.c	-	-	-	<10
A59	n.c	-	-	-	<10
A60	n.c	-	-	-	<10
B4	13	+	+	+	260
B5	15	+	+	+	305
B6	15	+	+	+	325
B9	17	+	+	+	230
B11	15	+	+	+	405
B13	17	+	+	+	440

Nota: n.c – não houve crescimento; + positivo; - negativo

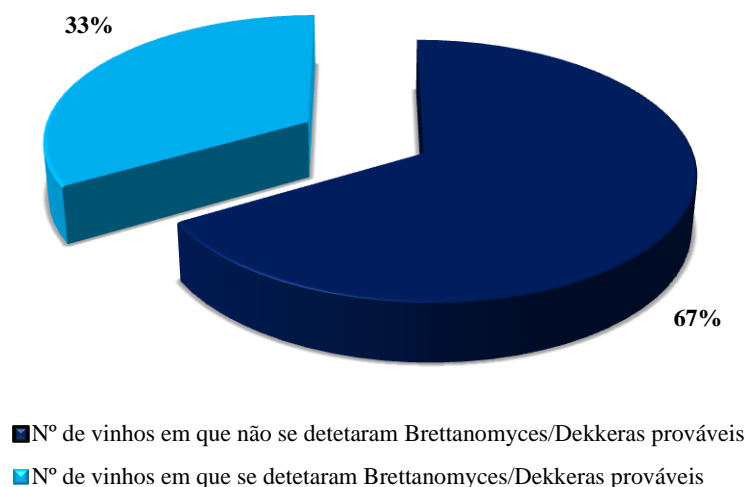


Figura 13. Representação da percentagem de vinhos em que se detetaram *Brettanomyces/Dekkera* prováveis.

Da análise da Figura 13, verifica-se que maior parte das amostras de vinho (67%) não apresentaram características típicas de possuírem leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*.

Da observação da Tabela 5 constata-se que dos 18 vinhos analisados, 12 não apresentaram unidades formadoras de colónias de *Brettanomyces/Dekkera*, apresentando a amostra B13 o maior número (440 UFC.mL⁻¹).

Dos resultados positivos, verificou-se que o tempo necessário para observar crescimento das colónias *Brettanomyces/Dekkera* prováveis em meio WLD oscilou entre os 13 e os 17 dias de incubação. O tempo de incubação obtido neste trabalho foi um pouco superior ao determinado por Couto *et al.* (2005) ^[123], que obteve crescimento ao fim de 12 dias de incubação. Esta diferença poder-se-á dever ao nível de contaminação das amostras de vinhos e à viabilidade das leveduras. Todas as amostras que apresentaram resultados positivos, evidenciaram também mudança de cor do meio, mudança de cor das colónias e um cheiro fenolado.

3.1.2 Identificação da levedura *Brettanomyces/Dekkera*

A identificação da levedura *Brettanomyces/Dekkera* foi efetuada por observação das colónias isoladas tanto macroscópica como microscópica.

O género *Brettanomyces/Dekkera* referenciado por Dias *et al.* (2003) ^[124] apresenta como características macroscópicas colónias brancas ou cremes, que mudam frequentemente para verde com o decorrer do tempo de incubação; o meio de cultura apresenta mudança de cor verde azulado para amarelo devido à acidificação induzida pelo crescimento microbiano. Adicionalmente as colónias apresentam um cheiro fenolado, como consequência da produção de fenóis voláteis. Neste estudo verificaram-se todas estas especificidades características das leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* como se ilustra na observação macroscópica da Figura 14.

De acordo com Larue *et al.* (1991) ^[131], Smith (1998) ^[21] e Suárez *et al.* (2007) ^[16] observando microscopicamente as culturas de *Brettanomyces/Dekkera*, é possível observar células de pequeno diâmetro, parede celular em forma oval e estruturas ramificadas em culturas velhas (Figura 14).

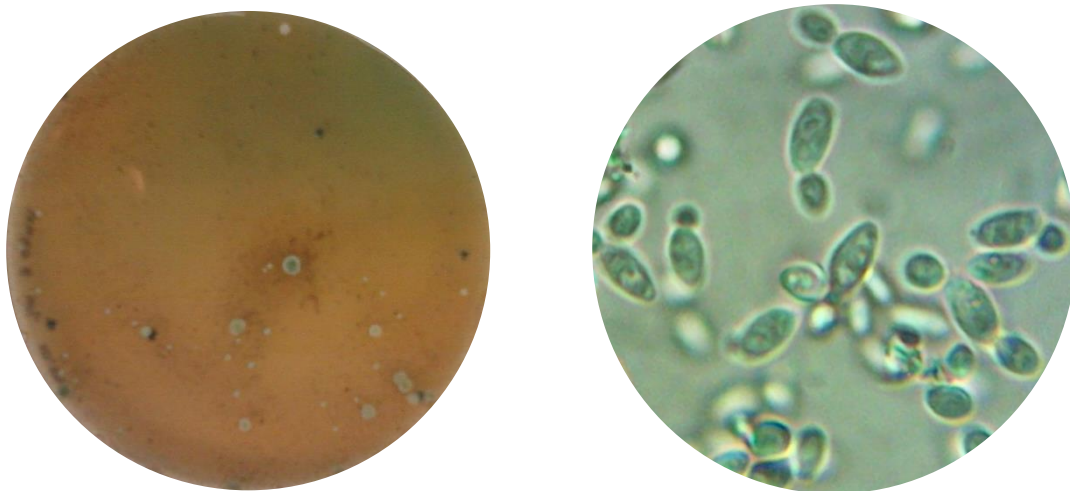


Figura 14. Observação macroscópica e microscópica da levedura *Brettanomyces/Dekkera*.

3.2 Fenóis Voláteis

3.2.1 Detecção de Fenóis Voláteis

Na Tabela 6 apresentam-se os tempos de retenção médios para cada composto utilizado na obtenção da reta de calibração para determinação dos fenóis voláteis.

Os tempos de retenção médios foram aproximadamente: 21 minutos para o padrão interno (3,4-Dimetilfenol), 18 minutos para o 4-Etilguaiacol e 20 minutos para o 4-Etilfenol.

Os picos foram identificados por comparação do tempo de retenção dos picos obtidos em cada amostra de vinho com os tempos de retenção dos padrões utilizados. A identidade do pico foi confirmada através da sobreposição do espectro de cada pico com os padrões correspondentes.

Nas Figuras 15 e 16 apresentam-se cromatogramas obtidos neste estudo, mais concretamente um cromatograma utilizado para a obtenção da reta de calibração e um cromatograma de uma amostra de vinho onde se observam os compostos voláteis (Amostra B5).

Tabela 6. Tempo de retenção para os fenóis voláteis e padrão interno, obtidos por cromatografia gasosa.

Composto	Tempo de Retenção Médio (minutos)
Padrão Interno (3,4-Dimetilfenol)	21,27
4-Etilguaiacol	18,10
4-Etilfenol	20,54

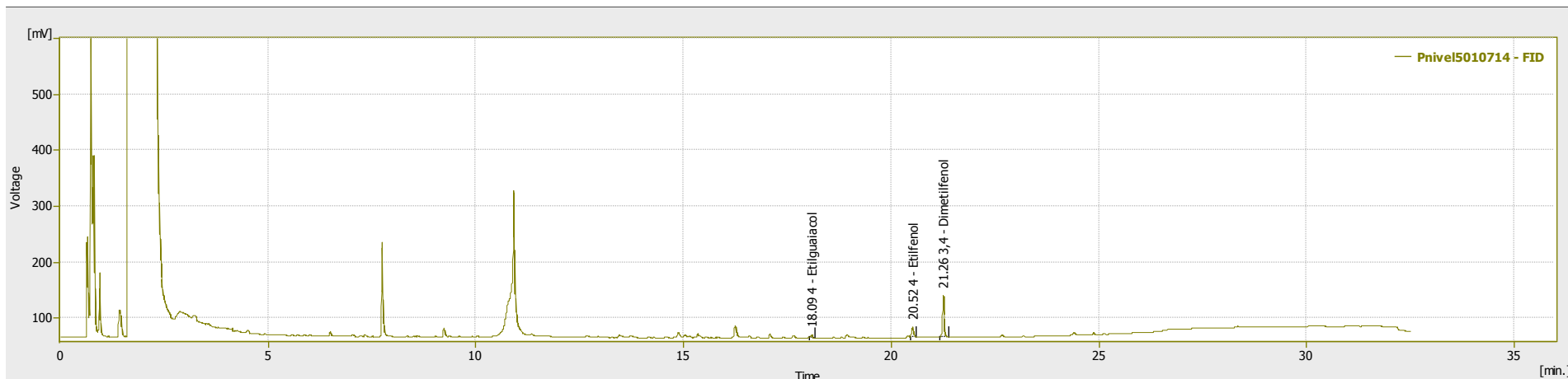


Figura 15. Cromatograma obtido do Nível 5 usado na curva de calibração.

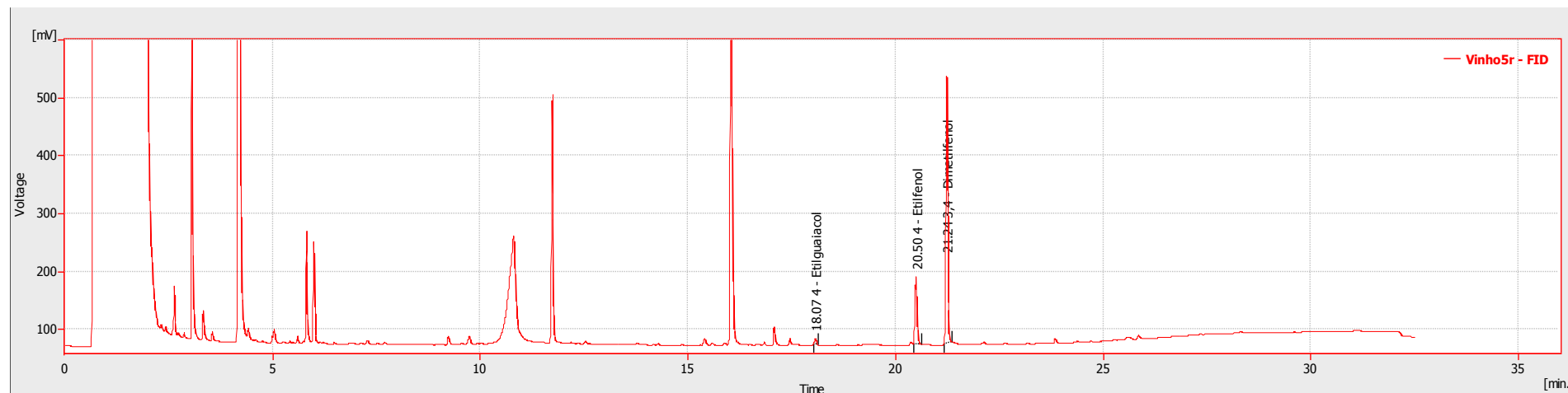


Figura 16. Cromatograma obtido da amostra B5.

3.2.2 Quantificação dos Fenóis Voláteis

A quantificação dos teores dos fenóis voláteis nas amostras de vinho foi obtida através da média dos valores em duas corridas cromatográficas independentes realizadas para cada amostra (material suplementar apresentado na Tabela 15 do Anexo IV).

A quantificação destes compostos foi efetuada recorrendo a uma reta de calibração obtida a partir de concentrações crescentes das soluções-padrão, mantendo constante a concentração do padrão interno. Para o 4-etilguaiaicol obteve-se a equação da reta $y = 0,6135x + 0,0023$ ($R^2 = 0,9941$) e para o 4-etilfenol a equação $y = 0,8936x + 0,0036$ ($R^2 = 0,9983$).

Na Figura 17 apresentam-se os resultados respeitantes à quantificação dos fenóis voláteis para todas as amostras.

Numa primeira análise da figura observam-se variações consideráveis, quer para o composto 4-etilguaiaicol, quer para o 4-etilfenol, que estão relacionadas com o nível de contaminação de cada amostra.

Analisando os resultados verifica-se que o teor em compostos voláteis apresentou um valor médio de $92,20 \pm 114,47 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $466,38 \pm 851,86 \mu\text{g.L}^{-1}$, para os compostos 4-etilguaiaicol e 4-etilfenol, respetivamente.

Verifica-se que, para ambos os compostos, as amostras com a identificação de letra B (6 amostras), apresentaram maiores valores que as restantes (Figura 17).

