

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SAMARINA RODRIGUES WLODARCZYK

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS PROVENIENTES DO MUNICÍPIO
DE PINTO BANDEIRA (RS) E DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA (PR)**

**CURITIBA
2013**

SAMARINA RODRIGUES WLODARCZYK

CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE PINTO BANDEIRA (RS) E DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA (PR)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Comitê de orientação: Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim

Dr.^a Debora Brand

Dr. Gildo Almeida da Silva

**CURITIBA
2013**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me manter firme em todos os momentos.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e a seus professores pelo aprendizado.

A toda equipe da Embrapa Uva e Vinho (CNPUV), em Bento Gonçalves, pela realização deste trabalho.

Às professoras Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim e Dr.^a Debora Brand pela orientação, confiança e oportunidade.

Ao Dr. Gildo Almeida da Silva, pela orientação e sua grande contribuição em minhas formações pessoal e profissional e por ter me recebido em seu laboratório.

À minha família pelo amor e apoio incondicional.

Aos amigos e parceiros de trabalho dos laboratórios de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações, na UFPR, e Microbiologia, no CNPUV, pelo auxílio, amizade e incentivo.

À Bruna Agustini, pela amizade, companheirismo, positivismo e colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos de Bento Gonçalves, pelo apoio e pelos momentos de alegria e descontração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

*Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso, aprendemos sempre.*

Paulo Freire

RESUMO

O uso de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas facilita o controle do processo fermentativo, reduzindo diferenças na qualidade do vinho de uma safra para a outra. Entre as características básicas de uma linhagem selecionada estão a alta taxa fermentativa, produção baixa ou nula de H₂S e neutralidade quanto ao fator *killer*. Leveduras autóctones, isoladas da própria região de elaboração do vinho, são preferidas por estarem melhores adaptadas às uvas da região e conferirem tipicidade ao produto. No Brasil, o vinho é elaborado em diversas regiões, como a Serra Gaúcha, no RS, principal polo vitivinícola, Vale do São Francisco, Pernambuco/Bahia, e a região Metropolitana de Curitiba, no PR. Esta última é caracterizada pela elaboração artesanal de vinho. Nestas regiões, há crescente demanda por linhagens selecionadas autóctones. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil enológico de 175 leveduras isoladas da região metropolita de Curitiba, no PR, nos anos de 2003 e 2012, e do município de Pinto Bandeira, no RS, quanto aos aspectos enológicos favoráveis à elaboração de vinho. Paralelamente, foram feitas a validação do meio Lorena/ELNC (80:20) quanto à detecção do fator *killer* e tentativas de melhoria de tecnologia para isolamento e detecção dos plasmídeos *killer*, responsável pelo fenótipo K⁺R⁺ em leveduras vínicas. A produção e detecção do fator *killer* e as características sensível e neutra foram avaliadas, em triplicata, em meio sólido Lorena/ELNC (80:20). A velocidade fermentativa e a produção de H₂S foram avaliadas, em triplicata, em meio mosto sulfito. As linhagens com perfil para a elaboração de vinhos e fenótipo *killer* foram identificadas por amplificação da região ITS1- 5.8S-ITS2 por PCR. Os resultados mostraram que a maioria das linhagens apresentou baixa velocidade fermentativa, baixa ou nula produção de H₂S e fenótipo K⁺R⁺. De um total de 120 leveduras isoladas, foram obtidas 16 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com perfil enológico para o município de Pinto Bandeira. Nenhuma linhagem, dentre as 42 isoladas na região metropolitana de Curitiba, em 2012, mostrou aptidão para a elaboração de vinho. Apenas uma levedura isolada em 2003 apresentou perfil enológico adequado. Uma linhagem de cada região foi escolhida para vinificar mosto Pinot Noir, para avaliar as características físico-químicas dos vinhos elaborados. Foram analisados o teor alcoólico, açúcares redutores totais residuais, acidez volátil e pH. Em cinco dias os vinhos já se encontravam secos, com menos de 3 g.L⁻¹ de ART, restando apenas a realização da fermentação malolática. A análise de compostos voláteis e minerais revelou, respectivamente, acentuada concentração produção de alguns álcoois superiores e alto teor de Zn. Dessa forma, as leveduras autóctones aqui isoladas e selecionadas devem conferir vantagem sobre a fermentação espontânea tradicional por elaborarem vinhos de qualidade, com a certeza de que metabólitos secundários indesejados não serão produzidos. A metodologia para o isolamento do plasmídeo responsável pela produção do fator *killer* foi modificada, porém novos estudos devem ser feitos para reduzir o tempo de execução.

Palavras-chave: Leveduras selecionadas *Saccharomyces cerevisiae*; vinho; fator *killer*.

ABSTRACT

The use of selected *Saccharomyces cerevisiae* yeasts allows the control of the fermentation process, reducing the differences in the wine quality from one harvest to another. Among the basic characteristics of selected strain are the high fermentation rate, low or absent production of H₂S and neutrality regarding the *killer* factor. Autochthonous yeasts, isolated from the own winemaking region, are preferred for being better adapted to the grapes of the region and confer typicity to the product. In Brazil, the wine is elaborated in several regions, such as the Serra Gaucha, which is the main wine pole, Vale do São Francisco, PE/BA, and the Metropolitan region of Curitiba, PR. This one is characterized by artisan winemaking. In these regions, there is growing demand for autochthonous selected strains. In this context, the goal of the present work was to evaluate the enological profile of 175 yeasts isolated from metropolitan region of Curitiba, PR, in the years 2003 and 2012, and from Pinto Bandeira, RS, in 2012, concerning the oenological favorable aspects to the elaboration of wine. In addition, it was performed the validation of the Lorena/ELNC (80:20) medium, with regard to the detection of the *killer* factor, and attempts of the improvement of the technology for isolating and detecting the *killer* plasmids, responsible for the K⁺R⁺ phenotype in wine yeasts. The production and detection of the *killer* factor and the sensitive and neutral characteristics were evaluated, in triplicate, in Lorena/ELNC (80:20) solid medium. The fermentation rate and the H₂S production were evaluated, in triplicate, in sulfite must medium. Strains with profile for winemaking and with *killer* phenotype were identified by PCR ITS1-5.8-ITS2 region amplification. The results showed that the majority of the strains presented low fermentation rate, low or absent H₂S production and phenotype K⁻R⁺. In a total of 120 isolated yeasts, there were obtained, in 2012, 16 strains of *Saccharomyces cerevisiae* with oenological profile for the region of Pinto Bandeira. None strain, among the 42 isolated in the Curitiba Metropolitan region in 2012, proved suitable for the elaboration of wine. Only one yeast isolated in 2003 presented suitable enologic profile. One strain of each region was chosen to vinify Pinot Noir grape to evaluate the physical and chemical characteristics of wines. There were analysed alcohol content, total reducing residual sugar, volatile acidity and pH. In five days the wines were dry, with less than 3 g.L⁻¹ TRS, remaining only the completion of malolactic fermentation. The analysis of the volatile compounds and minerals revealed, respectively, marked concentration of some higher alcohols and high content of Zn. Thus, the autochthonous yeasts, here isolated and selected, must confer advantage over traditional spontaneous fermentation by elaborating quality wines, with the certainty that undesirable secondary metabolites are not produced. The methodology for the isolation of plasmid responsible for producing the *killer* factor was modified, but further studies must be made to reduce the execution time.

Keywords: selected *Saccharomyces cerevisiae* yeasts; wine; *killer* factor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	MAPA DO ORIENTE PROXIMO MOSTRANDO SÍTIOS ARQUEOLÓGICOS ONDE HÁ EVIDÊNCIA DE PRODUÇÃO DE VINHO.....	18
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO L-A dsRNA E M-dsRNA.....	26
FIGURA 3 -	PROCESSAMENTO E SECREÇÃO DA PROTEÍNA <i>KILLER</i>	29
FIGURA 4 -	VIA DE PRODUÇÃO DE H ₂ S PELA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
FIGURA 5 -	MECANISMOS DE FLOCULAÇÃO DE ACORDO COM A TEORIA DA LECTINA.....	39
FIGURA 6 -	LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 NO rDNA NUCLEAR.....	42
FIGURA 7 -	PRODUÇÃO DE H ₂ S PELAS LEVEDURAS ISOLADAS NOS ESTADOS DO PARANÁ E DO RIO GRANDE DO SUL.....	63
FIGURA 8 -	NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H ₂ S POR LINHAGENS ISOLADAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NA SAFRA DE 2003 E NA SAFRA DE 2012	65
FIGURA 9 -	NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H ₂ S POR LINHAGENS ISOLADAS NO MUNICÍPIO DE PINTO BANDEIRA DAS CULTIVARES TANNAT, CABERNET FRANC E ANCELLOTTA.....	66
FIGURA 10 -	COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H ₂ S PELAS LEVEDURAS DE ACORDO COM A SAFRA E LOCALIDADE DE ISOLAMENTO.....	68
FIGURA 11 -	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS A PARTIR DA CULTIVAR ANCELLOTTA, REPRESENTANDO AS LINHAGENS DE A1 A A18.....	69
FIGURA 12 -	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS A PARTIR DA CULTIVAR ANCELLOTTA, REPRESENTANDO AS LINHAGENS DE A21 A A40.....	70

FIGURA 13 -	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS A PARTIR DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NA SAFRA DE 2003, REPRESENTANDO AS LINHAGENS 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49 E 51.....	71
FIGURA 14 -	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM CB1.031.71, ISOLADA NA SAFRA DE 2012.....	71
FIGURA 15 -	INTENSIDADE DE FLOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	72
FIGURA 16 -	INTENSIDADE DE FLOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO DE PINTO BANDEIRA NO RIO GRANDE DO SUL, REPRESENTADA PELA CULTIVAR ANCELLOTTA E DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA (SAFRAS 2003 E 2012).....	74
FIGURA 17 -	VELOCIDADE MÉDIA DE SEDIMENTAÇÃO DA LEVEDURA A38.....	76
FIGURA 18 -	VELOCIDADE MÉDIA DE SEDIMENTAÇÃO DA LEVEDURA 27.....	77
FIGURA 19 -	DETECÇÃO DO FATOR <i>KILLER</i> EM LINHAGENS ISOLADAS A PARTIR DA CULTIVAR CABERNET FRANC..	78
FIGURA 20 -	LEVEDURAS CONSIDERADAS <i>KILLER</i> NO MEIO YEPD 2% E LORENA/ELNC (80/20) PELO TESTE CÉLULA/CÉLULA.....	80
FIGURA 21 -	RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE/NEUTRALIDADE COM AS LINHAGENS 712, T16 E T17 ISOLADAS DA CULTIVAR TANNAT.....	81
FIGURA 22 -	LINHAGENS QUE APRESENTARAM MAIOR HALO DE INIBIÇÃO DE ACORDO COM A TEMPERADURA DE INCUBAÇÃO E MEIO DE CULTURA.....	85
FIGURA 23 -	HALOS DE INIBIÇÃO FORMADOS PELAS PROTEÍNA <i>KILLER</i> DAS LINHAGENS PADRÕES K1, 1B E 91B E DAS TESTADAS CB1.041.04, CB1.041.26 NOS MEIOS LORENA/ELNC (80:20) E YEPD À 24°C.....	86
FIGURA 24 -	INTERAÇÃO ENTRE LEVEDURAS <i>KILLER</i>	89
FIGURA 25 -	TESTE DE EXTRAÇÃO DE dsRNA SEM FENOL E SEM SDS.....	92
FIGURA 26 -	TESTE DE EXTRAÇÃO DE dsRNA COM FENOL.....	93

FIGURA 27 -	COMPARAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ORIGINAL COM TÉCNICAS SEM ACETATO DE SÓDIO, FENOL ACIDIFICADO E FENOL ACIDIFICADO SEM ESTAPA DE ADIÇÃO LiCl 2M.....	96
FIGURA 28 -	COMPARAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ORIGINAL COM PROTOCOLOS COM FENOL ACIDIFICADO COM HCl EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E PROTOCOLO SEM FENOL.....	97
FIGURA 29 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DA EXTRAÇÃO DE dsRNA DAS LEVEDURAS 26B E 1B.....	99
FIGURA 30 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DA REGIÃO rDNA ITS1-5.8S-ITS2 AMPLIFICADA PELOS INICIADORES ITS1 E ITS4 DE LINHAGENS ISOLADAS DA CULTIVAR ANCELLOTTA.....	102
FIGURA 31 -	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DE LEVEDURAS <i>KILLER</i> ISOLADAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NA SAFRA DE 2012.....	104
FIGURA 32 -	QUALIDADE AROMÁTICA DE LINHAGENS COM CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DESEJÁVEIS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS.....	105
FIGURA 33 -	PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DO VINHO ELABORADO COM A LINHAGEM 27 EM CROMOTOGRAFIA GASOSA COM DESTAQUE PARA O PADRÃO INTERNO (SETA).....	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ÁREA PLANTADA NO BRASIL DE VIDEIRAS (EM HECTARES).....	20
TABELA 2 -	LEVEDURAS ISOLADAS DO PARANÁ E DO RIO GRANDE DO SUL.....	49
TABELA 3-	LEVEDURAS COM ALTA INTENSIDADE DE FLOCULAÇÃO.....	74
TABELA 4-	RESULTADOS DOS FENÓTIPOS SENSÍVEL, <i>KILLER</i> , NEUTRO DO TOTAL DE LINHAGENS ISOLADAS EM MEIO LORENA/ELNC (80:20).....	82
TABELA 5-	COMPARAÇÃO DOS FENÓTIPOS ENCONTRADOS NOS MEIOS LORENA/ELNC (80:20) E YEPD DE LINHAGENS ISOLADAS NA SAFRA DE 2003.....	83
TABELA 6-	INTERAÇÃO ENTRE LEVEDURAS <i>KILLER</i>	90
TABELA 7-	RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO DE PINTÓ BANDEIRA.....	101
TABELA 8-	RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA..	103
TABELA 9-	RESULTADO DAS ANÁLISES DE AÇÚCAR RESIDUAL, TEOR ALCOÓLICO, ACIDEZ VOLÁTIL E pH NOS VINHOS ELABORADOS COM AS LINHAGENS A38, 27 E 1 VVT/97..	106
TABELA 10-	RESULTADO DO TEOR DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS NOS VINHOS ELABORADOS COM AS LINHAGENS 1 VVT/97, 27 E A38.....	109
TABELA 11-	TEORES DE CÁTIONS NOS VINHOS ELABORADOS COM A CULTIVAR PINOT NOIR E AS LINHAGENS A A38, 27 E 1 VVT/97.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- °GL: grau Gay-Lussac (porcentual volumétrico de etanol em solução)
- ADP: adenosina difosfato
- ART: açúcares redutores totais
- APS: 5-adenilil-sulfato
- ATP: trifosfato de adenosina
- dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados
- dsRNA: ácido ribonucleico de dupla fita
- ELNC: extrato de levedura não comercial
- EDTA: ácido etilenodiamino-tetra-acético
- ETS: espaçador externo transcrito
- IG: indicação geográfica
- IGS: espaçador intergênico
- ITS: espaçador interno transcrito
- LP: limiar de percepção
- NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- NPA: nitrogênio prontamente assimilável
- PAPS: 3-fosfo-5-adenilil-fosfato
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- RFLP: polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
- rRNA: RNA ribossomal
- rDNA: DNA ribossomal
- RNase A: ribonuclease A
- SAS: soma dos álcoois superiores
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- Tris: tris (hidroximetil)-aminometano
- TBE: solução tamponante Tris-Borato-EDTA
- TRS: açúcares redutores totais (do inglês, *total reducing sugars*) ou ART
- YEPD: meio de cultivo para leveduras (do inglês, *yeast extract, peptone, dextrose*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	HISTÓRIA DA PRODUÇÃO E CONSUMO DA UVA E DO VINHO..	17
3.2	PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE UVAS E VINHOS NO BRASIL.....	19
3.3	MATÉRIA – PRIMA: UVAS PARA ELABORAÇÃO DE VINHOS.....	20
3.4	AGENTES TRANSFORMANTES: LEVEDURAS.....	21
3.4.1	Leveduras selecionadas.....	22
3.5	CARACTERÍSTICA <i>KILLER</i>	23
3.5.1	Característica <i>killer</i> da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3.5.2	Multiplicação do L-A dsRNA e M-dsRNA na levedura.....	24
3.5.3	Técnicas de extração de dsRNA citoplasmático.....	26
3.5.4	Processamento da toxina <i>killer</i> pela levedura.....	28
3.5.5	Modo de ação da toxina <i>killer</i>	29
3.5.6	Condições para expressão do Fator <i>killer</i>	30
3.5.7	Distribuição de leveduras <i>killer</i> na natureza	31
3.5.8	Detecção do fenótipo <i>killer</i>	33
3.6	METABOLISMO.....	34
3.7	PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO.....	35
3.8	CAPACIDADE DE FLOCULAR ESPONTANEAMENTE.....	37
3.9	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS.....	40
3.10	VINIFICAÇÃO.....	42
3.10.1	Principais compostos monitorados durante a vinificação.....	44
3.10.1.1	Etanol.....	44
3.10.1.2	Açúcar.....	45
3.10.1.3	Compostos Voláteis	46
3.10.1.4	Ácidos Voláteis.....	47
3.10.1.5	Cátions.....	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	OBTENÇÃO DE CULTURAS.....	49
4.2	CONSERVAÇÃO DAS CULTURAS.....	50
4.3	ISOLAMENTO E ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	51
4.4	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS.	51
4.4.1	Avaliação da produção de Sulfeto de Hidrogênio.....	51
4.4.2	Avaliação da velocidade de fermentação.....	52
4.4.3	Avaliação da capacidade de floculação espontânea.....	52
4.4.4	Velocidade de sedimentação da levedura.....	52
4.4.5	Avaliação da característica <i>killer</i>	53
4.4.5.1	Detecção do fator <i>killer</i>	53
4.4.5.2	Sensibilidade e neutralidade ao fator <i>killer</i>	53
4.4.5.3	Validação do meio Lorena/ELNC (80:20) quanto à produção de fator <i>killer</i> e teste <i>killer</i> proteína/célula.....	54

4.4.6	Análise sensorial.....	55
4.5	MELHORIA NO PROCESSO METODOLÓGICO PARA A DETECÇÃO DE PARTÍCULAS SEMELHANTE A VÍRUS DE LEVEDURAS (VLP) POR ELETROFORESE.....	55
4.5.1	Extração de ácidos nucleicos totais.....	55
4.5.2	Extração de dsRNA de leveduras.....	56
4.5.3	Confirmação da extração de dsRNA.....	57
4.6	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS	57
4.6.1	Extração do DNA.....	57
4.6.2	Amplificação da região Rdna ITS e sua confirmação.....	57
4.7	VINIFICAÇÃO COM LEVEDURAS SELECIONADAS.....	58
4.7.1	Vinificação em escala laboratorial.....	58
4.7.2	Análises físico-químicas.....	59
4.7.2.1	Determinação de açúcares redutores.....	59
4.7.2.2	Determinação do teor alcoólico.....	60
4.7.2.3	Acidez volátil.....	60
4.7.2.4	Compostos voláteis.....	60
4.7.2.5	Análise de cátions.....	61
4.7.2.6	Análise do potencial hidrogeniônico.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	TESTE DE PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO.....	63
5.2	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO.....	68
5.3	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO ESPONTÂNEA.....	72
5.4	VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	75
5.5	DETECÇÃO DO FATOR <i>KILLER</i>	77
5.6	SENSIBILIDADE E NEUTRALIDADE AO FATOR <i>KILLER</i>	84
5.7	VALIDAÇÃO DO MEIO LORENA/ELNC (80:20) QUANTO À PRODUÇÃO DO FATOR <i>KILLER</i> E TESTE PROTEÍNA/CÉLULA...	85
5.8	INTERAÇÃO ENTRE LEVEDURAS <i>KILLER</i>	88
5.9	EXTRAÇÃO DE dsRNA CITOPLASMÁTICO.....	91
5.10	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	99
5.11	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS VINHOS.....	105
5.11.1	Determinação de açúcar residual, teor alcoólico, acidez volátil e pH.....	105
5.11.2	Compostos voláteis.....	108
5.11.3	Minerais.....	111
6	CONCLUSÃO.....	116
7	REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

Os vinhos elaborados no Brasil têm apresentado cada vez mais posição de notoriedade. O selo de indicação geográfica atribuído a vinhos finos brasileiros é o maior exemplo desta posição. A mais recente notícia de notoriedade está no fato de o Vale dos Vinhedos, no Rio Grande do Sul (RS), passar para a história como a primeira Indicação de Procedência (IP) e a primeira Denominação de Origem (DO) de vinhos do Brasil. Estes avanços garantem o estabelecimento de padrões mínimos de qualidade e melhoram a imagem da produção de vinhos nacionais (PROTAS; CAMARGO, 2011).

A Serra Gaúcha é a principal região vitivinícola do país. Está localizada no Rio Grande do Sul, estado que concentra 90% da produção nacional de vinhos (MELLO, 2011). A maioria da mão-de-obra empregada na viticultura é familiar (PROTAS; CAMARGO, 2011), constituindo uma atividade econômica adequada para a sustentabilidade de pequenas propriedades agrícolas (AGUSTINI, 2011). A atividade vitivinícola familiar também está presente em outras localidades, como na região metropolitana de Curitiba, no estado do Paraná, destacando-se pela elaboração de artesanal de vinhos (LIMA, 2011).

Como consequência desse cenário, algumas regiões têm investido em tecnologia para o processamento da uva em geral e, em especial, para a elaboração do vinho. Duas unidades da Embrapa, o Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, no RS, e Embrapa Semi-árido, no Vale do São Francisco em Petrolina, PE, se destacam no desenvolvimento e transferência de tecnologia ao vitivinicultor (CNPUV, 2012; CPATSA, 2012). No Paraná foi firmada uma cooperação por meio de um projeto de extensão entre a Universidade Federal do Paraná e a comunidade produtora de vinho da região metropolitana de Curitiba com o objetivo de orientar produtores da região sobre técnicas de elaboração de vinho (BONFIM *et al.*, 2002).

Dois são os itens básicos para a elaboração de vinhos de qualidade, a matéria-prima, a uva, e o agente transformante, a levedura. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* devem receber atenção especial, pois são elas as principais responsáveis pela transformação do mosto de uva em vinho. Neste

processo, uma série de produtos fará parte da composição química e dos aspectos organolépticos do produto final (SILVA *et al.*, 2008a). Como a linhagem selecionada interfere na qualidade do produto final, é necessária uma seleção criteriosa destes agentes transformantes.

O uso de leveduras selecionadas isoladas do próprio vinhedo oferece vantagens em relação ao uso de leveduras comerciais (SILVA *et al.*, 2008b; LOPES *et al.*, 2007). Essas linhagens estão melhores adaptadas às condições climáticas e práticas culturais específicas da região, possuindo propriedades intrínsecas mais adequadas para a elaboração do vinho (SILVA; SILVA, 1987). Dentre estas se destacam: alta capacidade fermentativa, baixa produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) (SILVA, 1999a) e neutralidade quanto ao fator *killer*¹ (SILVA, 1996). Em *Saccharomyces cerevisiae*, esta toxina é codificada por plasmídeo de RNA de fita dupla. Uma forma de caracterizar uma linhagem *killer* efetiva é a indexagem com linhagens sensíveis e outra é o isolamento do plasmídeo responsável pela formação da toxina *killer*. Como as técnicas de isolamento são bastante laboriosas e, muitas vezes, pouco efetivas, um dos objetivos deste trabalho foi estabelecer uma técnica reprodutível, robusta, rápida e de simples execução para detectar tais plasmídeos.

Com o propósito maior de alertar e transferir conhecimento ao pequeno produtor de vinho da região metropolitana de Curitiba, no PR, e disponibilizar leveduras selecionadas para o município de Pinto Bandeira, no RS, este trabalho visou avaliar o perfil enológico das leveduras autóctones, os aspectos que envolvem o fator *killer*, a produção de H₂S e a velocidade de fermentação das linhagens isoladas destas localidades. Isto se justifica pelas dificuldades encontradas pelos vinicultores da região metropolitana de Curitiba, em elaborar vinhos de qualidade e, no caso de Pinto Bandeira, pela falta de uma levedura autóctone selecionada para esta região.

¹Nota: É padrão a utilização da grafia inglesa *killer* para as leveduras produtoras da toxina. Expressão usada em espanhol, português, francês, alemão entre outras línguas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil das 120 leveduras *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do município de Pinto Bandeira (RS) e das 42 isoladas da região Metropolitana de Curitiba (PR), em 2012, e selecionar as mais adequadas para a vinificação. Também foram avaliadas 13 leveduras isoladas na região metropolitana de Curitiba em 2003 (PR).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio;
- b) Avaliação da taxa de fermentação;
- c) Avaliação da capacidade de floculação e velocidade de sedimentação;
- d) Avaliação da característica *killer* e melhoria no processo metodológico para a detecção de partículas semelhantes a vírus de levedura (VLP);
- e) Identificação genotípica por amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 com os primers (iniciadores) ITS1-ITS4 (PCR) de leveduras *killer* e de elevada velocidade de fermentação;
- f) Vinificação empregando as três leveduras selecionadas;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRIA DA PRODUÇÃO E CONSUMO DA UVA E DO VINHO

Uma das principais inovações marcando a transição da sociedade Paleolítica para a Neolítica foi a fermentação intencional de carboidratos em etanol, o que alguns acreditam ser, ao menos, um dos fatores que impulsionaram a domesticação de plantas selvagens e o desenvolvimento de tecnologia cerâmica, mostrando o impacto desta descoberta (BARNARD *et al.*, 2011).

Restos de sementes encontradas no Neolítico e na Europa Ocidental são sugestivas da exploração da uva nesse período (THIS *et al.*, 2006). As primeiras evidências da elaboração de vinho foram encontradas no Irã no sítio de Hajji Firuz Tepe e há 7000-7400 anos atrás (Figura 1) que corresponde a 5000-5400 a.C. A dispersão para áreas vizinhas, como o Egito e a Baixa Mesopotâmia ocorreu há, aproximadamente, 5000-5500 anos atrás, correspondendo a 3000-3500 a.C. (THIS *et al.*, 2006). Mais tarde, o cultivo da uva alcançou o Mediterrâneo, a China e o Japão. Sob influência dos Romanos, a *Vitis vinifera* se expandiu e atingiu regiões temperadas da Europa, sendo que isso, frequentemente, se devia ao acompanhamento das rotas comerciais. No fim do Império Romano, o cultivo de uva já era comum na maioria das regiões onde ele é encontrado hoje. Além disso, é provável que já se diferenciasse uva de mesa e uva usada para elaboração de vinho nessa época. (THIS *et al.*, 2006).

