



UNIVERSIDADE DE ÉVORA



FENÓIS VOLÁTEIS EM VINHOS TINTOS

FILIPA PATRÍCIA DA SILVA MORGADO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM VITICULTURA
E ENOLOGIA

Orientadora: Professora Doutora MARIA JOÃO CABRITA

Co-Orientadora: Professora Doutora CRISTINA COSTA

Évora 2009

FENÓIS VOLÁTEIS EM VINHOS TINTOS

FILIPA PATRÍCIA DA SILVA MORGADO

Orientadora: Professora Doutora MARIA JOÃO CABRITA

Co-Orientadora: Professora Doutora CRISTINA COSTA



171 390

Évora 2009

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Maria João Cabrita por todos os ensinamentos, pela sua disponibilidade e atenção incondicional desde o início até ao final da tese e por todo o apoio e motivação em todos os momentos.

À minha co-orientadora Professora Doutora Cristina Costa pela disponibilidade demonstrada a nível experimental, na organização e interpretação dos resultados obtidos.

Ao Professor Doutor Marco Gomes da Silva pela sua disponibilidade e atenção.

À D. Antónia sempre disponível e atenciosa, ao Rui e à D. Albina que me acolheram com muito carinho no Laboratório de Enologia da Universidade de Évora e que ajudaram sempre que precisei.

Aos meus pais de uma forma especial por todo o apoio incansável ao longo desta fase e também em toda a minha vida, sem eles nada disto seria possível. E a eles dedico a minha tese.

Ao Sérgio pela sua paciência, compreensão e palavras de encorajamento que foram essenciais para ter força para continuar.

Aos meus amigos Maria João e Luís Xarepe que estiveram sempre prontos a ouvir-me e que apoiaram-me em todos os momentos. E à minha amiga Margarida pelo seu carinho e força.

A todos os meus amigos em geral, que mesmo não estando presentes transmitiram-me muito apoio.

RESUMO

As leveduras *Dekkera/Brettanomyces* são responsáveis pela formação de fenóis voláteis em vinhos tintos, tornando-se numa grande preocupação para a produção enológica a nível mundial, devido à dificuldade em controlá-las.

Os fenóis voláteis são responsáveis por aromas desagradáveis nos vinhos tintos, diminuindo a sua qualidade e resultando em grandes perdas económicas.

Este trabalho teve como principal objectivo estudar um método de preparação de amostra e um método cromatográfico para analisar e quantificar os principais fenóis voláteis (4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 4-etilcatecol, 4-vinilfenol e o 4-vinilguaiacol), em meio sintético e em vinhos tintos comerciais. A preparação de amostras foi efectuada através do método de extracção líquido-líquido e a separação dos compostos foi efectuada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID).

Os resultados obtidos permitem concluir que é possível detectar e quantificar os fenóis voláteis com este método, incluindo o 4-etilcatecol. O 4-etilfenol foi o composto mais abundante nos vinhos tintos comerciais estudados.

Palavras – chave: *Dekkera/Brettanomyces*, vinho tinto, fenóis voláteis, 4-etilcatecol, método de extracção líquido – líquido, cromatografia gasosa – GC-FID.

Volatile Phenols in red wines

ABSTRACT

The yeasts *Dekkera* / *Brettanomyces* are responsible for the formation of volatile phenols in red wine, becoming a major concern for the enological production worldwide because of the difficulty in controlling them.

The volatile phenols are responsible for unpleasant aromas in red wines, reducing its quality and resulting in great economic losses.

The main objective of this work was to study a sample preparation and a chromatographic method to analyze main volatile phenols (4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol, 4-ethylcatechol, 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol) in synthetic wine and red wines. Sample preparation was done by liquid-liquid extraction and compounds separation was achieved by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID)

Results showed that it is possible to detect and quantified volatile phenols with the methodology proposed, including 4-ethylcatechol. 4-ethylphenol was the main compound found in commercial red wines.

Key-words: *Dekkera/Brettanomyces*, red wine, volatile, phenols, 4-ethylcatechol, method of extraction liquid – liquid, gas chromatography – GC-FID.

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

4-EF – 4-Etilfenol

4-EG – 4-Etilguaiacol

4-EC – 4-Etilcatecol

4-VF – 4-Vinilfenol

4-VG – 4-Vinilguaiacol

4-VC – 4-Vinilcatecol

SBSE – extracção sorptiva com barra de agitação (*stir bar sorptive extraction*)

PDMS – polidimetilsiloxano

ELL – extracção líquido-líquido

GC – cromatografia em fase gasosa (*gas chromatography*)

FID – detector de chama (*flame ionization detector*)

LOD – limite de detecção (*limit of detection*)

LOQ – limite de quantificação (*limit of quantification*)

PI – padrão interno (3,4-dimetilfenol)

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
I – INTRODUÇÃO	1
1 - Características Organolépticas de um Vinho	1
2 – Aroma	4
a) Aroma Varietal.....	5
b) Aroma Pré – Fermentativo	6
c) Aroma Fermentativo	6
d) Aroma Pós – Fermentativo	7
3 - Modulação do Aroma do Vinho por Acção de Leveduras	7
4 - <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	9
4.1 Características Morfológicas do Género <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	10
4.1.1 <i>Dekkera</i>	10
4.1.2 <i>Brettanomyces</i>	11
4.2 Espécies do Género <i>Dekkera</i> e <i>Brettanomyces</i>	12

5 – Precursores dos Fenóis Voláteis	14
5.1 Ácidos Hidroxicinâmicos	14
5.2 Conversão dos Ácidos Hidroxicinâmicos em Fenóis Voláteis	15
6 – Fenóis Voláteis	19
6.1 Estrutura Química	20
6.2 Influência dos Fenóis Voláteis no Aroma do Vinho	20
6.3 Factores Responsáveis pela Formação de Fenóis Voláteis	23
7 – Controlo das <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	28
7.1 Factores de Controlo de <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	28
1) Dióxido de Enxofre (SO₂)	28
2) Outros Aditivos	29
3) Clarificação	30
4) Filtração	30
5) Métodos Alternativos	31
7.2 Medidas de Controlo para os Fenóis Voláteis	32
II – PARTE EXPERIMENTAL	34
1 - Reagentes e Padrões	34
2 – Instrumentos Analíticos	35
3 – Método Cromatográfico.....	35
4 – Procedimento Experimental	36
4.1 Análise Qualitativa e Quantitativa dos Fenóis Voláteis em Meio Sintético	36
4.2 Preparação das Amostras para Elaboração das Rectas de Calibração	38
4.3 Extracção e Separação dos Fenóis Voláteis em Vinho Sintético	39
4.3.1 Preparação de Vinho Sintético Dopado com Fenóis Voláteis	39
4.3.2 Extracção por SBSE de Vinho Sintético Dopado com Fenóis Voláteis.....	39

4.3.3	Extracção por ELL de Vinho Sintético Dopado com Fenóis Voláteis.....	40
4.4	Análise dos Fenóis Voláteis Presentes em Amostras de Vinhos Tintos Comerciais Naturalmente Contaminados	40
III	– RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
1	– Optimização da Separação Cromatográfica de Fenóis Voláteis	41
2	– Cálculo dos Índices de Retenção Lineares	41
3	– Análise Qualitativa dos Fenóis Voláteis em Amostras de Vinho Tinto	43
4	– Métodos de Preparação de Amostra para Extracção de Fenóis Voláteis	45
4.1	Tentativas de Aplicação do Método de SBSE.....	45
4.2	Avaliação da Eficiência da ELL	46
4.2.1	Taxas de Recuperação do Método de Preparação de Amostra por ELL.....	46
5	– Análise Quantitativa de Fenóis Voláteis em Vinhos Tintos	46
5.1	Rectas de Calibração e Cálculo de LOD e LOQ	46
5.2	Quantificação de Fenóis Voláteis em Vinhos Comerciais.....	48
IV	– CONCLUSÃO	50
V	– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
VI	– ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Factores que influenciam a qualidade dos vinhos.....	1
Figura 2 – Revisão generalizada dos diferentes processos de vinificação de vinhos tintos e brancos	2
Figura 3 – Alguns descritores que podem caracterizar o aroma de um vinho.....	4
Figura 4 – Relação das diferentes etapas de vinificação com o tipo de aromas	5
Figura 5 – Formação do 4-etilfenol pela espécie <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	9
Figura 6 - Células alongadas e esferoidais de <i>Dekkera bruxellensis</i>	11
Figura 7 – Imagem de uma estirpe de <i>Brettanomyces</i> por microscópio óptico (ampliação: 1000×)	11
Figura 8 – Compostos gerados pelo metabolismo dos géneros <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	14
Figura 9 – Estrutura química dos ácidos cinâmicos	15
Figura 10 – Conversão dos ácidos hidroxicinâmicos em vinilfenóis e etilfenóis.....	15
Figura 11 – Estrutura química dos fenóis voláteis	20
Figura 12 – Diferentes percepções aromáticas dos consumidores em relação a um vinho contaminado com fenóis voláteis	22
Figura 13 – Produção de 4-etilfenol pela levedura <i>Dekkera bruxellensis</i> com 2% de glucose, 100 mg/L de ácido <i>p</i> -cumárico e concentrações crescentes de etanol (% v/v).....	24
Figura 14 – Exemplo das diferenças de concentração ($\mu\text{g/L}$) de um vinho tinto durante o seu envelhecimento em barricas durante o Verão.....	25
Figura 15 – Evolução da concentração ($\mu\text{g/L}$) de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol durante o envelhecimento de vinhos em barricas de carvalho americano.....	25
Figura 16 - Representação esquemática do processo extractivo dos fenóis voláteis.....	38
Figura 17 – Cromatograma, em GC-FID, de vinho sintético, com os fenóis voláteis.....	41
Figura 18 – Cromatograma em GC-FID de um vinho tinto comercial.....	43
Figura 19 – Cromatograma, em GC-FID, de um vinho tinto comercial, com adição dos fenóis voláteis.	44
Figura 20 – Cromatograma, em GC-FID, de um vinho tinto comercial.....	45
Figura 21 – Representação gráfica da recta de calibração para o 4-vinilguaiacol.....	61

Figura 22 – Representação gráfica da recta de calibração para o 4-etilfenol. 61

Figura 23 – Representação gráfica da recta de calibração para o 4-etilguaiacol..... 62

Figura 24 – Representação gráfica da recta de calibração para o 4-etilcatecol..... 62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes espécies de <i>Dekkera</i> definidas por diferentes autores e diferentes métodos.....	12
Tabela 2 – Diferentes espécies de <i>Brettanomyces</i> definidas por diferentes autores e diferentes métodos.....	12
Tabela 3 – Actividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela formação de fenóis voláteis.....	17
Tabela 4 – Variação da concentração dos ácidos hidroxicinâmicos - ácido caféico e ácido <i>p</i> - cumárico (mg/L).....	18
Tabela 5 – Concentração de etilfenol e vinilfenol nos diferentes tipos de vinhos (µg/L).....	19
Tabela 6 - Valores dos limiares do aroma de cada fenol volátil no vinho.....	23
Tabela 7 - Concentrações (µg/L) de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol encontrados de vinhos em envelhecimento em barricas de madeira por diferentes autores	26
Tabela 8 – Resumo dos diferentes tratamentos de controlo de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> e fenóis voláteis, nos vinhos.....	33
Tabela 9 - Programa de temperatura utilizado na análise por GC-FID dos fenóis voláteis.....	35
Tabela 10 – Composição química da solução modelo	36
Tabela 11 - Concentrações (mg/L) de 4-EF, 4-EG, 4-EC, 4-VG e 4-VF nos diferentes padrões	37
Tabela 12 – Índices de retenção lineares determinados para coluna RTW-Wax.	42
Tabela 13 – Resultados dos cálculos das taxas de recuperação.....	46
Tabela 14 – Parâmetros obtidos através das rectas de calibração dos fenóis voláteis....	47
Tabela 15 – Concentração dos etilfenóis em quatro vinhos tintos comerciais naturalmente contaminados.....	48

I. INTRODUÇÃO

1. Características Organolépticas de um Vinho

É reconhecida e comprovada a interação entre o agro-ecossistema vitícola e a qualidade dos vinhos. O clima, o solo e a casta (figura 1) constituem os factores naturais que determinam a tipicidade e qualidade dos vinhos produzidos numa região vitícola. As técnicas culturais utilizadas pelos vitivinicultores visam harmonizar estes factores de forma a optimizá-los numa perspectiva de obtenção de um produto final aos mais baixos custos de produção e com a mais elevada tipicidade e qualidade, proporcionando ao vinho melhores características organolépticas.

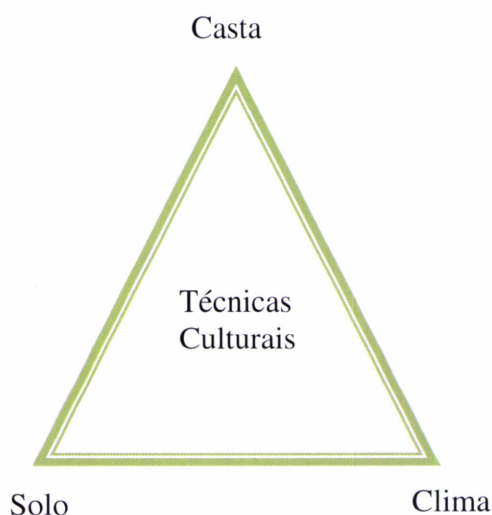


Figura 1 – Factores que influenciam a qualidade dos vinhos.
(Adaptado Fregoni, 1985)

Os processos de vinificação (figura 2) são outros factores muito importantes para a qualidade de um vinho, e por sua vez, para as características organolépticas. Esta fase é de extrema importância para o vinicultor, pois o trabalho feito pela viticultura, obtendo uvas de boa qualidade, pode ser prejudicado pela má condução dos processos enológicos.



Figura 2 – Revisão generalizada dos diferentes processos de vinificação de vinhos tintos e brancos (Adaptado Bartowsky *et al.*, 2009)

Para o consumidor, os requisitos da qualidade estão associados às características sensoriais intrínsecas do vinho, isto é, com o modo como o vinho agrada com a sua aparência, olfacto e paladar, e com a sua imagem, que deriva de muitos aspectos tais como o rótulo, os prémios atribuídos e o custo. Assim, um vinho com atributos sensoriais reconhecidos e uma boa imagem a um preço competitivo será considerado de grande valor pelos consumidores (Francis *et al.*, 2005).

Por isso, o produtor tem cada vez mais o papel de satisfazer as exigências do consumidor, tentando obter vinhos aromáticos, com cores límpidas e sabor apreciável.

O conjunto das características organolépticas de um vinho é realizado pela apreciação da visão, paladar e olfacto (Peynaud 1981).

A **visão** é o sentido imediato, é o que caracteriza primeiro um vinho, pela sua cor, limpidez e transparência.

O contacto do vinho com a boca, ou **paladar**, é importante pois dele resultam as impressões da temperatura, da consistência, da viscosidade, da suavidade e do volume (corpo). São quatro os sabores básicos recebidos pelas papilas gustativas: o doce, o ácido, o salgado e o amargo (Peynaud, 1981). Não existe sensibilidade específica para estes sabores, mas existem regiões específicas da língua onde se apreciam cada um destes sabores. O sabor doce é sobretudo perceptível na ponta da língua, o sabor ácido na parte inferior e lateral, o gosto salgado é sentido nos bordos e o gosto amargo é apenas perceptível na parte de trás da língua. Numa zona que é apenas atingida quando se engole (Peynaud, 1981).

O vinho possui os quatro sabores básicos, sendo o gosto doce provido do álcool e eventualmente pelo seu teor de açúcar; o gosto ácido pelos ácidos orgânicos; o gosto salgado pelos sais e o gosto amargo pelos compostos fenólicos, como os taninos (Peynaud, 1981).

O **olfacto** é um sentido que nos leva a um registo de uma imensidão de aromas, caracterizando o vinho pela sua intensidade, evolução e carácter. O aroma de um vinho descreve-se como a interacção do sabor e odor que cada indivíduo caracteriza como uma experiência agradável ou não. Os aromas são compostos voláteis, que são perceptíveis através dos receptores de odor do órgão olfactivo. O aroma tem a sua parte físico-química, mas o que realmente é importante quando se consome o produto é o efeito que exerce no consumidor (figura 3) (Fernández, 2004).

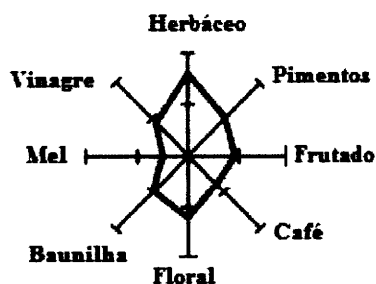


Figura 3 – Alguns descritores que podem caracterizar o aroma de um vinho.
(Adaptado de Swiegers *et al.*, 2005)

2. Aroma

O aroma de um vinho é de uma enorme complexidade devido à grande quantidade de compostos que o compõem. Este aroma é o produto terminal de uma longa sequência biológica, bioquímica e tecnológica e não apenas o produto da fermentação da uva (Cordonnier e Bayonove, 1978). Cada composto apresenta o seu próprio limite de percepção olfactivo que, por sua vez, é condicionado pelo conjunto dos outros compostos presentes no vinho (Patão, 2007).

É difícil determinar a influência sensorial individual de cada composto, uma vez que os compostos interagem entre si, dando origem às características organolépticas do vinho. O aroma das uvas, do mosto e do vinho a que dá origem, são completamente distintos e com a evolução deste mesmo vinho o aroma continua a sofrer alterações, diferenciando-se dos aromas iniciais. Certos compostos voláteis desaparecem, outros ficam inalterados e observa-se a formação de alguns compostos pelas leveduras, através de diferentes mecanismos (metabólicos ou hidrólise enzimática) (Fernández, 2004).

O aroma de um vinho pode ser classificado consoante a origem dos compostos que o constituem (figura 4): **Aroma Varietal** – devido aos compostos existentes na uva; **Aroma Pré-Fermentativo** – resultante da vindima, transporte, prensagem, maceração e clarificação; **Aroma Fermentativo** – compostos resultantes das fermentações e; **Aroma Pós-Fermentativo** – que resultam das transformações ocorridas durante a conservação e envelhecimento (Araújo, 2004).