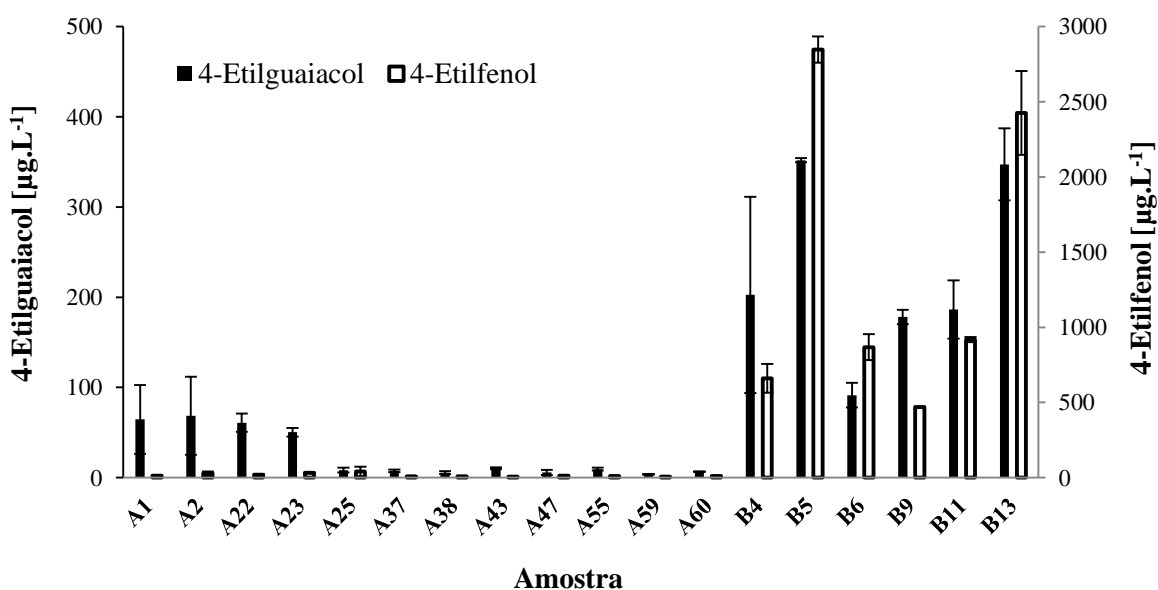


Figura 17. Concentração de 4-Etilguaiaicol e 4-Etilfenol [$\mu\text{g.L}^{-1}$] nas amostras de vinho.

O composto 4-etilguaiaicol esteve presente em maior quantidade na amostra B5 ($351,90 \pm 2,43 \mu\text{g.L}^{-1}$) e em menor na amostra A59 ($3,59 \pm 0,32 \mu\text{g.L}^{-1}$). Relativamente ao 4-etilfenol, o comportamento foi idêntico, a amostra B5 foi a que apresentou a maior concentração ($2847,51 \pm 87,20 \mu\text{g.L}^{-1}$) e a amostra A59 a menor ($6,26 \pm 0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Chatonnet *et al.* (1992) ^[34] definiu o limite de referência como a concentração mínima acima da qual um composto deprecia o aroma do vinho, ou seja, só é considerado alterado quando estes metabolitos secundários, 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol, estão presentes em níveis superiores a $620 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $140 \mu\text{g.L}^{-1}$, respetivamente. É de salientar que de acordo com este autor, uma concentração menor que $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ do composto 4-etilfenol contribui favoravelmente para a complexidade de vinho por transmitir aromas apreciados pelos consumidores ^[27].

Da análise dos nossos resultados observa-se que para o composto 4-etilguaiaicol as amostras B4 ($202,53 \pm 108,75 \mu\text{g.L}^{-1}$), B5 ($351,90 \pm 2,43 \mu\text{g.L}^{-1}$), B9 ($178,46 \pm 8,03 \mu\text{g.L}^{-1}$), B11 ($186,46 \pm 32,32 \mu\text{g.L}^{-1}$) e B13 ($347,13 \pm 39,92 \mu\text{g.L}^{-1}$) apresentam valores superiores aos estipulados por Chatonnet *et al.* (1992) ^[34].

Relativamente ao 4-etilfenol, os valores estabelecidos foram excedidos nas amostras B4 ($660,49 \pm 95,11 \mu\text{g.L}^{-1}$), B5 ($2847,51 \pm 87,20 \mu\text{g.L}^{-1}$), B6 ($867,87 \pm 85,56 \mu\text{g.L}^{-1}$), B11 ($918,95 \pm 16,98 \mu\text{g.L}^{-1}$) e B13 ($2425,58 \pm 277,99 \mu\text{g.L}^{-1}$).

As diferenças observadas entre amostras na concentração de etilfenóis podem estar relacionadas com a presença de *Dekkeras* nos vinhos, pois observa-se uma disparidade significativa entre as amostras representadas pela letra A e as indicadas pela letra B. Como previamente relatado por Chatonnet *et al.* (1993) ^[132], Chatonnet *et al.* (1995) ^[65], Chatonnet *et al.* (1997) ^[66] e Gerbaux *et al.* (2000) ^[71], existe uma correlação entre a população de *Brettanomyces/Dekkera* e a concentração de fenóis voláteis, ou seja, a formação de fenóis voláteis é proporcional ao tamanho da população destas leveduras.

A variação da concentração dos etilfenóis nas diferentes amostras de vinho poderá estar também correlacionada com a estirpe de leveduras. De acordo com Vigentini *et al.* (2008) ^[23] as diferentes concentrações de etilfenóis estão associadas com a diversidade genética da estirpe, apresentando cada estirpe diferentes capacidades de conversão.

Contudo, de acordo com Dias *et al.* (2003) ^[28], outros organismos como *Pichia gulliermondii* são capazes de converter pequenas quantidades o ácido p-cumárico em 4-etilfenol. Isto poderá ter acontecido nas amostras que apresentaram concentrações de 4-etilfenol mínimas, por exemplo a amostra A37 apresentou valores tão baixos que a

presença de outros microrganismos capazes de produzir etilfenóis poderá ter sido a responsável pela produção.

Segundo Romano *et al.* (2008) ^[67] a formação do “caráter Brett” é influenciada pela estirpe, pelo pH do vinho, pela quantidade de nutrientes presentes no mosto, e pelo estado de contaminação da adega e equipamentos.

3.2.2.1 Análises microbiológicas e presença de fenóis voláteis

No que diz respeito às análises microbiológicas, verificaram-se dois grupos distintos, o Grupo 1 constituído pelas amostras que não apresentaram crescimento microbiano (A1 a A60), e o Grupo 2 formado pelas amostras (B4 a B13) que apresentaram resultados positivos.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados obtidos para as concentrações de 4-etilguaicol e 4-etilfenol expressas em $\mu\text{g.L}^{-1}$ nos vinhos onde foi detetado crescimento.

Tabela 7. Valor das concentrações de 4-Etilguaicol e 4-Etilfenol ($\mu\text{g.L}^{-1}$) obtidos nos dois grupos de amostras.

Parâmetros	Grupo de Vinhos	
	1	2
4-Etilguaicol [$\mu\text{g.L}^{-1}$]	30,16 ± 29,05 ^a	226,26 ± 104,79 ^b
4-Etilfenol [$\mu\text{g.L}^{-1}$]	17,04 ± 13,23 ^a	1365,06 ± 964,55 ^b

As médias dentro de uma linha com letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Os valores de p foram calculados a partir da análise *T-Student* após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias.

De acordo com Vigentini *et al.* (2008) ^[23], a produção dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaicol por *Brettanomyces bruxellensis* é o principal fator que afeta as propriedades sensoriais do vinho, por isso, neste estudo avaliou-se o efeito da sua presença na quantidade dos fenóis voláteis presentes nos vinhos.

Numa primeira análise, verificou-se que foi de extrema importância comparar a concentração destes dois compostos com os resultados microbiológicos, pois a sua concentração variou significativamente nos diferentes vinhos analisados.

Da análise da Tabela 7, verifica-se que no grupo 1 as concentrações de 4-etilguaicol e 4-etilfenol foram de 30,16 ± 29,05 ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e 17,04 ± 13,23 ($\mu\text{g.L}^{-1}$),

respetivamente. As amostras que constituem o grupo 2 apresentaram para o 4-etilfenol uma concentração de $1365,06 \pm 964,55 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para o 4-etilguaiaicol de $226,26 \pm 104,79 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Na Tabela 7, observam-se diferenças ($p < 0,05$) entre os dois grupos quer para o 4-etilguaiaicol, quer para o 4-etilfenol.

Estes resultados confirmam os microbiológicos, ou seja, o grupo 1 que é constituído pelas amostras de vinho que não apresentaram a presença de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* apresentaram valores para os fenóis voláteis muito inferiores aos obtidos para o grupo 2.

De acordo com Chatonnet *et al.* (1992) ^[34] concentrações de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol de $620 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $140 \mu\text{g.L}^{-1}$ respetivamente, afetam negativamente o aroma do vinho tinto. Neste estudo o grupo 2 ultrapassou os limiares para ambos os compostos ($226,26 \pm 104,79 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o 4-etilguaiaicol e $1365,06 \pm 964,55 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o 4-etilfenol).

Os resultados deste estudo sugerem que os vinhos do grupo 2 provavelmente seriam rejeitados pelos consumidores ^[35]. No entanto, para tal seria necessário efetuar a análise sensorial.

3.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante do vinho

3.3.1 Análise dos compostos fenólicos e flavonoides totais

Para quantificar os grupos hidroxilo (compostos fenólicos) presentes nas amostras de vinho, recorreu-se ao método de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se numa reação de óxido-redução, no qual o íão fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente originando uma solução azul que absorve a 760 nm ^[133].

Na determinação dos flavonoides totais, o método baseia-se na propriedade do catião alumínio para formar complexos estáveis com o hidroxilo dos flavonoides, formando um complexo de cor amarela ^[133,134]. Este permite determinar a quantidade de flavonoides presentes nas amostras evitando a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, sobretudo os ácidos fenólicos ^[133].

Para a determinação do teor em compostos fenólicos totais, utilizou-se como padrão o ácido gálico (GAE), obtendo um coeficiente de correlação de 0,9998 e a equação da reta $y = 0,0092x + 0,0334$.

O teor em flavonoides totais foi determinado utilizando quercetina (Q) como padrão, obtendo para este um coeficiente de correlação de 0,9996 e a equação de $y = 0,0362x - 0,0148$.

Os valores obtidos para os fenóis e flavonoides nos vinhos apresentam-se na Figura 18 (material suplementar apresentado na Tabela 16 do Anexo IV). Observa-se que o teor de fenólicos totais variou entre 2,08 e 4,22 mg.mL⁻¹ (mg de Ácido Gálico.mL⁻¹ de vinho), com um valor médio de $3,23 \pm 0,63$ mg.mL⁻¹.

Da análise da Figura 18, verifica-se que a amostra A23 ($4,22 \pm 0,19$ mg.mL⁻¹) apresentou teores de compostos fenólicos superiores às restantes, enquanto a amostra B13 foi a que apresentou concentrações mais baixas ($2,08 \pm 0,45$ mg.mL⁻¹).

Os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais estão em concordância com os obtidos por Katalinic *et al.* (2004) ^[90]; Stako *et al.* (2008) ^[92]; Roussis *et al.* (2008) ^[93]; Rivero-Pérez *et al.* (2008) ^[94]; DiMajo *et al.* (2008) ^[96]; Li *et al.* (2009) ^[97]; Versari *et al.* (2010) ^[99]; Chira *et al.* (2011) ^[101] e Segura *et al.* (2011) ^[103] em vinhos tintos.

Paixão *et al.* (2007) ^[91] em vinhos tintos portugueses e Granato *et al.* (2010) ^[100] em vinhos tintos brasileiros, obtiveram valores mais baixos para os compostos fenólicos, os quais variaram entre 0,483 e 1,959 mg.mL⁻¹.

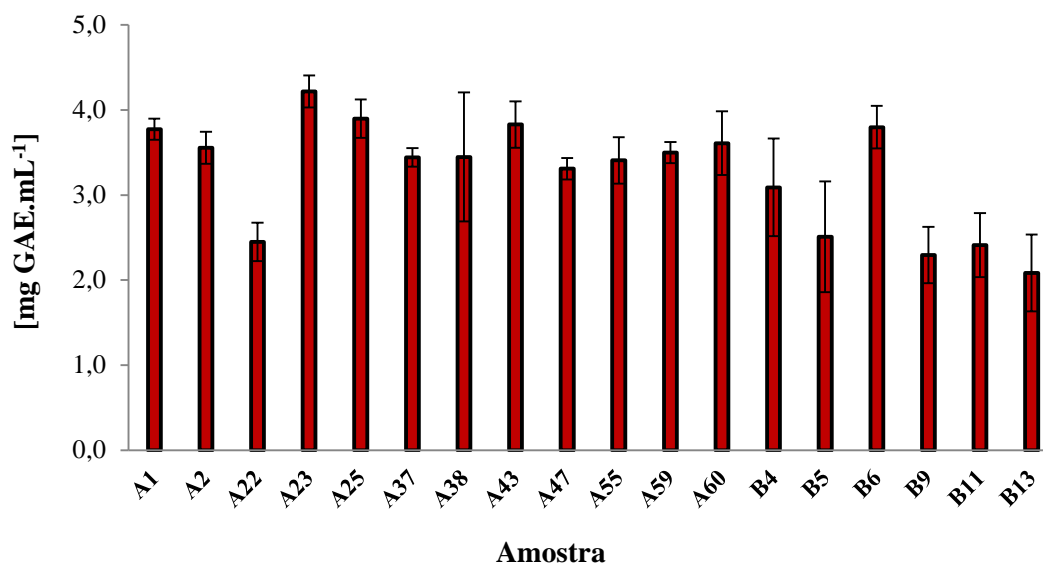


Figura 18. Concentração de fenóis totais (mg de Ácido Gálico (GAE). mL⁻¹ de vinho) nas amostras de vinho.