Em tumbas egípcias de 5000 anos, foram encontradas jarras com resíduos que continham DNA de *Saccharomyces cerevisiae*, a principal levedura utilizada no processo de fermentação vínica (HANSSON, FOLEY, 2008). Nessa sociedade, inclusive, o vinho adquiriu importância não apenas social, mas também religiosa. A família real egípcia, assim como a alta sociedade, bebia vinho, o qual também acreditavam ser adequado para as necessidades da vida após a morte. O vinho tinto simbolizava o renascimento do morto, pois era comparado ao sangue do deus Osíris, que foi o primeiro a ressuscitar. Cenas do processo de elaboração do vinho e viticultura foram encontradas na parede de tumbas particulares do Antigo Reinado Egípcio (2575-2150 a.C.) e do Novo Reinado Egípcio (1539 - 1075- a.C.). Na China,

evidências físicas apontam o cultivo de uva nos séculos IV e III a.C, em Xinjiang, por um desenho de uvas impresso em um túmulo no cemitério de Sampula (JIANG *et al.*, 2009).

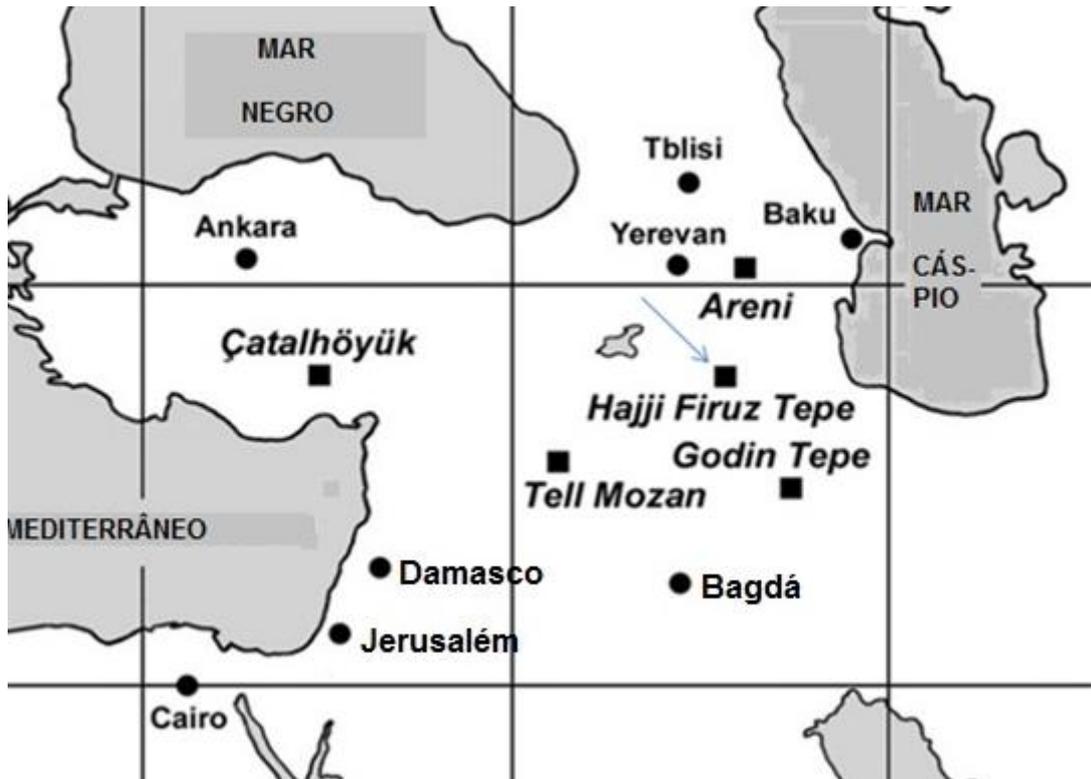


FIGURA 1 - MAPA DO ORIENTE PRÓXIMO (ESQUERDA SUPERIOR) MOSTRANDO SÍTIOS ARQUEOLÓGICOS ONDE HÁ EVIDÊNCIA DE PRODUÇÃO DE VINHO.

FONTE: Barnard (2011)

NOTA: Seta indicando o sítio de Hajji Firuz Tepe no Irã, local onde foram encontradas as primeiras evidências da elaboração de vinho.

3.2 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE UVAS E VINHOS NO BRASIL

O cultivo de uva no Brasil iniciou-se no estado de São Paulo, onde se localizava a Capitania de São Vicente, por volta de 1535, e, posteriormente, propagou-se para os estados da Bahia e de Pernambuco. As missões que vieram da Argentina e se estabeleceram na Capitania do Rio Grande trouxeram as primeiras mudas para esta região, mas as cultivares *Vitis vinifera* não eram resistentes às novas condições ambientais. Por volta de 1830-1840, com a imigração italiana, ocorreu o ressurgimento da viticultura no estado de São Paulo, utilizando, principalmente, *Vitis labrusca*, cultivar Isabel (NUNES, 2008). Entretanto, com o passar do tempo, constatou-se que também é possível cultivar uvas onde há clima com prevalência de altas temperaturas, como no semi-árido brasileiro (CPATSA, 2011).

A vitivinicultura brasileira ocupou, no ano 2007, o 17º lugar mundial em área cultivada com uvas e a 19ª colocação em produção de acordo com dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO). Dados de 2010 também mostram que 43% da uva cultivada no Brasil foi utilizada para a elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, mostrando o potencial da atividade de produção de vinho no país (MELLO, 2011).

Avaliando-se a área plantada com videiras é possível estimar a elaboração de vinhos no território brasileiro (SCHNEIDER, 2006). Na Tabela 1 estão listadas as principais regiões vitivinícolas do país. As regiões que merecem destaque são: Serra Gaúcha (Rio Grande do Sul), Campanha e Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, Vale do Submédio do São Francisco (Pernambuco/Bahia), Vale do Rio do Peixe (Santa Catarina), região Sul de Santa Catarina, Leste e Noroeste de São Paulo, Norte e Sul de Minas Gerais, Norte e Leste do Paraná (IBRAVIN, 2011).

TABELA 1- ÁREA PLANTADA NO BRASIL DE VIDEIRAS (EM HECTARES)

Estado/Ano	2007	2008	2009	2010
Pernambuco	7.137	7.083	7.104	8.801
Bahia	4.096	4.376	3.724	3.273
Minas Gerais	878	911	854	853
São Paulo	11.039	10.77	9.750	9.750
Paraná	5.700	5.800	5.800	5.800
Santa Catarina	4.915	4.836	4.937	5.052
Rio Grande do Sul	48.428	49.819	50.415	50.389
Brasil	84.220	83.552	82.584	83.718

Fonte: Mello (2011)

A comercialização de vinhos e derivados elaborados no Rio Grande do Sul entre janeiro e abril de 2012 foi estimada e comparada com o mesmo período no ano de 2007. No mercado interno, foram comercializados 53.528.301 L de vinho de mesa, representando um aumento de 10,5% em relação ao volume comercializado no mesmo período em 2007. Houve um decréscimo de 21,2% no consumo de vinhos elaborados a partir da variedade *Vitis vinifera*. Entretanto, as exportações de produtos elaborados com essa cultivar cresceram 133,4% no mesmo período (UVIBRA, 2012). Os espumantes apresentaram aumento de 158% na quantidade exportada, o que pode ser um indício da valorização do produto (UVIBRA, 2012; MELLO, 2012).

3.3 MATÉRIA – PRIMA - UVAS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS

Atualmente, há cerca de 10.000 cultivares, as quais surgiram espontaneamente ou por meio de cruzamentos programados (VOUILLAMOZ, GRANDO, 2006). Estas também sofreram mudanças em sua composição e morfologia durante a domesticação, as quais garantiram produção de maior quantidade de açúcar para a fermentação, maior rendimento e regularidade na produção (THIS *et al.*, 2006).

Quanto a novos genótipos de cultivares, estes podem surgir por reprodução sexual, e para evitar uma escolha de duas espécies próximas para cruzamento, estudos têm focado na procura por parentesco entre as espécies existentes, como no caso da variedade *Pinot*, que provou ser o 3º ancestral da cultivar *Syrah* (VOUILLAMOZ; GRANDO, 2006; THIS *et al.*, 2006).

O gênero *Vitis* faz parte da família *Vitaceae*, a qual contém mais de 90 espécies. Destas, a *Vitis labrusca*, de origem americana, e a *Vitis vinifera*, de origem européia, se destacam pelo valor econômico (TEIXEIRA *et al.*, 2002). A cultivar plantada em maior proporção no Brasil é a Isabel, perfazendo cerca de 50% da produção de uvas. É uma espécie híbrida (*Vitis vinifera* x *Vitis labrusca*), introduzida na serra Gaúcha entre 1839 e 1842, capaz de originar mostos com teor adequado de açúcares e baixa acidez (RIZZON; MIELE; MENEGUZZO, 2000). Nesta região, também se encontra a maior parte do cultivo brasileiro de uvas *Vitis vinifera*. Estas têm seu cultivo limitado aos estados mais frios do país, enquanto que a *Vitis labrusca*, devido à sua rusticidade e resistência, é encontrada nos demais estados (GUIMARÃES, 2005). Apesar disso, os vinhos elaborados com a variedade *Vitis vinifera* tem uma imagem intrínseca de qualidade (DESPLOBINS; SILVA, 2005). Esta variedade pode chegar a concentrar 20% ou mais de açúcar quando madura, enquanto a *Vitis labrusca* raramente alcança este nível (JACKSON, 2000). Além da limitação climática, a desvantagem no cultivo da *Vitis vinifera* está na sua baixa resistência a doenças fúngicas e dificuldade para crescer em alguns tipos de solo (REISCH *et al.*, 1993).

3.4 AGENTES TRANSFORMANTES - LEVEDURAS

A transformação do mosto de uva em vinho por fermentação é resultado da ação combinada de diversos gêneros e espécies (CLAVIJO; CALDERÓN; PANEQUE, 2010). As espécies *Saccharomyces cerevisiae* álcool-tolerantes dominam o estágio intermediário e final da fermentação vínica. Entretanto, no início do processo gêneros como *Pichia*, *Candida* e *Hanseniaspora* são os mais encontrados (CLAVIJO; CALDERÓN; PANEQUE., 2010; SANGORRIN *et al.*, 2007).

Para que as leveduras *Sacch. cerevisiae*² se sobreponham à população microbiana, elas devem exibir características fisiológicas e enológicas que permitam a superação de condições de estresse provocadas pela exaustão gradativa de glicose, aumento gradativo de etanol, baixo pH, quantidade limitada de nitrogênio e condições anaeróbicas (PARAPOULLI *et al.*, 2010). Essa competição entre microrganismos pode, inclusive, ocorrer entre linhagens da levedura *Sacch. cerevisiae*, o que pode impedir o desenvolvimento de algumas destas. Nesse caso, a qualidade do produto final pode ser comprometida se a linhagem inibida tiver sido a inoculada (SILVA, 2003).

3.4.1 Leveduras Seleccionadas

Leveduras *Sacch. cerevisiae* seleccionadas facilitam o controle da fermentação, diminuindo as diferenças na qualidade do vinho de uma safra para outra (SILVA; SILVA, 1987). Entretanto, algumas características somente são obtidas a partir da presença de outros gêneros e espécies, portanto, o uso exclusivo de leveduras seleccionadas pode não permitir que traços de substâncias desejáveis sejam formados (CAPECE *et al.*, 2010). Isso ocorre porque as demais leveduras presentes na microflora da uva são capazes de produzir altas concentrações de compostos voláteis como álcoois superiores, ésteres de ácidos e compostos de carbono conhecidos como produtos secundários da fermentação, os quais contribuem grandemente para a qualidade sensorial do vinho (MAMEDE; PASTORE, 2004; MARO; ERCOLINI; COPPOLA 2007). As vinícolas modernas usam leveduras seleccionadas uma vez que se conhecem suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e enológicas (SILVA; SILVA, 1987).

A seleção de uma linhagem autóctone traz vantagens adicionais, pois leveduras nativas associadas com variedades de uva específicas e áreas geográficas específicas podem conferir ao vinho produzido uma característica regional, refletindo a biodiversidade da área produtora (PARAPOULLI *et al.*, 2010).

² Nota: A notação da abreviação de leveduras segue a mesma sugerida e adotada por Lodder (1974) e Kreger-Van Rij (1984) e usadas em coleções internacionais como ATCC, CBS, LKB e NRRL.

Além disso, a associação de mosto de uva e leveduras da mesma região parecem comunicar ao consumidor uma imagem positiva, promovendo, assim, benefícios econômicos ao vinicultor (CAPECE *et al.*, 2010). Portanto, leveduras autóctones selecionadas e adequadas colaboram no processo de padronização e diferenciação do produto final (SILVA, 2003).

Recentemente, o termo Indicação Geográfica tem sido bastante empregado na agricultura. Ele transmite uma identidade histórica e cultural aos produtos agrícolas, assim como a origem geográfica (BOWEN; ZAPATA, 2009). No Brasil, produtores de vinho da Serra Gaúcha, visando à obtenção de uma imagem de qualidade associada aos seus produtos, depois de estudos realizados e outras Instituições, coordenados pela Embrapa, obtiveram do INPI, em 2002, a Indicação de Procedência Vale dos Vinhedos (IBRAVIN, 2011).

Diversos estudos têm sido feitos com leveduras selecionadas. AGNOLUCCI *et al.* (2007) procuraram caracterizá-las genética e fenotipicamente pela realização de testes como a produção de fator *killer*, capacidade de fermentação, produção de sulfeto de hidrogênio e atividade proteolítica. Um melhor entendimento de linhagens específicas isoladas do mosto de uva é necessário para otimizar o processo de fermentação vínica, no que diz respeito à qualidade.

3.5 CARACTERÍSTICA *KILLER*

3.5.1 Característica *killer* da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Contendo um grupo haploide de 16 cromossomos, a levedura *Sacch. cerevisiae* foi bem caracterizada tanto geneticamente quanto fenotipicamente. O número aproximado de genes do genoma é de 6000, os quais têm um tamanho médio de 2 kb e poucos íntrons (GOFFEAU *et al.*, 1996). Algumas entidades de ácido nucleico também fazem parte do genoma, como o DNA mitocondrial e os plasmídios. O primeiro codifica componentes da maquinaria de tradução e proteínas da mitocôndria, enquanto que o segundo se encarrega de realizar sua própria

replicação. Várias linhagens de *Sacch. cerevisiae* contêm partículas semelhantes a vírus de RNA dupla fita (dsRNA) transmitido por herança não-mendeliana. Além dos componentes requeridos para a transcrição e replicação viral, esse dsRNA também codifica a chamada toxina *killer* (SHERMAN, 1991). Entretanto, não há apenas um, mas dois plasmídios em linhagens *killer*. Um deles, o M dsRNA, carrega informação genética responsável tanto pela formação da toxina quanto da resistência a mesma. O outro segmento, o L-A dsRNA, codifica a síntese de seu próprio capsídeo proteico assim como o do M dsRNA (GEORGOPOULOS; LEIBOWITZ, 1987).

A descoberta do fenômeno *killer* ocorreu quando, em 1963, Bevan e Makover observaram que, durante o co-cultivo de diferentes linhagens de *Sacch. cerevisiae* algumas leveduras eram mortas enquanto outras nada sofriam (BEVAN; MAKOVER, 1963). Esta diferença resultou na classificação das linhagens *Sacch. cerevisiae* quanto ao fenótipo *killer*. As leveduras foram agrupadas por estes próprios autores em *killer* (K^+R^+), sensíveis (K^-R^-) ou neutras (K^-R^+). As leveduras *killer* matam as sensíveis, enquanto as neutras resistem ao ataque das *killer* e não atacam letalmente as sensíveis (WOODS; BEVAN, 1968; WICKNER, 1974; SILVA, 1996).

Portanto, para que a levedura seja portadora da atividade *killer*, deve conter os dois tipos de RNA. Se estiver presente apenas a forma L-A dsRNA, a levedura é considerada sensível (GEORGOPOULOS; LEIBOWITZ, 1987; SILVA, 2003).

3.5.2 Multiplicação do L-A ds RNA e M-dsRNA na levedura

A replicação e manutenção do L-A ds RNA e M-dsRNA depende de genes cromossomais da levedura portadora dos plasmídeos. Foram identificados cerca de 30 genes envolvidos com a manutenção do M-dsRNA, denominados MAK (*maintenance of killer*) (OHTAKE; WICKNER, 1995). O MAK1 (TOP1) codifica uma DNA topoisomerase I, enquanto que mudantes *mak18-1* são deficientes na subunidade ribossomal 60S (CARROLL; WICKNER, 1995; OHTAKE; WICKNER, 1995). A acetilação N-terminal da *Gag* não só do M1-dsRNA mas também do L-A dsRNA depende do gene MAK3, o qual codifica uma N-acetiltransferase (OHTAKE; WICKNER, 1995). O MAK11 tem 1.406 pares de bases e codifica uma proteína de

53.650 daltons, sendo que sua deleção é letal para a célula, mostrando que estes genes também estão envolvidos com funções celulares vitais (ICHO; WICKNER, 1988; OHTAKE; WICKNER, 1995). Outros genes, como o KEX1 e KEX2, são necessários para a expressão da proteína *killer* ativa (WICKNER, 1993).

A inibição da propagação viral e a resistência à toxina *killer* também estão envolvidas com genes cromossomais da levedura. Os produtos dos genes SK2, SK3 e SK8 inibem, especificamente, a tradução dos RNAs não-poli (A), como o L-A e o M1-dsRNA (OHTAKE; WICKNER, 1995). Foram encontrados defeitos nos genes KRE (*killer resisitant*) em linhagens com quantidade reduzida do receptor da toxina *killer*, o β -1,6-glucana. Dessa forma, um dos efeitos observados é a resistência a esta toxina (NOVOTNA; FLEGLOVÁ; JANDEROVÁ, 2004).

O L-A dsRNA é um segmento linear de 4,6 kb (WICKNER, 1992). Existe em três formas distintas L_a, L_b e L_c, as quais se encontram em diferentes combinações nas linhagens (HANNIG; THIELE; LEIBOWITZ, 1984). O vírion maduro possui uma única molécula de L-A dsRNA contida em uma partícula isomérica de 160S e 40nm, a qual é composta de 120 moléculas da proteína *gag* e 1 ou 2 moléculas da proteína de fusão *gag-pol* (Figura 2) (WICKNER, 1992). A enzima transcriptase reversa está presente nos vírions e produz várias fitas virais (+) que são libertadas da partícula viral. No citoplasma da levedura, estas fitas funcionam como mRNA para a produção de proteínas virais tanto do M-dsRNA quanto do L-A dsRNA. Algumas fitas virais (+) são separadas e empacotadas para formar novas partículas virais. A proteína de fusão *gag-pol* é responsável pela atividade de replicase encontrada nessas novas partículas. A fim de produzir uma única molécula de L-A dsRNA dentro da partícula viral, a replicase sintetiza uma fita (-) a partir do molde da fita positiva, completando o ciclo (WICKNER, 1992; SCHMITT; BREINIG, 2006).

O M-dsRNA é considerado um RNA satélite do L-A dsRNA e, da mesma forma que este, possui vários subtipos, variando de M1 a M28. Como já citado anteriormente, a montagem do capsídio viral do M-dsRNA é feita a partir das proteínas produzidas pela tradução mRNA do L-A dsRNA. A replicação é do tipo *headful*, na qual as fitas dentro do capsídio viral (+) se multiplicam até o limite máximo, quando os novos segmentos de RNA(+) são expulsos da partícula viral (WICKNER, 1993).

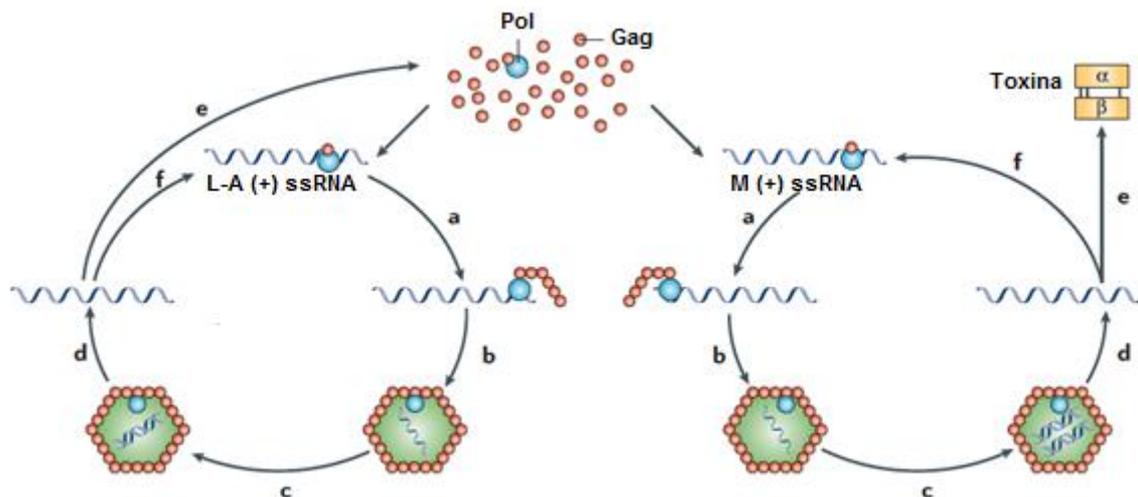


FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO L-A dsRNA e M-dsRNA

FONTE: Schmitt e Breinig (2006)

NOTA: O L-A ds RNA e o M dsRNA competem pelas mesmas proteínas traduzidas. A Gag e a Gag-Pol são necessárias para a formação do capsídeo (a), montagem do vírion (b), síntese da fita (-) (c), síntese da fita (+) e liberação no citoplasma (d), tradução do ssRNA (e) e ligação do ssRNA (f).

3.5.3 Técnicas de extração de dsRNA citoplasmático

O principal objetivo de qualquer técnica analítica é reduzir o número de etapas, maximizar a reprodutibilidade, eliminar processos subjacentes, reduzir a degradação da amostra e não depender das condições de preparo da amostra (SASIDHARAN *et al.*, 2012). Há diversos métodos para a extração e isolamento de RNA (XU *et al.*, 2011; AKIN; WU; LIN, 1998). O fundamento destas técnicas é a separação do DNA genômico e a eliminação de contaminantes, como proteínas (FISHER; FAVREAU, 1991).

Kirby (1956) introduziu o fenol para a remoção de proteínas e extração de material genético. O fenol desnatura a maioria das proteínas, mas não reage com macromoléculas carregadas negativamente como o DNA e o RNA (BEHREND, 1998). Dessa forma, as proteínas e impurezas são removidas para a interfase e fase fenólica, enquanto os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa (XU *et al.*, 2011). Esta é a etapa crucial do método por eliminar contaminantes e separar o material genético. A adição de sulfato de amônio parece ajudar na eliminação de

impurezas. Este reagente, ao ser adicionado à mistura extratora, facilita a entrada do ssRNA na fase fenólica. Dessa forma, ssRNA e proteínas são removidos junto com a fase fenólica (FLEGR, 1987). Outra forma de remover o ssRNA é pelo uso do LiCl. Diaz-Ruiz e Kaper (1978) mostraram que é possível separar diferentes tipos de material genético. O LiCl 2M precipita o ssRNA e em solução permanecem o DNA e o dsRNA (MAAN *et al.*, 2007). Por sua vez, a precipitação seletiva do dsRNA é realizada pelo LiCl 4M (FLEGR, 1987).

Pesquisadores trabalhando com o isolamento de dsRNA de leveduras *killer*, frequentemente, utilizam versões modificadas do protocolo de Fried e Fink (1978). Neste método, as células são lavadas em Na₂EDTA (pH 7,0), incubadas em Tris-H₂SO₄ com 2,5% de 2-mercaptoetanol e agitadas em solução contendo Tris-HCl (pH 7,5), Na₂EDTA/0,2% de dodecil sulfato de sódio e fenol. A incubação por 8 horas, a 4°C com LiCl 2M e citrato de sódio resulta na retenção de ácidos nucleicos no sobrenadante. Estes são recuperados pela precipitação com etanol e visualizados após coloração do gel de eletroforese com brometo de etídio. Liermann *et al.* (2000) consideram a extração de ácidos nucleicos por este método pouco seletiva. Em seu estudo, foi encontrada grande quantidade de DNA genômico e vários tipos de RNA como contaminantes.

Chomczynski e Sacchit (1987) utilizaram o método tiocianato-guanidina-fenol-clorofórmio para o isolamento de RNA. Este processo consiste na homogeneização da amostra em solução de tiocianato de guanidina e fenol para romper as células e desativar nucleases por desnaturação (MATHIESON; THOMAS, 2013; AKIN; WU; LIN, 1998). Neste processo, o tiocianato de guanidina age como desnaturante de RNase (XU *et al.*, 2011). Após a adição de clorofórmio a amostra é centrifugada. O sobrenadante retém o RNA. A toxicidade dos reagentes é a principal desvantagem dessa técnica (MATHIESON; THOMAS, 2013).

A toxicidade do fenol e seu impacto negativo no meio ambiente resultou na procura de novas técnicas. Kits comerciais prometem uma extração de RNA mais rápida e menos tóxica (YAFFE *et al.*, 2012). Os kits rompem a célula por lise enzimática, forças de cisalhamento físicas ou emprego de fenol ácido a quente. O RNA purificado é de alta qualidade e há grande rendimento (YILMAZ *et al.*, 2012). A desvantagem é o alto custo destes kits, o que pode ser um fator limitante quando o trabalho envolve um grande número de amostras (YAFFE *et al.*, 2012).

Técnicas cromatográficas também beneficiam a extração do RNA. A utilização da resina CF11 de celulose permite o isolamento de dsRNA ao eluir etanol 16% como tampão (CASTILLO *et al.*, 2011). Wickner e Leibowitz (1976) ao extraírem o dsRNA determinante da característica *killer* na levedura *Sacch. cerevisiae* também utilizaram este tipo de coluna. Nesta técnica, é necessária uma grande quantidade inicial de células para caracterizar o material genético obtido (CASTILLO *et al.*, 2011).

3.5.4 Processamento da toxina *killer* pela levedura

A toxina *killer* pode se apresentar tanto na forma intracelular quanto extracelular (PFEIFFER; RADLER, 1984). Após a tradução do transcrito viral, é formada a preprotoxina *killer* (Figura 3). Esta contém um peptídeo líder N-terminal que direciona a proteína para o retículo endoplasmático. No lúmen deste compartimento celular ocorre a remoção desse peptídeo e o dobramento inicial da toxina (SCHMITT; BREINIG, 2006). A protoxina formada é processada no complexo de Golgi. A protease Kex2p cliva o peptídeo α -N-terminal e remove a sequência- γ glicosilada que separava a subunidade- α hidrofóbica da subunidade- β hidrofílica. Para finalizar o processo, a carboxipeptidase Kex1p cliva o α -C-terminal. A toxina heterodimérica madura é composta pelas subunidades α e β ligadas covalentemente uma a outra por pontes dissulfeto (BREINIG; TIPPER; SCHMITT, 2002; SCHMITT; BREINIG, 2006).