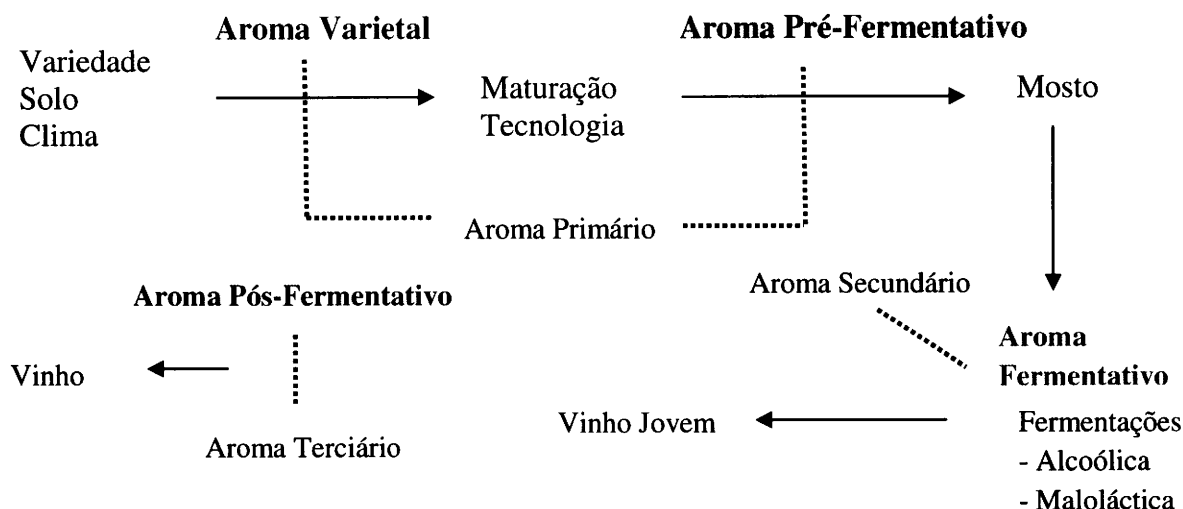


Figura 4 – Relação das diferentes etapas de vinificação com o tipo de aromas.
(Araújo, 2004)

O aroma varietal e pré-fermentativo são também conhecidos por aroma primário, o aroma fermentativo por secundário e o pós-fermentativo por aroma terciário, segundo designação proposta por Lepe (1995) e Peynaud *et al* (1997).

a) Aroma Varietal

O aroma varietal é característico da variedade da uva e depende essencialmente do solo, do clima, da fitotecnia, do estado sanitário e do grau de maturação (Patão, 2007).

Podem distinguir-se dois tipos de substâncias específicas de variedade de uva: as substâncias odorantes que passam para o vinho sem transformações e que transmitem a sua tipicidade e as substâncias odoríferas susceptíveis de revelar um aroma típico durante a fermentação e a conservação. Esta distinção é importante pois introduz a noção de precursor de aroma (Cordonnier e Bayonove, 1978), a qual justifica o facto de castas neutras poderem dar origem a vinhos mais aromáticos, com características particulares, indissociáveis da variedade (Bayonove *et al.*, 1998; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

a) Aroma Pré-fermentativo

Os aromas de origem pré-fermentativa formam-se desde a colheita das uvas até ao início da fermentação alcoólica no decorrer das operações de recolha, transporte, desengace, prensagem e maceração das uvas (Araújo, 2004).

Os efeitos mecânicos destes tratamentos vão permitir, ao dilacerar os bagos, que os sistemas enzimáticos entrem em contacto com os substratos existentes, promovendo a formação de alguns compostos aromáticos. Por outro lado, estes processos têm como consequência a incorporação de oxigénio no meio, fornecendo o segundo substrato implicado nas reacções de oxidação enzimática (Bayonove *et al.*, 1998).

b) Aroma Fermentativo

A etapa fermentativa é o processo fundamental de conversão do mosto de uva em vinho e engloba duas importantes transformações biológicas: a fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica.

Na primeira, comum a todos os vinhos, há produção pelas leveduras de etanol e de numerosos produtos secundários a partir dos açúcares do mosto. As leveduras mais comuns são as espécies do género *Saccharomyces*, sendo uma das mais importantes a *Saccharomyces cerevisiae*. Estas fornecem as enzimas necessárias para o processo de transformação dos açúcares (principalmente sacarose, glucose e frutose) em etanol (Patão, 2007). Este tem um papel fundamental na percepção olfactiva, quer pela participação directa no odor, quer pela influência que exerce sobre os outros constituintes do aroma ao fazer diminuir a polaridade do meio (Araújo, 2004).

É durante esta etapa fermentativa que se forma a maioria dos constituintes característicos do aroma fermentativo, tais como álcoois, ácidos gordos voláteis e respectivos ésteres, compostos carbonilados, sulfurados e azotados, lactonas e fenóis voláteis (Bayonove *et al.*, 1998).

Na fermentação maloláctica, provocada por bactérias lácticas, principalmente *Oenococcus oeni* e várias espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus*, procura-se diminuir o teor de acidez do vinho por conversão do ácido málico em ácido láctico.

A fermentação maloláctica é um processo fermentativo secundário importante, normalmente adoptado só no caso dos vinhos tintos, pois para além da desacidificação

contribui para a complexidade do aroma dos vinhos e confere-lhes estabilidade microbiológica (Patão, 2007).

c) Aroma Pós-fermentativo

O aroma pós-fermentativo resulta das transformações ocorridas durante a conservação e envelhecimento do vinho, devidas a um conjunto de reacções físico-químicas de oxidação e de redução (Oliveira, 2000) entre compostos aromáticos e fenólicos, e de reacções de esterificação entre ácidos e álcoois, que se traduzem numa melhoria das características organolépticas dos vinhos e na transformação do aroma, o qual se denomina de “bouquet” (Fernández, 2004).

3. Modulação do Aroma do Vinho por Acção de Leveduras

Numerosos géneros e espécies de leveduras são encontrados durante a produção do vinho. O pH baixo, o conteúdo elevado de açúcares, as condições anaeróbias rapidamente geradas e a presença de inúmeros compostos, proporcionam um ambiente favorável ao crescimento de leveduras. A actividade metabólica das leveduras pode ter um elevado impacto na composição do vinho, e consequentemente no seu aroma e sabor (Fleet, 2003; Gil *et al.*, 1996; Lema *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 2003). Na realidade, alguns tipos de vinho dependem dos metabolitos de leveduras específicas, uma vez que estes conferem ao vinho uma composição química característica. As leveduras que têm impacto na composição do vinho podem ser provenientes das uvas, da flora indígena ou/e de vectores como os insectos (Fleet *et al.*, 2002). Os organismos encontrados no vinho também podem resultar directamente da utilização de preparações comerciais de leveduras (Boulton *et al.*, 1996).

Durante a fermentação alcoólica, as leveduras não só convertem os açúcares em etanol e dióxido de carbono mas também produzem uma gama de metabolitos voláteis sensorialmente importantes e que conferem ao vinho o seu carácter vinoso (Etiévant, 1991; Romano *et al.*, 2003). Similarmente, durante a fermentação maloláctica, as bactérias não só providenciam a desacidificação, mas também contribuem para a intensificação do sabor e aroma do vinho (Henick-Kling, 1993; Bartowsky *et al.*, 2002).

Os vinhos produzidos a partir de variedades de uvas específicas revelam um carácter varietal, isto é, aromas diferentes que evocam essa variedade. Contudo, enquanto alguns compostos odoríferos voláteis provêm directamente dos componentes químicos das uvas, outros compostos são libertados e/ou modificados pela acção de leveduras e bactérias, sendo uma parte substancial das substâncias aromáticas resultante das actividades metabólicas destes microorganismos. Assim, as leveduras e, em menor extensão, as bactérias têm uma importância central no desenvolvimento do aroma do vinho (Williams *et al.*, 1989; Swiegers *et al.*, 2005).

As leveduras são predominantes durante o processo complexo da vinificação. Dos 100 géneros de leveduras, representados por mais de 700 espécies, 16 estão associados com a vinificação: *Brettanomyces* e a sua forma perfeita *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* e a sua forma assexuada *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (Pretorius *et al.*, 1999).

Nas fermentações espontâneas existe um crescimento progressivo padrão das leveduras indígenas: as leveduras dos géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida* predominam nos estágios iniciais, sendo gradualmente substituídas por diversas espécies de *Metschnikowia* e *Pichia* nos estágios intermédios, nos quais o etanol atinge um teor de 3 a 4 % (Fleet *et al.*, 1993). Os últimos estágios das fermentações naturais do vinho são dominados invariavelmente pelas estirpes *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes ao álcool. Outras leveduras, tais como as espécies de *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces*, podem também estar presentes durante a fermentação e algumas podem afectar adversamente a qualidade sensorial do vinho.

Entre todas as possíveis contaminações microbianas, as leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* são as mais temidas pelos vinicultores. De facto, estas leveduras podem desempenhar um papel importante e negativo na evolução aromática do vinho (Chatonnet *et al.*, 1992; Loureiro *et al.*, 2003).

Estas leveduras podem ser encontradas na fermentação do mosto e no vinho. Normalmente desenvolvem-se depois das fermentações alcoólica e maloláctica durante o envelhecimento em cubas, barricas e garrafas (Fariña, 2007).

Os produtos metabólicos resultantes da contaminação pelas leveduras *Brettanomyces/Dekkera* são fenóis voláteis, que incluem o 4-vinilfenol (4-VF), o 4-

vinilguaicol (4-VG), o 4-etilfenol (4-EF), o 4-etilguaiaicol (4-EG) e o 4-etilcatecol (4-EC).

Os vinilfenóis são igualmente formados durante a fermentação alcoólica pelas leveduras *S. cerevisiae*, mas as leveduras *Brettanomyces/Dekkera* têm a capacidade de transformar os vinilfenóis em etilfenóis. Os etilfenóis fornecem ao vinho aromas desagradáveis com elevadas consequências económicas aos vinhos. O composto mais prejudicial, quando presente, é o 4-EF, cujo precursor é o ácido *p*-cumárico (figura 5).

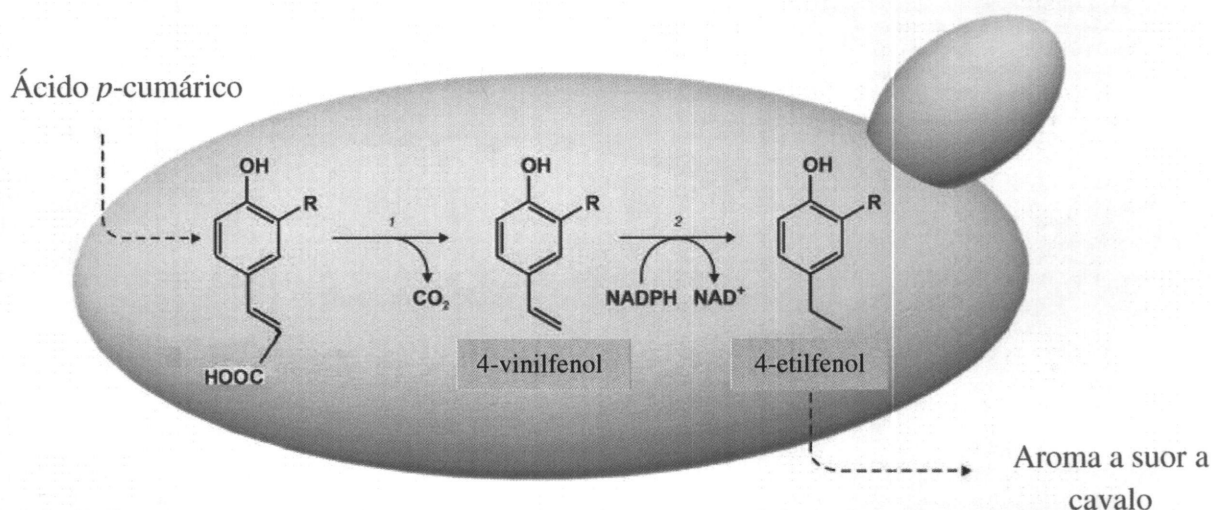


Figura 5 – Formação do 4-etilfenol pela espécie *Brettanomyces bruxellensis* (Adaptado Bartowsky, E. J. *et al.*, 2009)

4. *Dekkera/ Brettanomyces*

As leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera* são descritas na literatura como parte da microflora de muitos produtos fermentados como o vinho, a cerveja, a cidra, (Greenwalt *et al.*, 2000; Martens *et al.*, 1997; Morrissey *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Teoh *et al.*, 2004; Wyder *et al.*, 1997), os lacticínios (Cosentino *et al.*, 2001), o azeite (Coton *et al.*, 2006) e refrigerantes (Kofschoten e Yarrow, 1970).

As *Brettanomyces* e *Dekkera* podem-se desenvolver durante o envelhecimento de vinho tintos (Froudiere e Larue, 1988) mesmo depois do engarrafamento. Raramente se encontram estas leveduras durante a fermentação alcoólica do mosto (Wright e Parle, 1973). Alguns estudos indicam a presença anormal de *Brettanomyces* em bagos de uvas e em armazéns de vinho (Penyaud e Domercq, 1956) e mais comum em cubas, bombas e em equipamentos que são difíceis de esterilizar (Fugelsang, 1998).

A deterioração atribuída às *D.bruxellensis* no vinho inclui a produção de sedimentos ou formação de “névoa” (van der Walt e van Kerken, 1958), a formação de odores desagradáveis (Grbin e Henschke, 2000; Snowdon *et al.*, 2006), de ácido acético e acetato de etilo (Scheffers, 1961; Freer *et al.*, 2003), de ácidos gordos voláteis (Spaepen e Verachtert, 1982; Fugelsang *et al.*, 1993) e a produção de fenóis voláteis (Chatonnet *et al.*, 1992).

As leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* são microrganismos responsáveis por aromas desagradáveis em alguns vinhos tintos. Estas leveduras têm capacidade de produzir o 4-EF e o 4-EG a partir dos ácidos hidroxicinâmicos (ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico). Mais recentemente, a literatura referencia o 4-EC como sendo resultante de contaminações com estas espécies de leveduras (Ribéreau-Gayon, 2006).

Brettanomyces/Dekkera spp. foram desde sempre isoladas a partir de vinhos, predominantemente de vinhos tintos. Não é tão frequente isolar estas leveduras a partir de vinhos brancos (Licker *et al.*, 1998; Dias *et al.*, 2003b), sendo a perda de viabilidade e as pequenas quantidades de etilfenóis nestes vinhos atribuídas à eficiência do dióxido de enxofre em condições de pH baixo para eliminar estas espécies (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006).

4.1 Características Morfológicas do Género *Dekkera/Brettanomyces*

4.1.1 *Dekkera*

Este género apresenta, ao microscópio, células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais. Podem também ser cilíndricas ou alongadas (figura 6). A reprodução vegetativa ocorre por gemiparidade e exhibe pseudomicélio. Na reprodução sexuada os ascos são evanescentes e possuem um a quatro ascosporos que apresentam um formato de chapéu ou esférico com uma borda tangencial. Como características gerais podem ser enumeradas o seu lento crescimento, a curta duração de vida em placas, o aroma característico, a forte produção de ácido acético a partir de glucose, o estímulo da fermentação pelo oxigénio molecular e a exigência de uma fonte externa de vitaminas (www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc041.pdf).

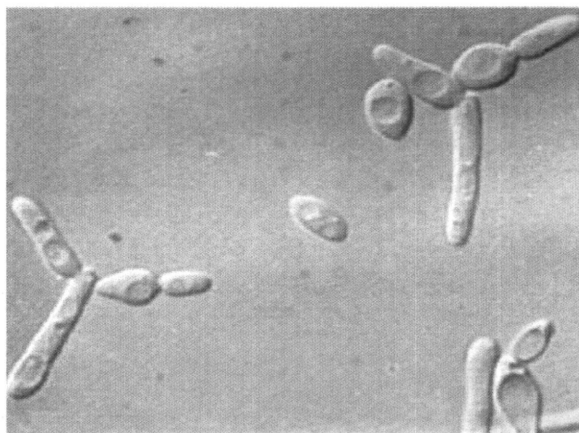


Figura 6 - Células alongadas e esferoidais de *Dekkera bruxellensis* (Barnett *et al.*, 1990).

4.1.2 Brettanomyces

O género *Brettanomyces* não forma ascos, ou seja, trata-se da forma imperfeita do género *Dekkera*. Como tal, não possui fase sexuada e, portanto, não forma ascosporos. A sua reprodução ocorre pelo processo de gemiparidade. Pode formar pseudomicélio e micélio ramificado dando uma visão unicelular por não apresentar septos nem invaginações.

As células apresentam-se de forma esferoidal, subglobosas a elipsoidais, ogivais, cilíndricas e alongadas (figura 7) e, à semelhança das do género *Dekkera*, também possuem, em geral, um crescimento lento e um tempo de vida curto. As restantes características são as mesmas definidas anteriormente para o género *Dekkera* (www.cnpvembrapa.br/publica/documentos/doc041.pdf).

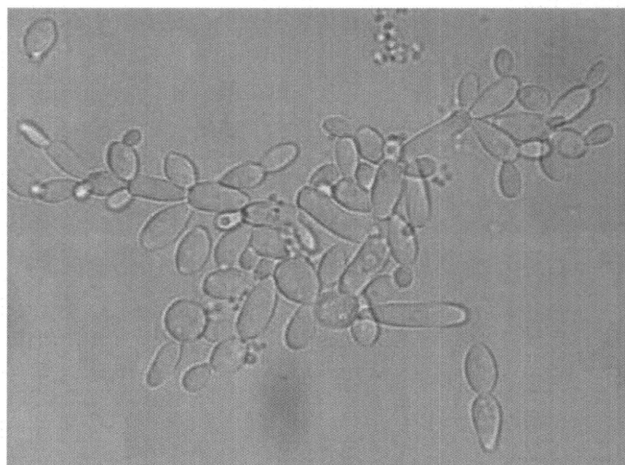


Figura 7 – Imagem de uma estirpe de *Brettanomyces* por microscópio óptico (ampliação: 1000×) (Suárez *et al.*, 2007)

4.2 Espécies do Género *Dekkera* e *Brettanomyces*

Como podemos ver na tabela 1 e 2, as espécies destes géneros não são definidas de forma consensual.

Tabela 1 – Diferentes espécies de *Dekkera* definidas por diferentes autores e diferentes métodos (www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc041.pdf).

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

Tabela 2 – Diferentes espécies de *Brettanomyces* definidas por diferentes autores e diferentes métodos (www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc041.pdf).

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

A taxonomia do género *Brettanomyces* tem sofrido inúmeras reclassificações ao longo dos anos, a partir das espécies que foram inicialmente identificadas. Actualmente o conjunto de cinco espécies pertencentes aos géneros *Brettanomyces* e *Dekkera* são: *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces nanus*, *B. anomalus* e *B. bruxellensis* (Kurtzman e Fell, 2000; Cocolin *et al.*, 2004). As espécies telemorfos (forma perfeita) são conhecidas pelas últimas duas espécies, *Dekkera anomalus* e *Dekkera bruxellensis*, respectivamente (Kurtzman e Fell, 2000). Das cinco espécies actualmente conhecidas, especialmente as espécies *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*), estão associadas com o vinho (Egli e Henick-Kling, 2001; Stender *et al.*, 2001; Cocolin *et al.*, 2004), embora o isolamento de *B. anomalus* (*Dekkera anomalus*) e *Brettanomyces custersianus* no vinho tenha sido descrito em dois casos (Querol *et al.*, 1990; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001). Dias *et al.* (2003a) refere que poucas investigações têm incidido nas espécies de *Brettanomyces*, mas que estas não têm nenhum papel fundamental na contaminação de vinhos e que nenhuma espécie deste género foi encontrada a produzir mais do que 1 mg/L de 4-EF.