Convém salientar que, os valores mais elevados (até 5860 mg.mL⁻¹) para os fenóis totais foram relatados para vinhos italianos e espanhóis [135,136].

A variação no teor de compostos fenólicos observado nas amostras analisadas, pode estar relacionada com a variedade da uva, com o grau de maturação, com a região produtora [82,83], com as técnicas de vinificação [83,84], bem como com os métodos de envelhecimento do vinho [84].

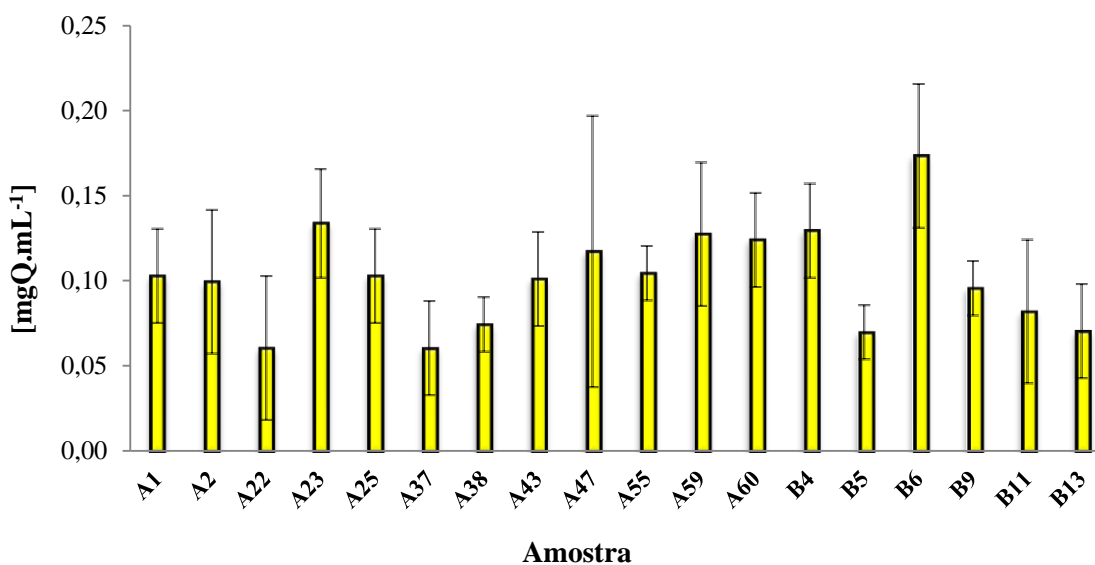


Figura 19. Concentração de flavonoides totais (mg de Quercetina (Q).mL⁻¹ de vinho) nas amostras de vinho.

No que diz respeito ao teor de flavonoides totais (Figura 19) não se verificaram variações consideráveis entre as várias amostras analisadas contrariamente ao verificado para o teor de fenólicos totais. Estes variaram entre 0,06 e 0,17 mg.mL⁻¹ (mg de Quercetina.mL⁻¹ de vinho), com um valor médio de 0,10 ± 0,03 mg.mL⁻¹.

A amostra que apresentou maior concentração destes compostos foi a B6 (0,17 ± 0,04 mg.mL⁻¹) em contraste com as amostras A22 (0,06 ± 0,04 mg.mL⁻¹) e A37 (0,06 ± 0,03 mg.mL⁻¹) que apresentam teores de flavonoides totais menores.

Silva *et al.* (2014) ^[137] em amostras de vinhos portugueses obtiveram teores de flavonoides totais compreendidos entre 0,049 a 0,511 mg.mL⁻¹ de vinho, valores idênticos aos determinados neste trabalho.

Os valores encontrados para os flavonoides totais estão também em concordância com os propostos por Waterhouse (2002) ^[141]; Yang *et al.* (2009) ^[140]; Stefenon *et al.* (2010) ^[139] e Arcari *et al.* (2013) ^[138] que obtiveram valores compreendidos entre (0,050 a 0,300 mg.mL⁻¹) em vinho tinto.

Gris *et al.* (2013) ^[105] em vinhos tintos brasileiros, encontraram valores muito inferiores que variaram entre 0,01 e 0,03 mg.mL⁻¹ de vinho.

3.3.1.1 Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais de acordo com os resultados microbiológicos

Tal como referido anteriormente, observaram-se amostras de vinho que não apresentaram quaisquer leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* (Grupo 1 (A1 a A60)), e amostras em que se verificou crescimento deste tipo de levedura (Grupo 2 (B4 a B13)).

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados obtidos para os fenóis e flavonóides totais de acordo com os resultados microbiológicos.

Da análise da Tabela 8, constata-se que em termos do teor de fenóis totais o grupo 1 (3,54 ± 0,42 mg.mL⁻¹) apresentou valores superiores, relativamente ao obtido para o grupo 2 (2,70 ± 0,60 mg.mL⁻¹). Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

Tabela 8. Teor de fenóis e flavonoides totais nas amostras de vinho de acordo com os resultados microbiológicos.

Parâmetros	Grupo de Vinhos	
	1	2
Compostos Fenólicos Totais [mg GAE.mL ⁻¹]	3,54 ± 0,42 ^a	2,70 ± 0,60 ^b
Flavonoides Totais [mg Q.mL ⁻¹]	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,04

As médias dentro de uma linha com letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Os valores de p foram calculados a partir da análise *T-Student* após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias.

De acordo com Macheix *et al.* (1990)^[85] e Jackson (2000)^[86], o teor de compostos fenólicos no vinho é influenciado pela atividade microbiana de algumas leveduras.

No nosso trabalho verificamos que, o grupo 2 apresentou um conteúdo em fenóis totais inferior ao obtido ao do grupo 1, pois esta levedura utiliza como substrato para o seu crescimento estes compostos, daí a quantidade de fenóis totais vá diminuindo à medida que aumenta a população de *Brettanomyces/Dekkera* no vinho.

Da observação da Tabela 10, verifica-se que a concentração em flavonoides totais para o grupo 1 foi de $0,10 \pm 0,02$ mg.mL⁻¹ e para o grupo 2 de $0,10 \pm 0,04$ mg.mL⁻¹.

Relativamente ao teor de flavonoides totais não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos.

Os valores obtidos sugerem que a presença de levedura do género *Brettanomyces/Dekkera* não influenciou a concentração destes compostos nos vinhos em estudo.

3.3.1.2 Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais de acordo com a região produtora dos vinhos

As diversas amostras analisadas tiveram origem em duas regiões distintas, tendo sido divididas em dois grupos. O Grupo A é constituído pelas amostras provenientes da Região do Alto Douro (A1 - A60 e B6 - B11) e o Grupo B é formado pelas amostras da Região de Trás-os-Montes (B4, B5 e B13).

Na Tabela 9 encontram-se descritos os resultados obtidos para os fenóis e flavonóides totais de acordo com a região produtora dos vinhos.

Tabela 9. Teor de fenóis e flavonoides totais nas amostras de vinho de acordo com a região produtora.

Parâmetros	Grupo de Vinhos	
	A	B
Compostos Fenólicos Totais [mg GAE.mL ⁻¹]	3,40 ± 0,56 ^a	2,56 ± 0,44 ^b
Flavonoides Totais [mg Q.mL ⁻¹]	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,03

As médias dentro de uma linha com letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Os valores de p foram calculados a partir da análise *T-Student* após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias.

Constata-se que o teor em fenóis totais das amostras de vinho provenientes da Região do Alto Douro foi superior ($3,40 \pm 0,56 \text{ mg.mL}^{-1}$) ao das amostras da Região de Trás-os-Montes ($2,56 \pm 0,44 \text{ mg.mL}^{-1}$), tendo-se verificado diferenças significativas entre regiões ($p < 0,05$). Este resultado pode dever-se ao facto, de as vinhas atualmente utilizadas na produção dos vinhos de Trás-os-Montes serem novas, produzindo menor quantidade de matéria corante, ou seja, menor teor de fenóis totais.

Os nossos resultados vão de encontro às observações de Andrade *et al.* (2001)^[82] e Ramos *et al.* (1999)^[83], segundo as quais a região afeta a composição em fenólicos totais.

Apesar de existirem diferenças significativas entre vinhos provenientes de diferentes regiões, esta variação pode também resultar de outros fatores, como por exemplo a variedade da uva, contribuindo estes fatores para o efeito benéfico associado ao consumo de uvas e seus derivados.

Relativamente ao teor de flavonoides totais verificamos que não existem diferenças significativas entre o grupo A ($0,10 \pm 0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$) e o grupo B ($0,09 \pm 0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$), indicando que o fator região não influenciou o conteúdo de flavonoides totais.

3.3.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante consiste em atrasar ou inibir a oxidação de lípidos ou de outras moléculas, impedindo o desenvolvimento das reações em cadeia da oxidação [142].

Para caracterizar o potencial antioxidante dos vinhos utilizaram-se os métodos DPPH e Poder Redutor, cujos resultados se expressam em EC_{50} .

O ensaio de DPPH mede a capacidade de uma substância em neutralizar os radicais livres DPPH. Este composto constitui um dos poucos radicais azotados orgânicos estáveis, que pode ser comercializado como tal, eliminando a necessidade de ser gerado antes de um ensaio de atividade antioxidante.

O radical livre DPPH é um cromóforo estável que absorve a 517 nm e apresenta uma coloração violeta intensa. O radical DPPH na presença de antioxidantes doadores de átomos de H, como é o caso dos fenóis, ou eletrões, é reduzido formando um produto amarelo, com conseqüente diminuição da absorvância. O DPPH vai sendo reduzido à forma de hidrazina por um composto químico antioxidante, o seu eletrão emparelha-se, o que resulta na diminuição da cor para amarelo claro e, da absorvância a 515 e 528 nm até valores constantes [142].

O método do Poder Redutor baseia-se na capacidade que os antioxidantes possuem em reduzir o Fe^{3+} /Ferricianeto ($FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$) à forma ferrosa (Fe^{2+}) [143,144]. Dependendo do poder redutor dos compostos avaliados, a cor amarela da solução altera para várias tonalidades de verde ou azul [145]. A reação ocorre em meio ácido (pH = 3,6) para manter a solubilidade do ferro [146]. Este pH diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de eletrões e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reação [147].

Quando a espécie oxidante é o Fe^{3+} ou o $Fe(CN)_6^{3-}$ (na composição do reagente ferricianeto), forma-se respetivamente Fe^{2+} ou $Fe(CN)_6^{4-}$ como produto da redução com o antioxidante, combinando-se com o outro componente do reagente para originar $KFe[Fe(CN)_6]$ (azul da Prússia) como produto colorido.

Na Figura 20 (material suplementar apresentado na Tabela 17 do Anexo IV) encontram-se sumariados os resultados obtidos para a atividade antioxidante determinados pelo método DPPH e pelo Poder Redutor.

A concentração de vinho equivalente a 50% de inibição, calculou-se a partir da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de vinho [148].

O valor de EC_{50} indica a concentração que elimina 50% dos radicais livres, o que significa que quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, menor será a concentração de EC_{50} e maior atividade antioxidante da amostra ^[149].

As soluções preparadas das amostras de vinhos para a análise do DPPH, com concentrações a variar entre 0,25 e 40,00 mL.L⁻¹ de vinho, apresentam uma coloração violeta que mudou para amarelo consoante a atividade antioxidante das soluções testadas, verificando-se uma relação linear direta entre a absorvância e o aumento da concentração em vinho.

Em relação aos valores de EC_{50} obtidos (Figura 20) as amostras que apresentam maior efeito bloqueador foram as amostras A23 e A37, com o valor de EC_{50} mais baixo ($7,78 \pm 0,24$ mL.L⁻¹ e $7,82 \pm 0,22$ mL.L⁻¹, respetivamente), pelo contrário, as amostras que apresentam menor efeito bloqueador foram as amostras A22 e B9 ($13,89 \pm 0,05$ mL.L⁻¹ e $12,74 \pm 0,47$ mL.L⁻¹), apresentando os valores de EC_{50} mais elevados. O valor de EC_{50} determinado pelo método do DPPH apresentou um valor médio de $9,58 \pm 1,92$ mL.L⁻¹.

Os resultados obtidos vão de encontro das observações de Stefenon *et al.* (2010) ^[139] em vinhos brasileiros e Paixão *et al.* (2007) ^[91] em vinhos tintos da Ilha da Madeira, que obtiveram valores a variar entre 1,83 e 80,76 mL.L⁻¹ e 4,85 e 25,59 mL.L⁻¹, respetivamente.

Silva *et al.* (2014) ^[137], em vinhos portugueses obtiveram valores de EC_{50} pelo método do DPPH que, variaram entre 40 e 80 mL.L⁻¹, valores muito superiores aos obtidos neste estudo.

No entanto, os resultados obtidos para EC_{50} pelo método do DPPH foram um pouco superiores aos determinados por Atanackovic *et al.* (2012) ^[150] em vinhos Pinot Noir, Merlot e Cabernet Sauvignon.

Na atividade antioxidante determinada pelo método do Poder Redutor as soluções preparadas das amostras de vinhos para a análise do Poder Redutor, com concentrações a variar entre 0,25 e 40,00 mL.L⁻¹ de vinho, apresentam uma coloração amarela que mudou para verde-azulado consoante o poder redutor das soluções testadas, mostrando existir uma relação de dependência entre a concentração de vinho e a sua atividade biológica, verificando-se um aumento à medida que aumenta a concentração de vinho.