Os heterodímeros excretados podem se agrupar em até oito unidades e formar octâmeros. Entretanto, ainda não é conhecido se estes multímeros são necessários para a ação da toxina (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002).

Alterações no processamento podem alterar o fenótipo de uma levedura, passando de *killer* para sensível. Um estudo utilizando a técnica de mutagênese sítio-dirigida mostrou que a peptidase de sinal, localizada no retículo endoplasmático, não é ativa quando há troca de uma glicina por um triptofano em seu sítio de clivagem. Como consequência, tem-se uma inibição da secreção da proteína e a formação do fenótipo sensível (RIFFER *et al.*, 2002). Portanto, a

alteração em um gene pode alterar o fenótipo *killer* de uma levedura (SCHMITT; TIPPER, 1995).

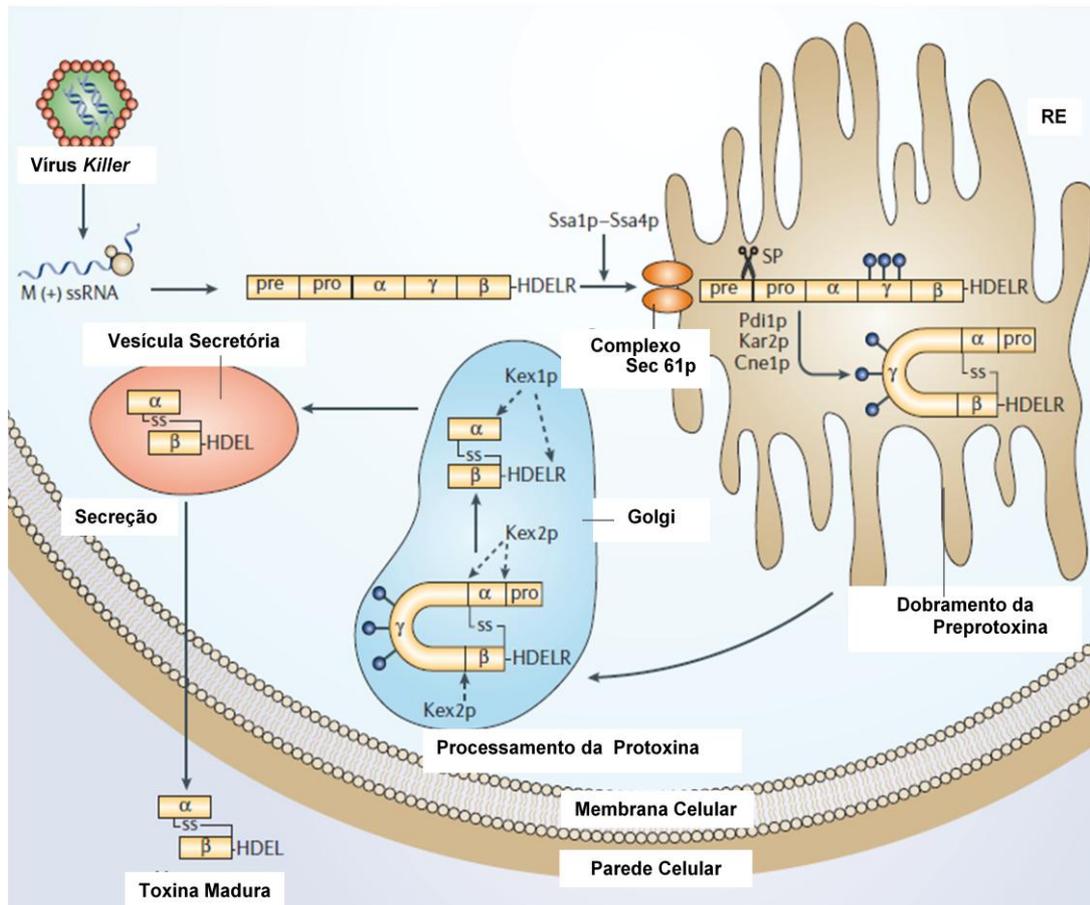


FIGURA 3- PROCESSAMENTO E SECREÇÃO DA PROTEÍNA *KILLER*

FONTE: Schmitt e Breinig (2006)

3.5.5 Modo de ação da toxina *killer*

Existem diversos grupos de toxina *killer*, cada um com um tipo específico de imunidade (POLI, 2009; SCHMITT; TIPPER, 1995). Dentre os encontrados na levedura *Sacch. cerevisiae* somente três K_1 , K_2 e K_{28} foram estudados em detalhes (SCHMITT; TIPPER, 1995).

As toxinas K_1 e K_2 exibem modo de ação similar, embora sejam proteínas diferentes (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002). A ação da proteína

compreende duas etapas (POLI, 2009). Primeiramente ocorre a adsorção da toxina ao componente β -1-6-glucana da parede celular (SCHMITT; BREINIG, 2006). Em seguida, age formando canais catiônicos transmembrânicos voltagem-dependentes (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002). Conseqüentemente, ocorre o extravazamento do conteúdo intracelular e morte da levedura (SCHMITT; BREINIG, 2006).

A toxina K_{28} age no componente α -1,3-manana da parede celular, é transferida para a membrana celular e sofre endocitose. É direcionada, respectivamente, para o complexo de Golgi, retículo endoplasmático e citosol. Neste compartimento celular, o sinal citotóxico é transmitido para o núcleo (HEINTEL; ZAGORE; SCHMITT, 2001). O primeiro efeito detectável da ação é o bloqueio da síntese de DNA (SCHMITT; TIPPER, 1995). Dessa forma, a célula apresenta apenas um brotamento médio, único núcleo na célula mãe e um conteúdo de DNA pré-replicado ($1n$) (HEINTEL; ZAGORE; SCHMITT, 2001).

O mecanismo que confere imunidade às leveduras resistentes ainda não é conhecido. Entretanto, a formação do precursor da toxina K_1 na via secretória é suficiente para conferir imunidade. Desta forma, especulou-se que o precursor pode agir como um inibidor competitivo da proteína madura, ao saturar receptores de membrana, ainda não identificado, resultando em imunidade (RIFFER *et al.*, 2002).

3.5.6 Condições para Expressão do Fator *killer*

As classes de proteína K_1 e K_2 são as mais encontradas em leveduras *Sacch. cerevisiae*. A toxina K_1 é ativa em uma estreita faixa de pH, 4,6-4,8, e pode ser inativada por agitação. Ao contrário, a faixa de pH ótimo para a toxina K_2 varia de 2,9 a 4,9 (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002). O pH do mosto varia em torno de 3,3 a 4,2 (MAQUEDA *et al.*, 2012), portanto, a toxina K_2 é a única capaz de atuar na fermentação vínica (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002; LOPES *et al.*, 2007).

O fenótipo *killer* varia de acordo com o meio, condições empregadas para o crescimento das leveduras e a linhagem utilizada (SILVA, 1996). Componentes tais como peptona e extrato de levedura, comumente encontrados em meio de

crescimento celular estimulam a produção da proteína *killer* (WOODS; BEVAN, 1968). A presença de ADP também aumenta a produção deste fator (KOTANI; SHINMYIO; ENATSU, 1977).

O tipo de meio utilizado para a expressão do fator *killer* está diretamente relacionado com o fenótipo resultante. Silva (1996) observou que a linhagem *killer* K1 não matou 63,5% das linhagens isoladas no meio YEPD-MB e 81,2% no meio MA-MB (composto de mosto de uva e extrato de levedura), indicando assim que o mosto exerce algum tipo de proteção. As linhagens Embrapa 1B e Embrapa 20B, por exemplo, se comportaram como sensíveis em meio YEPD e resistentes em mosto. A variação de pH, presença de fatores protetores e formação de enzimas proteolíticas podem proteger as linhagens sensíveis da ação da proteína *killer* (SILVA, 2003). Linhagens neutras também podem proteger células sensíveis. Segundo Silva (1996), o mecanismo desta ação é por processos de competição ou por um sistema de diluição. No primeiro, a levedura produz uma proteína *killer* defeituosa que se liga no sítio de ação, mas não exerce efeito. Já no segundo, usa-se o termo “diluição” porque a proteína *killer* liga-se a sítios tanto de leveduras neutras quanto de linhagens sensíveis. Conseqüentemente, a quantidade de proteína *killer* efetiva é menor.

3.5.7 Distribuição de leveduras *killer* na natureza

A capacidade *killer* está presente em vários gêneros e espécies. Além da *Sacch. cerevisiae*, também é encontrada no *Williopsis mrakii*, *Kluyveromyces lactis*, *K. wickerhamii*, *K. phaffii*, *Hansenula anomala*, *Candida tropicalis*, *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala* e *P. inositovora* (SILVA, 2003; POLI, 2009). Na natureza, as micotoxinas secretadas por estas linhagens são letais a outras leveduras, fungos e até mesmo bactérias, garantindo sua prevalência no ambiente (VADKERTIOVÁ; SLÁVIKOVÁ, 2007; STARMER; GANTER; ABERDEEN, 1992). Na fermentação vínica, a levedura *Sacch. cerevisiae killer* têm capacidade de eliminar a população original de leveduras e garantir a prevalência das características enológicas desejadas (HEARD; FLEET, 1987; ZAGORC *et al.*, 2001), embora esta

garantia seja relativa, devido à interação com outros microrganismos e composição do meio de cultura, como anteriormente exposto.

O comportamento *killer* no processo de elaboração do vinho tem sido extensivamente estudado nas principais regiões vitivinícolas do mundo (SANGORRIN *et al.*, 2007; SILVA, 1996; MAQUEDA *et al.*, 2012). A frequência de leveduras *killer* em regiões vitivinícolas ou até mesmo em uma única fermentação espontânea é variável. Fatores como estágio da fermentação, período de colheita e área de produção podem influenciar o resultado (MAQUEDA *et al.*, 2012).

Na Argentina, região da Patagônia, 35% das leveduras isoladas de dornas foram caracterizadas como *killer*, 25% como neutras e 40% como sensíveis (SANGORRIN *et al.*, 2007). Na região noroeste da Argentina, 11 de 31 leveduras isoladas de adegas foram identificadas como *killer*, dentre as quais também foram identificados os gêneros *Candida* e *Pichia* (ULLIVARRI *et al.*, 2011).

No Brasil, em Bento Gonçalves, no RS, a totalidade de leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon apresentou fenótipo neutro (SILVA; DALARMI, 2003). Na mesma região, 56,5% das linhagens isoladas da cultivar *Riesling Itália* foram resistentes a linhagem *killer* 91B, enquanto a proporção de células sensíveis foi 32,9% em meio YEPD (SILVA, 1996). Na região metropolitana de Curitiba, no PR, foi observado que 71,4% das linhagens eram *killer*, 21,4% eram leveduras neutras e 7,1% eram linhagens sensíveis (LIMA, 2011).

Na Espanha, na região de Extremadura, 40,8% foram caracterizadas como *killer*. Dentre as 59,2% restantes, 78,8% não continham M-dsRNA e 21,2% o continham (MAQUEDA *et al.*, 2012). Em Madrid, a porcentagem de leveduras *killer* isoladas de mosto em fermentação e vinhos foi 42,6% (HIDALGO; FLORES, 1994). Entretanto, essa porcentagem variou conforme a fase fermentativa em que as amostras foram coletadas. A ocorrência foi de 18,8% no mosto, 50% no meio do processo e 58,8% no final. Isso mostra a interdependência entre o ambiente de isolamento e a frequência *killer* como afirma Silva (1996), ou, neste caso, a prevalência crescente das linhagens com fenótipo *killer* em meios líquidos.

Na França o fenótipo *killer* variou de 0 a 100%. Em Tourraine nenhuma linhagem *killer* foi encontrada, enquanto que em Beaujolais e Gard o fenótipo *killer* esteve presente em 80% a 100% das leveduras testadas (CUINER; GROS, 1983). Realizado na região de Cognac, outro estudo mostrou que de um total de 35 leveduras, 60% foram caracterizadas como *killer*, 11% como neutras e 28% como

sensíveis. Também foi verificada a coexistência de leveduras *killer* e sensíveis nessa região (VERSAVAUD *et al.*, 1995). Na Austrália, Heard e Fleet (1987) observaram que há coexistência quando a proporção de leveduras sensíveis é sete vezes superior a de *killer*. No Brasil, Silva (1996) mostrou que há coexistência quando linhagens neutras estão presentes.

Devido à falsa segurança com relação à predominância durante o processo de elaboração de vinhos, Silva (1996) sustenta que a aptidão enológica da linhagem deve ser o principal critério para seleção de leveduras para a elaboração de vinhos, e não o fato de a levedura se comportar como agente *killer*.

3.5.8 Detecção do fenótipo *killer*

Há um potencial importante de leveduras *killer*. Na área médica, o uso de toxinas *killer* para o tratamento de infecções fúngicas tem sido explorado. Alguns aspectos como transcrição do RNA, replicação do dsRNA, o empacotamento do ssRNA, o sistema conhecido como *frameshifting* ribossomal, processamento do precursor proteolítico, as interações vírus – hospedeiro e vírus – vírus guardam semelhanças com determinados vírus de mamíferos como o HIV (SCHMTT; BREINIG, 2002) e muitos retrovírus (RIBAS; WICKNER, 1998; WICKNER, 1989; VICKERS; ECKER, 1992). O entendimento destes mecanismos em leveduras *killer* pode ajudar a combater problemas de saúde de origem viral.

Na área biotecnológica, a investigação desta proteína para a conservação de alimentos e eliminação de microrganismos indesejáveis foi proposta por diversos autores (BAEZA; SANHUEZA; CIFUENTES, 2008). No processo de vinificação, leveduras com fenótipo neutro, K^+R^+ são preferidas por permitir a atuação de outras linhagens no início da fermentação (ORTIZ *et al.*, 2013). Dessa forma, a identificação de linhagens *killer* contribui para a seleção de leveduras vínicas.

A atividade *killer* é detectada somente quando a levedura em teste é avaliada contra uma linhagem sensível (BAEZA; SANHUEZA; CIFUENTES, 2008). A maioria dos métodos se baseia no processo descrito por Bevan e Makower (1963). Neste teste, linhagens sensíveis são testadas semeando-as sobre a superfície do meio, enquanto as leveduras *killer* são colocadas como massas pontuais sobre aquelas. A

formação de halo de inibição indica a sensibilidade ou produção da proteína *killer* (LOPES; SANGORRÍN, 2010). É uma técnica simples e de baixo custo que fornece dados consistentes sobre o fenótipo das leveduras (BAEZA; SANHUEZA; CIFUENTES, 2008)

A atividade *killer* depende de vários fatores, dentre os quais se destacam a salinidade, o pH e a temperatura (BAEZA; SANHUEZA; CIFUENTES, 2008). Como descrito no item 3.5.6, a faixa de pH ótima para a expressão da capacidade *killer* depende do tipo de toxina produzida. Entretanto, a faixa de pH ótima para a expressão da capacidade *killer* é entre 4,5 e 4,7 para a maioria das linhagens isoladas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

O principal meio de cultura utilizado para detecção do fator *killer* é o YEPD (PÉREZ-NEVADO *et al.*, 2006; MATURANO *et al.*, 2012; SILVA, 1996). Vários autores propuseram modificações em sua composição visando facilitar a detecção desta toxina. O conteúdo de salinidade do meio é um dos itens de escolha para alteração. Vários autores encontraram que a adição de 1% a 6% de NaCl permite melhor observação da atividade *killer* (LOPES; SANGORRÍN, 2010; HERNÁNDEZ *et al.*, 2008; LLORENTE *et al.*, 1997). O meio MA-MB, contendo mosto de uva, foi proposto por Silva (1996) para a detecção do fator *killer*. A influência do meio ficou evidente neste estudo. Linhagens que se comportaram como sensíveis no meio YEPD-MB apresentaram fenótipo neutro no meio MA-MB. Poli (2009) sugeriu empregar o meio Mosto/ELNC (80:20) para a detecção do fator *killer*. O extrato de levedura não comercial (ELNC) se mostrou eficaz. Dessa forma, modificações na técnica contribuem para a caracterização simples e rápida de leveduras que são aplicadas industrialmente (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

3.6 METABOLISMO

A fermentação é definida como o processo bioquímico no qual o receptor final de elétrons é um composto orgânico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). Como exemplo, pode-se citar a formação de etanol e de ácido láctico cujos receptores finais de elétrons são, respectivamente, o acetaldeído e o ácido pirúvico.

O sucesso da fermentação vínica depende da viabilidade das leveduras, as quais fermentam de forma diáuxica glucose e frutose, resultando na formação majoritária dos metabólitos etanol e gás carbônico (SILVA, 2003; GUIMARÃES, 2005). O uso de leveduras selecionadas parece conferir vantagens durante este processo. O estudo de Sharma, Singh e Sawant (2012) mostrou menor concentração residual de açúcares em vinhos elaborados a partir da inoculação de leveduras em relação à fermentação espontânea.

O catabolismo das leveduras é realizado, principalmente, através da glicólise. Envolve uma sequência de, no mínimo, doze reações químicas. Como resultado deste conjunto de reações, cada molécula de hexose gera duas de piruvato, quatro de ATP e uma de NADH, mas como duas moléculas de ATP são consumidas no processo preparativo, o ganho energético líquido por hexose consumida é de duas moléculas de ATP. O piruvato produzido pode ser utilizado em diferentes caminhos metabólicos, entretanto, as leveduras devem regenerar NAD^+ a partir do $\text{NADH} + \text{H}^+$ para restabelecer o potencial oxi-redutor do citoplasma propício ao início de um novo processo glicolítico, o que pode ser feito pela redução do etanal ou do diidroxiacetona-3-fosfato. No primeiro caso, há formação de etanol e no segundo, produção de Sn-glicerol-3-fosfato, via esta necessária para a síntese de glicerol (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2008).

3.7 PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO

O H_2S deve ser rigorosamente controlado no processo de elaboração de vinho. É um gás de aroma indesejável, como o de ovo podre, e com um baixo limiar de percepção (LP), que segundo Brites (2003) e Cordente *et al.* (2009), no vinho, este valor é de 50-80 $\mu\text{g/L}$. Sabe-se que o H_2S é um composto volátil e pode ser removido por aeração, entretanto, este é potencialmente capaz de formar etil mercaptano e outros compostos voláteis no vinho, os quais não são facilmente removidos. Além disso, a remoção de H_2S por aeração ou por introdução de N_2 pode ser problemática, pois, junto com H_2S outros compostos voláteis importantes do vinho podem ser eliminados (LINDERHOLM *et al.*, 2010). Portanto, sua remoção não implica apenas em despesas suplementares, mas também pode comprometer a

qualidade fina do produto (SILVA; SILVA, 1987). Dessa forma, as leveduras com baixa produção de H₂S são uma exigência do mercado (VERO; SOLIERI; GIUDICI, 2011).

Os aminoácidos metionina e cisteína são essenciais para o crescimento da célula de levedura. Estão presentes em baixa concentração no mosto de uva, portanto, a levedura precisa biossintetizá-los para suprir a necessidade metabólica (CORDENTE *et al.*, 2009). É durante este processo que ocorre a produção do H₂S (Figura 4) (VERO; SOLIERI; GIUDICI, 2011). Inicialmente, a levedura assimila enxofre extracelular, presente no suco de uva na forma de sulfato (CORDENTE *et al.*, 2009). Duas permeases específicas transportam o SO₄²⁻ para dentro da célula, o qual deve ser reduzido a sulfeto. Entretanto, esta redução direta é desvantajosa por ser endergônica (CORDENTE *et al.*, 2009). Para viabilizá-la, íons sulfato são ativados por meio de compostos adenilados. A enzima ATP sulfurilase catalisa a transferência de uma unidade adenosil-fosforil do ATP para o sulfato, formando 5-adenilil-sulfato (APS). Este é fosforilado pela enzima APS quinase, resultando em 3-fosfo-5-adenilil-sulfato (PAPS). Este é reduzido a SO₂²⁻ que pode ser convertido a SO₂ ou ser reduzido a S²⁻. Neste ponto, poderá haver formação de H₂S (THOMAS; SURDIN-KERJAN 1997) ou reagir com um precursor nitrogenado, como O-acetilserina ou O-acetil homoserina, podendo originar cisteína ou metionina (CORDENTE *et al.*, 2009).

Apenas uma pequena quantidade de H₂S prevalece ao final do processo fermentativo, 1-20 µg/L, devido a sua alta volatilidade e a ação purgante do CO₂ (UGLIANO; KOLOUCHOVA; HENSHKE 2011). A liberação acentuada de H₂S é consequência, principalmente, de um desequilíbrio entre a quantidade de compostos sulfurados inorgânicos presentes no meio e a demanda celular aminoacídica (JIRANECK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995). A adição de nitrogênio prontamente assimilável pela levedura (NPA) é uma estratégia utilizada para limitar a produção de H₂S e garantir a disponibilidade dos precursores nitrogenados (UGLIANO; KOLOUCHOVA; HENSHCKE, 2011). Dentre os aminoácidos mais efetivos para eliminar o H₂S estão serina, glutamina, aspartato, arginina, asparagina, além de amônio e de precursores diretos como O-acetilserina (JIRANECK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995).

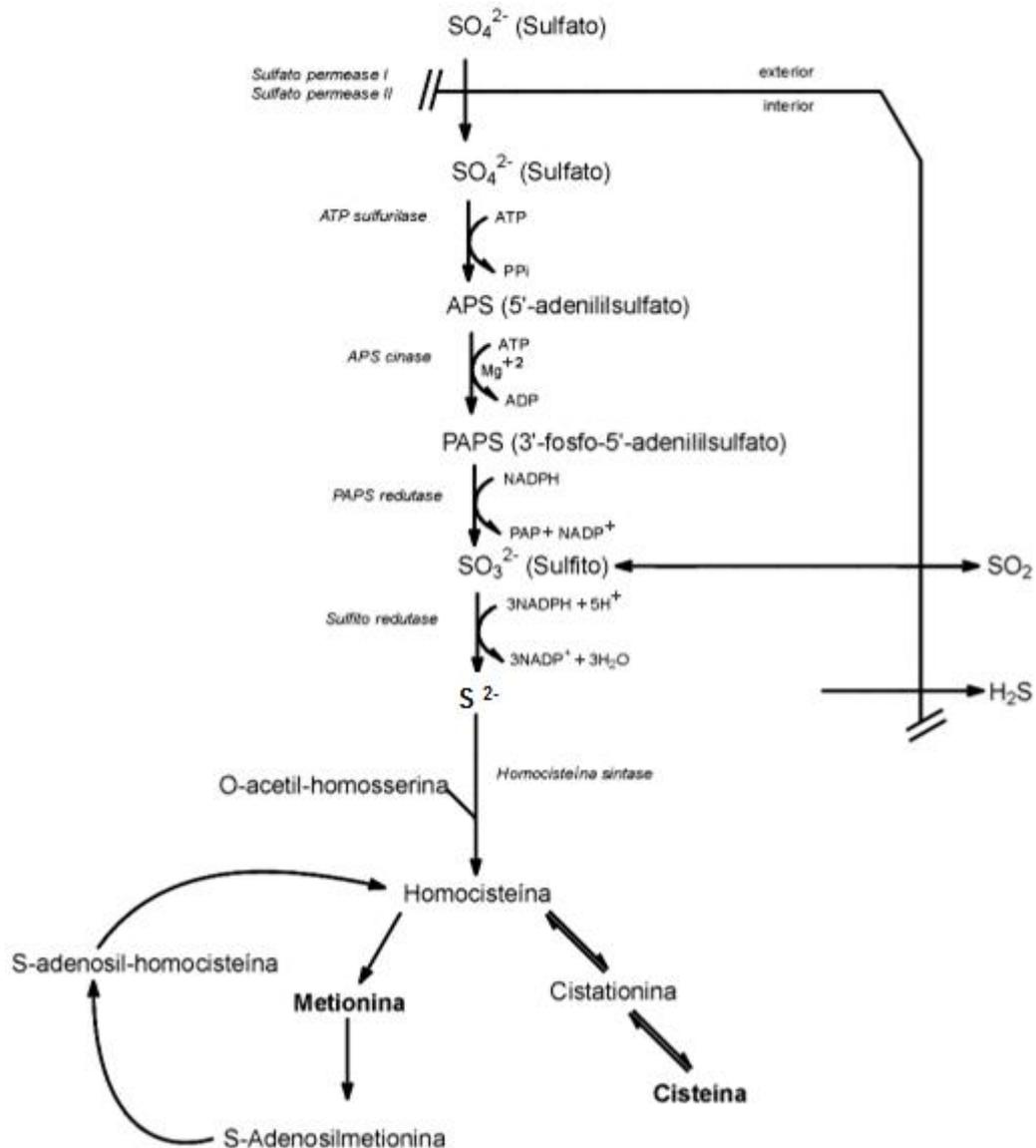


FIGURA 4- VIA DE PRODUÇÃO DE H₂S PELA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

FONTE: Neto e Mendes-Ferreira (2005)

3.8 CAPACIDADE DE FLOCULAR ESPONTANEAMENTE

Algumas linhagens de levedura formam aglomerados, os quais, em algumas circunstâncias, floculam e se depositam no fundo da dorna de fermentação (MARTINS; HORII; PIZZIRANI-KLEINER, 1998). Este fenômeno é conhecido como floculação e é desejado na elaboração de vinho por facilitar a remoção das

leveduras do líquido fermentado (HAMERSVELD *et al.*, 1996). Durante a elaboração de vinho processos de clarificação e remoção de partículas são bastante utilizados para melhorar o aspecto físico do produto. A clarificação envolve várias etapas: sedimentação, centrifugação e filtração. Esta última pode alterar a cor, o aroma e remover partículas que contribuem para a estrutura do vinho (GOVENDER; KROPENSTEDT; BAUER, 2011). Dessa forma, a floculação visa à melhoria da qualidade sensorial, ao mesmo tempo em que contribui para redução de custos e aumento de produtividade (BRITES, 2003).

A floculação não é um fenômeno exclusivo da *Sacch. cerevisiae*. Outros gêneros e espécies de leveduras como *Sacch. uvarum* (AMRI *et al.*, 1982) *Schizosaccharomyces pombe*, *K. marxianus* (STRATFORD, 1994) podem exibir este atributo. Entretanto, a relevância comercial desta levedura a tornou foco de vários estudos sobre este assunto.