Com os avanços em métodos baseados em ADN, as recentes investigações relacionadas com o vinho incluem *D. anomala* com a espécie predominante *D. bruxellensis*, uma vez que os métodos convencionais mostraram dificuldade em diferenciar estas duas espécies (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006). Embora as classificações taxonómicas actuais sugiram que o género *Dekkera* deve ser usado em referência com a espécie *bruxellensis* e *anomala* (Boekhout *et al.*, 1994), existem muitas discrepâncias e alguns autores preferem utilizar frequentemente a nomenclatura tecnicamente incorrecta de *B. bruxellensis* e *B. anomalus* quando se referem às leveduras *Dekkera* num contexto sobre vinhos. Isto é atribuído ao facto de que a forma sexual ou esporulada, ainda não foi encontrada no vinho.

Alguns autores defendem que a separação de *Brettanomyces* e *Dekkera* não tem sentido, porque as actuais técnicas moleculares de ADN não revelam distinção entre a forma anamorfa e telemorfa (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006). Este facto pode explicar a razão pela qual é comum depararmo-nos com o uso de “*Brettanomyces/Dekkera* spp”, em pesquisas bibliográficas sobre vinhos.

Apesar destas controvérsias, as leveduras da espécie *Dekkera bruxellensis*, ou a sua anamorfa *Brettanomyces bruxellensis*, são responsáveis por sérias perdas económicas na indústria do vinho devido à sua capacidade de contaminar os vinhos através da produção de etilfenóis (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006). Estes compostos

aromáticos são produzidos por estas leveduras em quantidades significativas (Chatonnet *et al.*, 1992). Para além destes, os géneros *Brettanomyces* e *Dekkera* produzem uma larga variedade de outros compostos voláteis com repercussões olfactivas significativas (Suárez *et al.*, 2007) (figura 8).

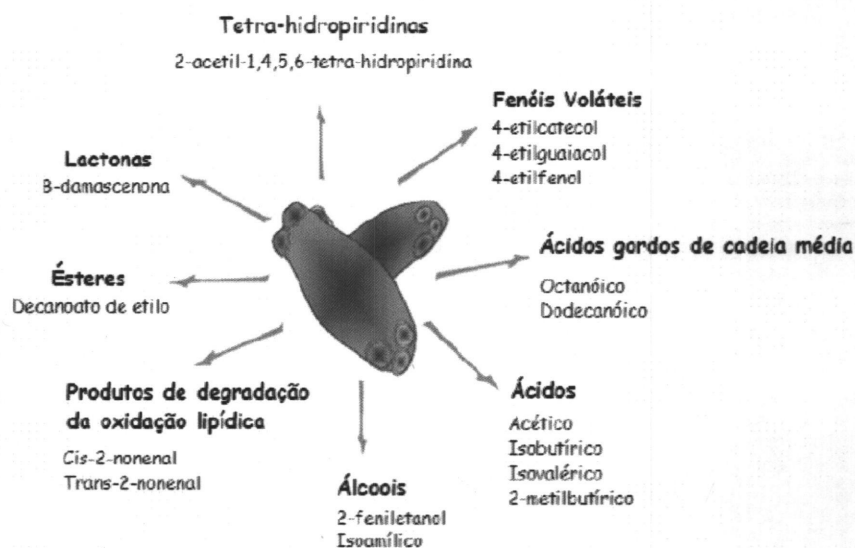


Figura 8 – Compostos produzidos pelo metabolismo de leveduras dos géneros *Brettanomyces/Dekkera*. (Adaptado de Suárez, R. *et al.*, 2007)

5. Precusores dos Fenóis Voláteis

5.1 Ácidos Hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos, que se encontram nos vacúolos das células das películas e polpas (Ribéreau-Gayon, 1965) sob a forma de ésteres tartáricos, libertam-se para o mosto durante o esmagamento das uvas (Harris *et al.*, 2008). Usualmente estes compostos encontram-se individualmente em concentrações baixas, mas colectivamente têm um papel importante no aroma e gosto do vinho (Allen, 1994), estando implicados no aparecimento de fenóis voláteis, com as consequentes alterações aromáticas dos vinhos.

Na figura 9 encontram-se representados os ácidos cinâmicos mais importantes, o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico.

A descarboxilação sequencial dos ácidos (*p*-cumárico, ferrúlico e cafeíco) e redução dos vinis (fenol e guaiacol) a etis (fenol, guaiacol e catecol), pelas leveduras do vinho, foram demonstradas em *D. bruxellensis* e *P. guilliermondii* (Barata *et al.*, 2006). Dias *et al.* (2003b) e Martorell *et al.* (2006) verificaram que *P. guilliermondii* produz níveis altos de etilfenóis em meio sintético. No entanto, não consegue fazê-lo em vinhos (Barata *et al.*, 2006). Estas leveduras também podem converter 4-VF em 4-EF na ausência dos ácidos hidroxicinâmicos.

A produção de 4-EF, nos vinhos, depende do crescimento das populações de leveduras. Como *P. guilliermondii* não se desenvolve nos vinhos com teores médios de 12% de etanol, não é provável que produza quantidades significativas de 4-EF durante a maturação do vinho (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2009). Em relação a *D. bruxellensis* não se desenvolve em vinhos brancos, explicando assim a ausência de defeitos fenólicos neste tipo de vinhos (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2001).

As leveduras da espécie *Dekkera bruxellensis* apresentam capacidade cinamato descarboxilase e vinilfenol redutase sob condições enológicas sendo esta a espécie considerada uma levedura indesejável capaz de produzir elevadas concentrações de 4-EF (Suárez *et al.*, 2007).

Inicialmente, a presença de etilfenóis no vinho foi atribuído a bactérias lácticas. De facto, estas são capazes de produzir quantidades significativas de vinilfenóis em meio sintético, mas em condições enológicas estas bactérias apenas produzem pequenas quantidades destes compostos (Suárez *et al.*, 2007).

Outras leveduras presentes no vinho, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* spp., *Torulaspota* spp. e *Zygosaccharomyces* spp. são capazes de produzir 4-VF, mas não o reduzem a 4-EF (Dias *et al.*, 2003a). Durante a fermentação, *S. cerevisiae* poderá produzir derivados de vinilfenóis devido à presença de enzimas cinamato descarboxilase (Chatonnet *et al.*, 1992, 1993a), mas devido à presença dos polifenóis nos mostos tintos, as enzimas estão inactivas (Chatonnet *et al.*, 1992). Algumas espécies de leveduras que contaminam o mosto têm capacidade de formar vinilfenóis (Dias *et al.*, 2003a) mas a sua contribuição para o conteúdo de vinilfenóis nos vinhos só é relevante quando não são inibidas pela *S. cerevisiae* (Barata *et al.*, 2006).

Na tabela 3, podemos verificar os diferentes microrganismos relacionados com a produção de fenóis voláteis na indústria do vinho.

Tabela 3 – Actividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela formação de fenóis voláteis. (Adaptado de Malfeito-Ferreira, M. *et al*, 2009).

Espécies	Função	Actividade Metabólica
<i>Aspergillus niger</i> ^a	Moldes para produção de enzimas comerciais	Activa a cinamoil esterase libertando ácidos hidroxicinâmicos para o mosto.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^b	Levedura de fermentação	Activa a cinamato descarboxilase produzindo vinilfenóis em mosto branco fermentado.
<i>Dekkera bruxellensis</i> ^c	Levedura de contaminação	Activa a cinamato descarboxilase e vinilfenol redutase produzindo etilfenóis em meio sintético, mosto e vinho.
<i>Pichia guilliermondii</i> ^d	Levedura de contaminação	Activa a cinamato descarboxilase e vinilfenol redutase produzindo etilfenóis em meio sintético e mosto.
<i>C. albidus</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. wickerhamii</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>H. anomala</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>K. apiculata</i> , <i>K. thermotolerans</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>R. rubra</i> , <i>S. pombe</i> , <i>Z. bailii</i> ^e	Leveduras de contaminação	Activa a cinamato descarboxilase produzindo vinilfenóis em meio sintético e no mosto.
<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Pediococcus spp.</i> ^f	Bactérias lácticas de fermentação e contaminação	Activa a cinamato descarboxilase e vinilfenol redutase produzindo etilfenóis em meio sintético.
<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> ^g	Bactérias lácticas de fermentação	Activam a cinamoil esterase libertando ácidos hidroxicinâmicos livres no vinho tinto.
^{a,b} Dugelay <i>et al.</i> (1993) ^b Chatonnet <i>et al.</i> (1989); ^{b,d} Barata <i>et al.</i> (2006) ^{b,c,e} Shinohara <i>et al.</i> (2000); ^c Heresztyn (1986); Chatonnet <i>et al.</i> (1995); Rodrigues <i>et al.</i> (2001) ^{c,e} Dias <i>et al.</i> (2003a, 2003b) ^e Chatonnet <i>et al.</i> (1992); ^f Cavin <i>et al.</i> (1993); Couto <i>et al.</i> (2006) ^g Hernández <i>et al.</i> (2007); Cabrita <i>et al.</i> (2007)		

Embora o crescimento de *D. bruxellensis*, num meio com glucose seja mais lento do que o observado para outras leveduras, a taxa de conversão do ácido *p*-cumárico em 4-EF é dependente da fonte de carbono e energia existente, verificando-se taxas mais elevadas em presença de glucose e etanol (Dias *et al.*, 2003b). A conversão dos outros ácidos hidroxicinâmicos pelas leveduras ainda não foi profundamente estudada. A maioria dos estudos estão relacionados com o metabolismo do ácido *p*-cumárico, mas a conversão dos ácidos ferúlico e cafeíco podem não ser igualmente eficientes, como demonstrado em meio sintético, para *D. bruxellensis* (Heresztyn 1986a), *S. cerevisiae* (Chatonnet *et al.*, 1989) e *D. anomala* (Edlin *et al.*, 1995). Sabendo que o ácido cafeíco é mais abundante que o ácido *p*-cumárico nos vinhos, seria de esperar que 4-EC teria uma maior concentração que o 4-EF, mas os poucos resultados publicados não corroboram esta hipótese (tabela 4). *D. bruxellensis* embora utilizando o ácido cafeíco (Heresztyn, 1986a), não produz 4-EC com a mesma eficiência que produz 4-EF nos vinhos. Pois apesar da abundância do ácido cafeíco nos vinhos e da sua semelhança estrutural com a dos outros ácidos hidroxicinâmicos, as leveduras possuem maior afinidade para a conversão dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico nos etilfenóis correspondentes (Patão, 2007).

Tabela 4 – Variação da concentração dos ácidos hidroxicinâmicos - ácido cafeíco e ácido *p*-cumárico (mg/L). (Adaptado de Malfeito-Ferreira *et al.*, 2009).

Cafeíco	<i>p</i> - Cumárico	Observações
2.36-9.95	2.87-11.21	6 Vinhos tintos sem envelhecimento ^a
0-31.2	0-7.1	41 Vinhos tintos novos ^b
0.47	0.24	Vinho tinto antes FML ^c
6.90	2.31	Vinho tinto depois FML ^c

^a Pérez-Margariño, S. e González-San José, M. L. (2007)

^b Makris, D. P. *et al.* (2006)

^c Cabrita, M. J. *et al.* (2007)

6. Fenóis Voláteis

De entre os inúmeros compostos voláteis existentes nos vinhos, os fenóis voláteis aparecem em concentrações pequenas. No entanto, devido ao seu odor, têm grande influência nas características sensoriais do vinho. Distinguem-se duas formas de produção de fenóis voláteis, sendo uma a formação enzimática através dos precursores do vinho e outra através da migração de compostos da madeira para o vinho durante o envelhecimento em barricas. Entre os fenóis voláteis, o vinilfenol e etilfenol são os mais importantes. Provenientes da descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos, estes compostos são responsáveis pelos aromas desagradáveis do vinho (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2009).

Os vinhos brancos contêm quantidades variáveis de vinilfenóis e não contêm etilfenóis. Ao contrário dos vinhos tintos, que só contêm pequenas quantidades de vinilfenóis e tem concentrações variáveis de etilfenóis (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) (tabela 5).

Tabela 5 – Concentração de etilfenol e vinilfenol nos diferentes tipos de vinhos ($\mu\text{g/L}$)
(Adaptado Chatonnet, P. *et al.*, 1992, 1993b)

Fenóis Voláteis	Vinhos Brancos	Vinhos Rosés	Vinhos Tintos
4-vinilfenol			
Mínimo	73	3	0
Máximo	1150	215	111
4-vinilguaiacol			
Mínimo	15	4	0
Máximo	496	75	57
4-etilfenol			
Mínimo	0	0	1
Máximo	28	75	6047
4-etilguaiacol			
Mínimo	0	0	0
Máximo	7	15	1561

6.1 Estrutura química

A estrutura química dos fenóis voláteis é caracterizada por um anel fenol e um radical com diferentes elementos (figura 11). Os principais fenóis dos vinhos são 4-VF, 4-VG e 4-VC e as suas respectivas formas reduzidas 4-EF, 4-EG e 4-EC. Estas moléculas aparecem nos vinhos a diferentes concentrações, sendo os vinilfenóis associados aos vinhos brancos e o etilfenóis aos vinhos tintos (Malfeito - Ferreira *et al*, 2009).

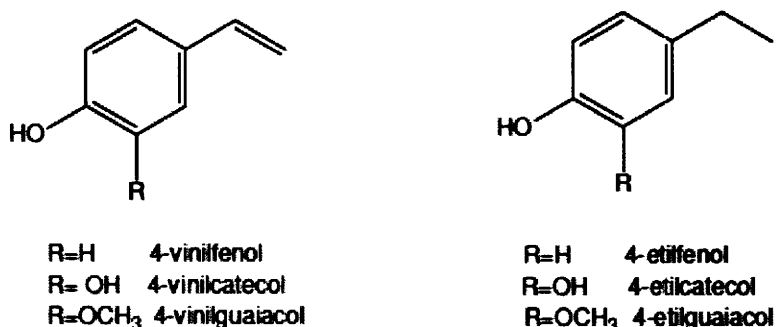


Figura 11 – Estrutura química dos fenóis voláteis (Adaptado de Patão, 2007).

6.2. Influência dos Fenóis Voláteis no Aroma do Vinho

O efeito sensorial de um composto volátil pode ser positivo ou negativo para o vinho, dependendo do seu aroma e concentração. Nos vinhos não é fácil definir um efeito benéfico ou prejudicial devido à mistura de odores de diferentes compostos que são perceptíveis de maneira diferente do que um único composto, existindo um efeito matriz na percepção. Além disso, a rejeição de um odor ocorre em maior concentração do que a detecção, o que conduz a diferentes limiares de percepção e detecção (Malfeito - Ferreira *et al*, 2009).

O limiar de percepção de compostos odoríferos é convencionalmente considerado a concentração mínima em que a sua presença numa solução modelo contendo álcool é detectável por 50% do painel de provadores. O limiar de reconhecimento de um composto odorífero corresponde ao seu limiar de percepção no vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Com limiares de percepção de 420 µg/L numa mistura em que a concentração de 4-VF é dez vezes superior ao 4-VG nos vinhos brancos e 720 µg/L numa mistura com

igual concentração de 4-EF e 4-EG nos vinhos tintos, estes compostos prejudicam facilmente o vinho (Malfeito - Ferreira *et al.*, 2009).

Os vinilfenóis e etilfenóis são responsáveis por certos defeitos do aroma no vinho. Os fenóis com aromas desagradáveis são o 4-VF e 4-EF. O 4-VG e 4-EG são muito menos desagradáveis, mas infelizmente estão sempre associados com o 4-VF e o 4-EF, respectivamente. O impacto no aroma dos dois vinilfenóis e dos dois etilfenóis devem ser considerados em conjunto, na proporção em que estão presentes no vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

As concentrações de 4-EF podem, em alguns casos, alcançar algumas mg/L, transmitindo ao vinho um cheiro a “estábulo”. Mesmo em pequenas concentrações, 600-700 µg/L, os etilfenóis alteram o aroma do vinho. O odor pode ser menos desagradável, mas de igual forma disfarça o frutado e o bouquet tirando o “carácter” ao vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). As sensações de boca são também alteradas pelo aumento de notas metálicas (Coulter *et al.*, 2004).

Concentrações elevadas de **4-etilfenol** no vinho tinto estão associadas com aromas desagradáveis descritas como “couro”, “suor a cavalo”, “estábulo”, “verniz” (Chatonnet, P. *et al.*, 1993b; Chatonnet, P. *et al.*, 1992; Rodrigues, N. *et al.*, 2001). O limiar de percepção deste composto é de 230 µg/L segundo Chatonnet *et al.* (1990) e Lopez *et al.*, (2002) atribui outro valor para o limiar de percepção deste composto, 440 µg/L. Pequenas concentrações de 4-EF podem ser apreciáveis em vinhos. Foram descritos (Licker *et al.*, 1999) vinhos contendo carácter *Brett* em que as concentrações de 4-EF variavam entre 3,0 e 0.68 mg/L.

O **4-etilguaiacol** afecta menos o aroma do vinho, mas está também relacionado com o “carácter Brett” de vinhos adulterados e está associado com expressões descritivas como “bacon” ou “fumado” e “especiarias” (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). O limiar de percepção deste composto é de 47 µg/L, segundo Chatonnet *et al.*, (1990) e 33 µg/L segundo Lopez *et al.*, (2002).

Recentemente tem vindo a ser estudado um composto que também origina aromas desagradáveis, o **4-etilcatecol**, que foi encontrado num vinho contaminado associado com *Brettanomyces* (Hesford *et al.*, 2004). Este composto resulta de uma reacção endógena, durante o processo de vinificação do vinho, em que o ácido cafeico é descarboxilado em 4-VC e subseqüente reduzido em 4-EC pelas *Brettanomyces anomalus* e *Brettanomyces bruxellensis* (Edlin *et al.*, 1995; Porret *et al.*, 2004). O 4-EC

tem vindo a ser descrito com aroma a cavalo, com limiar de percepção, no vinho, na ordem dos 50 µg/L (Hesford *et al.*, 2004).

O facto dos precursores do 4-EC, ácido cafeíco e os seus ésteres, estarem presentes em elevadas concentrações nos vinhos e o limiar de percepção do 4-EC (descrito como tendo um odor fenólico semelhante ao 4-EF) são de 50 µg/L (Porret *et al.*, 2004) faz com que a sua influência na contaminação fenólica não deva ser negligenciada. Eventuais discrepâncias entre detecção sensorial e a concentração de 4-EF e 4-EG podem ser explicados pelo facto do 4-EC estar presente.

A baixa concentração, o **4-vinilfenol** e o **4-vinilguaiacol**, podem ter inofensivas e desejáveis propriedades aromáticas, como por exemplo “picante” (Harris *et al.*, 2008), “cravo”, “madeira” e “doce” (Maga, 1978; Heresztyn, 1986; van Beek e Priest, 2000). Quando estão presentes a concentrações mais altas do que 725µ/L, o seu aroma e sabor são prejudiciais para a qualidade do vinho, e elevada quantidade de 4-VF está geralmente associado a “medicinal” e aromas fenólicos desagradáveis (Chatonnet *et al.*, 1993b).