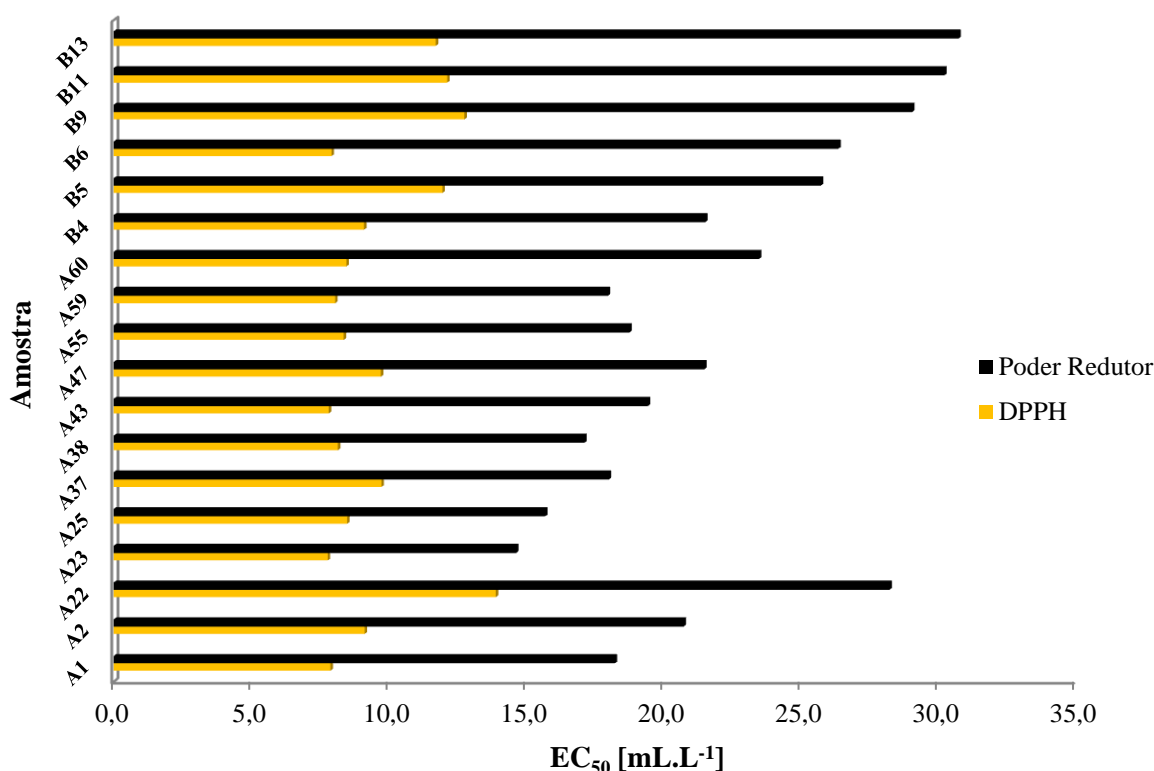


Figura 20. Valores de EC_{50} determinados pelo método DPPH e Poder Redutor nas amostras de vinho.

Tendo em conta os valores de EC_{50} obtidos pelo método do Poder Redutor para as diferentes amostras de vinho (Figura 20), verificou-se que as amostras que evidenciaram menor poder redutor (maiores valores de EC_{50}) foram as amostras B13 ($30,71 \pm 0,24$ mL.L⁻¹) e B11 ($30,19 \pm 0,35$ mL.L⁻¹). Por outro lado, as amostras que apresentaram maior poder redutor (menores valores de EC_{50}) foram as amostras A23 ($14,62 \pm 0,09$ mL.L⁻¹) e A25 ($15,68 \pm 0,36$ mL.L⁻¹). O valor de EC_{50} quantificado pelo método do Poder Redutor apresentou um valor médio de $21,97 \pm 5,01$ mL.L⁻¹.

Os resultados obtidos vão de encontro às observações de Choi *et al.* (2002) ^[151], segundo as quais a atividade antioxidante depende do teor em compostos fenólicos totais. De facto, a amostra A23 foi a que apresentou maior conteúdo em fenóis totais e menor valor de EC_{50} , conseqüentemente maior atividade antioxidante, como ilustra a Figura 20.

3.3.2.1 Análise da atividade antioxidante com base nos resultados microbiológicos

Nesta seção com o objetivo de verificar se a presença de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* influencia a atividade antioxidante das amostras de vinho, fomos comparar a atividade antioxidante das amostras sem e com presença de leveduras pertencentes a este género: Grupo 1 (A1 a A60) e Grupo 2 (B4 a B13).

Na Tabela 10 estão sumariados os resultados obtidos para a atividade antioxidante pelo método DPPH e pelo método Poder Redutor de acordo com as análises microbiológicas.

Tabela 10. Atividade antioxidante para as amostras de vinho de acordo com as análises microbiológicas.

Parâmetros	Grupo de Vinhos	
	1	2
Atividade Antioxidante Efeito Bloqueador de DPPH – EC₅₀ [mL.L⁻¹]	8,95 ± 1,66 ^a	10,92 ± 1,84 ^b
Atividade Antioxidante pelo Poder Redutor – EC₅₀ [mL.L⁻¹]	19,26 ± 3,61 ^a	27,23 ± 3,27 ^b

As médias dentro de uma linha com letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Os valores de p foram calculados a partir da análise T-Student após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias.

Da análise da Tabela 10, constata-se que o grupo 1 apresentou valores inferiores de EC₅₀ (8,95 ± 1,66 mL.L⁻¹) quantificada pelo método DPPH, relativamente aos obtidos para o grupo 2 (10,92 ± 1,84 mL.L⁻¹). Entre os grupos as diferenças na atividade antioxidante foram significativas ($p < 0,05$). Como os compostos fenólicos são principais responsáveis pela atividade antioxidante, e neste estudo verificou-se que o teor de fenóis totais foi influenciado pela presença das leveduras *Brettanomyces/Dekkera*, diminuindo o seu teor à medida que aumentava a população destas leveduras, assim sendo, as amostras que continham estas leveduras também apresentaram menor atividade antioxidante.

Relativamente aos valores obtidos para o EC₅₀ pelo método do Poder Redutor, o comportamento foi idêntico ao observado pelo método de DPPH, ou seja, o grupo 1

($19,26 \pm 3,61 \text{ mL.L}^{-1}$) apresentou menores valores de EC_{50} que o grupo 2 ($27,23 \pm 3,27 \text{ mL.L}^{-1}$), observando-se também diferenças significativas entre grupos.

3.3.2.2 Análise da atividade antioxidante de acordo com a região produtora dos vinhos

Tal como referido anteriormente, as amostras analisadas neste estudo tiveram origem em duas regiões distintas. O Grupo A é constituído pelas amostras provenientes da Região do Alto Douro (A1-A60 e B6-B11) e o Grupo B é formado pelas amostras da Região de Trás-os-Montes (B4, B5 e B13).

Na Tabela 11 encontram-se representados os resultados obtidos para a atividade antioxidante de acordo com a região produtora dos vinhos.

Tabela 11. Atividade antioxidante para as amostras de vinho de acordo com a região produtora.

Parâmetros	Grupo de Vinhos	
	A	B
Atividade Antioxidante Efeito Bloqueador de DPPH – EC_{50} [mL.L^{-1}]	$9,34 \pm 1,95^a$	$10,92 \pm 1,32^b$
Atividade Antioxidante pelo Poder Redutor – EC_{50} [mL.L^{-1}]	$21,11 \pm 5,00^a$	$25,96 \pm 4,02^b$

As médias dentro de uma linha com letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Os valores de p foram calculados a partir da análise *T-Student* após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias.

Analisando a Tabela 11, constata-se que a atividade antioxidante, determinada pelo método DPPH, das amostras de vinho provenientes da Região do Alto Douro foi superior, ou seja, os valores obtidos para EC_{50} ($9,34 \pm 1,95 \text{ mL.L}^{-1}$) no grupo A foram menores do que os determinados nas amostras da Região de Trás-os-Montes ($10,92 \pm 1,32 \text{ mL.L}^{-1}$). Como verificado no teor de fenóis totais, este foi influenciado pela região produtora, e como dito anteriormente, os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante, ou seja, as amostras da região do Alto Douro como apresentaram maior conteúdo de fenóis totais, apresentaram também maior atividade antioxidante.

Relativamente aos valores obtidos para o método do Poder Redutor verificamos que o grupo B ($25,96 \pm 4,02 \text{ mL.L}^{-1}$) apresentou valores de EC_{50} maiores que o grupo A ($21,11 \pm 5,00 \text{ mL.L}^{-1}$), ou seja, as amostras de vinho provenientes da Região de Trás-os-Montes apresentaram menor atividade antioxidante que as amostras da Região do Alto Douro.

Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos quer pelo método do DPPH, quer pelo método Poder Redutor.

De acordo com o descrito por Andrade *et al.* (2001)^[82] e Ramos *et al.* (1999)^[83], a região produtora dos vinhos afeta a composição em fenólicos totais. Nos resultados obtidos no nosso trabalho observou-se uma correlação entre o teor em compostos fenólicos e a atividade antioxidante sugerindo que a região também influencia esta atividade.

3.3.3 Correlações lineares entre os diversos parâmetros estudados

Para avaliar a correlação entre o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais das amostras estudadas, as suas propriedades antioxidantes, os fenóis voláteis e a presença de *Brettanomyces/Dekkera* determinaram-se as funções lineares entre os vários parâmetros e calcularam-se os correspondentes coeficientes de correlação. A associação entre duas variáveis quantitativas é preferencialmente expressa por um coeficiente de correlação, existindo o coeficiente de correlação de Pearson, que expressa a intensidade e o sentido da relação linear que existe entre duas variáveis numéricas.

Quando este coeficiente se situa entre 0,5 e 0,8 considera-se que os parâmetros envolvidos estão moderadamente correlacionados através de uma função linear, quando o coeficiente de correlação está compreendido entre 0,8 a 0,9 considera-se existir uma correlação linear forte entre os parâmetros em causa, e se o coeficiente for superior a 0,9 significa que existe uma correlação linear muito forte.

3.3.3.1 Correlação entre o teor de fenóis e flavonoides totais

Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação entre o conteúdo de fenólicos e o teor de flavonoides totais nas amostras de vinho analisadas estão sumariadas na Tabela 12.

Tabela 12. Matriz de correlação entre o teor de fenóis e flavonoides totais.

Parâmetros	Fenóis		
	Equação	R ²	p*
Flavonoides	$y = 11,803x + 2,066$	0,544	***

n.s.- não significante;

** $p \leq 0,01$ – correlação muito significativa;

* $p \leq 0,05$ – correlação significativa;

*** $p \leq 0,001$ – correlação altamente significativa.

Como se pode observar na Tabela 12 (material suplementar apresentado na Figura 21 do Anexo V), verifica-se que as variáveis variaram no mesmo sentido, ou seja, apresentaram uma correlação positiva, constatando-se este facto, através do valor positivo do declive da equação da reta. Verifica-se que o grau de relacionamento linear entre as duas variáveis apresenta um valor de $R^2 = 0,544$. O teor de fenóis e o conteúdo de flavonoides totais apresentam uma correlação altamente significativa ($p \leq 0,001$).

De facto, os flavonoides fazem parte dos compostos fenólicos, daí se verificar uma correlação positiva entre estes dois parâmetros.

3.3.3.2 Correlação entre a atividade antioxidante e fenóis, flavonoides totais e fenóis voláteis

As correlações entre a atividade antioxidante (valores de EC_{50}) obtidos a partir dos dois métodos testados e os fenóis, os flavonoides totais e os dois compostos voláteis estão sumariados na Tabela 13.

Relativamente, à correlação entre o teor de fenóis e a atividade antioxidante os resultados sugerem que para os dois métodos testados o conteúdo de compostos fenólicos apresenta um coeficiente de correlação muito elevado, com valores de $R^2 = 0,908$ e de $R^2 = 0,841$ para os métodos DPPH e Poder Redutor, respetivamente. Estes resultados indicam que a correlação entre os fenóis e a atividade antioxidante determinada pelos dois métodos é altamente significativa, como se pode visualizar nas Figuras 22 e 23 – Anexo V.

A associação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante encontrada neste estudo era de se esperar, uma vez que os compostos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante no vinho ^[151].

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos, deve-se principalmente, às características da estrutura química. Essas características desempenham um papel importante não somente na habilidade em doar hidrogénio ou eletrões, mas também por causa dos seus radicais intermediários serem muito estáveis e impedirem a oxidação [100,152].

A correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH foi confirmada por diversos autores. Katalinic *et al.* (2004) [90], Di Majo *et al.* (2008) [96], Seruga *et al.* (2011) [103] e Arcari *et al.* (2013) [138] obtiveram valores de R^2 de 0,954; 0,998; 0,967 e 0,820, respetivamente, em vinhos tintos.

Paixão *et al.* (2007) [91] relata valores de R^2 de 0,982 para esta correlação, em alguns vinhos tintos de Portugal.