O mecanismo de floculação ainda não está totalmente esclarecido, o que dá margem à criação de várias hipóteses para este fenômeno. Sugere-se que as linhagens haploides trocam substâncias que alteram a fisiologia celular durante a reprodução sexuada. Após essas modificações, as células se agregam antes da fusão nuclear para formar diploides. Pode-se explicar ainda pela possibilidade de formação de pseudomicélio. Neste caso, devido a brotamentos sucessivos, os brotos não se desprendem da célula-mãe, provocando aglutinação. Há ainda os que defendem que íons cálcio agem formando uma ponte entre grupos sulfatos, fosfatos e carboxilas presentes na superfície celular das leveduras. A estrutura formada seria estabilizada por pontes de hidrogênio pertencentes a grupos carboxilas de carboidratos. A teoria mais aceita sugere que há interação entre dois componentes da superfície celular. Lectinas funcionariam como ligantes para os receptores de manose presentes na parede celular de outras leveduras (MIKI *et al.* 1982, DOMINGUES *et al.*, 2000; SAMPERMANS; MORTIER; SOARES, 2005; LI *et al.*, 2012). Neste processo de adesão, o íon cálcio parece manter a conformação correta das lectinas (SAMPERMANS; MORTIER; SOARES, 2005). A Figura 5 ilustra este processo de floculação.

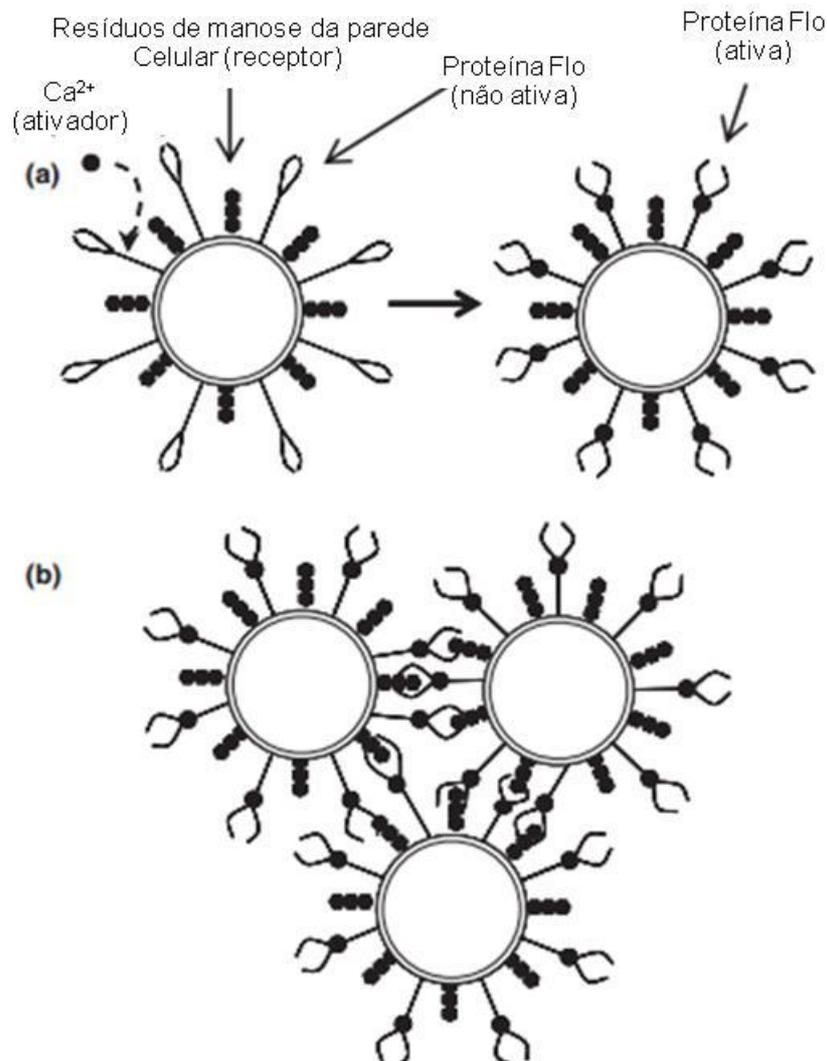


FIGURA 5 - MECANISMO DE FLOCULAÇÃO DE ACORDO COM A TEORIA DA LECTINA

FONTE: Soares (2010)

NOTA: (a) Íons cálcio permitem que as lectinas alcancem a conformação correta (a). As lectinas ativas, somente presentes em células floculantes, se ligam aos resíduos de manose das células adjacentes (b).

Baseando-se na teoria da lectina, foram identificados alguns genes envolvidos na floculação, os chamados *FLO* (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11*) (LI *et al.*, 2012; GOVENDER; KROPPENSTEDT; BAUER, 2011; ZHAO; BAI, 2009;). Estes genes codificam proteínas do tipo lectina que são conhecidas como adesinas, zimolectinas ou floculinas (VAN MULDER *et al.*, 2010). O gene dominante *FLO1* é o mais estudado. Está localizado no cromossomo 1 (CUNHA *et al.*, 2006) e codifica a proteína estrutural *flo1* diretamente envolvida com o processo de floculação (SOARES, 2010). Esta proteína é formada por 1537 aminoácidos, dentre os quais estão os resíduos O-glicosilados de serina e treonina que permitem a adoção de

uma conformação estendida. A porção N-terminal é exposta na superfície celular e sua deleção prejudica o desenvolvimento do fenótipo de floculação (SOARES, 2010). Há também componentes genéticos que se contrapõem ao processo de floculação. Segundo Stratford (1994), os genes *fsu1* e o *fsu2* podem suprimir a floculação.

A expressão desse fenótipo pode ser afetada por diversos fatores ambientais (BRITES, 2003). A composição dos sais do meio de cultura pode ser favorável ou não para o processo. Enquanto íons Ca^{2+} estimulam a floculação (ARMI *et al.*, 1982, DOMINGUES *et al.*, 2000), a presença de inositol a desfavorece (ARMI *et al.*, 1982). A influência da temperatura sobre a floculação parece depender da linhagem (DOMINGUES *et al.*, 2000; ZHAO; BAI, 2009). Algumas leveduras floculam mais intensamente a 5°C que a 25°C, enquanto outras exibem, exatamente, o comportamento oposto (ZHAO; BAI, 2009). A presença de determinados açúcares também pode alterar o fenótipo da levedura. As linhagens podem ser sensíveis ou não a manose ou sensíveis, simultaneamente, a manose e glicose (GOVENDER; KROPPESTEDT; BAUER, 2011).

3.9 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS

A casca da uva madura contém uma grande variedade de espécies. A levedura *Hanseniaspora uvarum* é a espécie predominante, enquanto a *Sacch. cerevesiae* é encontrada em baixa quantidade (BELTRAN *et al.*, 2002). Outros gêneros também estão presentes, os quais se manifestam no estágio inicial da fermentação vínica. Entre estes, destacam-se: *Candida* spp., *Pichia*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces* (CAPECE; SALZANO; ROMANO, 2003). Dessa forma, torna-se necessário identificar as linhagens isoladas.

As primeiras técnicas de identificação de microrganismos baseavam-se nas características fisiológicas e morfológicas (KREGGER-VAN RIJ, 1984; ESTEVEZARZOZO *et al.*, 1999; BARNETT, J.A.; PAYNE; YARROW, 1990). Entretanto, estes métodos podem gerar resultados duvidosos por serem fortemente influenciados pelas condições de cultura do microrganismo (YAMAMOTO *et al.*, 1991; GUILLAMÓN *et al.*, 1998; RATON, 2004).

Os métodos de identificação por biologia molecular têm sido empregados por diversos autores (CAPECE; SALZANO; ROMANO, 2003; SHI *et al.*, 2012; ROSCHUMILLAS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010). Estas técnicas se baseiam na presença ou ausência de similaridades no DNA, RNA ou em proteínas. Entre os métodos utilizados se destacam: hibridização DNA-DNA, cariótipo eletroforético, análise de microssatélite, análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, análise de DNA mitocondrial por polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição, RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e análise de DNA cromossômico por RFLP (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999). Esta última consiste na diferenciação de microrganismos por análise de fragmentos de DNA gerados pela clivagem de enzimas de restrição em sequências palindrômicas. A clivagem realizada por estas endonucleases resulta em fragmentos que variam de tamanho conforme a espécie do microrganismo (RATON, 2004). Esta técnica tem sido bastante útil para a detecção de muitas espécies de fungos e leveduras. Os fragmentos de escolha são, frequentemente, os que codificam o RNA ribossômico e os espaçadores que o compõem (FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000). Estas regiões genômicas estão contidas no cromossomo XII da levedura *Sacch. cerevisiae*, o qual contém cerca de 150 a 200 cópias *in tandem* codificando para o RNA ribossomal (GALOPIER; DENMAT, 2011). Cada unidade de repetição é composta pelas regiões codificadoras do RNA ribossomal. As regiões mais estudadas são a 18S, 5.8S e 28S, os quais são separados pelos espaçadores (Figura 6) (WHITE, 1990; SUGITA *et al.*, 2002). Estes compreendem dois espaçadores internos, ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacers*). Existem também espaçadores externos, ETS1 e ETS2 (*external transcribed spacers*), além de dois grandes espaçadores intergênicos, IGS1 e IGS2 (*intergenic spacer*) (JAMES *et al.*, 2009). As regiões 5.8S e ITS são bastante utilizadas por exibirem grande variedade interespecífica (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; MARTIN; RIEGIEWICZ, 2005). Ao contrário, as regiões 18S e 25S são menos empregadas devido à dificuldade de manipulação de seus grandes fragmentos (FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000). Guillamón *et al.* (1998) utiliza o método PCR-RFLP para a identificação de espécies de leveduras vínicas. Os autores amplificaram a região IT1-5.8S-ITS2 do rDNA com os iniciadores ITS1 e ITS4. O produto da reação de PCR, submetido ou não à ação de endonucleases de restrição, foi separado em gel de agarose e visualizado com brometo de etídio. Dessa forma, o estudo mostrou os perfis eletroforéticos de cada microrganismo em

duas diferentes situações. Primeiramente, analisou o tamanho dos fragmentos do produto da reação de PCR. Em seguida, comparou os fragmentos formados após a ação das enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*.

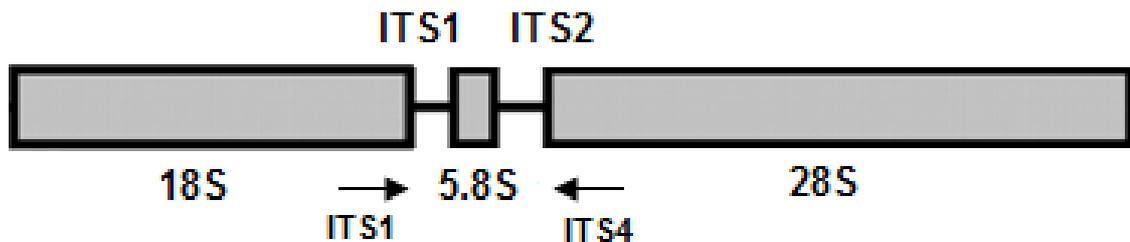


FIGURA 6 – LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO ITS1 – 5.8S – ITS2 NO rDNA NUCLEAR

FONTE: Adaptado de White *et al.* (1990)

NOTA: As setas representam a região de anelamento dos iniciadores ITS1 e ITS4.

3.10 VINIFICAÇÃO

A qualidade do vinho depende muito do tratamento dado ao vinhedo pelo viticultor e do processamento de elaboração executado pelo vinicultor. A maioria dos compostos presentes no vinho é produzida pela própria planta, incluindo algumas moléculas que estão relacionadas com o aroma e o sabor. Estas são produzidas, principalmente, durante o desenvolvimento e maturação dos frutos (CONDE *et al.*, 2007). Ainda na videira é verificado o amadurecimento da uva. Este é considerado completo quando a quantidade de açúcar, que apresenta uma curva ascendente durante a maturação do fruto, atinge um patamar (CARVALHO, 2007).

A fermentação alcoólica se inicia após a retirada da ráquis e esmagamento da uva para a separação do mosto (CARVALHO, 2007). Em vinho tinto, as cascas da uva ficam em contato com o mosto e permanece durante determinado período de tempo neste ambiente durante a fermentação alcoólica, processo conhecido como maceração. É durante esta fase que são extraídos as antocianinas (pigmentos) e os taninos (principalmente flavonóis), compostos importantes para a qualidade do vinho tinto (GUERRA, 2003a). Em vinhos brancos, esta etapa é evitada (GUERRA,

2003b), no entanto, há tecnologias que sugerem a permanência da casca na elaboração de vinhos brancos, como no caso do processamento da uva Lorena para a elaboração do vinho Lorena Ativa com a linhagem Embrapa 1vvt/97. O progresso da fermentação alcoólica é determinado pela concentração residual de açúcar. O valor de 5 g.L^{-1} determina o final da fermentação (BRASIL, 1991). Problemas na fermentação podem ocorrer caso este valor não seja atingido em, no máximo, sete dias (COLEMAN; FISH; BLOCK, 2007). Durante a fermentação, a pressão do gás carbônico liberado pelo metabolismo das leveduras faz com que as partes sólidas do mosto alcancem a superfície da dorna e permaneçam flutuando (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). A fim de se evitar o ressecamento da parte sólida, o que facilita o desenvolvimento de bactérias e o, conseqüente, avinagramento do vinho, é realizada a remontagem (RIZZON; ZANUZ; MANFREDINI, 1994). Esta consiste na retirada da fase líquida pela parte inferior do tanque de fermentação e sua reintrodução pela parte superior (GUERRA, 2003a). Quando as substâncias necessárias para alcançar as características desejadas do vinho já tiverem sido extraídas da casca pelo líquido, é realizada a descuba. Esta operação consiste na separação do mosto em fermentação do bagaço de uva (ROSIER, 1995). Após a fermentação, o vinho é separado do sedimento composto por leveduras mortas. As partículas que ainda permanecerem em suspensão devem ser removidas por clarificação (CHRISTAKI; TZIA, 2002).

A faixa de temperatura mais adequada para a vinificação situa-se entre 18-23°C (GUIMARÃES, 2005). Temperaturas baixas, em torno de 10-15°C favorecem a complexidade aromática do vinho (SALVADÓ *et al.*, 2012), entretanto requerem células capazes de se adaptar rapidamente a mudanças no meio ambiente. Caso contrário, poderá ocorrer lentidão na fermentação ou, até mesmo, a parada de fermentação (BELTRAN *et al.*, 2002). Este problema também é encontrado em temperaturas acima de 30°C (CHIVA *et al.*, 2012). A necessidade de se manter temperatura ótima para o crescimento e multiplicação de cada levedura requer rígido controle deste fator durante a fermentação vínica (BOQUETE *et al.*, 2010).

Os vinhos tintos passam ainda pelo processo de fermentação malolática (RIZZON; ZANUS; MIELE, 1997). É uma fermentação secundária no processo de vinificação, na qual ocorre a conversão do ácido L-málico a ácido L-lático e dióxido de carbono, podendo ser espontânea ou induzida pela inoculação de culturas de bactérias comerciais (KNOLL *et al.*, 2011). É iniciada cerca de 2 a 3 semanas após a

finalização da fermentação alcoólica por bactérias do ácido lático e realizada, principalmente, pelo *Oenococcus oeni*. Contribui para o decréscimo da acidez do vinho, aumento do aroma, sabor e complexidade pela produção de metabólitos, e também aumento da estabilidade microbiológica pela remoção de nutrientes residuais e bacteriocinas (FLEET, 2003).

O pH é uma importante característica do vinho, pois influencia nas propriedades organolépticas e qualidade microbiológica do produto (AERNY, 1985; CHAVARRIA *et al.*, 2008). A intensidade de matizes de coloração do vinho é alterada pelo grau de ionização dos compostos antociânicos, o qual é determinado pelo pH do vinho. O pH mais baixo torna o vinho mais avermelhado, enquanto o pH mais alto, torna-o de coloração mais parda ou púrpura (BARNABÉ, 2006). Alterações oxidativas e microbiológicas são mais comuns em vinhos com pH mais elevado, pois nessas condições a concentração de dióxido de enxofre ativo é menor (AERNY, 1985; CHAVARRIA *et al.*, 2008).

Após pronto, o vinho é envelhecido. Durante esta etapa, o produto deve ser mantido em temperatura controlada de 10-14°C por 6 a 36 meses (BOQUETE *et al.*, 2010). Antes de serem engarrafados, pode haver necessidade de filtrar estes vinhos (CHRISTAKI; TZIA, 2002).

3.10.1 Principais Compostos Monitorados durante a Vinificação

3.10.1.1 Etanol

Principal produto do metabolismo da levedura durante a fermentação alcoólica, formado pela transformação dos açúcares glicose e frutose. A quantidade produzida deste composto varia, dependendo da espécie da levedura utilizada, composição do mosto, temperatura e aeração do mosto (MOURA, 2009).

Na levedura, o etanol liberado no meio age causando estresse fisiológico, sendo capaz de inibir o crescimento e viabilidade desta. Além de inibir vários sistemas de transporte, como o da aminoácido permease e o de captação de glucose. O etanol também inibe a atividade de enzimas essenciais da via glicolítica

por causar danos no DNA mitocondrial das leveduras. Entretanto, o principal alvo dessa substância é a membrana plasmática, na qual ocorre alteração da fluidez e estimulação da atividade ATPase. Alguns autores encontraram uma correlação entre a tolerância ao etanol e o aumento da proporção de ácidos graxos insaturados na membrana lipídica (AGUILERA *et al.*, 2006).

A atividade antimicrobiana do etanol não se restringe a *Saccharomyces cerevisiae*, mas também a outros microrganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, alguns estudos propõem que sua ação não se deve a um efeito isolado, mas sim sinérgico da combinação dessa substância com outras presentes no vinho, como, por exemplo, os ácidos orgânicos (BOBAN *et al.*, 2010).

As características organolépticas do vinho também são afetadas pelo etanol, o qual provoca sensação de queimação no paladar, além de contribuir para a viscosidade do mesmo (YANNIOTIS *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2008).

3.10.1.2 Açúcar

O teor de açúcar está relacionado com a maturação da uva (RIZZON; MIELE, 2002). A uva madura é muito rica em carboidratos, principalmente glucose e frutose (ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2009). À medida que esta amadurece, a proporção glucose/frutose varia, sendo que no início do desenvolvimento dos grãos predomina a glucose, mas em uvas maduras, a quantidade de ambos é semelhante (DAUDT; SIMON, 2001).

Durante a fermentação, glucose e frutose são convertidas em etanol pela *Sacch. cerevisiae* (BERTHELS *et al.*, 2008). O consumo é diferenciado, sendo que há uma preponderância de frutose no mosto durante as últimas fases do processo fermentativo. Atribui-se estas discrepâncias ao transporte diferenciado pela membrana plasmática ou a diferenças durante a fosforilação da hexose dentro da célula (TRONCHONI *et al.*, 2009).

Uma alta relação frutose/glucose contribui para a ocorrência de fermentação lenta ou parada da mesma, que são problemas globais na indústria de vinho. Além

disso, a frutose tem um sabor, aproximadamente, duas vezes mais doce que a glucose, e pode causar uma doçura indesejável em vinhos (BERTHELIS *et al.*, 2008).

Em pequenas quantidades, porém presentes na uva, estão os açúcares não fermentescíveis, os quais são representados pelas pentoses, dentre as quais a arabinose e a xilose. Estes interferem na dosagem de açúcares redutores, sendo que o valor encontrado nunca é zero devido à presença destes (CARVALHO, 2007).

3.10.1.3 Compostos Voláteis

Estes compreendem, principalmente, o aldeído acético, acetato de etila, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (RIZZON; MIELE, 2002). São considerados os principais responsáveis pela qualidade do aroma do vinho (MUÑOZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Em concentrações elevadas, estes álcoois superiores apresentam um aroma penetrante e desagradável em vinhos. Entretanto, quando presentes em concentração abaixo de 300 mg.L⁻¹, podem contribuir positivamente para o aroma (FERREIRA, 2011).

Na maioria dos casos, os compostos voláteis que fazem parte do aroma são derivados da fermentação, na qual são formados muitos álcoois, sendo que após o etanol, são predominantes os de cadeia simples e ramificadas com três e cinco carbonos, e como éster o acetato de etila (POLASKOVÁ; HERSZAGE; EBELER, 2008). A produção desses álcoois pela levedura ocorre pela descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos seguida de redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica (GUTIERREZ, 1993).

Reações oxidativas também podem contribuir para o aroma dos vinhos envelhecidos, com a formação de etanal (nozes) e ácido acético (vinagre) (POLASKOVÁ; HERSZAGE; EBELER, 2008). Entretanto, se estas reações não forem controladas, o excesso dessas substâncias pode causar impacto sensorial negativo (TÔRRES, 2010).

Indesejável no vinho, o metanol ocorre em baixas concentrações em frutas frescas, mas é produzido em grandes quantidades por degradação enzimática de substâncias pécticas naturais em bebidas alcoólicas. Portanto, o controle desta

substância é crítico durante a fermentação alcoólica para a obtenção de um vinho seguro para a saúde humana, visto que pode causar envenenamento (HOU *et al.*, 2008).

3.10.1.4 Ácidos Voláteis

O conjunto de ácidos da série acética presentes no vinho é responsável pela acidez volátil. As fermentações alcoólica e maloláctica resultam em baixa acidez volátil. Dessa forma, o teor encontrado em vinhos novos é mínimo (MARTINS, 2007). Após a fermentação alcoólica, a acidez volátil do vinho tinto, em geral, aumenta. Este aumento está relacionado com a ação das bactérias lácticas sobre os açúcares de seis carbonos residuais do vinho, durante o processo de fermentação maloláctica (SILVA; MURATORE, 2003).

Acidez volátil excessiva e amargor são características comuns de vinhos contaminados (LUO *et al.*, 2012). Bactérias do gênero *Acetobacter* estão, intimamente, relacionadas com este tipo de problema (TÔRRES, 2010). Estes microrganismos estão bem adaptados a ambientes ricos em etanol e açúcar. Convertem, eficientemente, etanol a acetaldeído, e este último a ácido acético. A visualização de um biofilme logo acima da superfície do líquido é um indício de contaminação. Os aromas mais comumente encontrados são: vinagre, solventes, maçã estragada e nozes (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2008).

A adição de antimicrobianos como dióxido de enxofre ou dimetil carbamato, a pasteurização e a remoção física por filtração são algumas maneiras convencionais de evitar o problema (LUO *et al.*, 2012). O estudo de Barbosa *et al.* (2009) também mostra que a adição de nitrogênio na fase estacionária da fermentação alcoólica está relacionada com a redução na concentração de ácido acético no vinho.

3.10.1.5 Cátions

A fonte de elementos minerais no vinho pode ser natural ou antrópica (KMENT *et al.*, 2005). A primeira está relacionada com o tipo de solo, o qual interfere na composição de cátions presentes no vinho (KMENT *et al.*, 2005; GALANI-NIKOLAKI; KALLITHRAKAS-KONTOS; KATSANOS, 2002). A diversidade é de tal ordem que vários autores sugerem discriminar vinhos de regiões distintas pela análise de elementos minerais (MARTIN; WATLING; LEE, 2012; BAXTER *et al.*, 1997; COETZEE *et al.*, 2005, TAYLOR *et al.*, 2003). O Rubídio, por exemplo, é encontrado em todos os vinhos em baixa concentração. Os teores deste elemento podem estar relacionados com a origem geográfica dos vinhos (RIZZON; MIELE; SCOPEL, 2009). A fonte antropogênica pode ser devido à aplicação de pesticidas, à poluição do ambiente e à aplicação de aditivos, como a bentonita (KMENT *et al.*, 2005).

Os cátions desempenham várias funções no vinho, como participar dos processos de clarificação e de estabilização. O cálcio, potássio, magnésio e fósforo são alguns desses exemplos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998). No processo de fermentação, fazem parte da composição e nutrição das leveduras (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). O desequilíbrio de magnésio, assim como o de potássio, pode retardar ou interromper a fermentação. Além disso, baixa concentração de potássio acompanhada de um baixo pH pode contribuir para a produção de ácido acético. Dessa forma, a qualidade do produto pode ficar comprometida (SCHMIDT *et al.*, 2011).

Os elementos minerais devem estar dentro dos limites estabelecidos para a preservação da saúde humana (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). O consumo moderado e diário de vinho pode fornecer potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, manganês e zinco para suprir as necessidades biológicas. De outra forma, o consumo de cobre em excesso é tóxico para o organismo humano. Além disso, a alta concentração de ferro, zinco e cobre diminui a qualidade organoléptica do vinho (GALANI-NIKOLAKI; KALLITHRAKAS-KONTOS; KATSANOS, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS

Na safra de 2012, um total de 175 leveduras foi utilizado no presente trabalho (Tabela 2). Foram isoladas 120 leveduras da região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves, estado do Rio Grande Sul, no laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Uva e Vinho (CNPUV) a partir de amostras das cultivares Ancellotta, Tannat e Cabernet Franc. Outras 55 linhagens foram isoladas dos municípios de Colombo, Campo Largo e Almirante Tamandaré, estado do Paraná, no laboratório de Enzimologia-UFPR a partir de diferentes amostras. Destas, 42 leveduras foram isoladas em 2012, e outras 13 foram previamente isoladas em 2003.

As linhagens utilizadas como referência foram a sensível EMBRAPA 26B (K^-R^-), a neutra EMBRAPA 1vvt/97 (K^-R^+), e as *killer* EMBRAPA 91B (K^+R^+), EMBRAPA 1B (SILVA, 1996) e K1 (Lallemand Inc.). Com exceção da linhagem K1, todas estas linhagens pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves (RS). As leveduras isoladas na região Metropolitana de Curitiba foram transferidas para este laboratório em 2012.