Defeitos no aroma de um vinho atribuídos aos fenóis voláteis são relativamente comuns. Chatonnet *et al.*, (1993b) estudaram 100 vinhos (maioria franceses), de diferentes herdades e colheitas, que foram classificadas de acordo com o conteúdo em fenóis voláteis. Quase um terço dos vinhos analisados tinha concentrações de fenóis voláteis acima do limiar de percepção.

Na figura 12, encontra-se alguns descritores, utilizados pelos consumidores, na identificação dos fenóis voláteis de um vinho contaminado.

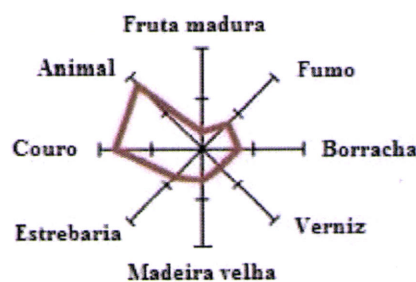


Figura 12 – Diferentes percepções aromáticas dos consumidores em relação a um vinho contaminado com fenóis voláteis (Adaptado de Swiegers, J. H. *et al.*, 2005).

A presença do **4-vinilcatecol**, produto esperado da descarboxilação do ácido cafeíco, nos vinhos não tem sido até à data muito referida na literatura apesar da abundância do seu precursor (Larcher *et al.*, 2008).

As concentrações e os limiares de percepção dos fenóis voláteis (tabela 6), especialmente os etilfenóis variam substancialmente e a percepção de cada aroma é fortemente influenciada pelo tipo de vinho, tipo de casta e das habilidades perceptivas do consumidor (Oelofse *et al.*, 2008) (figura 12).

Tabela 6 - Valores dos limiares do aroma de cada fenol volátil no vinho
(Adaptado Curtin *et al.*, 2005).

Composto	Concentração no vinho tinto (µg/L)	Limiar do aroma (µg/L)	Descritor do Aroma
4-vinilfenol	8.8-4.3	440*/600**	Medicinal
4-vinilguaiacol	0.2-15	33*/110**	Cravo
4-etilfenol	118-3696	30-60**	Suor a cavalo
4-etilguaiacol	1-432	20***	Pimenta, cravo
4-etilcatecol	27-427	10*	Medicinal, estábulo

*vinho modelo, **vinho tinto, ***água

6.3. Factores Responsáveis pela Formação de Fenóis Voláteis

A formação de fenóis voláteis no vinho depende da presença de precursores e da existência de *Brettanomyces/Dekkera* (Gerbeaux *et al.*, 2000).

Estas leveduras são resistentes às condições do vinho, tal como elevadas concentrações de etanol, ausência de oxigénio e pH ácido (Carrillo e Tena, 2006).

Gerbeaux *et al.*, (2000) também mostraram que diferentes estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* variam na sua capacidade de produzir fenóis voláteis, embora esta seja sempre maior quando a concentração de álcool é menor (a produção é maior a 12% v/v que a 14% v/v) e elevadas temperaturas (por exemplo, a produção é maior a 18°C que a 13°C). É atribuída pouca significância ao pH do vinho ou à presença de açúcares residuais. Em termos práticos, o vinho é considerado “seco” quando os açúcares residuais são inferiores a 5 g/L e esta quantidade de açúcar não foi uma

limitação para a elevada produção de 4-EF pelas *Dekkera bruxellensis*, como podemos observar na figura 13, com níveis crescentes de etanol (Dias *et al.*, 2003).

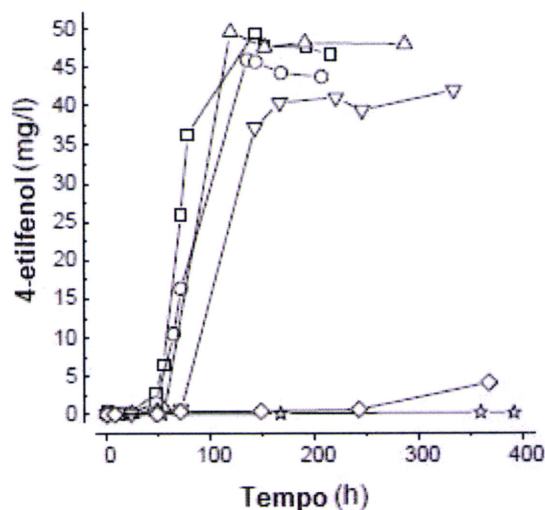


Figura 13 – Produção de 4-etilfenol pela levedura *Dekkera bruxellensis* com 2% de glicose, 100 mg/L de ácido *p*-cumárico e concentrações crescentes de etanol (% v/v): □ 4; ○ 6; ▲ 8; ▼ 10; ◇ 12 e ☆ 13 (Dias *et al.*, 2003).

A fermentação maloláctica e envelhecimento dos vinhos em barricas usadas têm, portanto, sido reconhecidos como a fase mais crítica da produção de vinho na contaminação de *Brettanomyces/Dekkera* (Chatonnet *et al.*, 1992, 1995; Fugelsang *et al.*, 1993; Licker *et al.*, 1998; Renouf *et al.*, 2006b; Suárez *et al.*, 2007). Durante a fermentação maloláctica as *Brettanomyces/Dekkera* encontram-se em condições de baixa concentração de dióxido de enxofre, baixa concentração de açúcar residual e autólise de leveduras com a libertação de nutrientes, podendo assim ocorrer competição microbiológica (Oelofse *et al.*, 2008). As barricas de madeira são particularmente conhecidas como um nicho ecológico, onde prejuízos microbiológicos podem ocorrer, principalmente por leveduras, tais como a *D. bruxellensis* (Swaffield e Scott, 1995; Laureano *et al.*, 2005). As principais características das barricas de carvalho (novas e antigas) que promovem o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* são a sua microestrutura porosa, o que permite a entrada de pequenas quantidades de oxigénio (Swaffield e Scott, 1995; Loureiro e Malfeito-Ferreira 2006) e a presença de celulose que serve como fonte de açúcar (Boulton *et al.*, 1996). Além disso, a falta de higiene

(barricas antigas) é favorável ao crescimento de *Brettanomyces/Dekkera*, promovendo a contaminação do vinho (Pollnitz *et al.*, 2000; Yap *et al.*, 2007).

Chatonnet *et al.*, (1993a) afirmou que os vinhos são mais susceptíveis à contaminação fenólica nos meses mais quentes.

A figura 14 mostra um exemplo do aumento da concentração dos etilfenóis de um vinho tinto em barrica durante os meses de Verão. Este fenómeno é promovido pelo aumento da temperatura na adega e pela diminuição do conteúdo em dióxido de enxofre durante este período (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

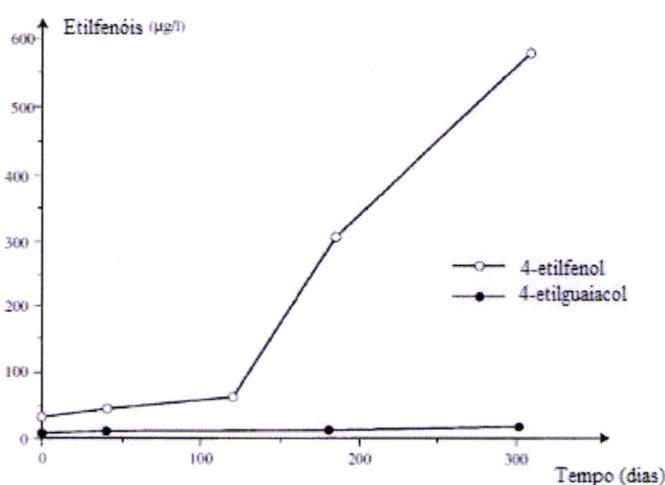


Figura 14 – Exemplo das diferenças de concentração ($\mu\text{g/L}$) em 4-EF e 4-EG num vinho tinto durante o seu envelhecimento em barricas durante o Verão (Adaptado Chatonnet *et al.*, 1992).

Num estudo feito por Garde - Cerdán *et al.* (2004), utilizando as castas Cabernet Sauvignon e Merlot, podemos verificar que as concentrações de 4-EF e 4-EG aumentam com o envelhecimento (figura 15).

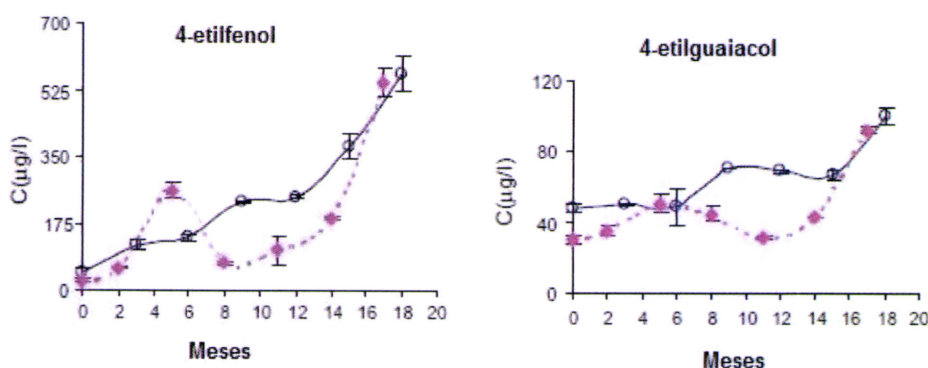


Figura 15 – Evolução da concentração ($\mu\text{g/L}$) de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol durante o envelhecimento de vinhos em barricas de carvalho americano (Garde - Cerdán *et al.* 2004).

A tabela 7 apresenta as concentrações de fenóis voláteis encontrados em vinhos a estagiar em barricas, por diferentes autores. Esta tabela mostra-nos que estes compostos foram formados em maior quantidade em vinhos armazenados em barricas e a sua concentração tende a aumentar durante o envelhecimento. No entanto, a concentração é mais baixa em vinhos armazenados em barricas novas (Garde-Cerdán e Ancín-Azpilicueta, 2006).

Tabela 7 – Concentrações ($\mu\text{g/L}$) de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol encontrados de vinhos em envelhecimento em barricas de madeira por diferentes autores.

	4-etilfenol ($\mu\text{g/L}$)	4-etilguaiacol ($\mu\text{g/L}$)
Vinho com as castas Tempranillo (41%) e Cabernet Sauvignon (59%) envelhecido em barricas de carvalho francês utilizadas cinco vezes durante 12 meses ^a	1657	293
Vinho com as castas Tempranillo (41%) e Cabernet Sauvignon (59%) envelhecido em barricas de carvalho americano utilizadas cinco vezes durante 12 meses ^a	1400	252
Vinho com as castas Tempranillo (60%) e Cabernet Sauvignon (20%) e Garnacha (20%) envelhecido em barricas de carvalho francês utilizadas duas vezes durante 18 meses ^b	1064	140
Cabernet Sauvignon envelhecido em barricas de carvalho americano utilizadas uma vez durante 18 meses ^c	568	101
Syrax envelhecido em barricas de carvalho americano utilizadas quatro vezes durante 8 meses ^d	555	31
Syrax envelhecido em barricas de carvalho americano utilizadas três vezes durante 8 meses ^d	514	24
Syrax envelhecido em barricas de carvalho americano utilizadas duas vezes durante 8 meses ^d	499	33
Monastrell envelhecido em barricas de carvalho americano utilizadas uma vez durante 9 meses ^e	~ 400	~ 75
Vinho com as castas Cabernet Sauvignon (60%) e Merlot (40%) envelhecido em barricas novas de carvalho americano durante 15 meses ^f	275	55
Monastrell envelhecido em barricas novas de carvalho francês durante 6 meses ^g	42,3	8,4
^a Garde-Cérdan, Rodríguez-Mozaz <i>et al.</i> (2002)		
^b Garde-Cérdan, Torrea Goñi <i>et al.</i> (2002)		
^c Garde-Cérdan <i>et al.</i> (2004)		
^d Pollnitz, Pardon, e Sefton (2000)		
^e Pérez-Prieto <i>et al.</i> (2003)		
^f Garde-Cérdan e Ancín-Azpilicueta (2006)		
^g Díaz-Plaza, Reyero, Pardo e Salinas (2002)		

As leveduras *Dekkera/Brettanomyces* já foram isoladas em cubas de aço inoxidável, provavelmente ocorrendo factores diferentes dos das barricas (Chatonnet *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 2001) e em vinhos engarrafados provavelmente devido a longos períodos de envelhecimento em barricas, concentrações de dióxido de enxofre baixas e filtração insuficiente antes do engarrafamento (Herezstyn 1986a; Arvik *et al.*, 2002).

Os etilfenóis são raramente formados durante o processo de fermentação alcoólica, mas, quando tal acontece, causa contaminações drásticas acompanhadas pela rápida produção de extensas quantidades de ácido acético. As causas deste tipo de problema ainda não são bem conhecidas, mas felizmente, são extremamente raras. No entanto, a insuficiência de dióxido de enxofre nas uvas dentro das cubas e a falta de higienização da adega proporcionam as condições ideais para a ocorrência deste tipo de contaminação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Em resumo, Yap *et al.* (2007) atribui a presença de *Brettanomyces/Dekkera*, em grande parte a:

- i. Elevado pH e açúcares residuais em alguns vinhos;
- ii. Diminuição do uso de filtração e SO₂;
- iii. Falta de higiene e limpeza nas adegas, tal como pouca higienização das barricas.
- iv. Utilização de barricas usadas.

7. Controlo das *Dekkera/Brettanomyces*

Como as leveduras *Brettanomyces/Dekkera* formam uma parte natural do processo de vinificação, não podem ser totalmente eliminadas. A contaminação causada por estas leveduras em certas condições é inevitável, favorecendo a sua proliferação. No entanto, existem algumas medidas preventivas que podem ser consideradas, embora as questões relacionadas com a contaminação microbiológica do vinho não sejam simplesmente resolvidas com factores individuais, mas exijam uma abordagem holística aproximada (Oelofse *et al.*, 2008).

Embora ainda existam conflitos na literatura sobre a origem das *Brettanomyces/Dekkera* spp., definitivamente a vinha pode desempenhar um papel importante, uma vez que as uvas de boa qualidade podem reduzir alguns dos principais riscos para a produção de compostos desagradáveis para o aroma do vinho (Loureiro e Malfeito - Ferreira 2006; Taillandier, 2007). Além disso as concentrações dos precursores, ácidos hidroxicinâmicos, directamente responsáveis pela formação de compostos fenólicos com aromas desagradáveis, podem depender da variedade e qualidade da uva (Phister e Mills 2003), e de diferentes tipos de maceração.

7.1. Factores de Controlo de *Dekkera/Brettanomyces*

1) Dióxido de Enxofre (SO₂)

O potencial antimicrobiano do SO₂ torna-o ideal para a conservação dos vinhos, nomeadamente a redução da instabilidade microbiológica (Romano e Suzzi 1992). Relativamente ao efeito de SO₂ sobre as leveduras *Dekkera bruxellensis*, estudos têm chegado a resultados incoerentes, não sendo consensual se esta espécie é considerada sensível ou resistente (Loureiro e Malfeito - Ferreira 2006). Alguns autores referem esta levedura como sendo sensível ao SO₂ livre em concentrações superiores a 30 mg/L (Chatonnet *et al.*, 1992; Gerbaux *et al.*, 2002), o que justifica a razão desta espécie ser isolada a partir de vinhos com pouca protecção em SO₂ (Heresztyn, 1986a). Outros observaram o crescimento da levedura acima de 30 mg/L (van der Walt e van Kerken, 1961; Froudière e Larue, 1988). Esta controvérsia, porém, não reside na forma livre de SO₂, mas sim na própria eficácia da sua forma molecular (Boulton *et al.*, 1996; Margalit, 1997; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), que é dependente de variações na

composição do vinho (pH, etanol, temperatura, teores de antocianinas e de nutrientes) (Smith, 1996 em Licker *et al.*, 1998). Por exemplo, a concentração molecular de SO₂ é dependente do pH, pois 30 mg/L de SO₂ livre pode libertar 0.4 mg/L de SO₂ molecular a pH 3.7, e 0.8 mg/L a pH 3.2 (Margalit, 1997). É recomendada uma concentração de SO₂ entre 0,5 e 0,8 mg/L para o controlo de *Brettanomyces/Dekkera* spp. (Henick-Kling *et al.*, 2000).

A eficácia do SO₂ molecular em estirpes de *Brettanomyces bruxellensis*, também tem sido associada com a disponibilidade de oxigénio (Du Toit *et al.*, 2005). Estes autores observaram que 0,25 mg/L de SO₂ molecular afecta drasticamente as estirpes, que no entanto quando expostas ao oxigénio permaneceram estáveis e o seu número aumentou. Isto é especialmente importante quando se realizam trasfegas em vinhos a envelhecer em barricas. As barricas podem reduzir os níveis de SO₂ ao longo de um período de quatro a seis meses de envelhecimento (Chatonnet *et al.*, 1993a) e, portanto, a gestão de SO₂ é crucial durante este tempo. As barricas novas conseguem absorver até 15 mg/L de SO₂ livre durante o mesmo período de tempo (Coulter, A. *et al.*, 2004).

2) Outros Aditivos

➤ Além do uso de SO₂, aditivos alternativos tal como o dimetil dicarbonato (DMDC), comercialmente conhecido como Velcorin® foram também investigados como inibidores do crescimento das leveduras *Brettanomyces/Dekkera* (Loureiro e Malfeito - Ferreira 2006; Suárez *et al.*, 2007). Verificou-se que DMDC poderia não inibir completamente o crescimento de *B. anomalus* com uma dose de 400 mg/L, mas 250 mg/L inibiu o crescimento de *B. bruxellensis* (Delfini *et al.*, 2002).

Um estudo recente descreveu a eficácia de DMDC para a prevenção de *B. bruxellensis* no vinho e avaliou a sua utilização durante as diferentes fases de vinificação (Renouf *et al.*, 2007). Os autores obtiveram resultados variáveis com as estirpes de *B. bruxellensis*, demonstrando resistência moderada com 150 mg/L em mosto e 250 mg/L em vinho, causando apenas uma inibição transitória durante a fermentação maloláctica. A eficácia de DMDC foi, contudo, dependente do conteúdo de etanol (Malfeito - Ferreira *et al.*, 2004). Verificou-se ainda que 200 mg/L de DMDC não elimina completamente as populações de *B. bruxellensis* na presença de borras (Renouf *et al.*, 2007). Por outro lado, nos vinhos acabados a população de *B. bruxellensis* diminui para menos de 100 UFC/mL.

Adições regulares até 200 mg/L (nível máximo permitido no vinho), pode ajudar a controlar o crescimento das *Brettanomyces* durante a maturação em barricas (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006), nos países em que é permitido o seu uso.