Em contrapartida, alguns autores referem coeficientes de correlação um pouco mais baixos. Assim, Giovanelli (2005) [153] observou para vinhos tintos italianos um coeficiente de correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante avaliada pelo DPPH de 0,808.

Apesar das diferenças entre os resultados obtidos pelos diferentes autores, praticamente todos os artigos publicados sobre este assunto sugerem que a fonte predominante da atividade antioxidante em vinhos tintos deriva de diferentes compostos fenólicos e depende fortemente do seu conteúdo de polifenóis totais.

Relativamente aos valores obtidos para o conteúdo de flavonoides totais a correlação com a atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH foi altamente significativa ($p < 0,001$), apresentando um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,591$. Não se verificou correlação entre os flavonóides e a atividade antioxidante quantificada pelo método do Poder Redutor ($p > 0,05$ e $R^2 = 0,206$).

Katalinic *et al.* (2004) [90] e Giovanelli (2005) [153], relatam em vinhos tintos valores de correlação entre o teor de flavonoides e a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH de 0,946 e 0,747, respetivamente, valores muito superiores aos obtidos neste estudo.

Da análise da Tabela 13, verifica-se que os fenóis voláteis (4-etilguaiacol e 4-etilfenol) apresentam uma correlação altamente significativa ($p < 0,001$) com a atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH, à exceção do composto 4-etilfenol que apresentou uma correlação muito significativa ($p < 0,01$).

Tabela 13. Matriz de correlação entre a atividade antioxidante e o teor de fenóis, flavonoides totais e os compostos voláteis.

Parâmetros	EC ₅₀ DPPH			EC ₅₀ Poder Redutor		
	Equação	R ²	p*	Equação	R ²	p*
Fenóis	$y = -0,291x + 6,048$	0,908	***	$y = -0,102x + 5,490$	0,841	***
Flavonoides	$y = -0,009x + 0,185$	0,591	***	$y = -0,001x + 0,126$	0,206	n.s
4-Etilguaicol	$y = 0,009x + 8,792$	0,566	***	$y = 0,029x + 19,328$	0,644	***
4-Etilfenol	$y = 0,001x + 9,164$	0,460	**	$y = 0,004x + 20,286$	0,594	***

n.s.- não significante;

** $p \leq 0,01$ – correlação muito significativa;

* $p \leq 0,05$ – correlação significativa;

*** $p \leq 0,001$ – correlação altamente significativa.

Tabela 14. Matriz de correlação entre os fenóis voláteis e o teor de fenóis, flavonoides totais e a contagem microbiana.

Parâmetros	4-Etilguaicol			4-Etilfenol		
	Equação	R ²	p*	Equação	R ²	p*
Fenóis	$y = -0,004x + 3,619$	0,724	***	$y = -0,001x + 3,476$	0,630	***
Flavonoides	$y = -6,480 \times 10^{-5}x + 0,107$	0,259	n.s	$y = -8,481 \times 10^{-6}x + 0,105$	0,248	n.s
UFC	$y = 0,601x + 26,557$	0,849	***	$y = 4,223x + 5,384$	0,816	***

n.s.- não significante;

** $p \leq 0,01$ – correlação muito significativa;

* $p \leq 0,05$ – correlação significativa;

*** $p \leq 0,001$ – correlação altamente significativa.

3.3.3.3 Correlação entre os fenóis voláteis (4-Etilfenol e 4-Etilguaiacol) e o teor de fenóis, flavonoides totais e a presença de *Brettanomyces/Dekkera*

As correlações entre os fenóis voláteis, o conteúdo de fenóis, flavonoides totais e a quantidade de *Brettanomyces/Dekkera* apresentam-se na Tabela 14.

Da observação da Tabela 14, constata-se que o teor de fenóis totais e de compostos voláteis variam sentido contrário, ou seja, a relação entre as variáveis foi linear e negativa (material suplementar apresentado nas Figura 24 e 25 do Anexo V). Obteve-se uma correlação altamente significativa ($R^2 > 0,6$; $p < 0,001$) entre os compostos voláteis e o conteúdo de fenóis totais.

Relativamente, aos flavonoides totais a correlação com os fenóis voláteis não foi significativa, isto é, o coeficiente de correlação foi inferior a 0,30 e $p\text{-value} > 0,05$.

A correlação entre a contagem de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* e os compostos voláteis foi altamente significativa ($R^2 > 0,8$; $p < 0,001$), como ilustram as Figuras 26 e 27 – Anexo V. Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois segundo o descrito na literatura os vinhos que apresentam um elevado número de leveduras têm maiores concentrações de compostos voláteis.



Capítulo 4

Conclusão e Perspetivas Futuras



Um dos mais graves problemas microbiológicos na enologia moderna conhecido por provocar graves defeitos olfativos, que determinam a deterioração do vinho são os fenóis voláteis produzidos pelas leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*. De entre todas as espécies *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* é referida como a que provoca mais impacto na qualidade do vinho, podendo ser isolada quer da superfície de uvas quer de barricas de madeira durante o armazenamento ou envelhecimento dos vinhos.

A nível microscópico e macroscópico observou-se a presença de *Brettanomyces/Dekkera* em certas amostras.

Da análise cromatográfica efetuada nas amostras de vinho verificou-se que as amostras que apresentavam leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*, também exibiam elevadas concentrações para os fenóis voláteis, níveis estes acima dos limites de referência (concentração mínima acima do qual um composto deprecia o aroma do vinho), mostrando que a presença deste tipo de leveduras afeta diretamente a produção destes metabolitos.

Relativamente ao teor em fenóis e flavonoides totais e à atividade antioxidante, apesar de neste estudo se ter realizado uma correlação entre os diversos parâmetros, provavelmente não se pode tirar uma conclusão definitiva, pelo facto, de a quantidade de amostras não ser muito representativa (quinze amostras da região do Alto Douro e três de Trás-os-Montes).

Relativamente à análise do teor em compostos fenólicos, esta revelou que o teor foi influenciado pelo número de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* e pela região produtora do vinho, ao contrário do que se verificou para o conteúdo de flavonoides totais. Referente à região, a do Alto Douro apresentou maior teor em fenóis em relação às amostras de vinho provenientes de Trás-os-Montes.

A atividade antioxidante determinada quer pelo método Poder Redutor, quer pelo método bloqueador de radicais livres de DPPH, foi influenciada pela região produtora do vinho e pela quantidade de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* presente nos vinhos. Os vinhos provenientes da região do Alto Douro foram os que evidenciaram maior capacidade antioxidante.

A quantidade de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* está correlacionada significativamente com os fenóis voláteis, como já era de se esperar, visto que, estas leveduras são responsáveis pelas concentrações elevadas destes metabolitos.

Constatou-se que existem correlações significativas entre os fenóis totais e os flavonoides, e a atividade antioxidante e o conteúdo de fenóis totais.

A nível de perspetivas futuras, um dos principais contributos para este tema das leveduras *Brettanomyces/Dekkera* em vinhos seria tentar encontrar um método fácil, rápido e expedito que possa ser utilizado pelos produtores na própria adega e que permita a deteção destas leveduras sem ter que estar à espera dos resultados de laboratórios certificados, que por vezes são muitos demorados.

Outro parâmetro interessante de estudar futuramente era a caracterização da conversão metabólica da levedura *Brettanomyces/Dekkera*, nomeadamente no que respeita à atividade das enzimas hidroxicinamato descarboxilase e vinilfenol redutase usando diferentes precursores para a produção de 4-Etilfenol.

Uma das próximas abordagens a um estudo deste género será estudar o efeito que os compostos voláteis produzidos pelas *Brettanomyces/Dekkera* têm sobre a qualidade dos vinhos testada recorrendo às apreciações de um painel de provadores. Seria também relevante verificar a partir de que valores destes metabolitos é que o painel de provadores conseguiria detetar e considerariam indesejáveis.

Este trabalho deixa também em aberto algumas pistas de investigação futuras, tal como investir numa amostragem mais abrangente e representativa de várias regiões vitivinícolas portuguesas. Outro aspeto interessante seria um estudo mais aprofundado sobre vinhos tintos, brancos e rosés, e sobre a importância tanto dos métodos de vinificação como das uvas (mais precisamente as castas utilizadas para a produção dos vinhos) nos diferentes compostos que se encontram posteriormente no vinho que lhe conferem características terapêuticas, nomeadamente a sua capacidade antioxidante.

Capítulo 5

Bibliografía

- [1] FAOSTAT, (2012). <http://faostat.fao.org> (acedido em Agosto de 2014).
- [2] Peynaud, E. (1981). *Connaissance et Travail du Vin*. Dunod, Paris.
- [3] Jackson, R.S. (2008). *Wine Science – Principles and Applications*, 3rd ed. Academic Press.
- [4] Henschke, P., Curtin, C., & Grbin, P. (2007). Molecular characterization of the wine spoilage yeast – *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Microbiology Australia*, 76 – 78.
- [5] Wedral, D., Shewfelt, R., & Frank, J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in Wine. *LWT – Food Science and Technology*, **43** (10), 1474-1479.
- [6] Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2006). *Dekkera/Brettanomyces spp*, in: Blackburn, C. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishers, 354-398.
- [7] Oelofse, A., Pretorius, I.S., & du Toit, M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **29** (2), 128-144.
- [8] Fugelsang, K., & Edwards, C.G. (2007). *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*, New York Springer Science, Second. Ed.
- [9] Zuehlke, J.M., Petrova, B., & Edwards, C.G. (2013). Advances in the Controlo f Wine Spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Anual Review of Food Science and Technology*, **4**, 57-58.
- [10] Licker, J.L., Acree, T.E., & Henick-Kling, T. (1998). What is “Brett” (*Brettanomyces*) Flavor? A preliminary investigation. *Chemistry of Wine Flavor*, 714, 96-115.
- [11] Roccato, A., Daguerre, C., Mercado, L., Catania, C., & Combina, M. (2001). Deteccion de *Dekkera/Brettanomyces* en uva, mosto y vinos: metodologia y primeiros

resultados. Vitiviniculture and Enology Latin American Congress, Montevideo, Uruguay, 1-7.

[12] van der Walt, J.P. (1964). *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **30**, 273-280.

[13] van der Walt, J.P. (1984). *Brettanomyces* Kufferath & van Laer. In: N.J.W. Kreger-van Rij (Ed.), *The Yeast, A Taxonomic Study (3th ed.)*. Elsevier, Amsterdam, 562-576.

[14] Barnett, J.A., Payne, R.W., & Yarrow, D. (1990). *Yeast: Characteristics and Identification*, 2nd ed. Cambridge University Press. Cambridge.

[15] Kurtzman, C.P., & Fell, J.W. (2000). *The Yeasts, A taxonomic Study (4th ed.)*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V.

[16] Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, **102** (1), 10-21.

[17] Demain, A.L., Phaff, H.J., Kurtzman, C.P. (1998). The industrial and agricultural significance of yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds), *The Yeasts, A Taxonomic Study (1th ed.)*, Amsterdam: Elsevier Science B.V, 13-19.

[18] Mittrakul, C.M., Henick-Kling, T., & Egli, C.M. (1999). Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiology*, **16** (1), 3-14.

[19] Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B., & Coull, J. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from Wine by Fluorescence In Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (2), 938-941.

- [20] Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, A.P., Godden, P.W., & De Barros Lopes, M.A. (2007). Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research*, **7** (3), 471-481.
- [21] Smith, M.T. (1998). *Brettanomyces* Kufferath and van Laer. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. *The Yeasts, A Taxonomic Study (4th ed.)*, New York: Elsevier Science B.V, 450-453.
- [22] van Dijken, J.P., & Scheffers, W.A. (1986). Redox balance in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **32** (3-4), 199-224.
- [23] Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., & Volonterio, G. (2008). Physiological and oenological traits of diferente *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Research*, **8** (7), 1087-1096.
- [24] Rayne, S., & Eggers, N.J. (2008). 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol concentrations in barreled red wines from the Okanagan Valley appellation, British Columbia. *American Journal of Enology and Viticulture*, **59**, 92-97.
- [25] Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., & Bisson, L.F. (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57** (2), 139-147.
- [26] Smith, M.T. (2011). *Dekkera* van der Walt. In: Kurtzman, C., Fell, J.W., & Boekhout, T. (Eds.), *The Yeast*. Elsevier B.V., 373-379.
- [27] Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, **86** (1-2), 23-50.
- [28] 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*, **20** (4), 377-384.

- [29] Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Rever, G., & Lonvaud-Funel, A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, **100** (6), 1208-1219.
- [30] Barata, A., Pagliara, D., Piccininno, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008a). The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Research*, **8** (7), 1097-1102.
- [31] Brandam, Cédric., Castro-Martínez, Claudia., Délia, M.L., Ramón-Portugal, F., & Strehaiano, P. (2008). Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Canadian Journal of Microbiology*, **54**, 11-18.
- [32] Uscanga, M.G.A., Délia, M.L., & Strehaiano, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61** (2), 157-162.
- [33] Malfeito-Ferreira, M. (2005). Avances recientes en el control de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* en vinos. Zaragoza, Spain: Enotour Agrovin.
- [34] Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J., & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **60** (2), 165-178.
- [35] Licker, J.L., Acree, T.E., & Henick-Kling, T. (1999). Impacto of *Brettanomyces* yeast on Wine Flavor: Sensory Description of Wines with Different “Brett” Aroma Character. Geneva, New York: *New York State Agricultural Experiment Station, Departmento f Food Science and Technology*.
- [36] Chatonnet, P., Boidron, J.N., & Pons, M. (1990). Maturation of red wines in aol barrels evolution of some volatile compounds and their aromatic impact. *Science des Aliments*, **10**, 565-587.