TABELA 2- LEVEDURAS ISOLADAS DO PARANÁ E DO RIO GRANDE DO SUL

LEVEDURAS	LOCALIDADE/ANO DE ISOLAMENTO	PROCEDÊNCIA
24, 48;	Colombo (PR) / 2003	Mosto (Trasfega de Fermentação Vínica)
27, 29, 33, 34, 37;	Colombo (PR) / 2003	Vinho Tinto Seco Safra 2003
47, 49; 51; 53; 58,59;	Colombo (PR) / 2003	Suco de Uva Tinta
CB1.031.12, CB1.031.27, CB1.031.34, CB1.031.50, CB1.031.51, CB1.031.71, CB1.031.97, CB1.031.99, CB1.041.04, CB1.041.07, CB1.041.26, CB1.041.38, CB1.041.49, CB1.041.69;	Colombo (PR) / 2012	Uva Terci
CL1.051.79, CL1.052.73, CL1.052.85, CL1.053.19, CL1.053.91, CL1.061.55,	Campo Largo (PR) / 2012	Uva Merlot

Continua

TABELA 2- LEVEDURAS ISOLADAS DO PARANÁ E DO RIO GRANDE DO SUL

		Conclusão
LEVEDURAS	LOCALIDADE/ANO DE ISOLAMENTO	PROCEDÊNCIA
CL2.041.C4, CL2.041.32, CL2.041.67, CL2.041.81, CL2.042.59, CL2.042.83, CL2.042.90, CL2.051.50	Campo Largo (PR) / 2012	Uva Viagnier
AT2.031.19, AT2.031.38, AT2.031.47, AT2.031.94, AT2.032.05, AT2.032.23, AT2.032.45, AT2.041.17, AT2.041.35, AT2.041.44, AT2.041.49, AT2.041.68, AT2.041.70, AT2.041.91;	Almirante Tamandaré (PR) / 2012	Uva Terceira
A 01 – A 40	Município de Pinto Bandeira (RS) / 2012	Uva Ancelota
T 01 – T 40	Município de Pinto Bandeira (RS) / 2012	Uva Tannat
CF 01 – CF 40	Município de Pinto Bandeira (RS) / 2012	Uva Cabernet Franc

FONTE: O autor (2013)

4.2 CONSERVAÇÃO DAS CULTURAS

As leveduras foram conservadas por transferência periódica e criopreservação. No primeiro método, cada levedura pura foi semeada em tubo de ensaio contendo meio sólido mosto-ágar inclinado (SILVA, 1996). As células recém-crescidas foram mantidas a 4 °C e repicadas a cada 6 meses. No segundo, cada microrganismo proveniente de uma cultura recém-crescida em mosto-ágar foi inoculado em 2 mL de meio para conservação (10 g.L⁻¹ sacarose, 114 mL.L⁻¹ extrato de levedura não comercial). Foi adicionado à suspensão celular o volume de 500 µl de solução de glicerol (24,65 g.L⁻¹ sulfato de magnésio, 10 mL.L⁻¹ de tampão fosfato pH 4,0, 100 g.L⁻¹ sacarose, 650 mL.L⁻¹ de glicerol). As linhagens foram armazenadas em Ultra-Freezer Sanyo a -80 °C.

4.3 ISOLAMENTO E ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS

As 120 leveduras provenientes das cultivares do município de Pinto Bandeira, RS, foram isoladas no laboratório de Microbiologia-CNPUV (2012) pela técnica de diluição seriada, seguida de plaqueamento em meio sólido mosto-ágar (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Bacto™ Yeast Extract), 20 g.L⁻¹ de ágar (Bacto™ Agar), 250 mL.L⁻¹ de mosto de uva, pH 3,5). Foram ativadas por transferência periódica neste mesmo meio e crescidas em estufa a 24 °C por 24 à 48 h. Salienta-se que todos os meios de cultura e conservação utilizados neste trabalho foram previamente esterilizados em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C por 30 minutos.

As 55 leveduras provenientes do laboratório de Enzimologia-UFPR foram obtidas durante o processo fermentativo do mosto do qual foram isoladas em 2003 e 2012. A ativação ocorreu em 10 mL de meio líquido YEPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ glucose, 20 g.L⁻¹ peptona, pH 5,6). Os inóculos foram incubados em agitador rotatório (Novatécnica) em 150 rpm, 28 °C por 12 horas. O crescimento celular foi avaliado qualitativamente por meio da turbidez observada nos frascos. Procedeu-se à diluição seriada para a obtenção de colônia isolada. O isolamento foi efetuado meio sólido YEPD 2% e o crescimento a 24 °C por 24 à 48 h.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS

4.4.1 Avaliação da Produção de Sulfeto de Hidrogênio

A produção de H₂S foi acompanhada usando papel de filtro de 6 cm comprimento e 0,5 cm de largura impregnado com solução de acetato de chumbo 3%. Estas foram fixadas à tampa de tubos contendo 1 mL de uma suspensão contendo 10⁷ células/mL da levedura teste e 9 mL de mosto sulfito (0,1% sulfito de sódio anidro, 1% de triptona, 9 mL de mosto de uva) . O surgimento de coloração marrom escura nestas fitas indica produção de H₂S. Foram utilizadas duas linhagens

testemunhas, EMBRAPA 1vvt/97 como controle negativo e a comercial K-1 como controle positivo. Os tubos foram mantidos em estufa na temperatura de 24 °C e a avaliação do H₂S foi monitorada por 96 horas com intervalos de 6 e 18 horas (SILVA; SILVA, 1984). Estes tubos também foram utilizados para os ensaios de velocidade de fermentação, floculação e velocidade de sedimentação.

4.4.2 Avaliação da velocidade de fermentação

A velocidade de fermentação foi avaliada, em intervalos de 6 e 18 horas, por gravimetria (GIUDICI; ZAMBONELLI, 1992; LONGO *et al.*, 1992; SILVA, 2011a).

4.4.3 Avaliação da capacidade de floculação espontânea

A capacidade de flocular espontaneamente foi avaliada visualmente pela ocorrência ou ausência de precipitado nos tubos no decorrer de 3-4 dias (SILVA; SILVA, 1987; WHITE, 2012). O grau de floculação foi determinado subjetivamente pela aplicação de uma escala variando de 0 (sem floculação) a 3 (floculação intensa).

4.4.4 Velocidade de sedimentação da levedura

As amostras das leveduras que apresentaram atividade floculante foram homogêneas em vortex e filtradas em papel de filtro do tipo 5A (Advantec Toyo). O volume de 1 mL do filtrado foi transferido para a cubeta de quartzo e analisado em espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer). Como branco foi utilizada a água destilada. O registro da absorvância foi obtido no comprimento de onda de 600 nm a cada 2 minutos por 1 h (HAMERSVELD *et al.*, 1996). Esta medida foi realizada em

triplicata. Este teste foi avaliado estatisticamente por análise de variância das linhagens mais promissoras ($P= 0,05$).

4.4.5 Avaliação da Característica *killer*

4.4.5.1 Detecção do fator *killer*

A produção do fator *killer* pelas leveduras isoladas foi avaliada em placas de Petri contendo o meio Lorena/ELNC (80:20) (800 mL^{-1} de mosto Lorena, 200 mL^{-1} de ELNC, 6 mL.L^{-1} de azul de metileno, 5 gotas de dimeticona, pH 4,5) (SILVA *et al.*, 2011b). As placas continham $100 \mu\text{L}$ de uma suspensão de 10^7 células. mL^{-1} da levedura sensível EMBRAPA 26B. Sobre estas foram plaqueadas massas pontuais, em duplicata, das leveduras em teste com o auxílio de alça de platina. As placas foram mantidas em estufa a 24°C por 48-72 h. As linhagens *killer* utilizadas como referência neste experimento foram a EMBRAPA 1B, EMBRAPA 91B e a comercial K1. A formação de halo de inibição ao redor da colônia da levedura testada confirma a produção da toxina (SILVA, 1996; SILVA *et al.*, 2011b). O teste foi repetido nas mesmas condições, porém com o meio tamponado YEPD 2% (10 g.L^{-1} extrato de levedura (Difco), 20 g.L^{-1} peptona (Difco), 20 g.L^{-1} dextrose (Difco), pH 4,5).

4.4.5.2 Sensibilidade e neutralidade ao fator *killer*

O teste de sensibilidade e neutralidade ao fator *killer* refere-se a leveduras que, respectivamente, respondem e não respondem à ação da proteína *killer*. O ensaio é realizado em placas de Petri contendo o meio Lorena/ELNC (80:20) (SILVA *et al.*, 2011b). A alíquota de $100 \mu\text{L}$ de suspensão contendo 10^7 células. mL^{-1} da levedura a ser testada foi plaqueada. Sobre estas, as leveduras *killer* de referência EMBRAPA 1B, EMBRAPA 91B e a comercial K1 foram transferidas de forma pontual

e em triplicada com o auxílio de alça de platina. As placas foram incubadas a 24 °C por 48-72 h. A presença ou ausência de halo de inibição em torno das colônias *killer* representa, respectivamente, o fenótipo K⁻R⁻ ou K⁻R⁺ (SILVA, 1996). O teste foi repetido nas mesmas condições, porém com o meio tamponado (pH 4,5) YEPD 2%.

4.4.5.3 Validação do meio Lorena/ELNC (80:20) quanto à produção de fator *killer* e teste *killer* proteína/célula

O teste *killer* pela avaliação proteína/célula verifica a ação direta da toxina *killer* sobre linhagens sensíveis ao mesmo tempo em que é realizada a avaliação do meio Lorena/ELNC (80:20). Esta se baseia na comparação do diâmetro do halo de inibição formado no teste proteína/célula no meio artificial tamponado YEPD 2% e Lorena/ELNC (80:20). As linhagens testadas foram as que apresentaram o fenótipo K⁺R⁺. Para o preparo da amostra, a quantidade de 1 mL de uma suspensão contendo 10⁷ células.mL⁻¹ foi inoculada em 9 mL de meio líquido Lorena/ELNC (80:20) e incubado por 96 horas à 18 °C. Depois deste período de tempo, o meio foi centrifugado a 13.800 x g por 10 minutos e o sobrenadante armazenado à -18 °C até a análise. O volume de 0,1 mL de uma suspensão de 10⁷ células.mL⁻¹ da levedura sensível 26B foi transferido para placas de Petri contendo os meios sólidos Lorena/ELNC (80:20) e YEPD 2%. Com o auxílio de cilindro de 6 mm de diâmetro, o ágar foi perfurado para formação de micropoços. Uma alíquota de 30 µL de cada suspensão foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millex - Millipore) e aplicada, em triplicata, nos micropoços. Uma série foi mantida a 18 °C e outra a 24 °C por 48-72 horas (SILVA *et al.*, 2011b). As leveduras tomadas como referência foram EMBRAPA 1B, EMBRAPA 91B e comercial K1. Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento formadas nos meios sólidos Lorena/ELNC (80:20) e YEPD foram medidos e comparados (SILVA, 1996; SILVA *et al.*, 2011b). Foi realizada análise de variância e aplicado o teste de Tukey (P=0,05).

4.4.6 Análise Sensorial

As leveduras que apresentaram perfil adequado para a elaboração de vinhos foram submetidas ao teste de aromas. A quantidade de 1 mL de cada levedura foi inoculada em 9 mL de meio G7 (200 g.L⁻¹ de sacarose, 114 mL.L⁻¹ de ELNC). Os tubos foram incubados a 18 °C por 96 horas. Um painel de quatro pessoas analisou a qualidade do aroma. A cada participante foi fornecida uma amostra de cada linhagem, a qual foi comparada com as demais. Cada participante atribuiu uma nota ao aroma, de acordo com a seguinte escala: 0, 1, 2 e 3. O valor 0 e 3 correspondem, respectivamente, às leveduras que não produziram aromas, e as que produziram aroma agradável mais intenso. O desempate entre amostras que atingiram a nota máxima foi realizado qualitativamente pela comparação entre ambas.

4.5 MELHORIA NO PROCESSO METODOLÓGICO PARA A DETECÇÃO DE PARTÍCULAS SEMELHANTE A VÍRUS DE LEVEDURAS (VLP) POR ELETROFORESE

4.5.1 Extração de ácidos nucleicos totais

As leveduras 1B e 26B foram incubadas a 24 °C por 48 h em tubos de ágar inclinado contendo o meio mosto. O inóculo consistiu em lavar os tubos recém-crescidos com 9 mL de meio mosto/ G7 (80:20) e verter o líquido obtido em 600 mL deste meio contido em frasco Fernenbach. O ensaio foi realizado em triplicada. Os frascos para crescimento celular foram mantidos a 24 °C, 150 rpm por 48 h em agitador-incubador rotatório. As células foram coletadas por centrifugação a 2000 x g por 10 minutos. As etapas de adição de 15 mL de H₂O destilada sobre as células, homogeneização e centrifugação a 2000 x g por 10 minutos foram repetidas até se obter células livres de mosto residual. O material foi congelado por 24 h e, em seguida, descongelado em temperatura ambiente. Isto foi repetido, no mínimo, duas

vezes para a extração eficiente do material intracelular (SILVA *et al.*, 2012). O material foi mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

4.5.2 Extração dsRNA de leveduras

As linhagens 1B e 26B foram descongeladas. O volume de $500\text{ }\mu\text{l}$ de cada suspensão de levedura foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min (as condições de centrifugação foram as mesmas durante todo o procedimento). O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de solução NaCl 0,1 M, Tris 10mM, EDTA 10 Mm e 0,2% de dodecil sulfato de sódio (SDS). Em seguida, acrescentaram-se 2 mL de fenol tamponado pH 8,0, homogeneizou-se a mistura em vortex e esta foi deixada em repouso por 3 horas à temperatura ambiente. O conteúdo de cada frasco foi centrifugado. Foi adicionado acetato de sódio 0,3 M à 1/10 da parte aquosa obtida. Esta foi tratada com 2,5 volumes de etanol a frio e deixado por 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O material foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min e ao sedimento foi adicionado 2 mL de LiCl 2 M a frio, o qual foi incubado por 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A amostra foi centrifugada nas mesmas condições e o sedimento foi descartado. Ao sobrenadante foram adicionados acetato de sódio 0,3 M e etanol nas mesmas condições descritas acima. Após a incubação e centrifugação executada da forma já descrita, ao sedimento foram adicionados 2 mL de LiCl 4 M a frio, o qual foi incubado por 30 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após nova centrifugação a 10.000 x g por 15 min, descartou-se o sobrenadante, no qual se encontra o DNA, e se reteve o sedimento com o dsRNA. Esta etapa foi repetida visando atingir maior grau de pureza. O plasmídeo foi ressuspensionado em 25-200 μl de tampão TBE 1x e armazenado a -20°C (FRIED; FINK, 1978).

4.5.3 Confirmação da extração de dsRNA

A presença do dsRNA foi averiguada em gel de agarose 1,2% (90V, 1h 30min). Para cada extração de dsRNA, 20 µL de solução tamponada foram pipetados no gel. Após 20 min de imersão em brometo de etídio, os fragmentos foram visualizados e fotografados em luz UV no transiluminador Eagle Eye II (Stratagene, EUA). Foi utilizado o marcador λDNA/ PSTI para estimar o tamanho de cada fragmento.

4.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS

4.6.1 Extração do DNA

A extração do material genético foi feita pela técnica de congelamento/descogelamento como descrita por Silva *et al.* (2012).

4.6.2 Amplificação da região rDNA ITS e sua confirmação

A amplificação do material genético foi feita por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A região ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificada pelos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 nas seguintes condições: água ultrapura 15,45 µL, tampão 10x 2,50 µL, iniciador ITS1 (Invitrogen, EUA) 1,0 µL, iniciador ITS4 1 µL, MgCl₂ (Invitrogen, EUA) 1,25 µL, dNTP (Invitrogen, EUA) 2,5 µL, Taq polimerase Platinum® (Invitrogen, EUA) 5 U/µL 0,3 µl e DNA 1,0 µL perfazendo um total de 25 µL de volume total da reação. Foi utilizado o termociclador Bio-Rad (EUA). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5

min, seguidos de 25 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 s, pareamento a 60 °C por 45 s, extensão por 72 °C por 30 s, finalizando em 72 °C de extensão por 5 min. Aliquotas de 2,0 e 5,0 µL, respectivamente, do marcador de massa molecular Easy Gen (100 – 1500 bp) e dos produtos da PCR, acrescidos de 2 µL de corante azul de bromofenol foram aplicados em gel de agarose 1% (Sigma, EUA). Este foi submetido à corrente elétrica de 90 mA durante 1 hora e 30 min. O gel corado com uma solução de brometo de etídio 5% por 20 min e visualizado e fotografado em luz UV 302 nm no transiluminador Eagle Eye II (Stratagene, EUA) (GUILLAMÓN *et al.*, 1998).

As linhagens que não foram amplificadas com os iniciadores ITS1 e ITS4 também foram testadas com os iniciadores YEAST R e YEAST F. Estes iniciadores geram um fragmento de 375 pb da região rDNA 18S. A PCR foi realizada nas condições definidas por Silva *et al.* (2012). Foi utilizado o termociclador Bio-Rad (EUA). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 s, pareamento a 68 °C por 45 s, extensão por 72 °C por 30 s, finalizando em 72 °C de extensão por 5 min. A revelação do produto de PCR foi realizada nas mesmas condições descritas acima.

4.7 VINIFICAÇÃO COM LEVEDURAS SELECIONADAS

4.7.1 Vinificação em escala laboratorial

A quantidade de 40 kg de uvas da cultivar Pinot Noir foi colhida na safra de 2013 em Bento Gonçalves, no RS. O processo de elaboração dos vinhos compreendeu: desengaçamento, esmagamento das uvas, chaptalização, adição de dióxido de enxofre (metabissulfito de potássio), inoculação das leveduras testadas e fermentação alcoólica, remontagem, descuba, trasfega, atesto e fermentação maloláctica. A chaptalização visou permitir ao vinho elaborado atingir um grau

alcoólico de 11,7° GL. Após esta etapa, foi adicionado 70 mg.L⁻¹ SO₂ ao mosto resultante. Este permaneceu em repouso por 1 hora. As leveduras autóctones 27 e A38 foram utilizadas como inóculo a partir de culturas recém-crescidas em mosto de uva Pinot Noir a 24 °C por 24 h. A linhagem 1vvt/97 foi utilizada como controle. O volume de 100 ml de inóculo de cada levedura foi adicionado a 2000 mL de mosto de uva, suficiente para atingir a concentração final de 10⁷ células.mL⁻¹. A fermentação foi conduzida a 24 °C por 5 dias. Ao final deste período, foram realizadas as análises de açúcar residual, grau alcoólico, pH e acidez volátil pela coleta de 200 mL de amostra de cada mosto.

4.7.2 Análises Físico-Químicas

4.7.2.1 Determinação de Açúcares Redutores

O método escolhido foi o titulométrico. Foi adicionado 10 ml de Fehling A (solução de sulfato de cobre penta-hidratado 6,93%) e Fehling B (solução com 34,5% tartarato duplo de sódio e potássio, 34,6%, NaOH 10,3%) em 10 mL de vinho diluído em 10 mL de água destilada. A mistura foi aquecida até a fervura para a conversão da sacarose em açúcares redutores. Após o resfriamento da solução, foi acrescido 3 mL de iodeto de potássio 30% e 10 mL de ácido sulfúrico 17%. A solução resultante foi titulada com tiosulfato de sódio 0,1 N. Como indicador, foi utilizado 2 mL de solução de amido 1%. O ponto final da titulação é reconhecido pela visualização de coloração esbranquiçada na mistura contendo a amostra. O cálculo da quantidade açúcares redutores foi feito a partir de um fator de conversão considerando-se a diferença de quantidade de tiosulfato de sódio consumido na reação com a amostra e na reação com o branco (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1982).

4.7.2.2 Determinação do Teor Alcoólico

A quantidade de 100 mL de amostra, acrescida de 10 mL de solução óxido de cálcio 12%, foi destilada em aparelho Gibertini Super D.E.E (Itália). Foram recolhidos 70 mL de destilado, ao qual foi adicionado 30 mL de água destilada. A densidade da solução é aferida a 20 °C em balança Gibertini Super Alcomat (Milão - Itália) e o teor alcoólico calculado e expresso em °GL (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1982).

4.7.2.3 Acidez Volátil

A quantidade de 20 mL de amostra foi analisada em aparelho Gibertini Super D.E.E (Milão - Itália), equipado com coluna de refrigeração. O fundamento da técnica é o arraste de ácidos voláteis pelo aquecimento da solução. O volume recolhido de 240 mL é titulado com hidróxido de sódio 0,1 N até que o indicador, fenolftaleína, adquira a coloração rosada. A determinação da acidez volátil foi estimada com base no valor gasto de NaOH e expresso em mEq.L^{-1} (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1982).

4.7.2.4 Compostos Voláteis

Os compostos voláteis etanal, acetato de etila, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol foram determinados em cromatógrafo à gás Autosystem XL Perkin Elmer (EUA) equipado com detector de ionização em chama (DIC) e uma coluna CP-WAX 57 CB de 50 m de comprimento, 0,25 mm e 0,39 mm, respectivamente, de diâmetro interno e externo, operada com programação linear de temperatura. A temperatura inicial foi de 40 °C por 2 min, aumentada a 15 °C/min até 120 °C por 1 min, em seguida foi aumentada 35 °C/min até 200 °C. Esta temperatura foi mantida por 1 min. As temperaturas do detector e

injetor foram de, respectivamente, 200 e 250 °C. Os fluxos de ar sintético (comburente) e de hidrogênio (combustível) foram de 450 mL/min e de 45 mL/min, respectivamente. O fluxo do gás de arraste, hélio, foi 2 mL/min. As áreas dos picos foram medidas usando o programa do fabricante e a concentração medida de acordo com padrão de cada componente.

Uma alíquota de 1 µL do destilado de cada vinho foi injetado diretamente no aparelho. Como padrão interno, foi empregada uma solução de 0,1% 4-metil-2-pentanol. Para diminuir a quantidade de amostra injetada foi utilizado um fracionamento mecânico (*split*) na razão 1:30, utilizando o próprio gás de arraste como diluente.

4.7.2.5 Análise de Cátions

Os teores de potássio, sódio, cálcio, lítio e rubídio foram analisados em espectrofotômetro de emissão de chama. O aparelho utilizado para as três primeiras substâncias foi o Perkin-Elmer 2380 (EUA), enquanto que para as duas últimas foi o Varian AA240 FS (EUA). Em ambos os equipamentos, foi utilizada lâmpada de cátodo-oco para cada cátion das suas respectivas marcas Perkin-Elmer e Varian. A proporção de ar/acetileno do queimador, a abertura de fenda (*slit*) e os comprimentos de onda seguiram as recomendações dos fabricantes (PERKIN-ELMER, 1976; VARIAN, 1989) para cada elemento.

As análises de cálcio, magnésio, manganês, ferro, cobre, lítio e zinco foram feitas em espectrofotômetro de absorção atômica Varian AA240 FS e Perkin-Elmer 2380. Somente o cálcio foi analisado por este último aparelho. Os aparelhos foram equipados com queimador de ar acetileno e lâmpadas de cátodo oco Ca da Perkin-Elmer, Zn e multi da Varian, para as análises de, respectivamente, cálcio, zinco e demais elementos. A proporção de ar/acetileno, a abertura de fenda (*slit*) e os comprimentos de onda seguiram as recomendações dos fabricantes (PERKIN-ELMER, 1976; VARIAN, 1989) para cada elemento.

O teor de fósforo foi determinado por colorimetria em espectrômetro Agilent Technologies Cary 60. O volume de 1 mL de amostra foi analisado em 725 nm conforme o método de Ribèreau-Gayon *et al.* (1982).

4.7.2.6 Análise do potencial hidrogeniônico

O potencial hidrogeniônico (pH) foi aferido em aparelho da marca Marconi, modelo PA 200 (Brasil), devidamente calibrado. Foi aplicado o método potenciométrico (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1982).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TESTE DE PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO

Dos 175 microrganismos avaliados, 25,1%, 6,8% e 16% apresentaram, respectivamente, baixo, médio e alto desprendimento de H_2S . Como verificado na Figura 7, a maioria, 52%, não produziu o gás.

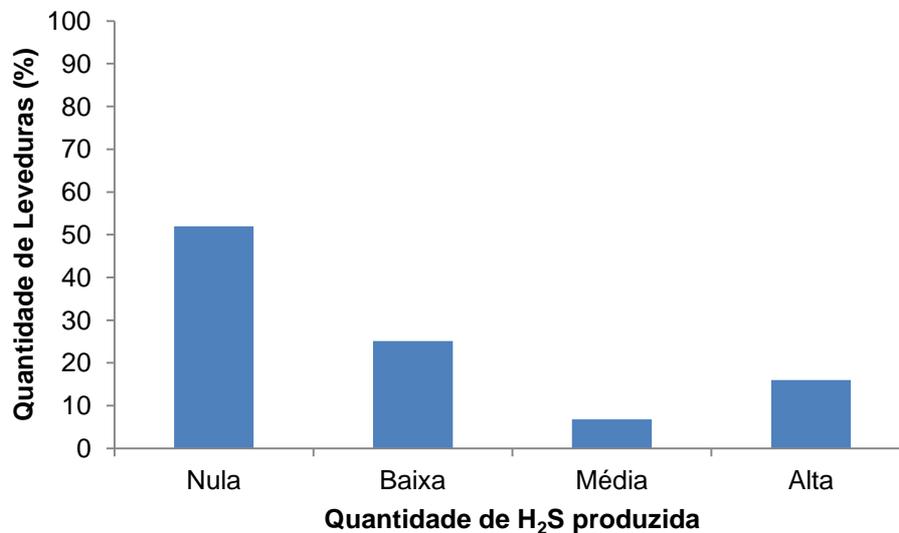


FIGURA 7- PRODUÇÃO DE H_2S PELAS LEVEDURAS ISOLADAS NOS ESTADOS DO PARANÁ E RIO GRANDE DO SUL

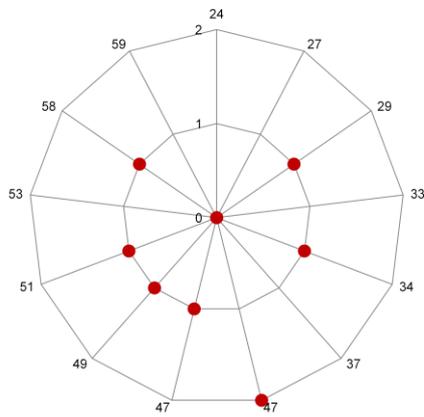
FONTE: O autor (2013)

É conhecido que as linhagens produtoras do H_2S necessitam da presença das enzimas da via de redução do sulfato, e a repressão ou expressão destas enzimas está relacionada com a quantidade de H_2S formado (BUTZKE; PARK, 2011). Além disso, a composição do mosto pode influenciar a produção de H_2S pela presença de nitrogênio assimilável. O metabolismo de aminoácidos que contém enxofre, como a metionina e a cisteína, pode resultar em produção acentuada de sulfeto de hidrogênio se não houver presentes no meio de cultura precursores

nitrogenados destes aminoácidos prontos para reagir enzimaticamente com o H₂S formado pela levedura (CORDENTE *et al.*, 2009).