O efeito de DMDC não está directamente dependente do pH (Threlfall e Morris, 2002), e não produz odores ou sabores residuais (Ough, 1983).

➤ Alguns ácidos fracos, como o sórbico, benzóico e fumárico, também têm sido investigados para a utilização contra *Brettanomyces/Dekkera* spp., uma vez que possuem actividade antifúngica. No entanto a sua acção não é selectiva, portanto o seu uso não é autorizado na vinificação. Uma medida indirecta para evitar a formação de etilfenóis durante o envelhecimento é o uso de antioxidantes, tal como o ácido ascórbico (Suárez *et al.*, 2007).

3) Clarificação

Uma solução paliativa é a clarificação dos vinhos tintos antes da sua introdução nas barricas. Quantos mais agentes de clarificação forem utilizados, maior é a redução da população inicial destes microorganismos. Alguns agentes são mais eficazes do que outros. Contudo, este processo é por vezes rejeitado pelos vinicultores porque também reduz o aroma e a cor do vinho (Suárez *et al.*, 2007).

4) Filtração

A filtração pode também reduzir a quantidade de leveduras contaminantes, contudo este método coloca problemas similares aos da clarificação.

Além disso, para ser eficaz, devem ser usadas membranas com um tamanho de poros inferior a 0,45 µm (Calderón *et al.*, 2004), o que causa uma deterioração da estrutura coloidal do vinho e reduz a intensidade da sua cor. E devido à forma das *Brettanomyces*, estas podem ser capazes de passar por um filtro de 0,45 µm.

5) Métodos Alternativos

Foi demonstrado o que uso de um polissacárido derivado da quitina, que se denomina por quitosano, causa um efeito selectivo sobre o crescimento de *B. bruxellensis* (Gómez-Rivas *et al.*, 2004).

A aplicação de pressões de 400 – 500 MPa durante 5 a 15 minutos, à temperatura de 5-20 °C, pode reduzir as populações de *B. bruxellensis* (Puig *et al.*, 2003). A pasteurização do vinho usando pressões hidrostáticas tem demonstrado não causar modificações às propriedades físico-químicas e sensoriais do vinho (Mok *et al.*, 2006).

Couto *et al.* (2005b) verificaram que uma população de 10⁶ UFC/mL pode ser termicamente inactivada através de tratamentos com 37.5 °C durante 6 minutos e 41 °C durante 0,6 minutos. A preocupação com esta abordagem resulta do seu possível impacto sobre o aroma e sabor do vinho, principalmente se o tratamento não for cuidadosamente controlado.

Uma estratégia alternativa para preservação química envolve o uso de agentes antimicrobianos, como parte da biopreservação (Pretorius, 2000). O controlo biológico com agentes antimicrobianos, como as zimocinas, está actualmente a ser considerado. Contudo, no vinho estas técnicas não são muito eficazes sendo geralmente requeridos outros métodos de controlo (Toit e Pretorius, 2000).

A intensidade e temperatura de maceração e o uso de enzimas pectolíticas têm vindo a ser estudadas como possíveis factores condicionando a formação de fenóis voláteis pelas *Brettanomyces* e *Dekkera* a partir do ácido hidroxicinâmico proveniente da película das uvas (Gerbeaux *et al.*, 2002).

7.2. Medidas de Controlo para Reduzir os Teores em Fenóis Voláteis

Para além das metodologias que têm sido investigadas para controlar os aspectos da contaminação microbiológica das *Brettanomyces/Dekkera* spp., existem também algumas estratégias de controlo relativamente à química do aroma ou odores fenólicos desagradáveis (Oelofse *et al.*, 2008). Os teores em fenóis voláteis, especificamente os etilfenóis que resultam da contaminação de *Brettanomyces/Dekkera* podem ser reduzidos.

Ugarte *et al.*, (2005) obteve uma redução de 77% do total de etilfenóis através de um tratamento por osmose reversa e adsorção. O processo de três horas pressupõe a utilização de um adsorvente hidrofóbico de resina e uma membrana com fluxo de filtração tangencial. Este método não é selectivo, uma vez que reduz outros compostos aromáticos, tais como, etil e metil vanilato e outros ésteres.

Uma cola de síntese denominada por polivinilpirrolidona (PVPP) e carvão são utilizados por alguns enólogos para diminuir os níveis de etilfenóis (Suárez *et al.*, 2007). A concentração aplicada varia entre 60-400 mg/L para PVPP e 15-240 mg/L para carvão, dependendo da intensidade dos aromas desagradáveis.

As colas como caseína ou caseinato de potássio, possuem igualmente uma função adsorptiva e são também utilizadas para reduzir os níveis de etilfenóis em vinhos (Ruiz-Hernández, 2003).

Na tabela 8 encontra-se um resumo dos diferentes tratamentos utilizados, no vinho, para o controlo de *Brettanomyces/Dekkera* e fenóis voláteis.

Tabela 8 – Resumo dos diferentes tratamentos de controlo de *Brettanomyces/Dekkera* e fenóis voláteis, nos vinhos (Suárez, R. *et al.* 2007).

Tratamentos	Resultados	Observações
Clarificação Proteica^a - Gelatina - Clara de Ovo - Caseinato de Potássio - Caseína	Redução da população de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> por floculação.	Perda de cor e aroma
Filtração^b - Membrana (0,45µm) - Ultrafiltração	Redução da população de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> por separação física.	Perda da cor e aroma.
Variáveis físico-químicas^c - Diminuição da temperatura de envelhecimento - Diminuição do pH - Redução do oxigénio - Evitar a micro-oxigenação - Elevação do teor alcoólico	Estabelecem condições físico-químicas que reduzem a viabilidade das <i>Dekkeras</i> e <i>Brettanomyces</i> .	Estas variáveis podem ser difíceis de modificar nos vinhos e podem ser incompatíveis com o seu processo de envelhecimento.
Redução da concentração dos precursores^d - Diminuição da temperatura de maceração - Evitar o uso de enzimas pectolíticas e com actividade cinamoil esterase	- Diminuição da temperatura de maceração - Evitar o uso de enzimas pectolíticas e com actividade cinamoil esterase	Pode causar perda da cor e aroma.
Aditivos^e -SO ₂ -DMDC -Quitosano -Ácido sórbico -Ácido benzóico -Ácido fumárico -Ácido ascórbico -Ácido eritórbico	Inibem o crescimento das <i>Dekkeras</i> e <i>Brettanomyces</i> e previnem as condições que favorecem a formação dos etilfenóis.	O uso de alguns destes produtos não é autorizado no sector dos vinhos ou é ainda de carácter experimental.
Processamento a elevadas pressões^f - 400 – 500 MPa	Destrói os microrganismos do vinho sem afectar seriamente as suas propriedades sensoriais.	O custo dos equipamentos necessários é muito elevado.
Técnicas biológicas^g - Bacteriocinas - Enzimas Bacteriológicas - Zimocinas	Inibem o crescimento das <i>Dekkeras</i> e <i>Brettanomyces</i> .	O uso destas técnicas no vinho é experimental.
Engenharia Genética^h Leveduras transgénicas	Previne o crescimento das <i>Dekkeras</i> e <i>Brettanomyces</i> .	Não é correntemente permitida na vinificação.
^a Murat and Dumeau (2003); Ruiz-Hernández (2003) ^b Calderón <i>et al.</i> (2004) ^{c, d} Gerbeaux <i>et al.</i> (2000) ^e Delfini <i>et al.</i> (2002), Gómez-Rivas <i>et al.</i> (2004) ^f Puig <i>et al.</i> (2003) ^{g, h} Toit and Pretorius (2000)		

II. PARTE EXPERIMENTAL

O objectivo do presente trabalho foi estudar um método de preparação de amostra e um método cromatográfico que permitisse a detecção e quantificação de fenóis voláteis em vinhos tintos.

Inicialmente foi escolhido como método de preparação de amostra a “stir bar sorptive extraction” (SBSE). Esta metodologia faz uso de uma barra constituída por um magnete recoberto de fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) que é colocada em agitação na amostra e adsorve os analitos. Estes compostos podem depois ser retro-extraídos com um solvente orgânico apropriado que é posteriormente injectado num sistema cromatográfico. A grande vantagem desta metodologia é usar quantidades muito menores de solventes orgânicos, sendo por isso uma técnica “verde”. Como não obtivemos sucesso com esta técnica recorreremos à extracção líquido-líquido (ELL) como técnica de preparação de amostra.

Esta metodologia de preparação de amostra foi testada em amostras de vinho sintético e em amostras reais.

Em relação à técnica de preparação de amostras estudámos as taxas de recuperação e em relação ao método cromatográfico estabelecemos as condições, calculámos as rectas de calibração e os limites de quantificação e de detecção.

1. Reagentes e Padrões

A água usada foi previamente purificada num sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, MA).

O n-pentano, o etanol e a acetona foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Germany). O éter dietílico de grau analítico foi fornecido pela Fisher Scientific.

O padrão interno (PI) utilizado foi o 3,4-dimetilfenol e foi adquirido à Sigma-Aldrich (St Louis, MO). O 4-VF e o 4-VG foram fornecidos pela Alfa Aesar GmbH & Co KG. O 4-EF foi fornecido pela Merck, o 4-EC pela ABCR (GmbH & Co.) e o 4-EG pela TCI (Tokio Casei).

2. Instrumentos Analíticos

Utilizou-se um cromatógrafo GC Hewlett Packard série 6890, com amostrador automático e um detector FID. Os dados obtidos nas análises cromatográficas foram tratados com o software Chemstation da Hewlett Packard.

Para a pesagem dos padrões utilizou-se uma balança analítica da Mettler Toledo com precisão de 0,01 mg.

3. Método cromatográfico

Utilizou-se uma coluna RTX-Wax da Resteck (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), injector em modo splitless a 230 °C, split vent de 2 minutos e detector de ionização de chama (FID) a 250 °C. Usou-se hélio como gás de arraste com um fluxo de 1,4 mL/min. Utilizou-se o programa de temperaturas expresso na tabela seguinte:

Tabela 9 - Programa de temperatura utilizado na análise por GC-FID dos fenóis voláteis.

Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Tempo (min)
100	---	0
220	10	0
240	3	7

Para se conseguirem injeções reproduzíveis, uma vez que estamos a trabalhar em modo splitless, o injector foi programado com “post-injection dwell time” de 0,07 minutos. O volume de injeção foi de 1 μL.

4. Procedimento Experimental

4.1. Análise Qualitativa e Quantitativa dos Fenóis Voláteis em Meio Sintético

O 4-EF, o 4-EG, o 4-EC, o 4-VF e o 4-VG foram identificados por comparação do tempo de retenção com o de padrões comerciais. Também foram calculados os índices de retenção lineares destes compostos. A quantificação foi efectuada pelo método das rectas de calibração.

➤ Preparação de Soluções

Solução Modelo de Vinho

Preparou-se 1,0 L de solução modelo de vinho de acordo com a tabela 10. O pH foi acertado a 3,30 com NaOH 2M.

Tabela 10 – Composição química da solução modelo.

Composto	Concentração g/L
Ácido Tartárico	4,0
Ácido Málico	3,0
Ácido Acético	0,10*
Sulfato de Magnésio MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
Sulfato de Potássio	0,10
Etanol	90**

* Pipetou-se 95 µL de ácido acético glacial

** Pipetou-se 114 mL de etanol absoluto

➤ Preparação de Padrões

Solução Padrão Interno

Pesou-se 0,085 g de 3,4-dimetilfenol que foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, perpez-se o volume com a solução de etanol a 75% (v/v), ficando a solução com concentração de 850 mg/L.

Solução mãe dos Fenóis Voláteis

A solução mãe em fenóis voláteis foi preparada pesando as seguintes quantidades dos compostos individuais:

- 40,9 mg de 4-EF;
- 45,2 mg de 4-EG;
- 41,7 mg de 4-EC;
- 46,6 mg de 4-VG;
- 46,3 mg de 4-VF.

Os padrões foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, fez-se o volume com etanol a 75% (v/v), ficando a solução com concentrações de 818 mg/L, 904 mg/L, 834 mg/L, 932 mg/L e 926 mg/L em 4-EF, 4-EG, 4-EC, 4-VG e 4-VF, respectivamente.

Solução de Trabalho

Pipetou-se 10 mL da solução mãe de fenóis voláteis para um balão de 100 mL e fez-se o volume com etanol a 75% (v/v), ficando a solução com as concentrações de 81,8 mg/L, 90,4 mg/L, 83,4 mg/L, 93,2 mg/L e 92,6 mg/L, em 4-EF, 4-EG, 4-EC, 4-VG e 4-VF, respectivamente.

Soluções Padrão usadas para a construção da recta de calibração

Pipetaram-se diferentes volumes da solução de trabalho para balões volumétricos de 100 mL e fez-se o volume com a solução modelo de vinho de modo a se obterem as seguintes concentrações dos diferentes padrões:

Tabela 11 – Concentrações (mg/L) de 4-EF, 4-EG, 4-EC, 4-VG e 4-VF nos diferentes padrões.

	4-EF (mg/L)	4-EG (mg/L)	4-EC (mg/L)	4-VG (mg/L)	4-VF (mg/L)
Padrão 1 (16 mg/L)	16,36	18,08	16,68	18,64	18,52
Padrão 2 (4,8 mg/L)	4,91	5,42	5,00	5,59	5,56
Padrão 3 (0,8mg/L)	0,82	0,90	0,83	0,93	0,93
Padrão 4 (0,2 mg/L)	0,10	0,11	0,10	0,12	0,12

Índices de retenção lineares

Para o cálculo dos índices de retenção lineares, foi injectada uma solução dos padrões dos compostos em estudo e uma solução de alcanos (de C16 a C25) com o intuito de determinar os tempos de retenção. As injeções foram feitas exactamente nas mesmas condições para as duas soluções com uma coluna RTX-Wax.

4.2. Preparação das Amostras para Elaboração das Rectas de Calibração

Adicionaram-se 200 μL de uma solução de 850 mg/L de 3,4-dimetilfenol (PI) a amostras de 20 mL de solução padrão, de modo a obter uma concentração de 8,42 mg/L deste composto no volume final. Cada amostra foi extraída em duplicado com 5 mL de solução éter dietílico/pentano (1:1) durante 10 minutos, com agitação. Após cada extracção as amostras foram decantadas e as fracções orgânicas (menos densas) foram combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro e concentradas até ao volume de 1 mL sob fluxo suave de azoto (figura 16). A amostra obtida foi analisada por GC-FID, nas condições descritas.

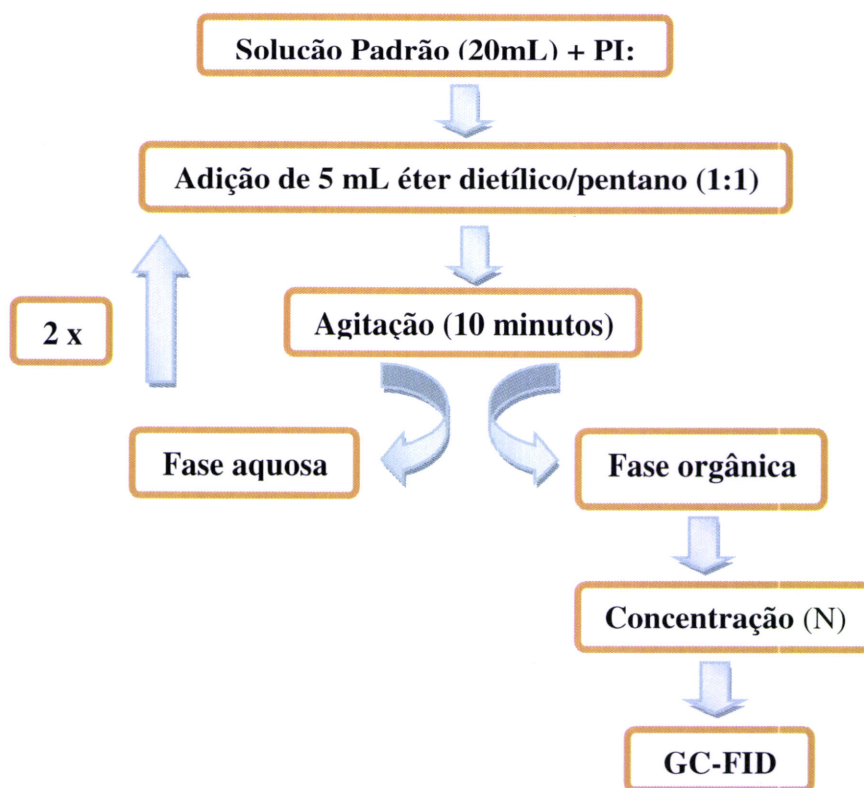


Figura 16 - Representação esquemática do processo extractivo dos fenóis voláteis.

4.3. Extracção e Separação dos Fenóis Voláteis em Vinho Sintético

4.3.1. Preparação de Vinho Sintético Dopado com Fenóis Voláteis

As amostras de vinho sintético foram obtidas através de uma solução com 30 mL de etanol (12%); 0,8 g de ácido tartárico (3,2 g/L) e 220 mL de água.

A esta solução foi adicionado:

- 100 µL de 4-EF de uma solução padrão com 5,0 g/L de modo a obter 2,5 mg/L no volume final;
- 250 µL de 4-EG de uma solução padrão com 2,0 g/L, de modo a obter 2,65 mg/L no volume final;
- 500 µL de 4-EC de uma solução padrão com 1,0 g/L, de modo a obter 2,5 mg/L no volume final;
- 500 µL de 3,4-dimetilfenol (PI) de uma solução padrão com 590 mg/L, de modo a obter 1,5 mg/L no volume final;
- 400 µL de 4-VG de uma solução padrão com 1,29 g/L, de modo a obter 2,58 mg/L no volume final;
- 500 µL de 4-VF de uma solução padrão com 985 mg/L, de modo a obter 2,5 mg/L no volume final.

4.3.2- Extracção por SBSE de Vinho Sintético Dopado com Fenóis Voláteis

Esta técnica consiste em agitar uma “stir bar” na solução que contém os compostos a extrair. Os analitos são adsorvidos na fibra PDMS da barra e depois são retro-extraídos com um solvente orgânico.

Para promover a adsorção dos analitos à barra foram testados vários parâmetros: volume de vinho sintético (5, 10 e 20 mL), concentrações decrescentes dos padrões no vinho sintético, tempo de agitação (60, 90, 120 e 180 minutos a 900 rpm).

Para a retro-extracção coloca-se a barra num vial com 0,5 mL de um solvente em banho de ultra-sons, durante 15 minutos, retira-se a barra, reduz-se o volume sob

corrente de azoto e injecta-se. Testamos vários solventes: éter dietílico:pentano (1:1 v/v), diclorometano, acetonitrilo e hexano.

4.3.3- Extracção por ELL de Vinho Sintético Dopado com Fenóis Voláteis

O processo de extracção e separação dos fenóis voláteis desta solução foi análogo ao descrito anteriormente, à excepção que foi utilizado 10 mL da solução de vinho sintético para o processo de extracção.