- [37] Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., & Kunkee, R.E. (1996). *Principles and practices of Winemaking*. New York: Chapman and Hall.
- [38] Fugelsang, K. (1997). *Wine microbiology*. New York: The Chapman and Hall Enology Library.
- [39] Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008b). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, **121** (2), 201-207.
- [40] Smith, M.T., Yamazaki, M., & Poot, G.A. (1990). *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eniella*: Electrophoretic Comparison of Enzymes and DNA-DNA Homology. *Yeast*, **6**, 299-310.
- [41] 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*, *Journal of Applied Microbiology*, **90** (4), 588-599.
- [42] Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., & Carreira, A. (2004). *Detecting spoilage yeast*. In: Steele, R. (ed) *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food*. Woodhead Publishing, 233-288.
- [43] Loureiro, V. (2000). Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control, *Food Research International*, **33** (3-4), 247-256.
- [44] Rose, A.H., & Harrison, J.S. (1971). *The Yeast*, vol. 2, London, UK, Academic Press.
- [45] Medawar, W., Strehaiano, P., & Délia, M.L. (2003). Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media, *Food Microbiology*, **20** (5), 527-532.

- [46] Couto, M.M.B., Reizinho, R.G., & Duarte, F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts presente during red wine fermentations, *International Journal of Food Microbiology*, **102** (1), 49-56.
- [47] Morneau, A.D., Zuehlke, J.M., & Edwards, C.G. (2011). Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*, *Letters in Applied Microbiology*, **53** (4), 460-465.
- [48] Guerzoni, E., & Marchetti, R. (1987). Analysis of Yeast Flora Associated with Grape Sour Rot and of the Chemical Disease Markers, *Applied and Environmental Microbiology*, **53** (3), 571-576.
- [49] Renouf, V., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of na enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries, *Microbiological Research*, **162** (2), 154-167.
- [50] Connel, L., Stender, H., & Edwards, C.G. (2002). Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis, *American Journal of Enology and Viticulture*, **53** (4), 322-324.
- [51] Renouf, V., Perello, M.C., de Revel, G., & Lonvaud-Funnel, A. (2007). Survival of wine microorganisms in the bottle during storage, *American Journal of Enology and Viticulture*, **58** (3), 379-386.
- [52] Couto, J.A., Barbosa, A., & Hogg, T. (2005). A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines, *Letters in Applied Microbiology*, **41** (6), 505-510.
- [53] Whiton, R.S., & Zoecklein, B.W. (2000). Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds, *American Journal of Enology and Viticulture*, **51** (4), 379-382.
- [54] Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N., & Loureiro, V. (2011). Yeasts and off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*, **61** (1), 95-102.

- [55] Godoy, L., Martínez, C., Carrasco, N., & Ganga, M.A. (2008). Purification and characterization of a *p*-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*, *International Journal of Food Microbiology*, **127** (1-2), 6-11.
- [56] Edlin, D., Narbad, A., Dickinson, J.R., & Lloyd, D. (1995). The biotransformation of simple phenolic-compounds by *Brettanomyces-Anomalus*, *FEMS Microbiology Letters*, **125** (2-3), 311-315.
- [57] Kheir, J., Salameh, D., Strehaiano, P., Brandam, C., & Lteif, R. (2013). Impacto f volatiles phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts, *European Food Research Technology*, **237**, 655-671.
- [58] Malfeito-Ferreira, M., Barata, A., & Loureiro, V. (2009). Wine Spoilage by Fungal Metabolites, In: Moreno-Arribas, M.V., & Polo, C. (Ed.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, 615-645.
- [59] Whiting, G.C., & Carr, J.G. (1959). Metabolism of cinnamic acid and hydroxy-cinnamic acids by *Lactobacillus pastorianus* Var *quinicus*, *Letters to Nature*, **184** (4696), 1427-1428.
- [60] Curiel, J.A., Rodríguez, H., Landete, J.M., de las Rivas, B., & Munoz, R. (2010). Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids, *Food Chemistry*, **120** (1), 225-229.
- [61] Couto, J.A., Campos, F.M., Figueiredo, A.R., & Hogg, T.A. (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols, *American Journal of Enology and Viticulture*, **57** (2), 166-171.
- [62] Barthelmebs, L., Divies, C., & Cavin, J.F. (2000). Knockout of the *p*-Coumarate Decarboxylase Gene from *Lactobacillus plantarum* Reveals the Existence of Two Other Inducible Enzymatic Activities Involved in Phenolic Acid Metabolismo, *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (8), 3368-3375.

- [63] Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., Ledauphin, J., Guichard, H., Barillier, D., & Coton, E. (2011). Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability, *Food Microbiology*, **28** (7), 1243-1251.
- [64] Cavin, J.F., Barthelmebs, L., Guzzo, J., Beeumen, J.V., Samyn, B., Travers, J.F., & Diviès, C. (1997). Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*, *FEMS Microbiology Letters*, **147** (2), 291-295.
- [65] 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 Society for Enology and Viticulture*, **46** (4), 463-468.
- [66] Chatonnet, P., Viala, C., & Dubourdieu, D. (1997). Influence of Polyphenolic Components of Red Wines on the Microbial Synthesis of Volatile Phenols, *American Journal for Enology and Viticulture*, **48** (4), 443-448.
- [67] Romano, A., Perello, M.C., de Revel, G., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine, *Journal of Applied Microbiology*, **104** (6), 1577-1585.
- [68] Barata, A., Nobre, A., Correia, P., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2006). Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices, *American Journal of Enology and Viticulture*, **57** (2), 133-138.
- [69] Conterno, L., Lasik, G., Tomasino, E., Schneider, K., Hesford, F., & Henick-Kling, T. (2007). Influence of sugar and nitrogen sources on growth and phenolic off-flavor production by *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, **58** (3), 411.
- [70] Harris, V., Ford, C.M., Jiranek, V., & Grbin, P.R. (2009). Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast, *Applied Microbiology & Biotechnology*, **81** (6), 1117-1127.

- [71] Gerbaux, V., Jeudy, S., & Monamy, C. (2000). Study of phenol volatiles in Pinot Noir wines in Burgundy, *Bulletin de l'OIV*, **73**, 581-599.
- [72] Gerbaux, V., Vicent, B., & Bertrand, A. (2002). Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, **53** (2), 131-137.
- [73] 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*, **35** (3), 157-164.
- [74] Ciani, M., & Ferraro, L. (1997). Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **75** (4), 489-495.
- [75] Ciani, M., Maccarelli, F., & Fatichenti, F. (2003). Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **19** (4), 419-422.
- [76] Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., & Marques, M.P.M. (2006). New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols, *Medicinal Research Reviews*, **26** (6), 747-766.
- [77] Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M., & Diamandis, E.P. (2006). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols, *Clinical Biochemistry*, **39** (5), 492-497.
- [78] Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, Volume II, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex.

- [79] De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., & Manley, M. (2003). Antioxidant Activity of South African Red and White Cultivar Wines: Free Radical Scavenging, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **51** (4), 902-909.
- [80] Cantos, E., Espín, J.C., & Tomás-Barberán, F.A. (2002). Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC-DAD-MS-MS, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **50** (20), 5691-5696.
- [81] Delmas, D., Jannin, B., & Latruffe, N. (2005). Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing, Review, *Molecular Nutrition & Food Research*, **49** (5), 377-395.
- [82] Andrade, P.B., Oliveira, B.M., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., Ferreres, F., & Garcia-Viguera, C. (2001). Analysis of phenolic compounds in Spanish Albarino and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *Electrophoresis*, **22** (8), 1568-1572.
- [83] Ramos, R., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Pereira, C., Ferreira, M.A., & Faia, M.A. (1999). A preliminar study of non-coloured phenolics in wines of varietal white grapes (códega, gouveio and malvasia fina): effects of grape variety, grape maturation and technology of winemaking, *Food Chemistry*, **67** (1), 39-44.
- [84] Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martinez-Cacha, A., Pardo, F., & Nicolas, J.M.L. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** (16), 4694-7000.
- [85] Macheix, J.J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). Phenolic compounds in fruit processing. In *Fruit Phenolics*, CRC Press.
- [86] Jackson, R.S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*, 3rd Edition, Academic Press.

- [87] Moreno-Arribas, M.V., & Polo, M.C (2009). *Wine Chemistry & Biochemistry*, Springer Science+Business Media, New York, 437-529.
- [88] Cadenas, C., & Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidante, Chapter 20 – The Phenolic Wine Antioxidants*, 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc. New York.
- [89] Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., & García-Parrilla, M.C. (2004). The antioxidante activity of wines determined by the ABTS⁺ method: influence of sample dilution and time, *Talanta*, **65** (2), 501-509.
- [90] Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) - catechin, *Food Chemistry*, **86** (4), 593-600.
- [91] Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., & Câmara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines, *Food Chemistry*, **105** (1), 204-214.
- [92] Stasko, A., Brezová, V., Mazúr, M., Certík, M., Kalinák, M., & Gescheidt, G. (2008). A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines, *LWT – Food Science and Technology*, **41** (10), 2126-2135.
- [93] Roussis, I.G., Lambropoulos, I., Tzimas, P., Gkoulioti, A., Marinos, V., Tsoupeis, D., & Boutaris, I. (2008). Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, **21** (8), 614-621.
- [94] Rivero-Pérez, M.D., Muñoz, P., & González-Sanjosé, M.L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidante properties of wine, *Food and Chemical Toxicology*, **46** (8), 2815-2822.
- [95] Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G.L., & Salinas, M.R. (2008). Complementary effect of Cabernet Sauvignon on Monastrell wines, *Journal of Food Composition and Analysis*, **21** (1), 54-61.

- [96] Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., & Giammanco, M. (2008). The antioxidante capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents, *Food Chemistry*, **111** (1), 45-49.
- [97] Li, H., Wang, X., Li, Y., & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidante properties of selected China wines, *Food Chemistry*, **112** (2), 454-460.
- [98] Lucena, A.P.S., Nascimento, R.J.B., Maciel, J.A.C., Tavares, J.X., Barbosa-Filho, J.M., & Oliveira, E.J. (2010). Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines, *Journal of Food Composition and Analysis*, **23** (1), 30-36.
- [99] Versari, A., Parpinello, G.P., Scazzina, F & Del Rio, D. (2010). Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy, *Food Control*, **21** (5), 786-789.
- [100] Granato, D., Katayama, F.C.U., & Castro, I.A. (2010). Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidante activity of Brazilian red wines using chemometrics, *LWT – Food Science and Technology*, **43** (10), 1542-1549.
- [101] Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M & Teissedre, P.L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age, *Food Chemistry*, **126** (4), 1971-1977.
- [102] Ginjom, I., D’Arcy, B., Caffin, N., & Gidley, M. (2011). Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process, *Food Chemistry*, **125** (3), 823-834.
- [103] Seruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols contente and antioxidante activity of some red wines by Differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chemistry*, **124** (3), 1208-1216.
- [104] Vreck, I.V., Bojic, M., Zuntar, I., Mendas, G., & Medic-Saric, M. (2011). Phenol contente, antioxidante activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes, *Food Chemistry*, **124** (1), 354-361.

- [105] Gris, E.F., Mattivi, F., Ferreira, E.A., Vrhovsek, U., Filho, D.W., Pedrosa, R.C., & Bordignon-Luiz, M.T. (2013). Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidante activity, *Journal of Food Composition and Analysis*, **31** (1), 31-40.
- [106] Singleton, V.L. (1987). Oxygen with Phenol and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications, *American Journal of Enology and Viticulture*, **38** (1), 69-77.
- [107] Macheix, J.J., Sapis, J.C., & Fleuriet, A. (1991). Phenolic-Compounds and Polyphenoloxidase in Relation to Browning in Grapes and Wines, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **30** (4), 441-486.
- [108] Cabrita, M.J., Ricardo-da-Silva, J., & Laureano, O. (2000). Os Compostos Fenólicos das Uvas e dos Vinhos, *I Seminário Internacional de Vitivinicultura*, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- [109] Dornas, W.C., Oliveira, T.T., Rodrigues-das-Dores, R.G., Santos, A.F., & Nagem, T.J. (2007). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **28** (3), 241-249.
- [110] Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition*, **130** (8), 2073S-2085S.
- [111] Middleton Jr, E., Kandaswami, C., & Theoharides, C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer, *Pharmacological Reviews*, **52** (4), 673-751.
- [112] Anderson, R.F., Amarasinghe, C., Fisher, L.J., Mak, W.B., & Packer, J.E. (2000). Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids, *Free Radical Research*, **33** (1), 91-103.