Nas Figuras 8 e 9 estão apresentados os gráficos que mostram a produção de H₂S em três níveis de acordo com a região de estudo. Na região metropolitana de Curitiba, na safra de 2012, foi isolado o maior número de microrganismos que produziu H₂S intensamente (nível 3). No município de Pinto Bandeira, o maior número de linhagens com alta produção de H₂S foi isolado da cultivar Cabernet Franc. Csoma *et al.* (2010) estudaram a diversidade de *Saccharomyces* em vinhos fermentados espontaneamente em quatro vinícolas da Hungria. Embora os isolamentos tenham sido realizados na mesma região, ou a partir do mesmo mosto, foi encontrada grande diversidade genética e fisiológica entre as leveduras *Sacch. cerevisiae*. Os resultados desse estudo sugeriram que esta espécie tem um genoma propenso a mudar facilmente, alterando suas estruturas cromossômicas. Isso explicaria a diversidade de produção de H₂S na região metropolitana de Curitiba entre diferentes safras e entre as cultivares colhidas no município de Pinto Bandeira. As 13 linhagens isoladas em 2003 na região metropolitana de Curitiba foram previamente caracterizadas por Guimarães (2005). O autor encontrou a formação de H₂S em seis dessas linhagens, enquanto que no presente trabalho sete leveduras produziram este gás. Dessa forma, além de diferenças metodológicas, mudanças genéticas podem explicar a alteração observada no perfil de produção de H₂S por estas leveduras.

A.



B.

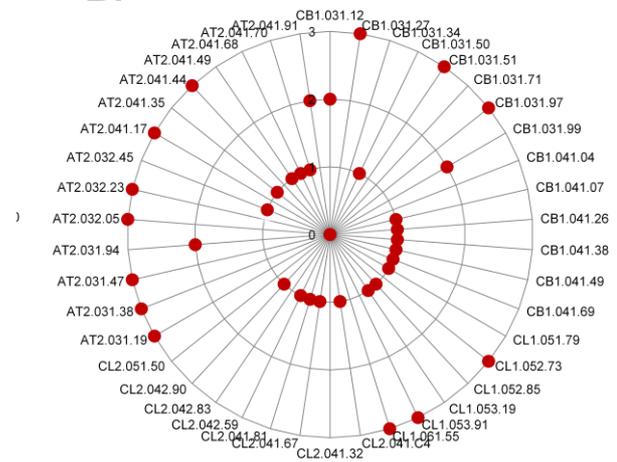


FIGURA 8- NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H_2S POR LINHAGENS ISOLADAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NA SAFRA DE 2003 (A) E NA SAFRA DE 2012 (B)

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os níveis de produção de H_2S estão indicados pela escala: (0) nula, (1) baixa, (2) média e (3) alta. Os pontos em vermelho indicam a intensidade de produção de H_2S pela linhagem correspondente no extremo da linha. Não houve nenhuma levedura na figura (A) que produziu H_2S com alta intensidade.

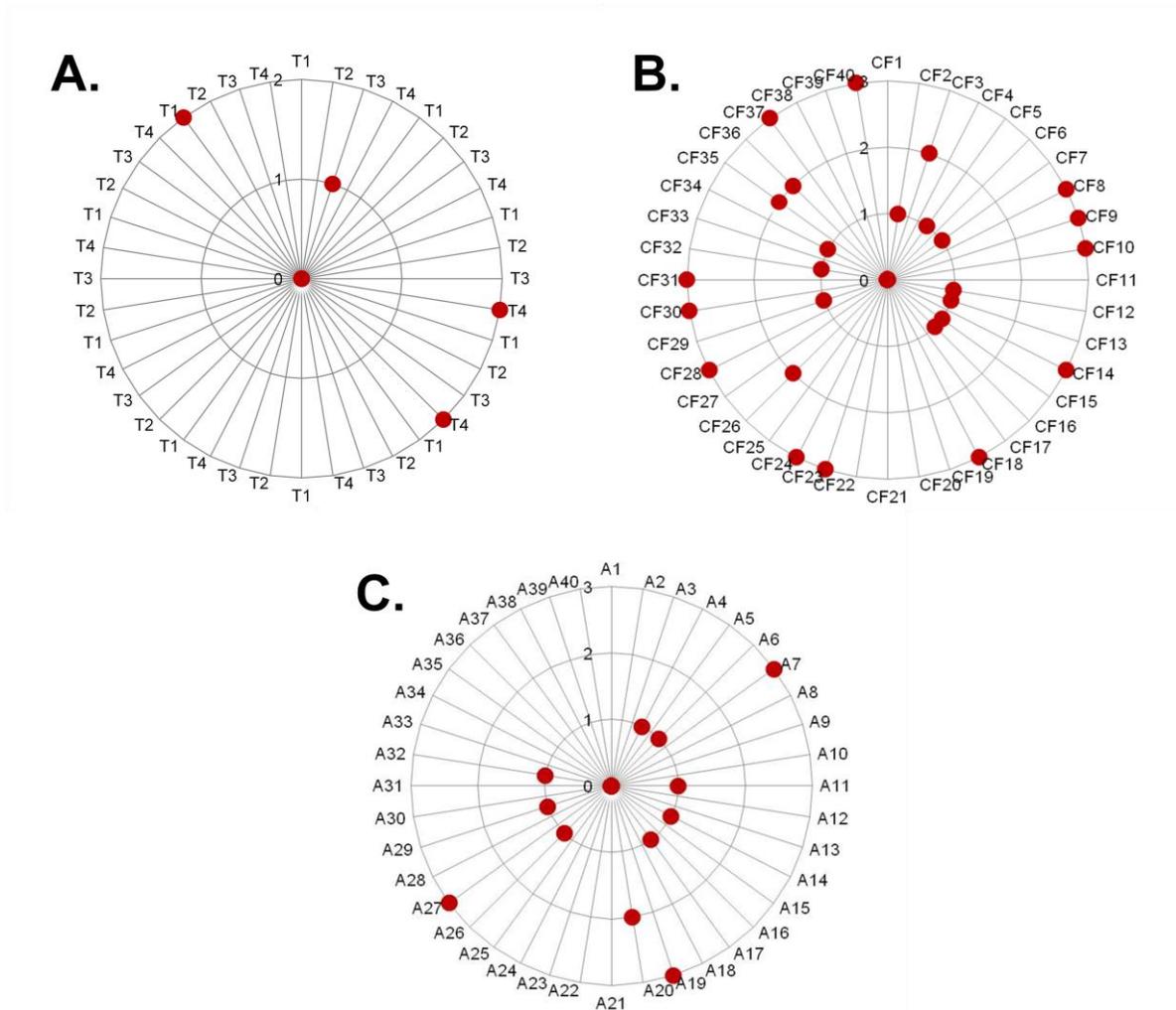


FIGURA 9- NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H₂S POR LINHAGENS ISOLADAS NO MUNICÍPIO DE PINTO BANDEIRA DAS CULTIVARES TANNAT (A), CABERNET FRANC (B) E ANCELLOTTA (C)

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os níveis de produção de H₂S estão indicados pela escala: (0) nula, (1) baixa, (2) média e (3) alta. Os pontos em vermelho indicam a intensidade de produção de H₂S pela linhagem correspondente no extremo da linha.

A frequência de linhagens produtoras de H₂S pareceu variar de acordo com a origem das leveduras e com relação à cultivar. Foram isoladas linhagens que apresentaram produção de H₂S de, respectivamente, 65%, 32,5% e 10% das cultivares Cabernet Franc, Ancellotta e Tannat provenientes do município de Pinto Bandeira da área de um mesmo vitivinicultor. Estudo anterior realizado com a cultivar Cabernet Franc confirma um percentual mais elevado (79,2%) (SILVA, 1999a). Uma pesquisa com a cultivar Cabernet Sauvignon, coletada na mesma região, mostrou que 70% das linhagens isoladas produziram H₂S (SILVA; DALARMI, 2003). A variação encontrada na frequência pode ser explicada pela composição química dos diferentes cultivares, a qual privilegiou determinados tipos de microrganismos. Pode também ser devido ao tipo de tratamento fitossanitário recebido por cada cultivar. O uso de fungicidas no cultivo da videira pode ser uma fonte de precursores ou de indutores seletivos para a formação do H₂S. Estes produtos podem conter resíduos de enxofre elementar, o qual é diretamente reduzido a H₂S (JIRANECK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995). Isso também explicaria a variação nas frequências encontradas em outras regiões.

A frequência da produção de H₂S pelas leveduras da região metropolitana de Curitiba, no ano de 2012, foi superior a encontrada nas linhagens no município de Pinto Bandeira como evidenciado na Figura 10. A formação de H₂S na safra de 2003 e 2012 foi de, respectivamente, 53,8% e 85,6%. Linhagens isoladas de cultivares da região demarcada do Douro em Portugal, mostraram valores ainda mais elevados para leveduras fortemente produtoras de H₂S (90,3%). Apenas 25 linhagens das 259 isoladas mostraram baixa atividade da sulfito redutase (NETO; MENDES-FERREIRA, 2005). Na Espanha, Ortiz *et al.* (2013) observaram que 46% das linhagens produziram H₂S durante a fermentação. A microbiota presente no suco de uva pode ser afetada por diversos fatores. A localização geográfica, condições climáticas, idade do vinhedo e variedade da uva são alguns exemplos (BELTRAN *et al.*, 2002). Dessa forma, a diversidade quanto à produção de H₂S presente nas regiões estudadas não pode ser atribuída a uma única variável.

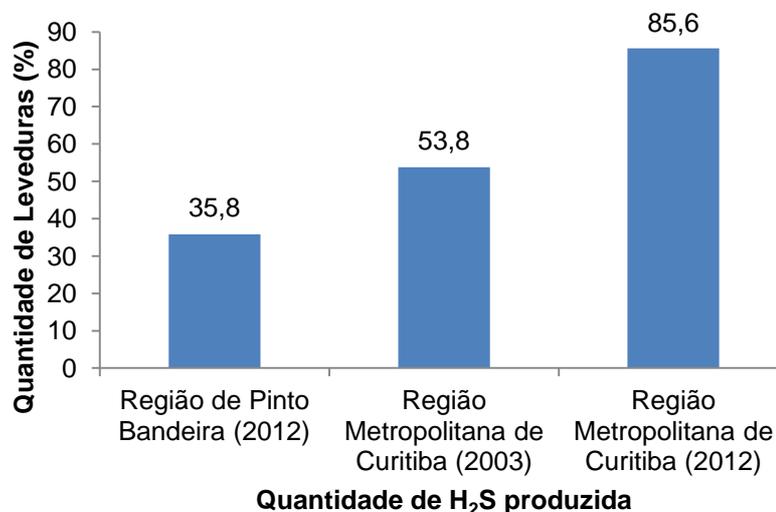


FIGURA 10 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H₂S PELAS LEVEDURAS DE ACORDO COM A SAFRA E LOCALIDADE DE ISOLAMENTO

FONTE: O autor (2013)

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que 52% do total de linhagens isoladas apresentam uma atividade extremamente baixa da enzima sulfito redutase ou são aptas em promoverem uma rápida combinação do H₂S formado com precursores nitrogenados.

5.2 VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO

A adequada capacidade fermentativa, indispensável para a elaboração de vinhos, foi baseada na velocidade de fermentação das linhagens padrões K1 e 1vvt/97. Na região de Pinto Bandeira, no RS, a alta velocidade de fermentação foi observada apenas em linhagens isoladas a partir da cultivar Ancellotta. Destas, 40% apresentaram velocidade de fermentação similar a dos padrões da *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 e K1 (Lallemand) e apenas uma produziu, embora em pequenas quantidades, H₂S, não apresentando risco à qualidade do vinho elaborado. Portanto, 13,33% das linhagens isoladas dessa região, unem os atributos de alta velocidade de fermentação, representada pelas figuras 11 e 12, e baixa atividade da

sulfito redutase. As demais, incluindo as produtoras de H_2S , apresentaram baixa atividade fermentativa.

As leveduras *Sacch. cerevisiae* podem estar presentes em baixa quantidade ou mesmo ausentes nas cultivares Cabernet Franc e Tannat. Da mesma forma, um estudo realizado na África do Sul não encontrou *Sacch. cerevisiae* em 5 dos 13 locais em que foram coletadas amostras. A ausência da levedura foi associada ao plantio recente de vinhedos na região e a inexistência de vinícolas nas redondezas (WESTHUIZEN; AUGUSTYIN; PRETORIUS, 2000). Diversos estudos relatam a dificuldade para isolar esta espécie a partir de solos de vinhedo e superfície de uvas maduras. Segundo Beltran *et al.* (2002), a linhagem predominante na superfície de grãos de uva é *Hanseniaspora uvarum*, representando 50-75% da população total de microrganismos. Demais leveduras são encontradas em baixa quantidade, incluindo a *Sacch. cerevisiae*. O estudo de Settani *et al.* (2012) encontrou distribuição heterogênea da levedura *Sacch. cerevisiae* nos vinhedos. Em algumas regiões da Sicília, na Itália, foram encontradas até 12 diferentes linhagens, enquanto em outras a presença de *Sacch. cerevisiae* foi muito baixa.

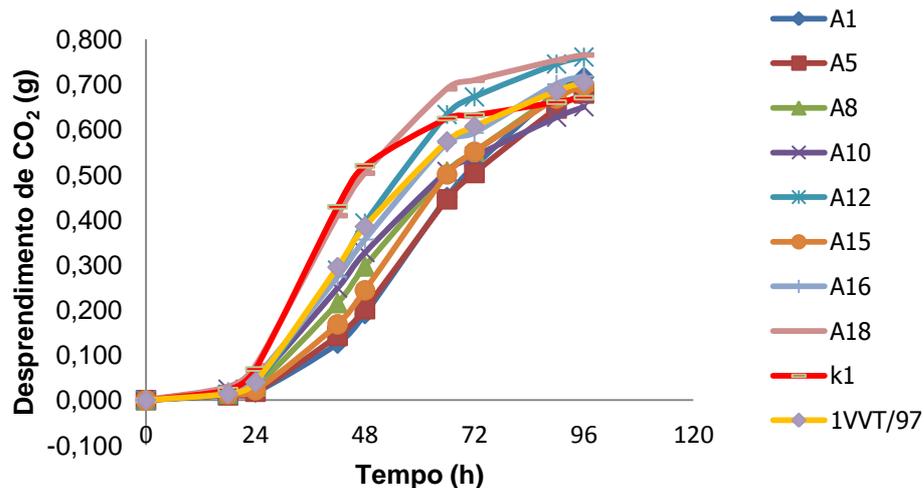


FIGURA 11 - VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS A PARTIR DA CULTIVAR ANCELLOTTA REPRESENTANDO AS LINHAGENS DE A1 A A18.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As linhagens 1 vvt/97 e K1 foram utilizadas como padrões.

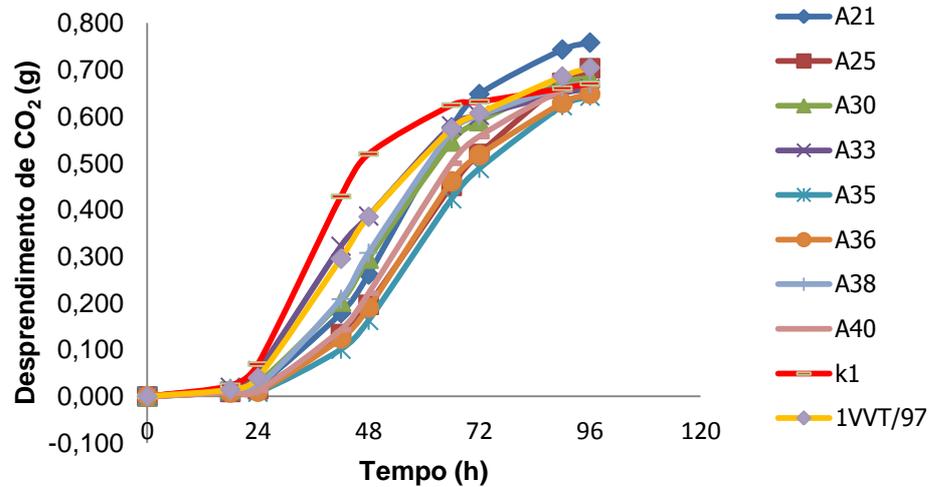


FIGURA 12 - VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS A PARTIR DA CULTIVAR ANCELLOTTA REPRESENTANDO AS LINHAGENS DE A21 A A40

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As linhagens 1 vvt/97 e K1 foram utilizadas como padrões.

Como demonstrado na figura 13, foram isoladas 13 linhagens com elevada capacidade fermentativa a partir das cultivares provenientes da região metropolitana de Curitiba, no PR, na safra de 2003. Por terem sido isoladas em 2003 (GUIMARÃES, 2005), estas leveduras estão passando por uma reavaliação. A linhagem 47 apresentou maior velocidade metabólica. Entretanto, produziu H₂S, não devendo ser utilizada por ser potencialmente capaz de comprometer a qualidade do vinho. O estudo de Guimarães (2005) apresentou a linhagem 48 como maior produtora de etanol. No presente trabalho, esta levedura obteve a segunda maior velocidade de fermentação, mas por ser classificada como sensível ao fator *killer* não foi selecionada e não pode ser utilizada de forma segura no processo de elaboração de vinho. Na safra de 2012, apenas a levedura CB1.031.71 apresentou alta velocidade fermentativa (figura 14). Entretanto, esta linhagem não foi selecionada para a elaboração de vinhos por produzir o fator *killer*. A viticultura na região metropolitana de Curitiba se caracteriza pelo processo de fermentação espontânea (LIMA, 2011). O não uso de uma levedura autóctone com aptidão enológica adequada pode permitir que leveduras *killer* de baixa qualidade enológica se estabeleçam e comprometam a qualidade do produto final. Como consequência,

a qualidade do produto poderá ser menor. Dessa forma, apenas a linhagem 27 da região metropolitana de Curitiba apresentou potencial de uso na vinificação.

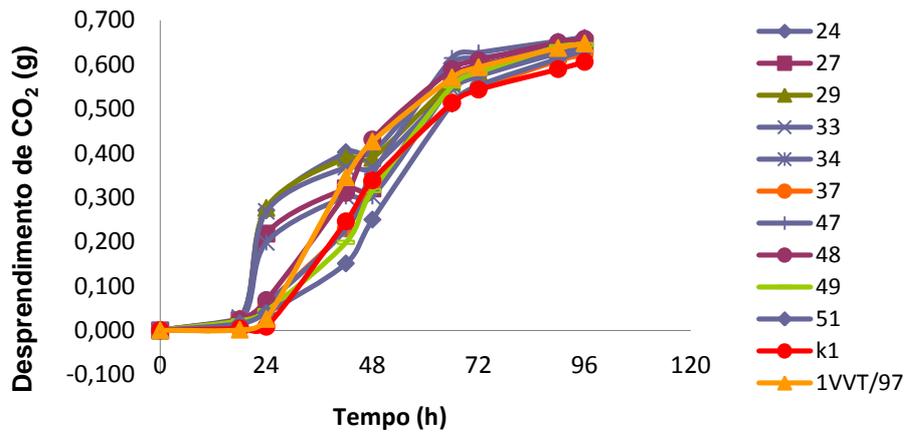


FIGURA 13 - VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS A PARTIR DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NA SAFRA DE 2003 REPRESENTANDO AS LINHAGENS 24, 27, 29, 33, 34, 37, 47, 48, 49 E 51

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As linhagens 1 vvt/97 e K1 foram utilizadas como padrões.

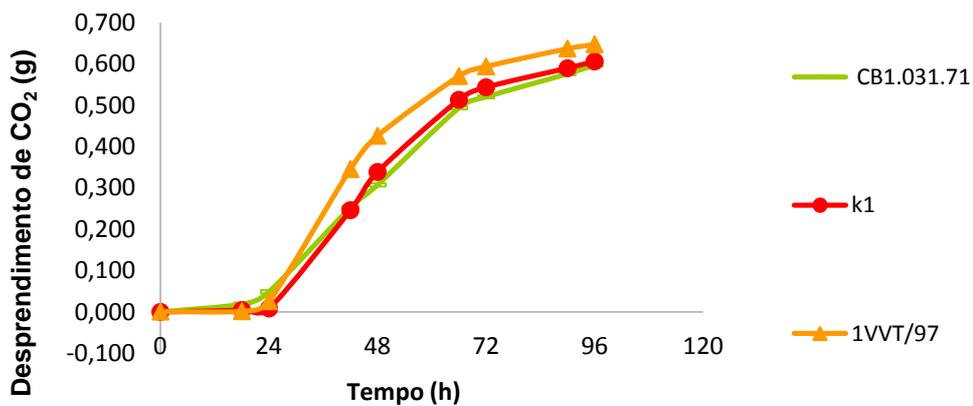


FIGURA 14 - VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM CB1.031.71, ISOLADA NA SAFRA DE 2012

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As linhagens 1vvt/97 e K1 foram utilizadas como padrões.

A capacidade fermentativa depende da resposta de cada linhagem em relação a fatores de estresse aos quais as leveduras estão submetidas, como alta produção de etanol e disponibilidade de nutrientes (SHARMA; SINGH; SAWANT,

2012). No município de Pinto Bandeira, no RS, as linhagens que melhor metabolizaram o açúcar foram as A12, A16 e A18, e com desprendimento de CO₂ de, respectivamente, 0,0079; 0,0075 e 0,0080 g.h⁻¹. A levedura A38, produtora de aromas agradáveis (5.11.1), fermentou a uma taxa de 0,0070 g.h⁻¹. Somente a linhagem A18 formou H₂S em baixa quantidade. A taxa de fermentação da linhagem 27, oriunda da região metropolitana de Curitiba, foi de 0,0067 g.h⁻¹. Dessa forma, a linhagem A18 apresenta a melhor capacidade fermentativa.

5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FLOCULAÇÃO ESPONTÂNEA

Na região de Pinto Bandeira, no RS, somente a partir da cultivar Ancellotta foram isoladas linhagens floculantes, perfazendo 57,5% do total destas. Nenhum dos microrganismos isolados das cultivares Tannat e Cabernet Franc foram capazes de flocular espontaneamente. Na região metropolitana de Curitiba, observou-se a formação desses agregados em 30,9% das linhagens. O uso de leveduras floculantes facilita o processo de elaboração de vinhos. O tempo de decantação é reduzido e, portanto, as etapas de filtração e centrifugação para a separação das células podem ser eliminadas (GUIMARÃES, 2005).

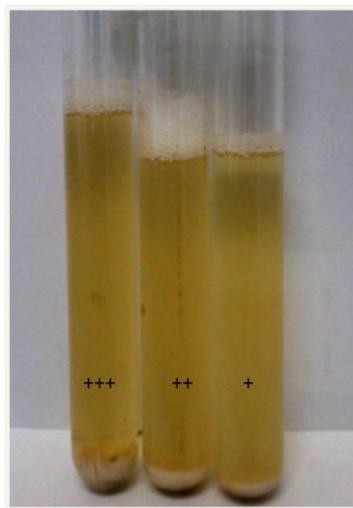


FIGURA 15 – INTENSIDADE DE FLOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Baixa (+), média (++) e intensa (+++)

Como mostrado na figura 15, as linhagens floculantes foram diferenciadas pelo volume de agregado formado nos tubos de ensaio. Leveduras com baixo, médio e alto grau de floculação representam, respectivamente, 5,7%, 2,8% e 16% do total de linhagens isoladas no presente trabalho em ambas as regiões. Na figura 16 é possível verificar a diferença na intensidade de floculação de acordo com a região e safra estudada. A quase totalidade de leveduras isoladas da safra de 2012 da região metropolitana de Curitiba não floculou, enquanto todas as da safra de 2003 apresentaram formação de agregados. As linhagens da safra de 2003 já haviam sido pré-selecionadas para a elaboração de vinhos no estudo de Guimarães (2005). Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, este último encontrou a capacidade de floculação em apenas uma levedura. O resultado encontrado está de acordo com dados da literatura, os quais citam que a floculação é um atributo instável (STRATFORD, 1994; BRITES, 2003). A composição de alguns meios de cultura pode favorecer a modificação de componentes da parede celular relacionados à floculação. Amri *et al.* (1982) observaram que a ausência de inositol e a presença de íons Ca^{2+} nos meios são importantes para a expressão deste fenótipo. Vários autores citam que a floculação pode ser inibida por açúcares e por EDTA (SAMPERMANS; MORTIER; SOARES, 2005; DOMINGUES *et al.*, 2000). STRATFORD (1994) afirma que os meios complexos, como o mosto de cerveja, favorecem a floculação. Dessa forma, sugere-se que o meio líquido mosto sulfito, com composição próxima a do mosto de uva, estimula a floculação, especialmente no final da fermentação quando o teor de ART se encontra baixo.

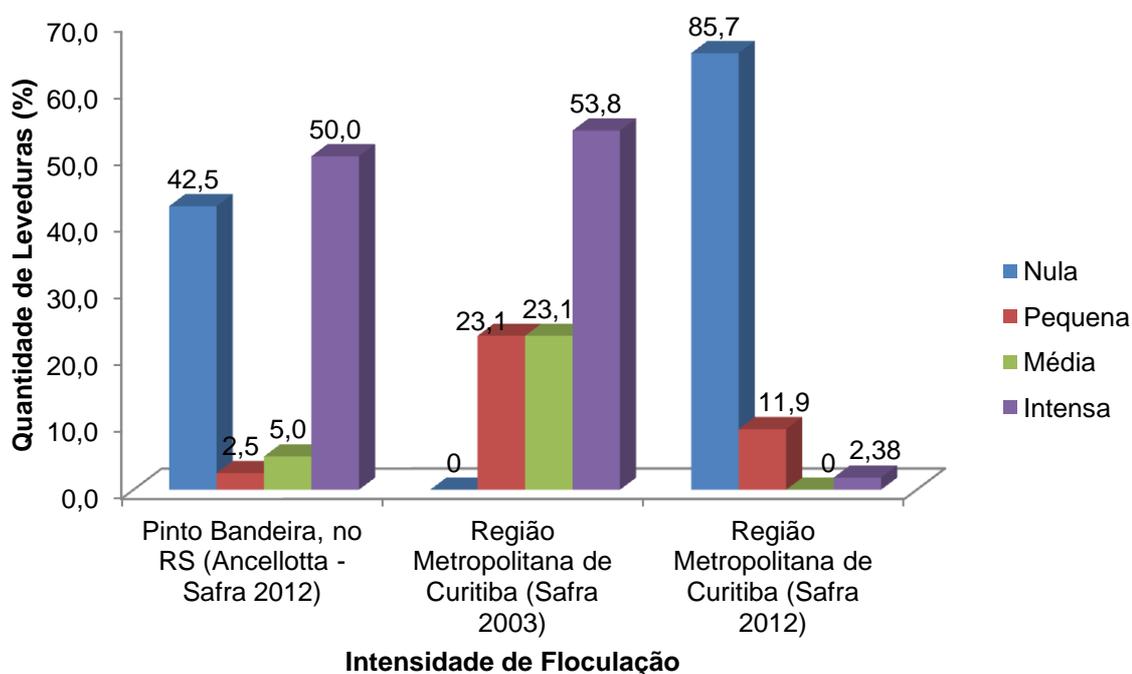


FIGURA 16 - INTENSIDADE DE FLOCULAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO DE PINTO BANDEIRA, NO RS, REPRESENTADA PELA CULTIVAR ANCELLOTTA E DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA (SAFRAS 2003 E 2012)

FONTE: O autor (2013)

As leveduras que flocularam intensamente estão listadas na tabela 3. Linhagens com este fenótipo são preferidas para a elaboração de vinhos. Ao final da fermentação é formada uma massa compacta de células no fundo do fermentador. Dessa forma, a remoção das células é facilitada. Leveduras com médio grau de floculação dificultam e aumentam o tempo de trabalho pela necessidade de utilizar filtros (WHITE, 2012).