4.4. Análise dos Fenóis Voláteis Presentes em Amostras de Vinhos Tintos Comerciais Naturalmente Contaminadas

Utilizou-se 20 mL de vinho tinto comercial naturalmente contaminado com *Dekkera* (a origem do vinho é desconhecida).

O processo de extracção e separação dos fenóis voláteis no vinho tinto está descrito anteriormente.

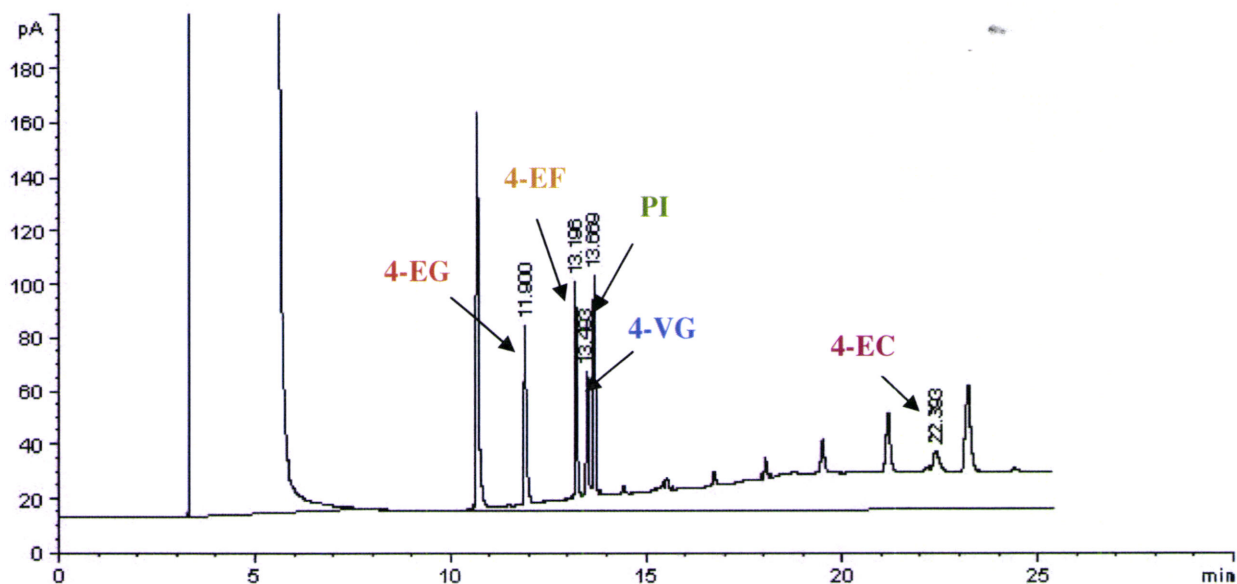
Taxas de Recuperação

Para o cálculo das taxas de recuperação utilizaram-se amostras de vinho tinto comercial naturalmente contaminado ao qual adicionámos 200 μL da solução mãe. O processo de extracção e separação está descrito anteriormente. As extracções foram efectuadas em duplicado.

III. RESULTADOS e DISCUSSÃO

1. Optimização da Separação Cromatográfica de Fenóis Voláteis

A figura seguinte mostra um cromatograma obtido da análise por GC-FID, nas condições cromatográficas atrás descritas, de uma amostra de vinho sintético (figura 17).



Condições cromatográficas descritas no ponto II. 3 da parte experimental – pág. 35.

Figura 17 – Cromatograma, em GC-FID, de vinho sintético, com os fenóis voláteis.

A utilização de uma coluna de 60 metros permitiu efectuar uma separação dos compostos em estudo que não foi possível obter com uma coluna idêntica mas de 30 metros. O programa de temperaturas e o fluxo de hélio foram optimizados de forma a conseguirmos a melhor separação dos compostos no menor tempo possível. Conseguiu-se uma boa resolução em 25 minutos de corrida.

2. Cálculo dos Índices de Retenção Lineares

Uma vez que o detector utilizado não permite a identificação inequívoca de compostos, a forma mais fiável de identificação é a determinação de dados de retenção para cada um dos componentes de uma mistura através da injeção individual de padrões. Assim, para além da determinação dos tempos de retenção de cada um dos compostos em estudo fomos também calcular os índices de retenção lineares destes

compostos, segundo a equação proposta por van den Dool e Kratz, que pela sua simplicidade é ainda hoje a mais utilizada (Barata, 2008). A equação utilizada foi:

$$IR = 100 * [C_n + ((tr - tr_{C_n}) / (tr_{C_{n+1}} - tr_{C_n}))]$$

onde:

C_n – número de carbonos do n -alcano com tr imediatamente anterior ao composto

tr – tempo de retenção do composto

tr_{C_n} – tempo de retenção do n -alcano que elui imediatamente antes ao composto

$tr_{C_{n+1}}$ – tempo de retenção do n -alcano que elui imediatamente a seguir ao composto

Os índices de retenção lineares obtidos para os diferentes compostos em estudo, para uma coluna RTX-Wax são apresentados na tabela 12:

Tabela 12 - Índices de retenção lineares determinados para coluna RTW-Wax.

Padrão	RTX-Wax
4-VF	1602
4-VG	2185
4-EF	2175
4-EG	2061
4-EC	2407
PI	2213

Barata (2008) refere para o 4-EF um índice de retenção linear em coluna polar de 2177 e de 1354 em coluna quiral. A utilização dos sistemas de índices de retenção permite uma maior facilidade de comparação de informação, pois esta passa a depender essencialmente da natureza química do analito e da fase estacionária, apesar de se terem de considerar as condições experimentais (Seeley e Seeley, 2007).

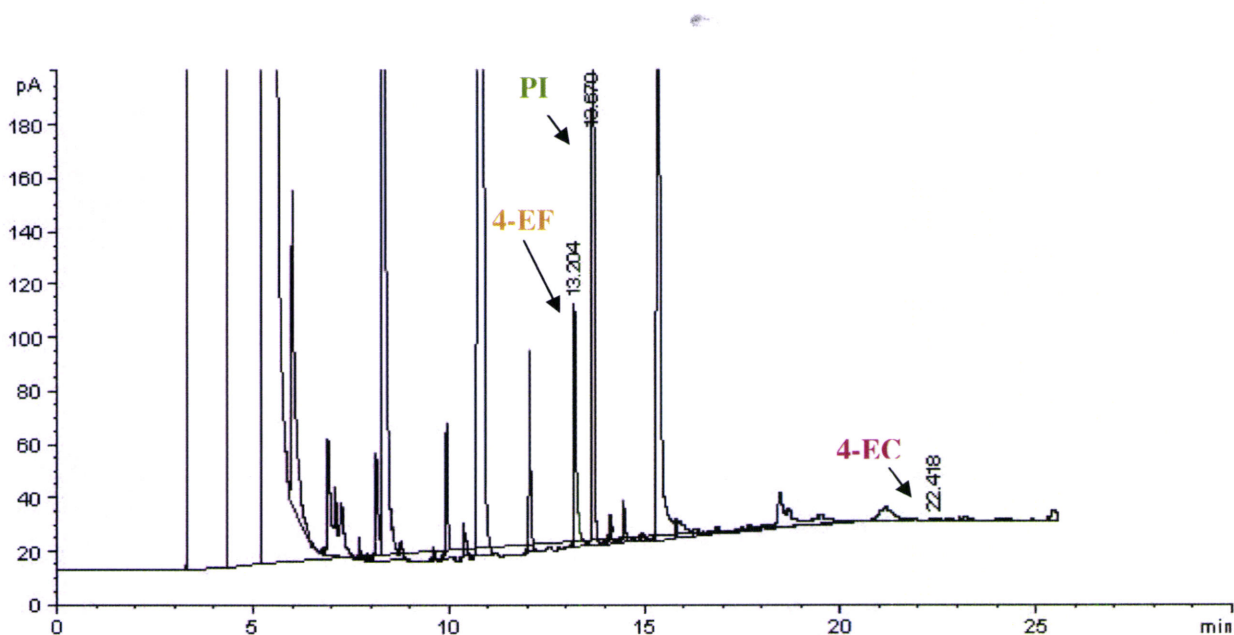
O conhecimento dos índices de retenção lineares dos compostos pode ser de grande ajuda na identificação dos mesmos quando não dispomos de um detector de espectrometria de massa. A utilização de fontes de índices de retenção lineares, nas quais estes tenham sido obtidos em condições diferentes pode levar a identificações erradas.

3. Análise Qualitativa dos Fenóis Voláteis em Amostras de Vinho Tinto

Após analisar o comportamento dos padrões de cada fenol volátil em vinho sintético, tentou-se analisar e identificar os diferentes fenóis voláteis em estudo, num vinho tinto comercial.

Os vinhos tintos comerciais utilizados (sendo a origem dos vinhos desconhecida) são naturalmente contaminados com *Dekkeras*, pois revelaram um odor a estrebaria, característico dos etilfenóis. Utilizaram-se 20 mL de um dos vinhos tintos ao qual se adicionou 100 μ L de PI. O processo de extracção e separação dos fenóis voláteis, nos vinhos tintos utilizados, está descrito anteriormente (ponto II.4.2 da parte experimental – pág.38).

A figura 18 ilustra o cromatograma obtido na amostra de um vinho tinto, analisado por GC-FID.



Condições cromatográficas descritas nos pontos II. 3 da parte experimental – pág. 35.

Figura 18 - Cromatograma em GC-FID de um vinho tinto comercial.

Foi detectada a presença de dois dos três etilfenóis em estudo no vinho, sendo mais abundante o 4-EF, seguido do 4-EC, encontrando-se este último em pequenas concentrações no vinho, o que se deve provavelmente à menor afinidade que as leveduras têm na conversão do ácido cafeíco em 4-EC.

O 4-EC é conhecido por ser termicamente lábil às temperaturas requeridas para a análise cromatográfica e por interagir com as fases líquidas e suporte inerte das colunas

disponíveis comercialmente (Larcher *et al.*, 2008). Para a quantificação directa do 4-EC no vinho nenhum método foi encontrado até 2004, devido à sua elevada polaridade e dificuldade de ampliação e verificação do seu pico na separação em colunas polares em cromatografia gasosa (Larcher *et al.*, 2008).

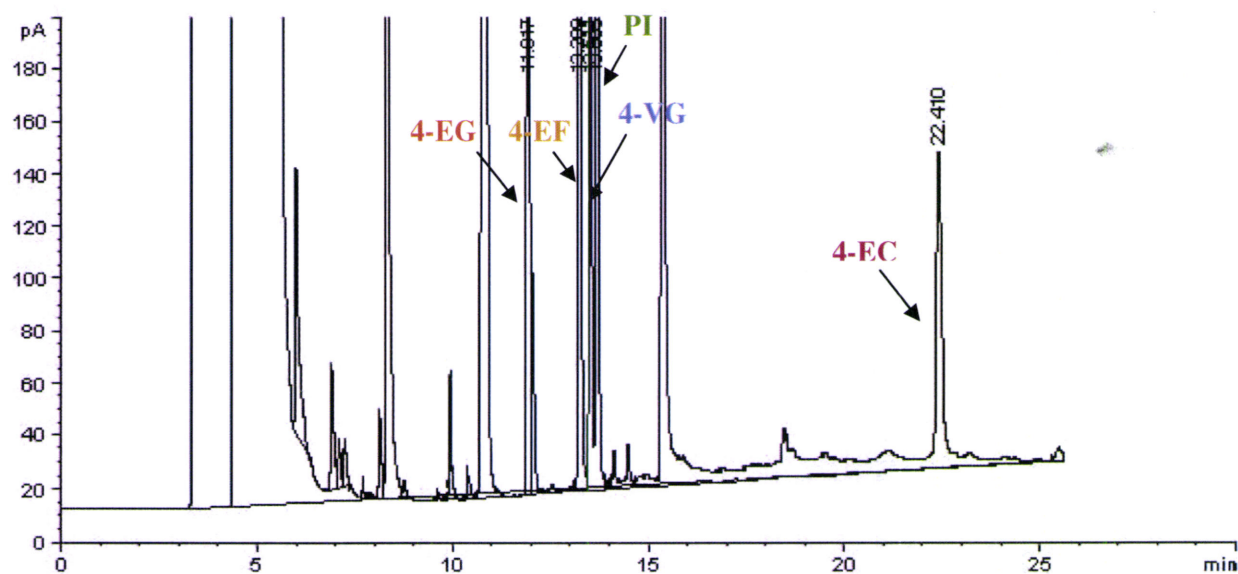
Até à data, a sua detecção e quantificação por GC têm sido descritas na literatura apenas após a sua derivatização.

Neste trabalho a detecção do 4-EC foi mais demorada em relação ao 4-EF (figura 18), no entanto não houve necessidade de recorrer a qualquer derivatização prévia.

A não detecção de 4-EC, pode ser devido ao facto das leveduras não terem sido capazes de metabolizar o ácido cafeíco em 4-EC (Heresztyn, 1987); devido a reacções do intermediário, 4-VC, com outros componentes intrínsecos do vinho (Marx *et al.*, 2003, Monagas *et al.*, 2003, Schwarz *et al.*, 2003); ou por inconformidade do método analítico.

No sentido de confirmar a presença dos etilfenóis neste vinho, procedeu-se à adição de cada um dos fenóis voláteis, a este mesmo vinho, ou seja a amostra foi dopada.

O cromatograma da figura 19 ilustra os diferentes fenóis voláteis existentes no vinho, com adição dos padrões dos mesmos em estudo.



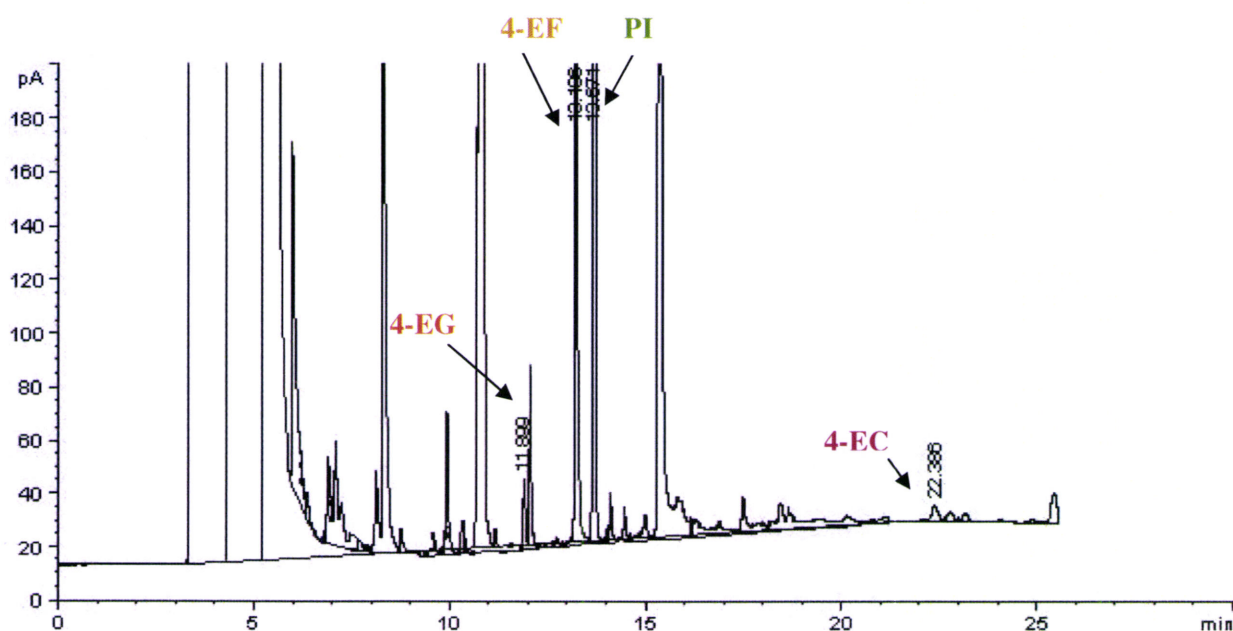
Condições cromatográficas descritas nos pontos II. 3 da parte experimental – pág. 35.

Figura 19 – Cromatograma, em GC-FID, de um vinho tinto comercial, com adição dos fenóis voláteis.

Neste cromatograma podemos visualizar e confirmar, por comparação com o cromatograma da figura 18, a presença do 4-EF e do 4-EC, neste vinho. Não foi

possível a detecção do 4-EG na análise desde vinho, tal como não foi detectado o 4-VG. Sabemos que a diminuição dos ácidos hidroxicinâmicos é acompanhada por um aumento dos vinilfenóis, e a diminuição destes é acompanhada pelo aumento dos etilfenóis.

Procedemos assim a uma análise de outro vinho tinto comercial, também naturalmente contaminado com *Dekkeras*. Na figura 20 é possível visualizar a detecção do 4-etilguiacol, do 4-etilfenol e do 4-etil-catecol. A confirmação da presença destes compostos foi também efectuada com dopagem da amostra.



Condições cromatográficas descritas nos pontos II. 3 da parte experimental – pág. 35.

Figura 20 - Cromatograma, em GC-FID, de um vinho tinto comercial.

4. Métodos de Preparação de Amostra para Extração de Fenóis Voláteis

4.1. Tentativas de Aplicação do Método de SBSE

Nenhuma das tentativas acima descritas deu resultado, tendo sido experimentadas nove barras diferentes. Quando se efectuou uma extração líquido-líquido ao vinho sintético dopado com padrões após extração com a barra, verificámos que os compostos não tinham sido adsorvidos à barra. Pensamos que por estarmos a usar barras já usadas, elas poderiam estar degradadas.

Como não obtivemos qualquer resultado esta metodologia foi abandonada.

4.2. Avaliação da Eficiência da ELL

4.2.1 Taxas de Recuperação do Método de Preparação de Amostra por ELL

Na tabela 13 apresentam-se as taxas de recuperação obtidas nas amostras de vinho tinto naturalmente contaminado (ponto II.4.4 da parte experimental, pág.40).

As taxas de recuperação são satisfatórias, denotando razoável aplicabilidade do método de preparação de amostra em estudo.

Tabela 13 – Resultados dos cálculos das taxas de recuperação.

Composto	Taxas de Recuperação
4-vinilguaiacol	84% ± 5,66
4-etilfenol	106% ± 0,71
4-etilguaiacol	102% ± 3,54
4-etilcatecol	111% ± 8,49

5. Análise Quantitativa de Fenóis Voláteis em Vinhos Tintos

5.1. Rectas de Calibração e Cálculo de LOD e LOQ

A análise quantitativa dos fenóis voláteis foi efectuada de acordo com o procedimento descrito no ponto II.4.2 da parte experimental.

A quantificação dos fenóis voláteis foi efectuada pelo método do padrão interno, como já foi referido. Este método consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona uma quantidade conhecida de um composto denominado padrão interno (PI). Idealmente, o composto usado como padrão interno deve ser similar aos compostos a serem quantificados, ter tempo de retenção diferente, não reagir com estes compostos ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando sujeito a análise cromatográfica, ficar separado dos demais compostos presentes na amostra.