- [113] Stecher, G., Huck, C.M., Popp, M., & Bonn, G.K. (2001). Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MA-MA, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **371** (1), 73-80.
- [114] Flamini, R. (2003). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols, *Mass Spectrometry Review*, **22** (4), 218-250.
- [115] Vareed, S.K., Reddy, M.K., Schutzki, R.E., & Nair, M.G. (2006). Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits, *Life Sciences*, **78** (7), 777-784.
- [116] Pedreschi, R., Cisneros-Zevallos, L. (2007). Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays L.*), *Food Chemistry*, **100** (3), 956-963.
- [117] Guo, L., Wang, L.H., Sun, B.S., Yang, J.Y., Zhao, Y.Q., Dong, Y.X., Spranger, M.I., & Wu, C.F. (2007). Direct in vivo evidence of protective effects of grape seed procyanidin fractions and other antioxidants against ethanol-induced oxidative DNA damage in mouse brain cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (14), 5881-5891.
- [118] Cushnie, T.P.T., & Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26** (5), 343-356.
- [119] Skoog, D.A., West., Holler, F.J., & Crouch. (2000). Fundamentos de Química Analítica, *Editora Thomson*, 8ª Edição, 889-945.
- [120] Braithwaite, A., & Smith, F. (1999). *Chromatographic methods*, 5ªed., Reino Unido: Kluwer Academic Publishers.
- [121] Laforgue, R., & Lonvaud-Funel, A. (2012). Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: Relationship with cell viability, *Food Microbiology*, **32** (2), 230-234.

- [122] Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., & Alexandre, H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*, *Food Microbiology*, **20** (2), 438-447.
- [123] Couto, J.A., Neves, F., Campos, F., & Hogg, T. (2005). Thermal inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*, *International Journal of Food Microbiology*, **104** (3), 337-344.
- [124] Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol, *Food Microbiology*, **20** (5), 567-574.
- [125] Bertrand, A. (1981). Formation des substances volatiles au cour de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité du vin. In *Séances Du Colloque Societé Française de Microbiologie*, 251-267. Reims: Cavin, J., Andioc, V., Etievant, P., & Divies, C. (1993). Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids, *American Journal of Enology and Viticulture*, **1**, 76-80.
- [126] Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Oxidants & Antioxidants*, PT A, **299**, 152-178.
- [127] Woisky, R.G., & Salatina, A. (1998). Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *Journal of Apicultural Research*, **37** (2), 99-105.
- [128] Berker, K.I., Guclu, K., Tor, I., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents, *Talanta*, **72** (3), 1157-1165.
- [129] Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root – their relative astringency and radical scavenging effects, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **36** (6), 2090-2097.

- [130] Maroco, J. (2003). *Análise Estatística com utilização do SPSS (2th ed.)*. Portugal, Lisboa: Edições Sílabo.
- [131] Larue, F., Rozes, N., Froudiere, I., Couty, C., & Perreira, G.P. (1991). Influence of development of *Dekkera/Brettanomyces* in wine musts. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **25**, 149-165.
- [132] Chatonnet, P., Boidron, J.N., & Dubourdiou, D. (1993). Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur les teneurs en acide acétique et en éthyl-phénols, *Journal International des Science de la Vigne et du Viniculture*, **27**, 277-298.
- [133] Funari, C.S., & Ferro, V.O. (2006). Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **26**, 171-178.
- [134] Almeida, R.B., Camarato, J.L., Navarro, D.F., Parker, Y.K., Ikegaki, M., & Junior, V.A.K. (1997). Determinação de flavonóides totais em amostras de própolis. *Ciência Biológicas e da Saúde*, **3**, 33-41.
- [135] Cimino, F., Sulfaro, V., Trombetta, D., Saija, A., & Tomaino, A. (2007). Radical-scavenging capacity of several Italian red wines. *Food Chemistry*, **103** (1), 75-81.
- [136] López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., & Del Valle.Ribes, C. (2003). The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **43** (2), 233-244.
- [137] Silva, S.D., Feliciano, R.P., Boas, L.V., & Bronze, M.R. (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidante capacity. *Food Chemistry*, **150**, 489-493.
- [138] Arcari, S.G., Chaves, E.S., Vanderlinde, R., Rosier, J.P., & Bordignon-Luiz, M.T. (2013). Brazilian fortified wines: Chemical composition, chromatic properties and antioxidante activity. *Food Research International*, **53**, 164-173.

- [139] Stefenon, C.A., Colombo, M., Bonesi, C.M., Marzarotto, V., Vanderlinde, R., Salvador, M & Henriques, J.A.P. (2010). Antioxidant activity of sparkling wines produced by *Champenoise* and *Charmat* methods. *Food Chemistry*, **119** (1), 12-18.
- [140] Yang, J., Martinson, T.E., & Liu, R.H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, **116**, 332-339.
- [141] Waterhouse, A.L. (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **957** (1), 21-36.
- [142] Zheng, W., & Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (11), 5165-5170.
- [143] Sousa, A., Ferreira, I., Barros, L., Bento, A., & Pereira, J.A. (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “*alcaparras*”. *LTW- Food Science and Technology*, **41** (4), 739-745.
- [144] Chung., Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F., & Chou, S.T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (8), 2454-2458.
- [145] Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, **84** (4), 551-562.
- [146] Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities, *Food Analytical Methods*, **2** (1), 41-60.
- [147] Prior, R.L., Wu, X.L., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (10), 4290-4302.

- [148] Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidante activity. *Analyst*, **127** (1), 183-198.
- [149] Sousa, C.M.D.M., Silva, H.R.E., Vieira, G.M., Ayres, M.C.C., Da Costa, C.L.S., Araujo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araujo, P.B.D.M., Brandao, M.S., & Chaves, M.H. (2007). Total phenolics and antioxidante acttivity of five medicinal plants. *Química Nova*, **30** (2), 351-355.
- [150] Atanackovic, Milica., Petrovic, Aleksandar., Jovic, Slobodan., Gojkovic-Bukarica, Ljiljana., Bursac, Mira., & Cvejic, Jelena. (2012). Influence of winemaking techniques on the resveratrol contente, total phenolic contente and antioxidante potential of red wines. *Food Chemistry*, **131**, 513-518.
- [151] Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S, H., & Kim, S,K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, **163**, 1161-1168.
- [152] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20** (7), 933-956.
- [153] Giovanelli, G. (2005). Evaluation of the antioxidante activity of red wines in relationship to their phenolic contente. *Italian Journal of Food Science*, **17** (4), 381-393.

Capítulo 6

Anexos

Anexo I

Meios de cultura utilizados na análise microbiológica do vinho

* Meio WL Differential Medium

Meio WL – 80 g/L

Cicloheximida – 100 mg/L

Ácido p-cumárico – 10 mg/L

Cloranfenicol – 50 mg/L

A esterilização do meio foi efetuada em frascos numa autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos, à exceção da cicloheximida, ácido p-cumárico e cloranfenicol que foram esterilizados por filtração através de membrana de 0,22 µm, sendo que este preparado é adicionado ao anterior após o seu arrefecimento.

O meio foi transferido, em ambiente estéril, para placas de vidro estéreis para posterior inoculação das amostras.

* Meio de Levedura

Peptona – 10 g/L

Extrato de levedura – 5 g/L

Glucose – 20 g/L

Agar – 20 g/L

Água Destilada – 1000 mL

A esterilização do meio foi efetuada em frascos numa autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos.

O meio foi transferido, em ambiente estéril, para placas de vidro estéreis para posterior inoculação das amostras.

Anexo II

Soluções utilizadas na quantificação dos fenóis voláteis.

Soluções utilizadas na obtenção da reta de calibração

Para obtenção da reta de calibração foi necessário preparar diferentes soluções.

Solução aquosa de etanol a 75% (v/v):

Num balão volumétrico de 1L introduziu-se 750 mL de etanol absoluto e fez-se o volume com água desionizada.

Solução Modelo:

Num balão volumétrico de 1L pesou-se 4 g de ácido tartárico; 3 g de ácido málico; 0,1 g de ácido acético; 0,025 g de sulfato de magnésio; 0,1 g de sulfato de potássio e 90 g.L⁻¹ de etanol, perfazendo o volume com água desionizada.

Finalmente, ajustou-se o pH da solução a 3,30 com hidróxido de sódio.

Solução aquosa de 3,4-Dimetilfenol (Padrão Interno):

Para o padrão 3,4-dimetilfenol com 98% de pureza com uma concentração final de 100,646 µg.L⁻¹ pesou-se 102,7 ± 0,0001 mg para um balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume com a solução de etanol a 75%.

Solução Padrão de 4-Etilguaiacol e 4-Etilfenol:

Para a realização das soluções padrão que contêm os dois padrões tem que se preparar inicialmente uma solução mãe, seguida de uma solução de referência, e por fim as soluções necessárias para a obtenção da reta de calibração.

* **Solução-mãe**

Pesou-se 62,3 mg de 4-Etilguaicol (98% de pureza) e 177,8 mg de 4-Etilfenol (98% de pureza), com uma precisão de $\pm 0,0001$ mg para um balão volumétrico de 100 mL, perfazendo o volume com a solução de etanol a 75% (v/v).

* **Solução de Referência**

Pipetou-se 1 mL da Solução mãe para um balão volumétrico de 100 mL e perpez-se o volume com a solução de etanol a 75% (v/v).

* **Soluções padrão usadas na reta de calibração**

Em cinco balões volumétricos de 100 mL introduziu-se respetivamente 1, 2, 4, 7,5 e 15 mL da solução de referência, adicionando 1 mL da solução aquosa do padrão interno, perfazendo o volume com a solução modelo.

Anexo III

Reagentes utilizados para a avaliação dos compostos bioativos e da atividade antioxidante

*** Reagente Folin-Ciocalteu a 10%**

Dissolveram-se 10 g do reagente Folin-Ciocalteu em 100 mL de água destilada.

*** Solução de Carbonato de Sódio**

Dissolveram-se 75 g de Carbonato de Sódio em 1 L de água destilada.

*** Reagente $AlCl_3$ a 2%**

Dissolveram-se 2 g de Cloreto de Alumínio em 100 mL de etanol absoluto. A solução foi conservada num frasco e local escuro.

*** Solução do DPPH**

Dissolveram-se 2,4 mg de DPPH em etanol absoluto e dissolver num ultra-sons e perfazer o volume de 100 mL com etanol absoluto.

*** Solução tampão fosfato (0,2M) pH = 6,6**

Dissolveram-se 6,95 g de dihidrogenofosfato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (2M) de sódio em água destilada, num balão volumétrico de 250 mL e 14,2 g de hidrogenofosfato disódico (Na_2PO_4) (4M) em água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Preparara-se 250 mL de solução tampão, adicionando-se 156,26 mL da solução de dihidrogenofosfato e 93,75 mL de solução hidrogenofosfato disódico, ajustando o pH.

* **Solução de ferrocianeto de potássio a 1% (solução diária)**

Dissolveu-se 1 g de ferrocianeto de potássio em um pouco de água destilada, adicionando-se 1 mL de HCl (1M), num balão volumétrico de 100 mL.

* **Ácido Tricloroacético (TCA) a 10%**

Dissolveram-se 10 g de ácido tricloroacético em 100 mL de água destilada.

* **Solução de Cloreto de Ferro a 0,1% (solução diária)**

Dissolveram-se 0,1 g de cloreto de ferro em um pouco de água, adicionando-se 1 mL de HCl (1M), e perfazer com água destilada num balão volumétrico de 100 mL

Anexo IV
Tabela 15. Valor obtido para os compostos voláteis nas amostras de vinho analisadas.

Amostra	4-Etilguaiacol [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	4-Etilfenol [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
A1	64,54 \pm 38,16	13,16 \pm 4,23
A2	68,65 \pm 43,21	29,41 \pm 10,76
A22	60,82 \pm 10,12	20,51 \pm 4,18
A23	50,44 \pm 4,84	31,82 \pm 3,77
A25	8,43 \pm 2,57	41,33 \pm 32,42
A37	7,61 \pm 1,42	8,70 \pm 1,60
A38	5,59 \pm 1,54	10,08 \pm 0,76
A43	10,37 \pm 0,94	7,35 \pm 0,72
A47	5,74 \pm 2,97	13,32 \pm 1,36
A55	9,43 \pm 1,59	11,35 \pm 0,69
A59	3,59 \pm 0,32	6,26 \pm 0,01
A60	6,75 \pm 0,15	11,16 \pm 2,51
B4	202,53 \pm 108,75	660,49 \pm 95,11
B5	351,90 \pm 2,43	2847,51 \pm 87,20
B6	91,45 \pm 13,53	867,87 \pm 85,56
B9	178,46 \pm 8,03	469,95 \pm 3,90
B11	186,46 \pm 32,32	918,95 \pm 16,98
B13	347,13 \pm 39,92	2425,58 \pm 277,99
Média	92,20 \pm 114,47	466,38 \pm 851,86

Tabela 16. Concentrações de fenóis e flavonoides totais nas amostras de vinho analisadas.