TABELA 3 - LEVEDURAS COM ALTA INTENSIDADE DE FLOCULAÇÃO

LINHAGENS	REGIÃO /SAFRA
A1, A3, A5, A8, A10, A12, A15, A16, A18, A21, A22, A23, A25, A30, A31, A33, A35, A36, A38, A40	Pinto Bandeira, no RS (2012)
CB1.031.71	Região Metropolitana de Curitiba, no PR (2012)
27, 29, 33, 48, 49, 53, 59	Região Metropolitana de Curitiba, no PR (2003)

FONTE: O autor (2013)

A expressão de genes, como *FLO1*, *FLO5*, *FLO8* e *FLO11*, afeta a composição da parede celular das leveduras (KREGIEL; BERLOWSKA; SZUBZDA, 2012). De acordo com a teoria mais aceita, a floculação ocorre pela interação entre dois componentes da parede celular das leveduras, a lectina e a manose (DOMINGUES *et al.*, 2000). Do total de linhagens estudadas, 76% não flocularam. Dessa forma, a ausência de componentes estruturais na superfície celular pode ter mantido as células em suspensão. O estudo de Shinohara, Mamiya e Yanagida (1996) também encontrou baixa frequência de leveduras floculantes em áreas vinícolas.

Vários autores relatam o efeito negativo do etanol sobre a floculação (KREGIEL; BERLOWSKA, SZUBZDA, 2012; CLARO; RIJSBRACK; SOARES, 2006). Todas as linhagens que fermentaram em taxa semelhante às leveduras controle também flocularam em menor ou maior grau. Dentre estas, destacam-se as linhagens isoladas da cultivar Ancellotta na região de Pinto Bandeira, as quais flocularam intensamente. Dessa forma, diferente dos relatos da literatura, o etanol produzido pelas linhagens floculantes parece não ter exercido efeito negativo sobre a floculação.

5.4 VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS

O teste de velocidade de sedimentação das leveduras foi aplicado somente a linhagens que fermentaram adequadamente a sacarose e não produziram H₂S. Os resultados mostraram que a maioria das linhagens apresentou comportamento linear. As linhagens A38 e 27, ambas escolhidas para fermentação do mosto (item 5.11.1), foram analisadas com mais detalhes. A figura 17 mostra o comportamento da levedura A38 em mosto sulfito. Esta linhagem segue um decaimento linear de 0,01596 nm/min. A linhagem 27 apresenta velocidade de sedimentação que tem presente um componente exponencial (Figura 18). A sua taxa de decaimento foi 0,00988 nm/min nas condições testadas. A análise ANOVA foi altamente significativa tanto para o componente linear e como para o exponencial. Todas as linhagens foram expostas as mesmas condições de crescimento. Dessa forma, fatores

intrínsecos parecem ter sido os principais responsáveis pela diferença entre as velocidades de floculação. Isso está de acordo com os dados da literatura, pois a velocidade de sedimentação depende das características do floco formado (STRATFORD; KEENAN, 1988). Da mesma forma, sugere-se que as linhagens 27, provenientes da região metropolitana de Curitiba, forme um tipo de floco que facilite a deposição (Figura 18).

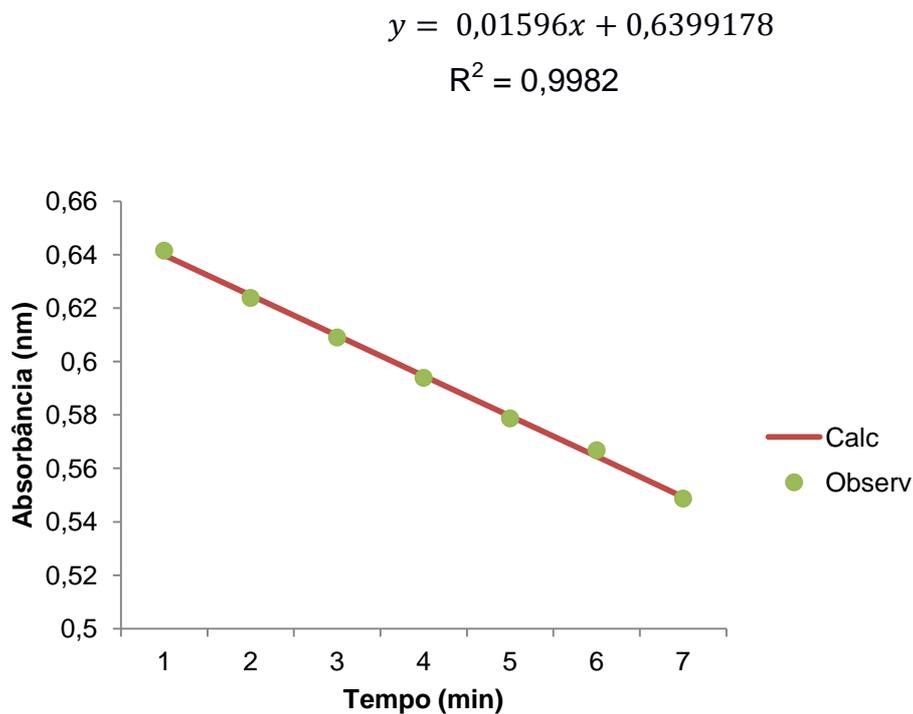


FIGURA 17 - VELOCIDADE MÉDIA DE SEDIMENTAÇÃO DA LEVEDURA A38

FONTE: O autor (2013)

NOTA: No topo do gráfico encontra-se a equação da reta.

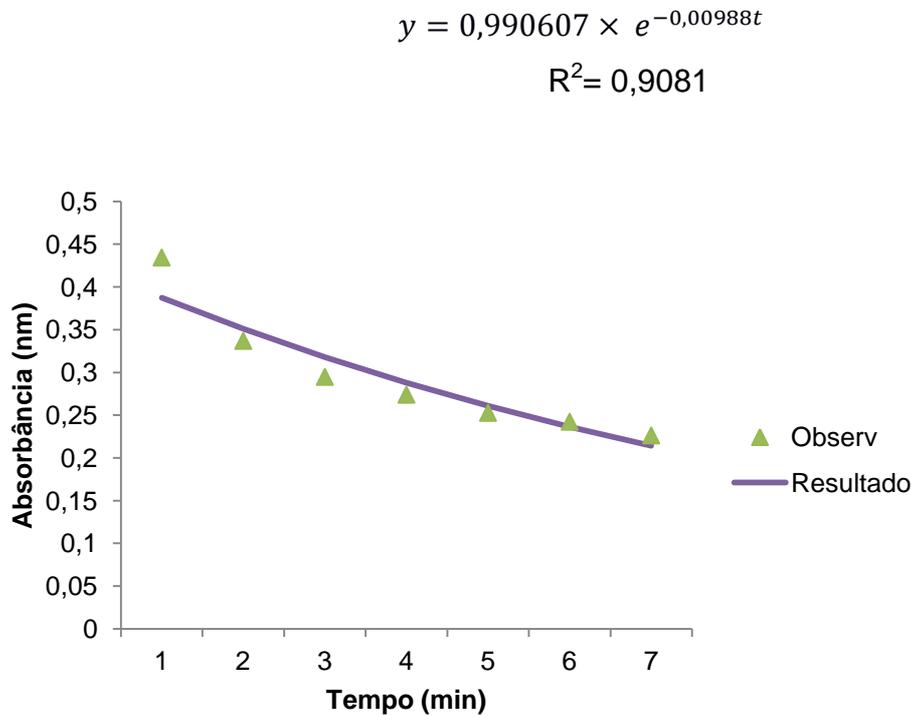


FIGURA 18 - VELOCIDADE MÉDIA DE SEDIMENTAÇÃO DA LEVEDURA 27

FONTE: O autor (2013)

NOTA: No topo do gráfico encontra-se a equação do componente exponencial.

5.5 DETECÇÃO DO FATOR *KILLER*

A presença de linhagens produtoras do fator *killer* foi baixa nas leveduras provenientes do município de Pinto Bandeira (RS). O caráter *killer* foi encontrado em 2,5% das linhagens. Nenhuma linhagem isolada a partir da cultivar Tannat apresentou perfil *killer*. Nas cultivares Cabernet Franc e Ancellotta, a frequência de detecção foi de, respectivamente, 2,5% (levedura CF3 – figura 19) e 5% (linhagens A11 e A24). Se estas linhagens forem capazes de produzir compostos indesejáveis, são fortes candidatas a prejudicar a fermentação e a qualidade do produto final, mesmo que sejam uma não-*Saccharomyces* (SILVA, 1996). Em Bento Gonçalves (RS), município vizinho a Pinto Bandeira, foi verificado que 24,7% dos microrganismos isolados possuíam a atividade *killer* (SILVA, 1996). Em três áreas de viticultura de Madrid, foi encontrado o fenótipo *killer* em 42,6% dos microrganismos (HIDALGO; FLORES, 1994).

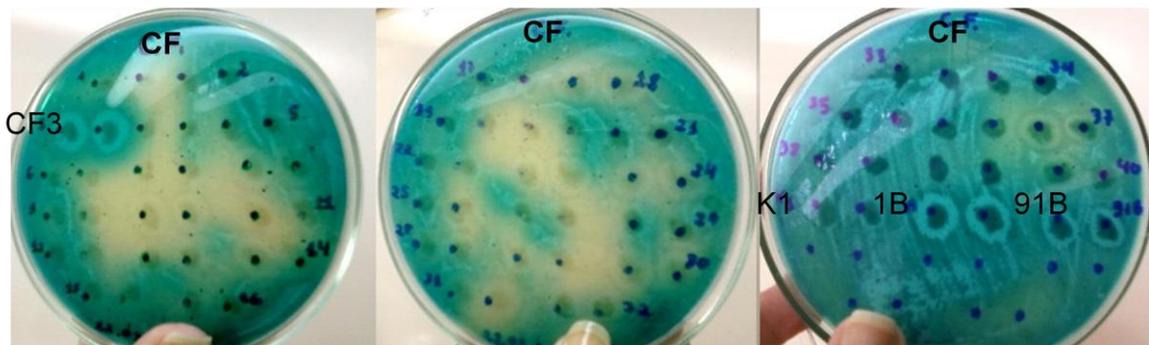


FIGURA 19 – DETECÇÃO DO FATOR *KILLER* EM LINHAGENS ISOLADAS A PARTIR DA CULTIVAR CABERNET FRANC

FONTE: O autor (2013)

A frequência de leveduras *killer* não foi e parece que nunca será uniforme. Nas linhagens isoladas da região metropolitana de Curitiba nas safras de 2003 e 2012, a frequência foi de, respectivamente, 53,8% e 16,7%. As 13 leveduras isoladas em 2003 foram previamente identificadas e todas são da espécie *Sacch. cerevisiae* (LIMA, 2011). As 42 linhagens isoladas em 2012 compreendem um grupo heterogêneo de leveduras. Apesar destas diferenças, a quantidade de leveduras *killer* desta região foi bastante superior à encontrada no município de Pinto Bandeira na safra de 2012 (RS). Esta diferença pode estar relacionada com o mecanismo de isolamento das leveduras utilizado. No isolamento das leveduras de Pinto Bandeira, os microrganismos foram isolados imediatamente após o esmagamento de modo a reduzir ao máximo a ação do fator *killer* sobre as linhagens presentes. Essa variação também está presente em outras regiões do mundo. Na França, a diferença se mostrou ainda mais expressiva. A frequência de linhagens *killer* variou de 0 a 100%. Nas regiões de Gard e Beaujolais a característica *killer* era prevalente em 80% a 100% das amostras, enquanto que em Touraine, nenhuma linhagem *killer* foi encontrada (CUINER; GROS, 1983). Na Grécia, a ocorrência de leveduras *killer* também variou conforme a região. A maior frequência foi na região continental de Mantinia, 75%, e na ilha de Limnos, 72%, duas áreas com o clima muito diferente. Na ilha de Santorini, este fenótipo não foi detectado em nenhum vinhedo analisado (KAPSOPOULOU *et al.*, 2008). A frequência de leveduras *killer* também pode ser similar em alguns locais. Na região de Comahue da Patagônia na Argentina, foram

isoladas leveduras de mostos em fermentação das variedades Malbec e Merlot. A incidência do caráter *killer* foi de 42% (SANGORRÍN *et al.*, 2001). Um estudo posterior realizado na região Norte da Patagônia encontrou 35% das linhagens com este caráter (SANGORRÍN *et al.*, 2007). Na África do Sul, de um total de 96 leveduras obtidas de uma coleção de microrganismos, 7 exibiram o fenótipo *killer*, perfazendo um total de 7,3% (TREDoux; TRACEY; TROMP, 1986). Como observado em outros países, o fenótipo *killer* variou de 6% a 100% na região do Cabo Ocidental da África do Sul (WESTHUIZEN; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2000). Dessa forma, as leveduras *killer* estão espalhadas na maioria das regiões vinícolas ao redor do mundo (MAQUEDA *et al.*, 2012).

Este teste foi realizado nos meios YEPD 2% e Lorena/ELNC (80:20). A proporção de leveduras *killer* detectadas foi a mesma, independente do meio. Diferentemente do teste proteína/célula, no qual a ação *killer* depende, exclusivamente, da proteína *killer* em solução; no ensaio célula/célula, a levedura em teste foi colocada em contato direto com a linhagem sensível. Portanto, a proteína *killer*, mesmo que produzida em pequena quantidade, foi capaz de agir sobre a linhagem sensível. Essa afirmação é válida para as leveduras testadas 33 e 51 e para a padrão K1. Estas não formaram halo de inibição no teste proteína/célula, mas provocaram a morte da levedura sensível de referência 26B no método célula/célula (Figura 20). É necessário realçar que para o teste proteína/célula é preciso o preparo da amostra. Cada amostra, proveniente do cultivo celular em meio Lorena/ELNC (80:20) líquido, foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millex). Embora a filtração seja uma operação eficiente, sua precisão é limitada pelo tamanho da partícula e da membrana porosa (ZIRKLER; LANG; KAUPENJOHANN, 2012). Karube *et al.* (1996) comparou a recuperação da partícula de caulinita, 100-300nm, em três tipos de membrana de filtração. A recuperação da amostra nas membranas com poros de 200 nm, 400 nm e 800 nm foi de, respectivamente, 10, 50, e 85%. Dessa forma, em títulos proteicos baixos, há maior probabilidade de perda significativa da toxina durante a manipulação e realização de operações unitárias com a amostra.

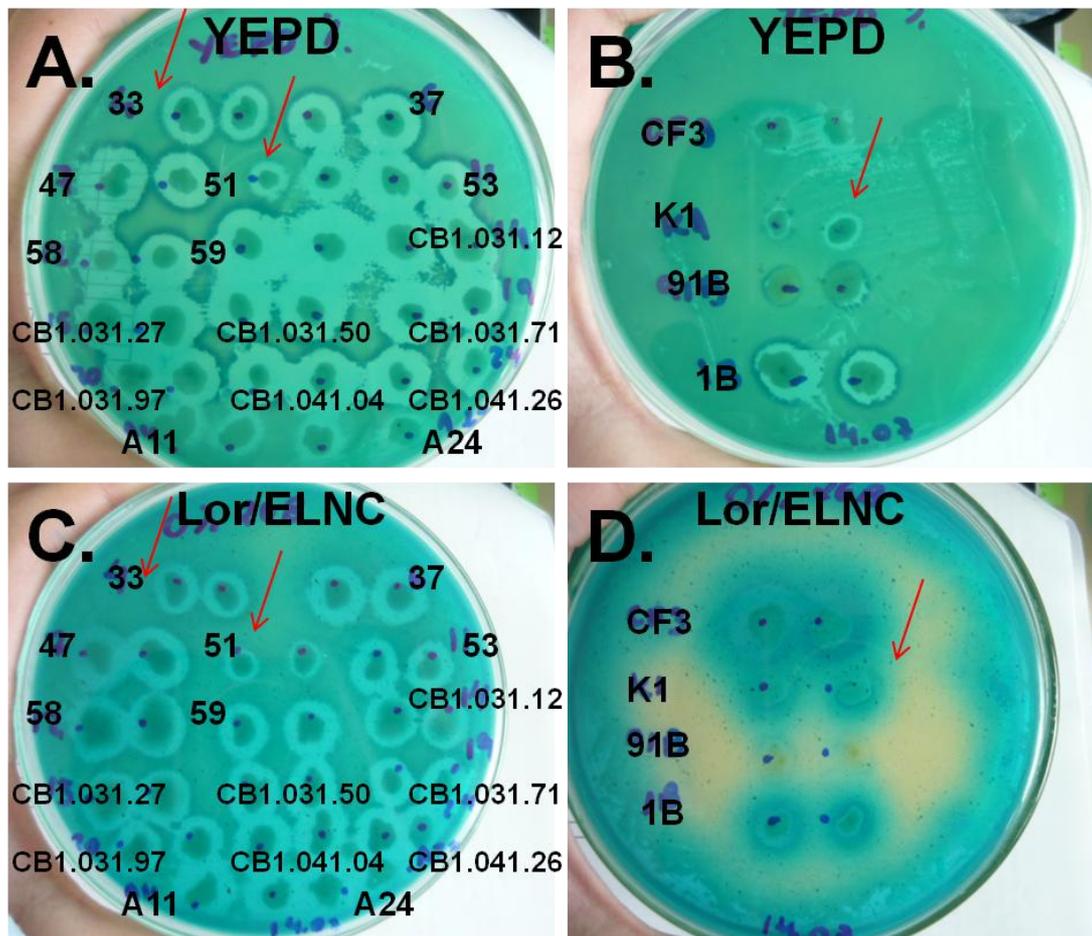


FIGURA 20 – LEVEDURAS CONSIDERADAS *KILLER* NO MEIO YEPD 2% E LORENAVELNC (80:20) PELO TESTE CÉLULA/CÉLULA

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As setas apontam para as linhagens 33, 51 e K1. Estas não formaram halo de inibição no teste proteína/célula.

É interessante selecionar leveduras não produtoras, mas resistentes à ação da toxina K_2 (ORTIZ *et al.* 2013; SILVA, 1996). O fenótipo K^R+ não impede a atuação de outras leveduras no início da fermentação (ORTIZ *et al.*, 2013) e, dessa forma, favorece a produção de compostos secundários importantes para a característica e composição do vinho (CAPECE; SALZANO; ROMANO, 2003).

5.6 SENSIBILIDADE E NEUTRALIDADE AO FATOR *KILLER*

Nenhuma linhagem isolada do município de Pinto Bandeira (RS) apresentou sensibilidade ao fator *killer* (Figura 21). A maioria se comportou como neutra. A frequência deste fenótipo nas cultivares Ancellotta, Cabernet Franc e Tannat foi de, respectivamente, 95%, 97,5% e 100%, significando que a maioria das linhagens isoladas dessa região não responde à ação da toxina *killer* e não é capaz de matar células sensíveis.

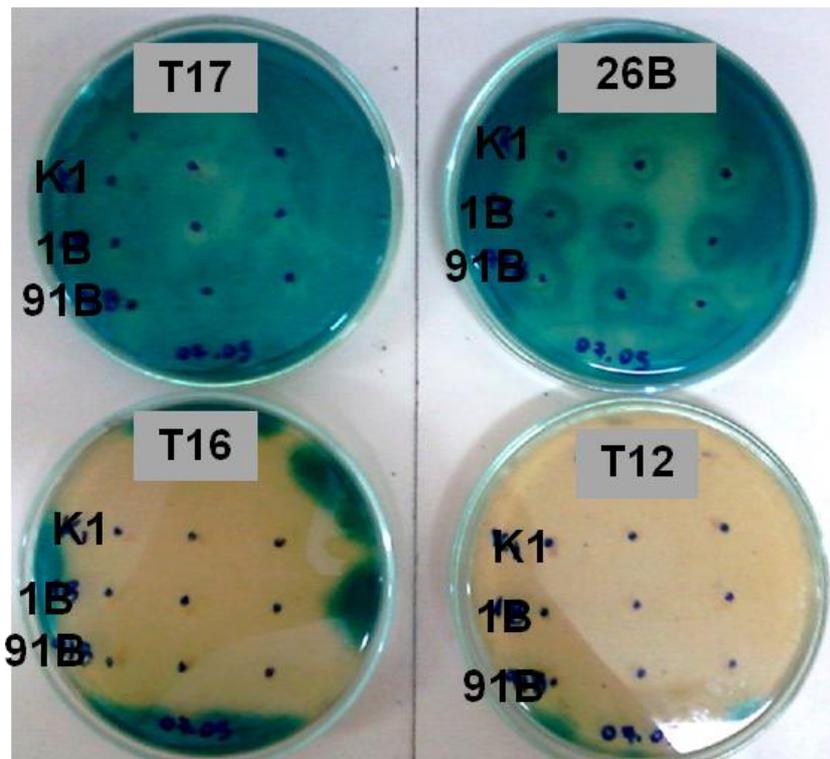


FIGURA 21 - RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE/NEUTRALIDADE COM AS LINHAGENS T12, T16 E T17 ISOLADAS DA CULTIVAR TANNAT

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Não houve formação de halo de inibição ao redor dos pontos de aplicação das leveduras *killer* padrão K1, 1B e 91B. A linhagem sensível 26B semeada sobre toda a superfície da placa respondeu positivamente ao teste.

Na região metropolitana de Curitiba, na safra de 2003, o fenótipo sensível foi encontrado em 38,5% das linhagens e o neutro em 7,7%. Na safra de 2012, o resultado foi diferente. Não houve leveduras rompidas pela ação da toxina *killer* e

83,3% foram resistentes, porém incapazes de produzir a mesma. A diferente frequência de leveduras neutras em uma mesma região também está relatado em outros estudos. Na Espanha, na região de La Mancha, 64% das leveduras foram caracterizadas como neutras e 38% como *killer* (ORTIZ *et al.*, 2013). Em um estudo similar na mesma região, foi encontrado o inverso. A maioria das linhagens, 62%, se comportou como *killer*, enquanto apenas 31% mostrou o fenótipo neutro. Segundo o autor, o mais importante nas linhagens isoladas é a característica K⁺ (NIKOLAOU *et al.*, 2006). Beltran *et al.* (2002) acompanharam a população de leveduras entre 1995 e 2000 na fermentação alcoólica espontânea na região de Tarragona, na Espanha. O estudo mostrou diferenças nas linhagens isoladas conforme a época de safra. Em 1999, a sanidade das uvas foi excepcional, o que implicou em baixa incidência de microrganismos fitopatogênicos sobre as bagas. Dessa forma, alguma diferença na microflora é esperada de um ano para o outro, logo, é natural que a frequência *killer*, sensível e neutra varie conforme a época de estudo.

Como demonstrado na tabela 4, a maioria das leveduras isoladas no presente trabalho, 87,4%, tem fenótipo neutro. A capacidade de matar células sensíveis foi encontrada em 9,7% das linhagens, e, apenas, 2,8%, foram sensíveis à ação da toxina. Na África do Sul, o estudo com leveduras de uma coleção mostrou que 9,4% eram neutras e 71,9% eram sensíveis (TREDoux; TRACEY; TROMP, 1986). Na região da Patagônia, o fenótipo neutro e sensível foi encontrado em, respectivamente, 25% e 40% das linhagens (SANGORRÍN *et al.*, 2007). A variação na porcentagem de linhagens com fenótipo neutro pode dificultar a seleção de linhagens autóctones para a fermentação vínica.

TABELA 4 - RESULTADOS DOS FENÓTIPOS SENSÍVEL, *KILLER* E NEUTRO DO TOTAL DE LINHAGENS ISOLADAS EM MEIO LORENA/ELNC (80:20)

Fenótipo	Leveduras	Total	Total %
Sensível	24, 29,34, 48, 49	5	2,8
<i>killer</i>	CF3, A11, A24, 33, 37, 47, 51, 53, 58, 59, CB1.031,12, CB1.031.27, CB1.031.50, CB1.031.71, CB1.031.97, CB1.041.04, CB1.041.26	17	9,7
Neutro	Demais linhagens	153	87,4
Total		175	100

FONTE: O autor (2013)

O teste foi repetido nas mesmas condições, porém empregando o meio YEPD tamponado. As leveduras 34 e 48, ambas sensíveis no meio Lorena/ELNC (80:20) foram reclassificadas como neutras (Tabela 5). As demais mantiveram o mesmo fenótipo. Como já discutido no item 5.5, esse resultado indica que o meio YEPD deve proteger as linhagens da ação da proteína *killer*, ou o meio Lorena/ELNC (80:20) deve potencializar a ação da mesma. É conhecido que o extrato de levedura aumenta a produção do fator *killer* (WOODS; BEVAN, 1968). Os meios YEPD e o Lorena têm, respectivamente, 2% e 20% de extrato de levedura em sua composição. Isso pode ter intensificado a produção e a, conseqüente, ação da proteína *killer* produzida pelas linhagens padrões no teste célula/célula. Como verificado por Silva (1996), o comportamento *killer* depende da composição do meio. Entretanto, como nem todas as leveduras modificaram seu fenótipo, os componentes do meio parecem afetar apenas algumas linhagens (SILVA, 1996). Por ter composição química semelhante ao mosto de uva, o resultado encontrado no meio Lorena/ELNC (80:20) indica que as leveduras 24 e 48 se comportariam como sensíveis durante a elaboração do vinho. Dessa forma, estas linhagens não foram selecionadas.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS FENÓTIPOS ENCONTRADOS NOS MEIOS LORENA/ELNC (80:20) E YEPD DE LINHAGENS ISOLADAS NA SAFRA DE 2003

Linhagem	Meio Lorena/ELNC	Meio YEPD
24	Sensível	Sensível
27	neutro	neutro
29	Sensível	Sensível
33	<i>Killer</i>	<i>Killer</i>
34	Sensível	Neutro
37	<i>Killer</i>	<i>Killer</i>
47	<i>Killer</i>	<i>Killer</i>
48	Sensível	Neutro
49	Sensível	Sensível
51	<i>Killer</i>	<i>Killer</i>
53	<i>Killer</i>	<i>Killer</i>
58	<i>Killer</i>	<i>Killer</i>
59	<i>Killer</i>	<i>Killer</i>

FONTE: O autor (2013)

Lima (2011), que utilizou o meio YEPD para detecção do comportamento *killer*, classificou as linhagens 29 e 48 como neutras, e as 34 e 49 como *killer*. O

fenótipo das demais permaneceu inalterado. A diferença encontrada pode ter sido causada pelos padrões *killer* e sensível utilizados. Lima (2011) usou a levedura sensível padrão *Sacch. cerevisiae* Uvaferm CK®, a qual pode ter mecanismos de defesa menos eficientes que os da linhagem sensível EMBRAPA 26B, justificando o fenótipo *killer*. A levedura *killer* utilizada por Lima (2011) foi a *Sacch. cerevisiae* Uvaferm BDX®. Esta deve ser menos efetiva na capacidade de ataque que a EMBRAPA 1B e a EMBRAPA 91B, pois não matou a linhagem 29. A levedura padrão comercial K1 também exibe característica de ataque inferior aos demais padrões *killer*, pois, somente a levedura 24 respondeu à ação de sua proteína no meio sólido Lorena/ELNC (80:20). Dessa forma, a capacidade *killer* pode estar ausente ou subestimada, dependendo da seleção das linhagens testemunhas *killer*/sensível e dos fatores experimentais (LLORENTE *et al.*, 1997).