Após análise dessas soluções, construíram-se os gráficos que se apresentam em anexo, relacionando a razão de áreas com a concentração dos analitos. A razão de áreas é obtida pela multiplicação da área do pico cromatográfico do analito com a concentração (que é conhecida) do PI e este valor é dividido pela área do pico cromatográfico do padrão interno.

A recta de calibração do 4-VF não é apresentada por se ter obtido um R^2 muito baixo e a recta de calibração não pode ser usada já que os resultados não seriam correctos. Este facto ficou a dever-se muito provavelmente ao acondicionamento incorrecto do padrão deste composto, que deveria ter sido guardado a temperaturas negativas, o que não se verificou. Assim, a quantificação deste composto não foi efectuada neste trabalho, sendo o padrão apenas usado para determinar o tempo de retenção deste composto.

Com os parâmetros da recta de calibração calcularam-se os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para os diferentes analitos, segundo Miller, J. C. e Miller, J. N. (1993).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados para cada composto, através da fórmula $b + (c * \text{erro padrão})$, em que:

- b = valor do declive da recta de calibração
- $c = 3$ no cálculo do LOD; $c = 10$ no cálculo do LOQ

Os dados apresentados na tabela 12 mostram que existe linearidade na gama de concentrações estudadas, com o coeficiente de correlação (R^2) a variar entre 0,9998 e 1, para os fenóis voláteis.

Tabela 14 - Parâmetros obtidos através das rectas de calibração dos fenóis voláteis.

Composto	Equação	R^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
4-VG	$y = 0,489x + 0,0503$	0,9998	0,29	0,83
4-EF	$y = 1,1036x + 0,0959$	1	0,27	0,66
4-EG	$y = 0,7163x + 0,0937$	0,9998	0,40	1,13
4-EC	$y = 0,2536x - 0,03$	0,9997	0,09	0,36

5.2. Quantificação de Fenóis Voláteis em Vinhos Comerciais

Foram estudados quatro vinhos comerciais que apresentavam os aromas típicos atribuídos à presença de fenóis voláteis. Os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela 13 e na figura 25.

Tabela 15 – Concentração dos etilfenóis em quatro vinhos tintos comerciais naturalmente contaminados.

Vinho Tinto	Compostos	Concentração (mg/L)
1	4-etilfenol	1,30 ± 0,21
2	4-etilfenol	2,10 ± 0,00
3	4-etilfenol	1,80 ± 0,21
4	4-etilguaiacol	1,44 ± 0,20
	4-etilfenol	2,24 ± 0,12
	4-etilcatecol	0,96 ± 0,12

Nas amostras 1, 2 e 3 dos vinhos tintos comerciais em estudo apenas foi possível dosar o 4-EF, que apresentou teores bastante superiores ao LOD (0,27 mg/L) e ao LOQ (0,66 mg/L), encontrando-se alguns dos restantes compostos abaixo do limite de quantificação, nomeadamente o 4-EG no vinho 2.

Já no caso do vinho 4 foi possível identificar e quantificar os três fenóis voláteis, 4-EG, 4-EF e 4-EC.

Para estas quatro amostras, os valores de 4-EF e 4-EG encontrados são superiores aos valores referenciados para os limiares de percepção, razão pela qual estes vinhos apresentavam um forte aroma a estrebaria e suor a cavalo.

Estudos experimentais, realizados recentemente por diversos autores, indicam que as condições de armazenamento do vinho podem afectar fortemente o seu conteúdo de compostos fenólicos, uma vez que estes podem sofrer modificações durante esse período devido a reacções de hidrólise, oxidação e complexação (Zafrilla *et al.*, 2003). Outros factores, como a luz e a temperatura, também podem contribuir para a degradação destes compostos (Cheynier *et al.*, 2003). Apesar dos vinhos analisados

terem sido escolhidos por apresentarem um forte aroma típico da presença de fenóis voláteis, na realidade, na altura em que foram analisados e por terem sido armazenados (em frigorífico), não foi possível detectar e quantificar todos os fenóis voláteis eventualmente existentes aquando da abertura das garrafas.

IV. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos algumas conclusões:

- O método de preparação de amostra escolhido, a extracção líquido-líquido com uma mistura de éter dietílico:pentano (1:1, v/v) apresenta, para os compostos estudados, boas taxas de recuperação.

- Esta metodologia de preparação de amostra permite que se analise por GC-FID os fenóis voláteis mais importantes em vinhos tintos, o 4-etilfenol e o 4-etilguaicol, mas também o 4-etilcatecol. A este último composto tem sempre sido dada pouca importância, e os métodos de preparação de amostra descritos na literatura envolvem sempre uma derivatização. A metodologia proposta, extracção líquido-líquido, funciona e é muito mais simples e barata que os métodos até aqui disponíveis.

- Também para o 4-vinilguaicol, esta metodologia de preparação de amostra apresentou bons resultados. Já para o 4-vinilfenol, por não termos um padrão em boas condições, não é possível retirar nenhuma conclusão.

- O método cromatográfico proposto permitiu uma resolução bastante satisfatória dos compostos em estudo, num tempo razoável.

Embora tenhamos tido acesso a muito poucas amostras de vinho nas quais pudéssemos identificar o aroma típico a “suor a cavalo”, analisamos 4 vinhos comerciais que apresentaram fenóis voláteis. O 4-etilfenol foi o composto encontrado em maior quantidade, e o 4-vinilguaicol não foi detectado em nenhuma das amostras. Porém a utilização de amostras de vinho sintético e de amostras de vinho às quais adicionámos os compostos em estudo, permite-nos concluir que estes compostos, a existirem nos vinhos, podem ser detectados e quantificados com a metodologia proposta.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, M. (1994) *Advanced Oenology*, Charles Sturt University.
- Araújo, I. M. M. (2004) Características aromáticas e cromáticas das castas Amarel e Vinhão, Tese de Mestrado, Universidade do Porto.
- Arvik, T. J.; Conterno, L. e Henick-Kling, T. (2002) *Brettanomyces bruxellensis* in New York State wines: a global issue. In: Henick-Klink, T. (ed). Proc. 31st Annual New York Wine Industry Workshop, April 3-5, Cornell University, New York State, 124-125.
- Barata, A.; Correia, P.; Nobre, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2006) Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices, *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 133–138.
- Barata, R.C. (2008) Aplicação de índices e retenção lineares na identificação de substâncias por cromatografia gás-líquido em matrizes naturais, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. (1990) *Yeasts: Characteristics and identification*, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University, 1002.
- Bartowsky, E. J.; Pretorius, I. S.; (2009) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 208-228.
- Bartowsky, E.; Costello, P.; Henschke, P. (2002) Management of malolactic fermentation – wine flavour manipulation, *The Australian Grapegrower and Winemaker*, **461**, 7-12.
- Bayonove C. L.; Baumes, R. L.; Crouzet J.; Günata Y. Z. (1998) Arômes In: *OEnologie - Fondements Scientifiques et Technologiques*, Paris, Lavoisier Tec & Doc, 163-235.
- Boekhout, T.; Kurtzman, C.; O'Donnell, K. & Smith, M.T. (1994) Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 781-786.
- Boulton, R. B.; Singleton, V. L.; Bisson, L.F.; Kunkee, R. E. (1996) *Principles and practices of winemaking*, Chapman & Hall, New York
- Cabrita, M. J.; Ricardo-da-Silva, J.; Laureano, O. (2003) Os Compostos Polifenólicos das Uvas e dos Vinhos, I Seminário Internacional de Viticultura, 61-100.
- Cabrita, M.J.; Torres, M.; Palma, V.; Alves, E.; Patão, R., Freitas, A.M.C. (2007) Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta*, 1281-1286.
- Calderón, F.; Morata, A.; Uthurry, C.; Suárez, J. A. (2004) Aplicaciones de la ultrafiltración en la industria enológica. Últimos avances tecnológicos. *Tecnología del vino*, **16**, 49–54.
- Campbell, I. (1973) Numerical analysis of *Hansenula*, *Pichia* and related yeast genera, *Journal of General Microbiology*, London, **77**, 427-441.
- Carrillo, J. D.; Tena, M. T. (2006) Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.*
- Cavin, J.; Andioc, P.; Etievant, P.; Divies, C. (1993) Ability of wine lactic bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1**, 76–80.
- Chatonnet, P.; Boidron, J.; Dubourdieu, D. (1993a) Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur le teneur en acide acétique et en ethyl-phenols. *J. Int. Vigne Vin*, **27**, 277–298.

- Chatonnet, P.; Boidron, J.; Pons, M. (1990) Elevage des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique, *Science des Aliments*, **10**, 587–656.
- Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; e Boidron, J.N. (1989) Incidence de certains facteurs sur la decarboxylation des acides phenols par la levure, *Conn. Vigne Vin*, **23**, 59–62.
- Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. N.; Pons, M. (1992) The origin of ethylphenols in wines, *J. Sci. Food Agric.*, **60**, 165–178.
- Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.; Lavigne, V. (1993b) Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **62**, 101–202.
- Cheyrier, V. F.; Fulcrand, H.; Oxidación de los polifenoles en los mostos y los vinos In *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, 2003, Madrid, Mundi- Prensa, second edition, 369-376.
- Cocolin, L.; Rantsiou, K.; Iacumin, L.; Zironi, R. & Comi, G. (2004) Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1347 – 1355.
- Cordonnier R.E.; Bayonove, C. L. (1978) Les composantes variétales et préfermentaires de l'arôme des vins, *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, **24**, 67-77.
- Curtin, C. D.; Bellon, J. R.; Coulter, A. D.; Cowey, G. D.; Robinson, E. M. C.; de Barros Lopes, M. A.; Godden, P. W.; Henschke P. A.; Pretorius, I. S. (2005) The six tribes of 'Brett' in Australia – Distribution of genetically divergent *Dekkera bruxellensis* strains across Australian winemaking regions, *Aus. Wine Ind. J.*, **20**, 28-36.
- Cosentino, S.; Fadda, M. E.; Deplano, M.; Mulargia, A. F.; Palmas, F. (2001) Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products, *Int J Food Microbiol*, **69**, 53–58.
- Coton, E.; Coton, M.; Levert, D.; Casaregola, S.; Sohier, D. (2006) Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations, *Int J Food Microbiol*, **108**, 130–135.
- Couto, J.; Campos, F.; Figueiredo, A.; Hogg, T. (2006) Ability of lactic bacteria to produce volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 166–171.
- Coulter, A.; Robinson, E.; Cowey, G.; Francis, I.L.; Lattey, K.; Capone, D.; Gishen, M.; Godden, P. (2004) *Dekkera/Brettanomyces* yeast: An overview of recent AWRI investigations and some recommendations for its control, In: Bell, S.M.; de Garis, K.A.; Dundon, C.G.; Hamilton, R.P.; Partridge, S.J.; Wall, G.S. (eds.), *Grape growing at the edge; Managing the wine business; Impacts on wine flavour: proceedings of a seminar; 10–11 July 2003, Barossa Convention Centre, Tanunda, S.A. Adelaide, S.A: Australian Society of Viticulture and Oenology*, 41–50.
- Couto, J.A.; Neves, F.; Campos, F. e Hogg, T. (2005b) Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*, *Int. J. Food Microbiol.*, **104**, 337-344.
- Dekkera e Brettanomyces: Leveduras não competitivas que deterioram vinhos - Características, problemas e identificação.
www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc041.pdf, acesso a 05-06-2009.
- Delfini, C.; Gaia, P.; Schellino, R.; Strano, M.; Pagliara, A. & Ambro, S. (2002) Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5605-5611.
- Dias, L.; Dias, S.; Sancho, T.; Stender, H.; Querol, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2003a) Identification of yeasts isolated from wine related environments and capable of producing 4-ethylphenol, *Food Microbiol*, **20**, 567–574.
- Dias, L.; Pereira da-Silva, S.; Tavares, M.; Malfeito-Ferreira, M. e Loureiro, V. (2003b) Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions, *Food Microbiol.*, **20**, 377-384.

- Díaz-Plaza, E. M.; Reyero, J. R.; Pardo, F. e Salinas, M. R. (2002) Comparison of wine aromas with different tannic content aged in French oak barrels. *Analytica Chimica Acta*, **458** (1), 139–145.
- Dugelay, I.; Gunata, Z.; Sapis, J.C.; Baumes, R.; & Bayonove, C. (1993) Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 2092–2096.
- Du Toit, W.J.; Pretorius, I.S. e Lonvaud-Funel, A. (2005) The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine, *J. Appl. Microbiol.* **98**, 862-871.
- Edlin, D.; Narbad, A.; Dickinson, J.; Lloyd, D. (1995) The biotransformation of phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**, 311–315.
- Edlin, D. A. N.; Narbad, A.; Gasson, M. J.; Dickinson, J. R.; Lloyd, D. (1998) Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*, *Enzyme Microbial Technology*, **22**, 232–239.
- Egli, C.M. & Henick-Kling, T. (2001) Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer, *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 241-247.
- Etiévant, P. X. (1991) *Wine In Volatile Compounds of Food and Beverages*, New York, USA, ed. H. Maarse Marcel Dekker Inc.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M.J., Garcia-Maiquez, E., Uruburu, F. & Querol, A. (2001) Yeast population dynamics during the fermentation and biological ageing of sherry wines, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2056-2061.
- Fariña, L.; Boido, E.; Carrau, F.; Dellacassa, E. (2007) Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry detection, *Journal of Chromatography A*, **1157**, 46-50.
- Fernández, M. T. C. (2004) Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen, Tesis Doctoral, Universidad de la Rioja, Servicio de Publicaciones.
- Fleet, G. H.; Heard, G. M. (1993) *Yeasts: Growth during fermentation In Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. G. H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fleet, G. H.; Prakitchaiwattana, C.; Beh, A. L.; Heard, G. M. (2002) The yeast ecology of wine grapes, In: Ciani M (ed) *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*, Research Signpost, Kerala, India, 1–17.
- Fleet, G. H. (2003) Yeast interactions and wine flavor, *Int J Food Microbiol*, **86**, 11–22.
- Francis, I. L.; Hoj, P. B.; Dambergs, R. G.; Gishen, M.; de Barros Lopes, M. A.; Pretorius, I. S.; Godden, P. W.; Henschke, P. A.; Herderich, M. J.; Waters, E. J.; (2005) Objective measures of grape quality - are they achievable? In *Proceedings of The Twelfth Australian Wine Industry Technical Conference*, Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Melbourne, Australia, 85 -89.
- Freer, S. N.; Dien, B.; Matsuda, S. (2003) Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH, *World J Microbiol Biotechnol*, **19**, 101 – 105.
- Fregoni, M.; (1985) *Viticultura Général, Reda Ramo Editoriale degli Agricoltori*, Itália.
- Froudiere, I.; Larue, F. (1988) Condition de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **2**, 296–303.
- Fugelsang, K. (1998) *Brettanomyces: Dr Jekyll ou Mr. Hyde des vins?* *Biofutur*, **182**, 22 – 23.

- Fugelsang, K. C.; Osborn, M. M.; Muller, C. (1993) Brettanomyces and Dekkera, implications in winemaking, In: Gump BH (ed) Beer and wine production, analysis, characterization, and technological advances. American Chemical Society, Washington DC, 110–131.
- Garde-Cerdán, T. e Ancín-Azpilicueta, C. (2006) Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine. Storage time optimization. *LWT—Food Science and Technology*, **39** (3), 199–205.
- Garde - Cerdán, T. e Ancín-Azpilicueta, C. (2006) Review of quality factors on wine ageing in oak barrels, *Food Science & Technology*, **17**, 438–447.
- Garde - Cerdán, T.; Goñi, D. T.; Azpilicueta, C. A. (2004) Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition, *Journal of Food Engineering*, **65**, 349–356.
- Garde - Cerdán, T.; Rodríguez-Mozaz, S., e Ancín-Azpilicueta, C. (2002) Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Research International*, **35**(7), 603–610.
- Garde-Cerdán, T.; Torrea-Goñi, D.; & Ancín-Azpilicueta, C. (2002) Changes in the concentration of volatile oak compounds and esters in red wine stored for 18 months in re-used French oak barrels, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **8**(2), 140–145.
- Gerbeaux, V.; Jeudy, S.; Monamy, C. (2000) Study of phenol volatiles in Pinot noir wines in Burgundy, *Bulletin de l'OIV*, **73**, 581–599.
- Gerbeaux, V.; Vincent, 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**, 131–137.
- Gil, J. V.; Mateo, J. J.; Jimenez, M.; Pastor, A.; Huerta, T. (1996) Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts, *J Food Sci*, **61**, 1247–1249.
- Gómez-Rivas, L.; Escudero-Abarca, B.I.; Aguilar-Uscanga, M.G.; Hayward-Jones, P.M., Mendoza, P. e Ramírez, M. (2004) Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations, *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 16-22.
- Grbin, P. R.; Henschke, P. A. (2000) Mousy off-flavour production in grape juice and wine by Dekkera and Brettanomyces yeast, *Aust J Grape Wine Res*, **6**, 255–262.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects, *Journal of Food Protection*, **63**, 976–981.
- Harris, V.; Ford, C. M.; Jiranek, V.; Grbin, P. R. (2008) Dekkera and Brettanomyces growth and utilization of hydroxycinnamic acids in synthetic media, *Appl Microbiol Biotechnol*, **78**, 997-1006.
- Henick-Kling, T. (1993) Malolactic fermentation In *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. G.H. Fleet, Harwood: Camberwell Vic.
- Henick-Kling, T.; Egli, C.; Licker, J.; Mitrakul, C. e Acree, T.E. (2000) In: Proc. 5th Int. symposium on cool climate viticulture and oenology, Melbourne, Australia, 16-20 January.
- Heresztyn, T. (1986a) Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts, *Arch. Microbiol.*, **146**, 96-98.
- Hernández, T.; Estrella, I.; Pérez-Gordo, M.; Alegría, E.G.; Tenorio, C.; Ruiz-Larrea, F.; Moreno-Arribas, M.V. (2007) Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5260–5266.
- Hesford, F.; Schneider, K.; Porret, N.A.; Gafner, J. (2004) Identification and analysis of 4-ethyl catechol in wine tainted by *Brettanomyces* off-flavor, *Abstract. Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 304A.