Amostra	Fenóis totais [mg GAE.mL⁻¹]	Flavonoides totais [mg Q.mL⁻¹]
A1	3,77 ± 0,13	0,10 ± 0,03
A2	3,56 ± 0,19	0,10 ± 0,04
A22	2,45 ± 0,23	0,06 ± 0,04
A23	4,22 ± 0,19	0,13 ± 0,03
A25	3,90 ± 0,23	0,10 ± 0,03
A37	3,44 ± 0,11	0,06 ± 0,03
A38	3,45 ± 0,76	0,07 ± 0,02
A43	3,83 ± 0,27	0,10 ± 0,03
A47	3,31 ± 0,13	0,12 ± 0,08
A55	3,41 ± 0,27	0,10 ± 0,02
A59	3,50 ± 0,13	0,13 ± 0,04
A60	3,61 ± 0,38	0,12 ± 0,03
B4	3,09 ± 0,57	0,13 ± 0,03
B5	2,51 ± 0,65	0,07 ± 0,02
B6	3,80 ± 0,25	0,17 ± 0,04
B9	2,30 ± 0,33	0,10 ± 0,02
B11	2,41 ± 0,38	0,08 ± 0,04
B13	2,08 ± 0,45	0,07 ± 0,03
Média	3,23 ± 0,63	0,10 ± 0,03

Tabela 17. Valores obtidos para a atividade antioxidante determinados pelo método DPPH e pelo Poder Redutor [mL.L⁻¹] para as amostras de vinho.

Amostra	EC₅₀ DPPH [mL.L⁻¹]	EC₅₀ Poder Redutor [mL.L⁻¹]
A1	7,88 ± 0,13	18,21 ± 0,16
A2	9,12 ± 0,15	20,71 ± 0,20
A22	13,89 ± 0,05	28,19 ± 0,27
A23	7,78 ± 0,24	14,62 ± 0,09
A25	8,48 ± 0,13	15,68 ± 0,36
A37	9,73 ± 0,21	17,99 ± 0,27
A38	8,15 ± 0,07	17,10 ± 0,39
A43	7,82 ± 0,22	19,41 ± 0,20
A47	9,71 ± 0,31	21,46 ± 1,07
A55	8,36 ± 0,18	18,74 ± 0,48
A59	8,05 ± 0,16	17,96 ± 0,31
A60	8,46 ± 0,21	23,44 ± 1,70
B4	9,10 ± 0,12	21,49 ± 0,20
B5	11,95 ± 0,16	25,69 ± 0,59
B6	7,92 ± 0,20	26,33 ± 0,15
B9	12,74 ± 0,47	29,01 ± 0,18
B11	12,12 ± 0,20	30,19 ± 0,35
B13	11,70 ± 0,25	30,71 ± 0,24
Média	9,58 ± 1,92	21,97 ± 5,01

Anexo V

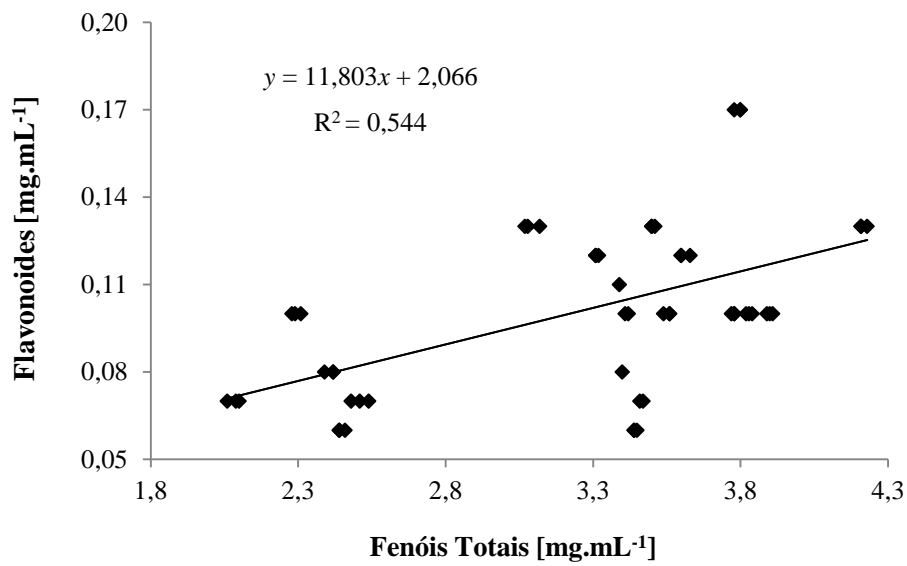


Figura 21. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e o conteúdo de flavonoides.

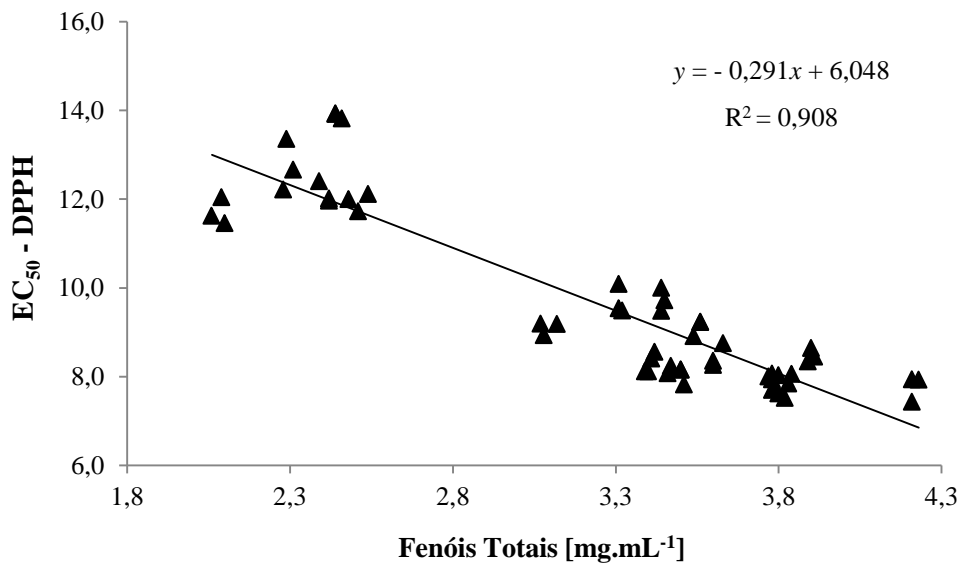


Figura 22. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os valores obtidos de EC₅₀ pelo ensaio antioxidante DPPH.

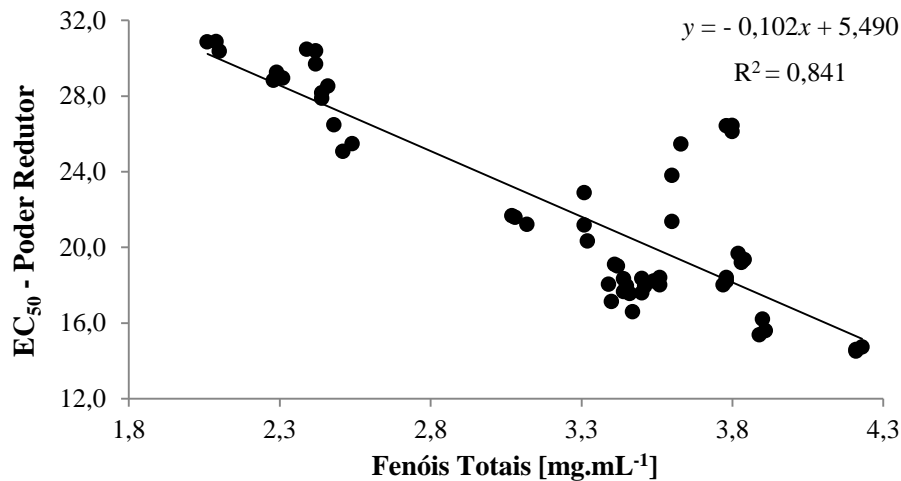


Figura 25. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os valores obtidos de EC₅₀ pelo ensaio antioxidante Poder Redutor.

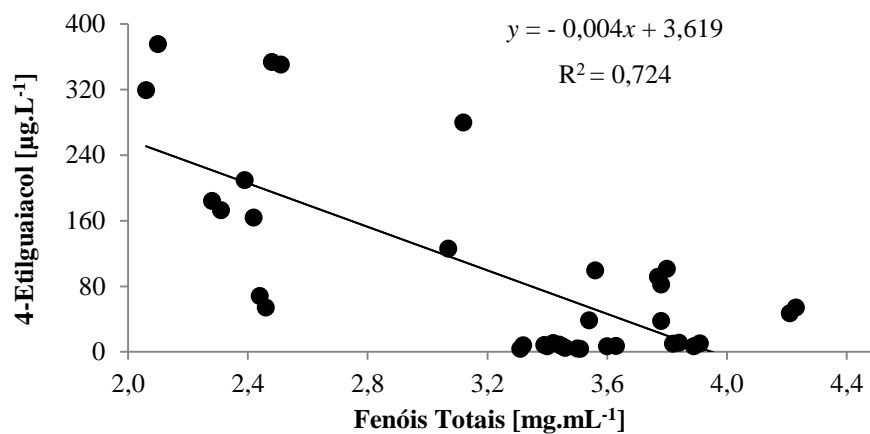


Figura 24. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os 4-Etilguaiaicol.

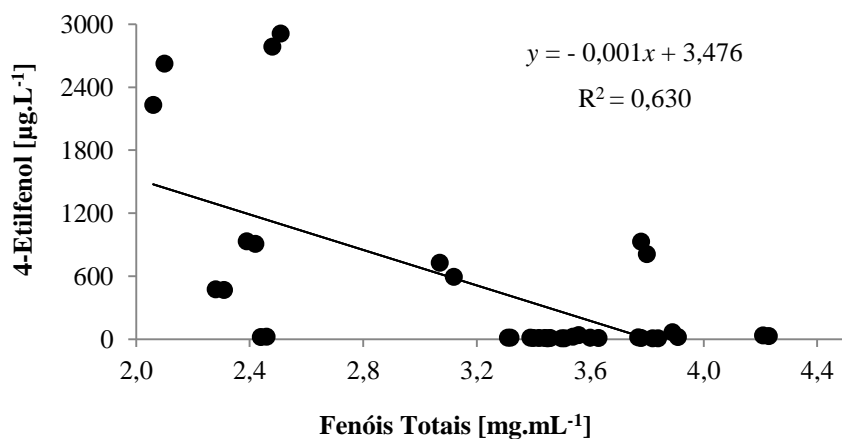


Figura 23. Correlação estabelecida entre o teor de fenóis totais e os 4-Etilfenol.

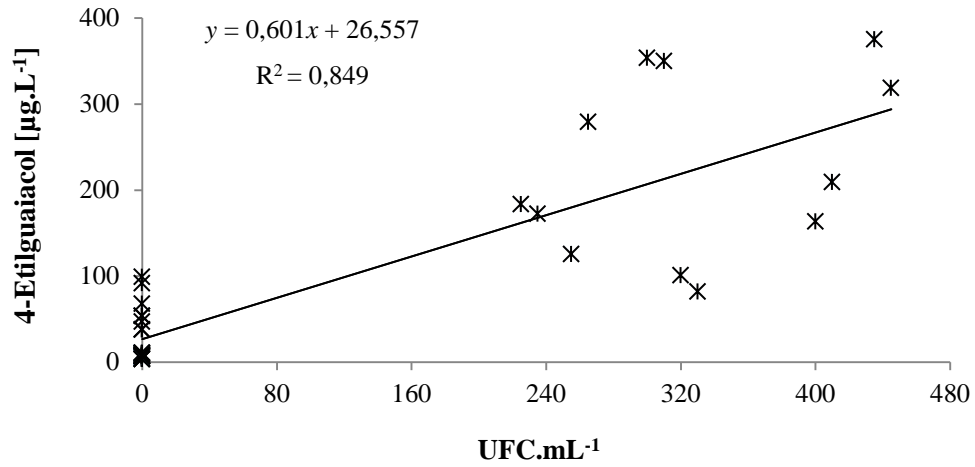


Figura 26. Correlação estabelecida entre contagem microbiana e o conteúdo de 4-Etilguaiaicol.

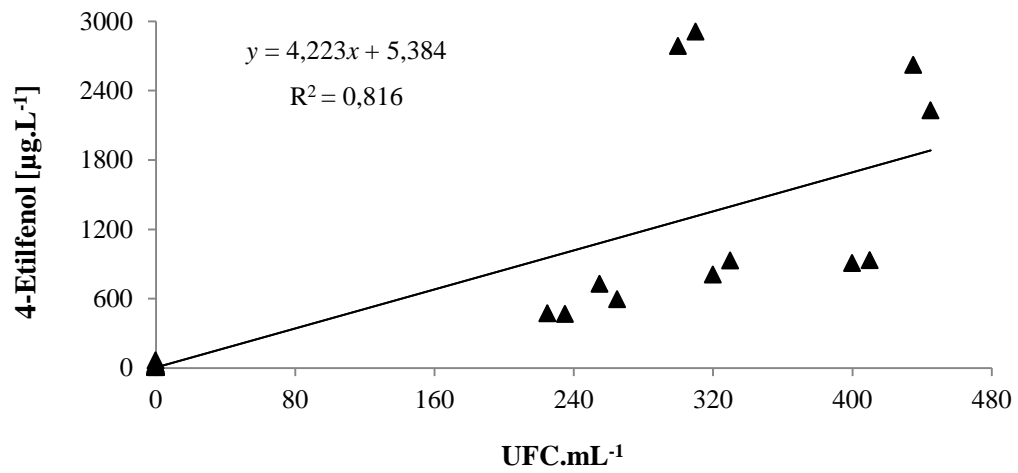


Figura 27. Correlação estabelecida entre contagem microbiana e o conteúdo de 4-Etilfenol.