- Hoeben, P.; Clark-Walker, G. D. (1986) An approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from *Dekkera/Brettanomyces* and *Eeniella* genera, *Current Genetics*, **10**, 371-379.
- Kolfschten, G. A.; Yarrow, D. (1970) *Brettanomyces naardenensis*, a new yeast from soft drinks, *Ant Van Leeuw Int J Gen and Mol Microbiol*, **36**, 458-460.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (2000) (4th ed. revised), *The yeasts, A taxonomic study*, Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Larcher, R.; Nicolini, G.; Bertoldi D.; Nardin, T. (2008) Determination of 4-ethylcatechol in wine by high-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical array detection, *Analytica Chymica Acta*, **609**, 235-240.
- Laureano, P.; D'Antuono, I.; Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M. e Loureiro, V. (2005) Efeito de diferentes tratamentos de sanificação na população de *Dekkera bruxellensis* isolada da madeira de barricas.
- Lema, C.; Garcia-Jares, C.; Orriols, I.; Angulo, L. (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma, *Am J Enol Vitic*, **47**, 206-216.
- Lepe, J. S. (1995) Aromas de fermentación, defectos olfativos y metabolismo microbiano, In XXI Congreso mundial de la vna y el vino, 75ª Asamblea General de la O. I. V., Uruguay.
- Licker, J. L.; Acree, T. E. & Henick-Kling, T. (1998) What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation, In: Waterhouse, A.L. & Ebeler, S.E. (eds), *Chemistry of wine flavour*. ACS symposium series. Am. Chem. Soc., Washington, DC, 96-115.
- López, R.; Aznar, M.; Cacho, J.; & Ferreira, V. (2002) Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, **966**, 167-177.
- Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M. (2006) *Dekkera/Brettanomyces* spp. Chapter 13, In: Blackburn, C. de W. (ed), *Food spoilage microorganisms*, Woodhead Publishing Ltd, Abington, Cambridge, UK., 353-398.
- Loureiro, V.; Malfeito-Ferreira, M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry, *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 23 - 50.
- Malfeito-Ferreira, M.; Barata, A.; Loureiro, V. (2009) Volatile Phenols In: *Wine Chemistry and Biochemistry*, 514 -515, 626-635.
- Malfeito-Ferreira, M.; Barata, A.; Nobre, A.; Tavares, M.; Dias, L.; Pereira-da-Silva, S.; Gonçalves, G.; Rodrigues, N. e Loureiro, V. (2004) "Behavior of *Brettanomyces bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* in wines", In: Proc. *Brettanomyces* seminar presented at ASEV 55th Annual Meeting, San Diego, California, 31.
- Malfeito-Ferreira, M.; Rodrigues, N.; Loureiro, V. (2001) The influence of oxygen on the "horse sweat taint" in red wines, *Italian Food Bev. Technol.*, **24**, 34-38.
- Maga, J. A. (1978) Simple phenol and phenolic compounds in food flavor, *Crit Rev Food Sci*, **10**,323-372.
- Makris, D.P.; Kallithraka, S.; & Mamalos, A. (2006) Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents, *Talanta*, **70**, 1143-1152.
- Margalit, Y. (1997) *Concepts in wine chemistry*, The Wine Appreciation Guild Ltd, South San Francisco, California, USA.
- Martens, H., Iserentant, D., & Verachtert, H. (1997) Microbiological aspects of a mixed yeast-bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale, *Journal of the Institute of Brewing*, **103**, 85-91.

- Martorell, P.; Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Fernandez-Espinar, M. T.; Loureiro, V.; Querol, A. (2006) Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources, *Int J Food Microbiol*, **106**:79–84.
- Marx, R.; Zimmer M.; Otteneder, H.; Brakowiecka-Sassy, B.; Fauhl, C.; Wittkowski R. (2003) Besonderheiten des anthocyanspektrums der rebsorte “Pinotage”, *Mitt. Klosterneuburg*, **53**, 153-158.
- Miller, J. C.; Miller, J. N. (1993) *Statistics for Analytical Chemistry*, Chichester, Ellis Horwood ed., Third edition.
- Mok, C.; Song, K.T.; Park, Y.S.; Lim, S.; Ruan, R. & Chen, P. (2006) High hydrostatic pressure pasteurization of red wine. *J. Food Sci.* **71**, 265-269.
- Monagas, M.; Núñez, V.; Begoña, B.; Gómez-Cordovés, C. (2003) Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo and Cabernet-Sauvignon wines produced in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**, 163-169.
- Morrissey, W. F., Davenport, B., Querol, A., & Dobson, A. D. W. (2004) The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations, *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 647–655.
- Murat, M. L. e Dumeau, F. (2003) Impact of fining on population levels of certain spoilage microorganisms in red wines, *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, **478**, 92–94.
- Oelofse, A.; Pretorius, I.S.; du Toit, M. (2008) Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **29**(2), 128-144.
- Oliveira, J. M. M. (2000) Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho, Tese de Doutorado, Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica.
- Ough, C.S. (1983) Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonate, In: Branen, A.L. & Davidson, P.M. (eds). *Antimicrobials in foods*, New York/Basel: Marcel Dekker, 299-325.
- Patão, R. C. F. (2007) Os Ácidos Hidroxicinâmicos como Precursores de Fenóis Voláteis em Vinhos Tintos, Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico.
- Pérez-Prieto, L. J.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A.; Pardo- Mínguez, F.; e Gómez-Plaza, E. (2003) Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(18), 5444–5449.
- Peynaud, E. (1981), “Conhecer e Trabalhar o vinho”, Paris.
- Peynaud, N.; Blouin, J. (1997) O gosto do vinho In O grande livro da prova, Lisboa, Litexa Editora.
- Peynaud, E.; Domercq, S. (1956) Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et des vins, *Archiv für Mikrobiologie*, **24**, 266–280.
- Phister, T. G. e Mills, D. A. (2003) Real-Time PCR assay for the detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7430-7434.
- Pollnitz, A. P.; Pardon, K. H. e Sefton, M. A. (2000) 4-Ethylphenol, 4-ethylguaiacol and oak lactones in Australian red wines. *Aus. Grapegrow. Winemaker*, **438**, 45-52.
- Pollnitz, A. P.; Pardon, K. H.; & Sefton, M. A. (2000) Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wines, *Journal of Chromatography A*, **874**(1), 101–109.
- Porret, N.A.; Schneider, K.; Hesford, F.; & Gafner, J. (2004) Früherkennung unerwünschter Mikroorganismen im wein: *Brettanomyces bruxellensis*, *Schweiz. Z. Obst-Weinbau*, **6**, 13–15.

- Pérez-Magariño, S. e González-San José, M.L. (2005) Effect of ripening stage of grapes on the low molecular weight phenolic compounds of red wines, *Eur. Food Res. Technol.*, **220**, 597–606.
- Pretorius, I. S.; Van der Westhuizen, T. J.; Augustyn, O. P. H. (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry, *South African Journal of Enology and Viticulture*, **20**, 61-74.
- Puig, A.; Vilavella, M.; Daoudi, L.; Guamis, B. & Minguez, S. (2003) Microbiological and biochemical stabilization of wines by application of high pressure processing. *Bull. de l'OIV*, **76**, 596-617.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*, **16**, 675-729.
- Querol, A., Jiménez, M. & Huerta, T. (1990) Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape harvests in the region of Alicante, Spain. *J. Food Sci.*, **55**, 1603-1606.
- Renouf, V.; Strehaiano, P. e Lonvaud-Funel, A. (2007) Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine, *Food Control*, **19**, 208-216.
- Renouf, V.; Perello, M.C.; Strehaiano, P. & Lonvaud-Funel, A.; (2006b) Global survey of the microbial ecosystem during alcoholic fermentation in winemaking, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **40**, 101-106.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donéche, B. e Lonvaud, A. (2000) The use of sulfur dioxide in must and wine treatments, In: Ribéreau-Gayon, P. (ed), *Handbook of Enology Vol. 1, The Microbiology of Winemaking*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 179-205.
- Ribéreau-Gayon P., Glories, Y.; Maujean A.; Dubourdieu D. (2006) Chemical Nature, Origins and Consequences of the Main Organoleptic Defects In *Handbook of Enology Vol. 2 – The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons Ltd., 242-256.
- Ribéreau-Gayon P., Glories, Y.; Maujean A.; Dubourdieu D. (2000) Varietal aroma In *Handbook of Enology Vol. 2 – The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons Ltd., 187-206.
- Ribéreau-Gayon, P. e Stonestreet E. (1965) Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.*, **9**, 2649-2652.
- Rodrigues, N.; Gonçalves, G.; Pereira-da-Silva, S.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2001) Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces* spp., *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 588–599.
- Romano, P.; Fiore, C.; Paraggio, M.; Caruso, M.; Capece, A. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour, *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 169–180.
- Romano, P. e Suzzi, G. (1992) Sulfur dioxide and wine microorganisms, In: Fleet, G.H. (ed). *Wine technology and Biotechnology*, Harwood, Academic Publishers, Chur, Suisse, 373-393.
- Ruiz-Hernández, M. (2003) Casein for correction of defects caused by *Brettanomyces* and *Dekkera*. *Semana Vitivinícola*, **58**, 1462–1463.
- Scheffers, W. A. (1961) On the inhibition of alcoholic fermentation in *Brettanomyces* yeasts under anaerobic conditions, *Experientia*, **17**, 40–42.
- Seeley J.V.; Seeley, S.K. (2007) Model for predicting comprehensive two-dimensional gas chromatography retention times, *Journal of Chromatography A*, **1172**, 72-83.
- Shinohara, T.; Kubodera, S.; Yanagida, F. (2000) Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 90–97.

- Schwartz, M.; Wabnitz, T. C.; Winterhalter, P. (2003) Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agr. Food Chem.*, **51**, 3682-3687.
- Smith, C.R. (1996) Studies of sulfur dioxide toxicity for two wine yeasts. University of California, Davis.
- Smith, M. T.; Yamazaki, M.; Poot, G. A. (1990) Dekkera, Brettanomyces and Eeniella-electrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology, *Yeast*, **6**, 299-310.
- Snowdon, E. M.; Bowyer, M. C.; Grbin, P. R.; Bowyer, P. K. (2006) Mousy offflavor: a review, *J Agric Food Chem*, **84**, 6465-6474.
- Spaepen, M.; Verachtert, H. (1982) Esterase-activity in the genus Brettanomyces, *J Inst Brew*, **88**, 11-17.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sorensen, 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, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 938-941.
- 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 Chem.*, **102**, 10-21.
- Swaffield, C. H.; Scott, J. A. (1995) Existence and development of natural microbial populations in wooden storage vats used for alcoholic cider maturation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **53**, 117-120.
- Swiegers, J.H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I.S.; (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**, 139-173.
- Swiegers, J. H.; Pretorius, I. S. (2005) Yeast modulation of wine flavour, *Advances in Applied Microbiology*, **57**, 131-175.
- Taillandier, P. (2007) Humidité et azote, des facteurs aggravants, *La Vigne*. No. 189 de Juillet-Aout, 50.
- Teoh, Ai Leng, Heard, G., & Cox, J. (2004) Yeast ecology of kombucha fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, **95**, 119-126.
- Threlfall, R.T. e Morris, J.R. (2002) Using dimethyldicarbonate to minimize sulfur dioxide for prevention of fermentation from excessive yeast contamination on juice and semi-sweet wine. *J. Food Sci.*, **67**, 2752-2758.
- Toit, M. e Pretorius, I. S. (2000) Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review, *South African Journal for Enology and Viticulture*, **21**, 74-92.
- Ugarte, P.; Agosin, E.; Bordeu, E. e Villalobos, J.I. (2005) Reduction of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiaicol concentration in red wines using reverse osmosis and adsorption. *Am. J. Enol. Vitic.*, **56**, 30-36.
- van Beek, S.; Priest, F. G. (2000) Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation, *App Environ Microbiol*, **66**, 5322-5328.
- van der Walt, J. P. (1984a) Discussion of the genera belonging to the ascosporeogenous yeasts: genus 8: Dekkera van der Walt, In: KREGGER-van RIJ. N.J.W. (Ed.), *The Yeast a taxonomic study*, Amsterdam: Elsevier Science, 146-151.
- van der Walt, J. P.; van Kerken, A. E. (1958) Part I. The wine yeasts of the Cape, A taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines, *Ant Van Leeuw Int J Gen Mol Microbiol*, **24**, 239-252.
- van der Walt, J. P. e van Kerken, A. E. (1961) The wine yeasts of the Cape. Part V. Studies on the occurrence of *Brettanomyces schanderlii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **27**, 81-90.

Williams, P. J.; Sefton, M. A.; Wilson, B. (1989) Nonvolatile conjugates of secondary metabolites as precursors of varietal grape flavour components In *Flavour Chemistry, Trends and Developments*, American Chemical Society, Washington, DC, 35–48.

Wright, J. M.; Parle, J. N. (1973) *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **17**, 273–278.

Wyder, M. T., Spillmann, H., & Puhán, Z. (1997) Investigation of the yeast flora in dairy products: a case study of kefir, *Food Technology and Biotechnology*, **35**, 299–304.

Yap, A.; Jiraneck, V.; Grbin, P.; Barnes, M. e Bates, D. (2007) Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection, *Aus. Wine Ind. J.*, **22**, 96-104.

Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Cayuela, J. M.; Martínéz-Cachá, A.; Pardo, F.; Nicolás, J. M. L.; Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 4694-4700.

ANEXOS

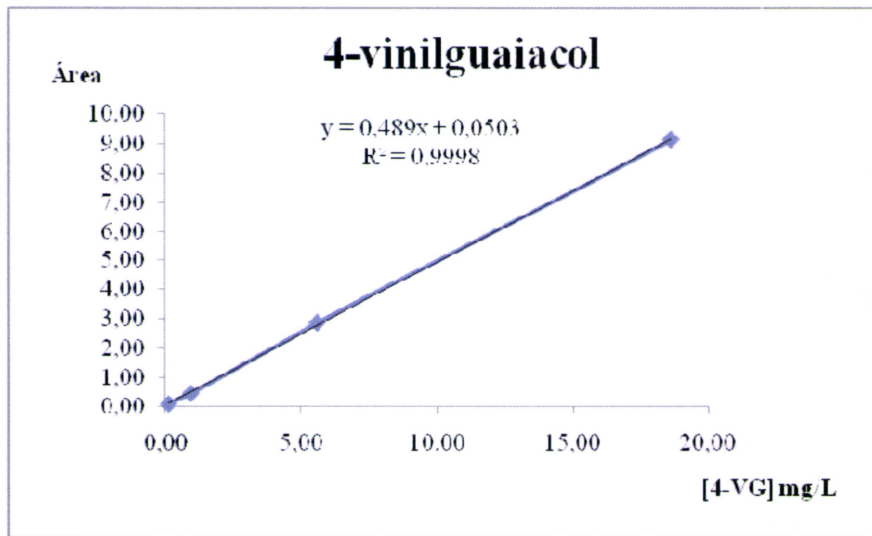


Figura 21 – Representação gráfica da recta de calibração para o 4-vinilguaiaicol.

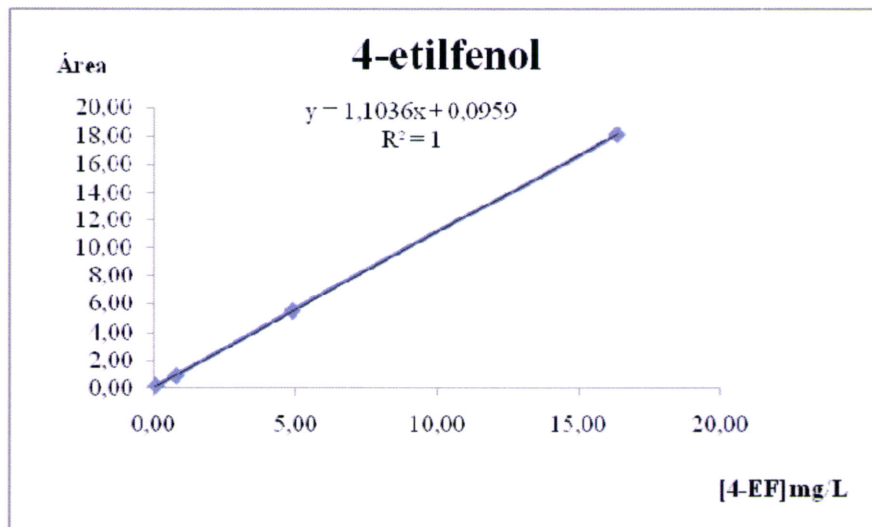


Figura 22 – Representação gráfica da recta de calibração do 4-etilfenol.

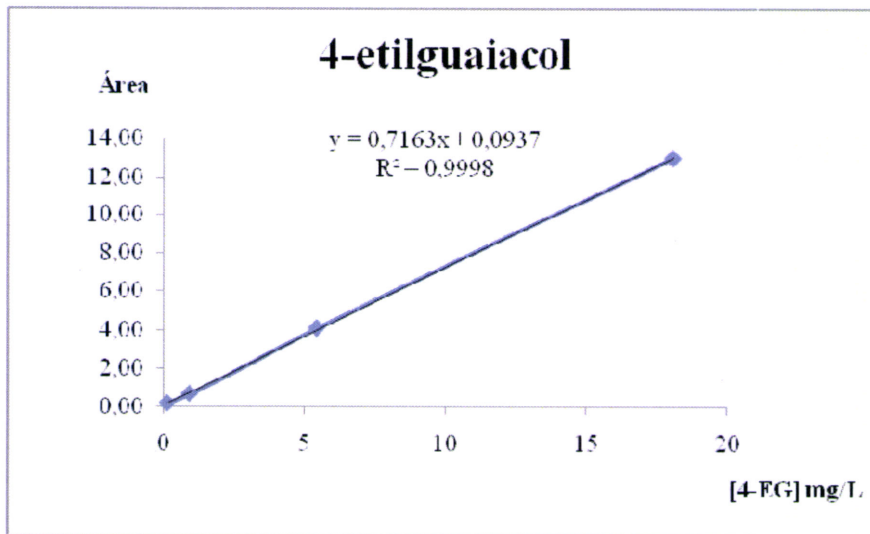


Figura 23 – Representação gráfica da recta de calibração do 4-etilguaiacol.

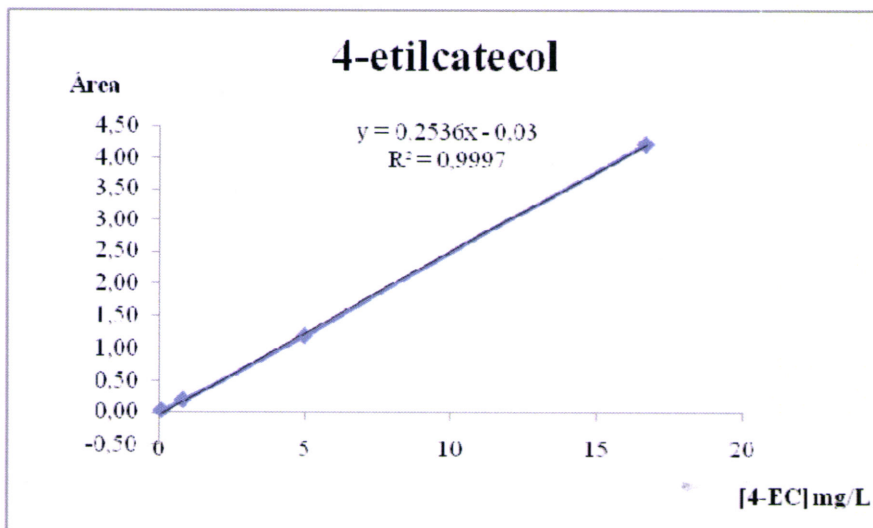


Figura 24 – Representação gráfica da recta de calibração do 4-etilcatecol.