5.7 VALIDAÇÃO DO MEIO LORENA/ELNC (80:20) QUANTO À PRODUÇÃO DO FATOR *KILLER* E TESTE PROTEÍNA/CÉLULA

A resposta *killer* foi comparada no meio YEPD e Lorena/ELNC (80:20). Como descrito no item (4.4.5.3), as culturas foram mantidas à temperatura de 18°C ou 24°C. Foram testadas 20 leveduras *killer*. Destas, 17 foram isoladas no presente trabalho e três correspondem às padrões K1, 1B e 91B. Os resultados mostraram que o meio Lorena/ELNC (80:20) à temperatura de 24°C é o que possui maior potencial para estimular a atividade da proteína *killer* sobre a linhagem sensível 26B (Figura 22). Para isso, foi realizada a análise de variância dos diâmetros dos halos e aplicado o teste de Tukey para a comparação de médias. Todas as condições de meios e temperaturas foram confrontadas (Lorena 24°C e YEPD 24°, Lorena 24°C e Lorena 18°C, Lorena 18°C e YEPD 18°C, Lorena 24°C e YEPD 18°C, YEPD 24°C e YEPD 18°C; Lorena 18°C e YEPD 24°C). Os resultados obtidos estão de acordo com o encontrado por POLI (2009), no qual foi proposto a utilização do meio Lorena/ELNC (80:20) como sendo o que mais estimula a produção do fator *killer* e assim facilitar identificação de leveduras *Sacch. cerevisiae killer*.

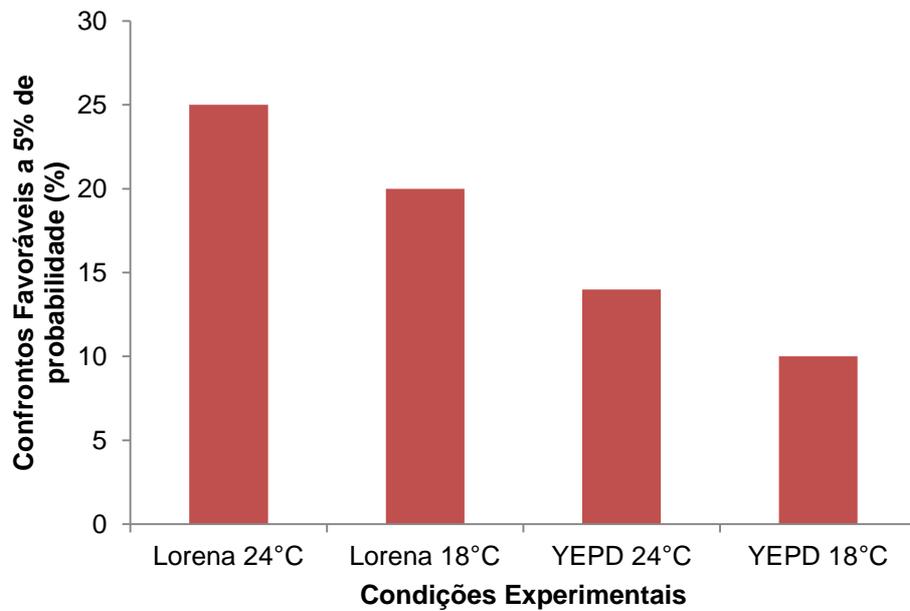


FIGURA 22 – LINHAGENS QUE APRESENTARAM MAIOR HALO DE INIBIÇÃO DE ACORDO COM TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E MEIO DE CULTURA

FONTE: O autor (2013)

A ação da toxina *killer* foi mais expressiva à temperatura de 24°C. Este resultado está de acordo com dados da literatura, nos quais a capacidade *killer* de algumas leveduras parece ser dependente da temperatura (SILVA, 1996). A figura 23 mostra o halo de inibição provocado pela proteína de algumas linhagens no meio Lorena e YEPD à 24°C. Baeza, Sanhueza e Cifuentes (2008) compararam a atividade *killer* nas temperaturas de 22, 30 e 37°C. Segundo estes, todas as linhagens K⁺ mostraram maior atividade a 22°C. Isto mostra que a proteína apresenta alguma forma de estabilidade funcional. Dados da literatura apontam que não há perda de sua atividade até 25°C em meio líquido (PALFREE; BUSSEY, 1979; WOODS; BEVAN, 1968). O presente trabalho mostra que a toxina *killer* é estável a 24°C para a maioria das linhagens.

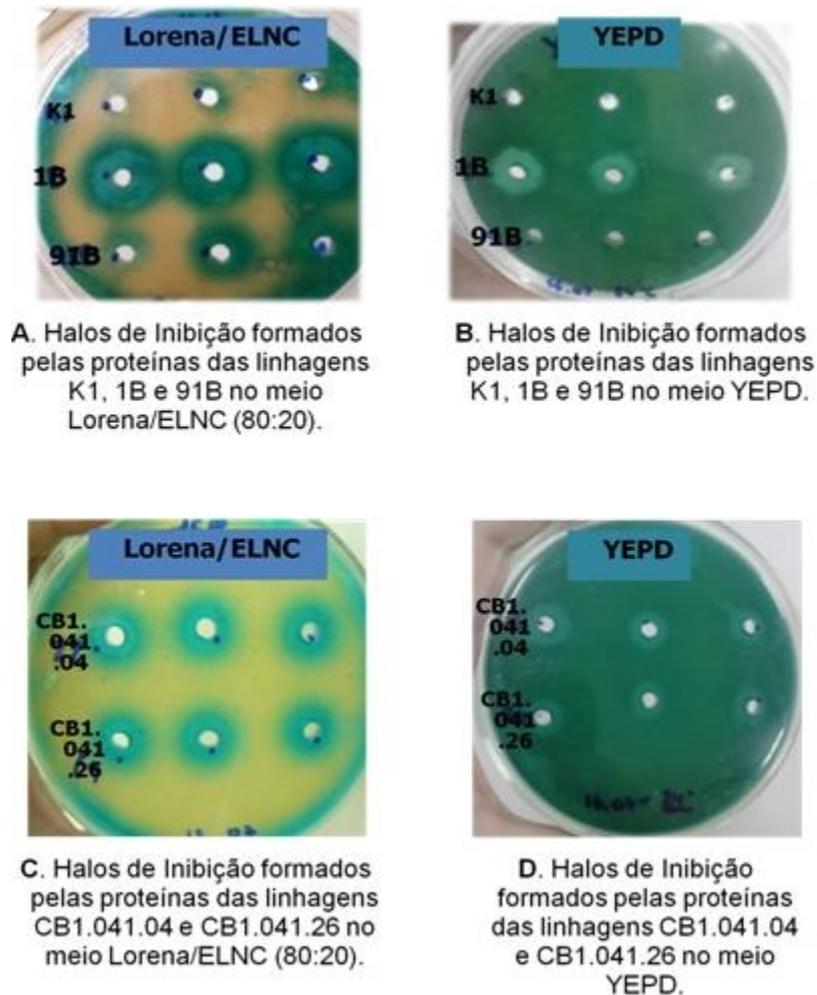


FIGURA 23 – HALOS DE INIBIÇÃO FORMADOS PELAS PROTEÍNAS *KILLER* DAS LINHAGENS PADRÕES K1, 1B E 91B E DAS TESTADAS CB1.041.04, CB1.041.26 NOS MEIOS LORENA/ELNC (80:20) E YEPD À 24 °C

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A proteína da linhagem K1 não formou halo de inibição em nenhuma condição experimental.

As proteínas das linhagens 33, 51, CB1.031.50, CF3, A24, A11 e das linhagens padrão K1 e 91B não provocaram formação de halo de inibição no meio YEPD nas temperaturas de 18 e 24°C. Estas proteínas foram ativas somente no meio Lorena/ELNC (80:20). O mosto de uva parece ser determinante na formação do fator *killer*. Silva (1996) já havia observado diferenças no comportamento *killer* com o meio MA-MB (25% mosto de uva *Riesling Italic*). Poli (2009) comparou os meios YEPD, MA-MB e Mosto 80 (Lorena/ELNC 80:20) quanto à detecção do fator *killer*. Houve diferença significativa entre os tamanhos de halos formados no Mosto (80:20) e nos demais, favorecendo o uso deste último. O extrato de levedura não-comercial (ELNC) está presente somente neste meio. O extrato de levedura é a

fração de moléculas solúveis em água resultante da lise celular. É uma mistura complexa composta de aminoácidos livres, peptídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e minerais (MOSSER *et al.*, 2012). O ELNC foi desenvolvido por Silva e Embrapa (2002) a partir de resíduo de cervejaria. É um composto que pode interferir no metabolismo não apenas de leveduras, mas também de bactérias. A produção de sideróforo por *Pseudomonas fluorescens* foi favorecida na presença de ELNC, quando comparada com o extrato de levedura comercial (SILVA; ALMEIDA, 2006). Dessa forma, os componentes do meio Lorena/ELNC (80:20) podem estar influenciando diretamente a produção da proteína *killer*. Convém salientar que, para uma mesma linhagem, se houver formação de halo de inibição no meio YEPD haverá também no Lorena/ELNC (80:20) independentemente da temperatura.

As proteínas das leveduras 33, 51 e K1 não mataram a linhagem sensível em nenhuma condição, independente do meio. A resposta em relação ao fator *killer* da linhagem K1 pode ser observada na figura 23. Os resultados obtidos podem ser explicados pela possibilidade do baixo título da toxina *killer*, uma vez que a formação de halo só foi observada na interação célula/célula. Pode ainda ter ocorrido algum tipo de desativação. A produção da proteína *killer* depende da composição química do meio (SILVA, 1996; WLOCH-SALAMON *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008b, SILVA *et al.*, 2011b). Dessa forma, o meio líquido Lorena/ELNC (80:20) pode não ter sido o mais adequado para a atividade do fator *killer* destas três linhagens. Outra hipótese é que estas toxinas não sejam estáveis e tenham sido inativadas durante o armazenamento. Como todas as proteínas passaram pelo mesmo processo de manipulação, a toxina destas linhagens deve ter algum fator intrínseco que as torne mais lábeis.

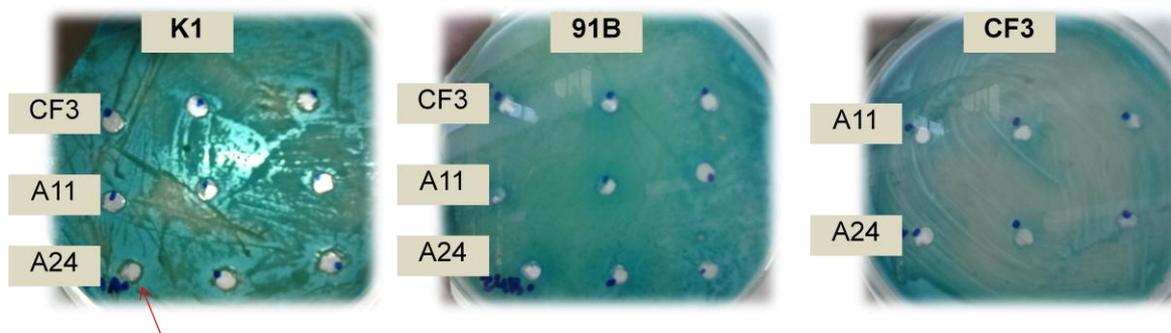
O pH é um dos fatores que pode influenciar na interação proteína – célula. O pH 4,5 foi o escolhido para os meios de cultura testados. A faixa de pH ótima para a expressão do fator *killer* é 4,5-4,7 para a maioria das linhagens (HÉRNANDEZ *et al.*, 2008). As toxinas *killer* do tipo K₁ atuam somente no pH 4,6-4,8 (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002). Dessa forma, as soluções proteicas 33 e 51 podem ter este tipo de toxina. Se isto for verdade, não haverá efeito *killer* no mosto de uva, cujo pH varia de 3,3 a 4,2 (MAQUEDA *et al.*, 2012). Entretanto, a mesma hipótese não é válida para a toxina da levedura K1 por esta não ser do tipo K₁. Silva (1996) a classificou como sendo do tipo K₂. O estudo de Marquina *et al.* (2001) trata sobre a

produção e características da toxina *killer* de *Debaryomyces hansenii*. Segundo este, solventes orgânicos (etanol, butanol, acetona, entre outros), álcoois poli-hídricos (etileno glicol, glicerol, manitol, entre outros), sais e minerais (sulfato de amônio, Mg^{2+} , Ca^{2+}) poderiam ser utilizados como estabilizadores da proteína *killer*. Uma publicação de Radler, Schmitt e Meyer (1990) cita o uso do glicerol para manter a estabilidade da proteína *killer* produzida pela levedura *Hanseniaspora uvarum*. Estudos subsequentes poderão contemplar estes testes com a toxina *killer* das linhagens 33, 51 e K1.

A adequabilidade do meio Lorena/ELNC (80:20) para a detecção do fator *killer* em *Sacch. cerevisiae* foi confirmada no presente trabalho. Dessa forma, a composição próxima do mosto de uva exerce maior influência na resposta das linhagens à toxina *killer*. Trabalhos posteriores poderão investigar a validade deste meio para a detecção de toxina *killer* pertencentes a outros gêneros.

5.8 INTERAÇÃO ENTRE LEVEDURAS *KILLER*

Sabe-se que as linhagens *killer* são resistentes à ação de sua própria toxina e de toxinas do mesmo tipo (HIDALGO; FLORES, 1994). Entretanto, nem sempre esta premissa é verdadeira, uma vez que as linhagens padrão 91B, 1B e K1, sendo *Sacch. cerevisiae* e do mesmo tipo K2, uma não deveria afetar a outra. No entanto, Silva (1999b) mostrou que a linhagem 1B é capaz de matar a linhagem sensível 26B, sendo portanto *killer*, é resistente à linhagem K1, mas é sensível à proteína *killer* da linhagem 91B. A linhagem 1B apresenta, ao mesmo tempo, características *killer*, neutra e sensível. Os testes proteína/célula e célula/célula confirmaram o exposto acima, pois a levedura de referência K1, considerada *killer*, foi sensível à ação da proteína produzida somente pela A24 (Figura 24). Convém salientar que esta linhagem não afeta as linhagens testemunhas *killer* 91B e 1B.



Levedura K1- sensível
à ação da proteína
A24

FIGURA 24 – INTERAÇÃO ENTRE LEVEDURAS *KILLER*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A seta aponta para o halo de inibição formado ao redor do poço inoculado com extrato proteico da levedura A 24. A ausência de halo é observada nos poços referentes às demais linhagens.

As proteínas das linhagens *killer* isoladas da região metropolitana de Curitiba não foram capazes de matar nenhuma outra levedura (Tabela 6). Entretanto, 50% destas apresentaram sensibilidade a alguma levedura isolada no município de Pinto Bandeira. As leveduras 47, 51, 53 e CB1.041.04 foram as mais sensíveis. O crescimento celular destas foi inibido pelas toxinas das linhagens A11, A24 e CF3. As leveduras A24 e CF3 não foram identificadas pela reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS1 e ITS4 e nem com os YEAST F e YEAST R, o que revela possíveis problemas no processo de extração (item 5.10). O amplo espectro de ação das linhagens A24 e CF3 sugere que estas não sejam *Sacch. cerevisiae*, mas não descarta a possibilidade de se tratar desta espécie. A maioria destas linhagens *killer* é ativa contra um número restrito de espécies, incluindo a *Sacch. cerevisiae*, enquanto os demais gêneros de leveduras *killer* tem um amplo espectro de ação, incluindo espécies de *Sacch. cerevisiae* (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Segundo o estudo de Soares e Sato (2000) a *Sacch. cerevisiae* pode ser sensível à toxina *killer* das espécies *Hansenula anomala*, *Kluyveromyces drosophilum* e *Torulopsis glabrata*. Dessa forma, deve-se prosseguir com a identificação das linhagens A24 e CF3 para confirmar a hipótese de se tratar de um gênero diferente de *Saccharomyces*.

TABELA 6 – INTERAÇÃO ENTRE LEVEDURAS *KILLER*

Linagem	² L	K1	1B	33	47	51	53	CB1.031.27	CB1.031.97	CB1.041.04
Proteína CF3	-	-	-	-	X	X	X	X	-	X
Proteína A11	-	-	-	X	X	X	X	X	-	X
Proteína A24	-	X	-	-	X	X	X	X	X	X
Proteína K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteína 91B	-	-	¹ X	-	-	-	-	-	-	-
³ P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A marcação “x” está presente nas linhagens mortas pelas proteínas correspondentes.

¹Interação encontrada por Silva (1999). Dado não fez parte da média estatística.

²L: Correspondem às linhagens CF3, A11, A24, 91B, 58, 59, CB1.031.12, CB1.031.50, CB1.031.71; CB1.041.26

³P: Correspondem às proteínas das linhagens 1B, 33, 47, 51, 53, CB1.031.27;

A linhagem A11, de Pinto Bandeira que mostrou capacidade de matar seis linhagens *killer* (33, 47, 51, 53, CB1.031.27, CB1.041.04) foi identificada como *Sacch. cerevisiae* (item 5.10). Todas, exceto a levedura CB1.031.27, são da espécie *Sacch. cerevisiae*. Estudos ecológicos efetuados com a toxina *killer* indicam que interações de sensibilidade ocorrem com maior frequência entre leveduras isoladas de diferentes localidades (YAP *et al.*, 2000). Isso justificaria o grande número de linhagens da região metropolitana de Curitiba sensível à proteína A11. A identificação da levedura sensível CB1.031.27 pela amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 sugere que esta seja da espécie *Candida rugosa* (item 5.10). Izgu, Altinbay e Yucelis (1997) mostram que o gênero *Candida* é letal à levedura *Sacch. cerevisiae*. Melvydas *et al.* (2007) não encontraram efeito inibitório da linhagem *killer Sacch. cerevisiae* com relação ao gênero *Candida*. No entanto, RODRIGUEZ *et al.* (2004) relatam sensibilidade da *Candida glabrata* à levedura *Sacch. cerevisiae*. A presença da espécie *Candida rugosa* não é relatada na maioria dos estudos ecológicos da uva e do vinho. Por ser uma interação rara, deve ser testada em novos estudos.

As linhagens C17 e C24, ambas *Hanseniaspora uvarum*, não foram afetadas por nenhuma levedura *killer* da espécie *Sacch. cerevisiae*. O oposto também foi

verdadeiro. De acordo com a publicação de Radler, Schmitt e Meyer (1990), a levedura *Hanseniaspora uvarum* libera uma toxina *killer* fracamente letal para algumas linhagens *Sacch. cerevisiae*. Isso corrobora o resultado do trabalho, que identificou a letalidade somente quando a proteína desta espécie foi aplicada contra a linhagem sensível 26B.

A toxina produzida pela 91B provocou a morte da levedura 1B, mas não afetou a linhagem A24. Portanto, os mecanismos de defesa e de ataque destas linhagens *killer* parecem ser diferentes. A interação da proteína *killer* com a parede celular de outra levedura implica na presença de receptores do tipo β -1,6-glucano (NOVOTNÁ; FLEGELOVÁ; JANDEROVÁ, 2004). Os resultados sugerem que, além desses receptores, parece haver uma interação de especificidade entre a proteína *killer* e a célula.

No total, 40% das linhagens testadas apresentaram algum tipo de sensibilidade em relação a pelo menos uma toxina *killer* nas condições avaliadas. As proteínas das linhagens A11, A24 e CF3 foram as que apresentaram o maior espectro de ação. Dessa forma, o fenótipo *killer* é dependente das linhagens presentes.

5.9 EXTRAÇÃO DE dsRNA CITOPLASMÁTICO

Os métodos propostos para a extração do dsRNA foram baseados na versão já modificada do protocolo de Fried e Fink (1978). O fenol foi o reagente eliminado na primeira técnica testada. Dados da literatura indicam que este é um solvente tóxico (MATHIELSON; THOMAS, 2013). Como a levedura testada passou pela técnica de congelamento/descongelamento de Silva *et al.* (2012) para a extração do conteúdo intracelular, não foi executada a etapa inicial que incluía a lise celular pelo uso da solução contendo dodecil sulfato de sódio. Em paralelo, foi executada a técnica padrão para a comparação de resultados.

A modificação inicial do método não foi eficaz. A figura 25 mostra que não houve extração do material genético. Tzanetakis e Martin (2008) desenvolveram um protocolo de extração sem fenol e clorofórmio para recuperar o dsRNA presente em

plantas. Entretanto, a desvantagem encontrada por outros autores é a grande quantidade de amostra, 10 g da planta, o que restringe o número de análises (BALIJJA; KVARNHEDEN; TURCHETTI, 2008). No experimento em questão, foi utilizado 1 ml do extrato celular das leveduras para a extração do dsRNA. Dessa forma, a quantidade de células pode ter sido insuficiente para a extração nessas condições.



FIGURA 25 – TESTE DE EXTRAÇÃO DE dsRNA SEM FENOL E SEM SDS

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Colunas 1 e 2 correspondem às amostras que não tiveram fenol durante o processo de extração do dsRNA. A coluna 3 corresponde ao marcador de peso molecular. A marcação em branco acima de cada coluna representa a levedura 1B, da qual foi extraído o material genético.

Os testes seguintes foram de acordo com o protocolo original, alterando apenas a fase fenólica. Foi utilizado fenol com o pH 8,0 e com o pH 6,7. Os resultados estão expostos na figura 26A. O fenol com pH 6,7 resultou em bandas fracas e pouco visíveis, enquanto que o protocolo original, com pH 8,0 resultou em bandas fortes e mais visíveis. Segundo Flegr (1987), esta é a etapa crucial do método por eliminar contaminantes e separar o material genético. Dessa forma, os dados confirmam a importância do fenol para o isolamento de RNA de leveduras. As amostras com bandas mais visíveis foram comparadas com as bandas formadas pelo marcador de massa molecular λ DNA/PSTI. A figura 26B mostra que apenas o

L-dsRNA foi isolado. A banda na região de 4,6 kb representa este plasmídeo (WICKNER, 1992). Outra banda, em 4,5 kb sugere que esta seja originária de uma mutação no plasmídeo L-dsRNA. Uma deleção em um ou mais nucleotídeos pode ter causado esta alteração de comportamento no gel de agarose. As demais bandas, presentes na região abaixo de 247 bp são contaminantes. O estudo de Liermann *et al.* (2000) encontrou contaminantes como DNA genômico, rRNA 25S, rRNA 18S, rRNA 5,8S e rRNA 5S e tRNA ao realizar o protocolo de extração de Fried e Fink (1978). O protocolo selecionado neste trabalho é uma modificação do método destes autores. O ssRNA é atribuído a banda na região de, aproximadamente, 300 bp. As bandas dos rRNA 18S e 25S se encontram na região de 1,6 a 2,0 Kb (CASTILLO *et al.*, 2011), a qual não reteve ácidos nucléicos. O tRNA e o rRNA 5S e 5,8S migram para regiões próximas ao ssRNA (LIERMANN *et al.*, 2000). Dessa forma, as bandas derradeiras no gel de agarose podem corresponder ao tRNA, rRNA 5 S e 5,8 S e ao ssRNA. O DNA genômico foi descartado como contaminante, pois segundo Liermann *et al.* (2000), a banda indicativa da sua presença estaria situada acima de 4,6 kb.

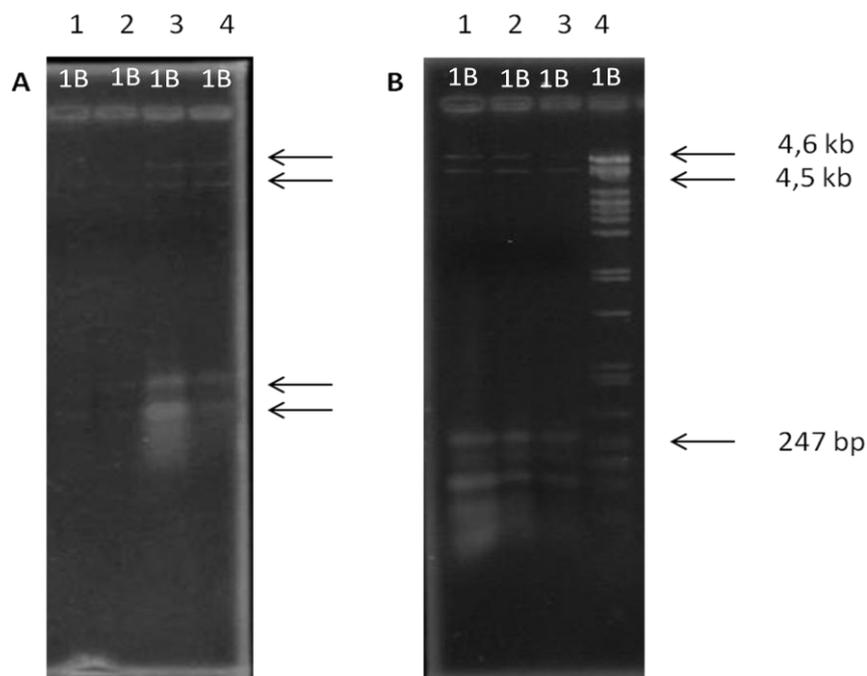


FIGURA 26 – TESTE DE EXTRAÇÃO DE dsRNA COM FENOL

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A. Colunas 1 e 2: extração com fenol pH 6,7; colunas 3 e 4 – fenol pH 8,0 (protocolo padrão). B. Colunas 1, 2, 3 – fenol pH 8,0 (protocolo padrão). A coluna 4 corresponde ao marcador de massa molecular λ DNA/PSTI. A marcação em branco acima de cada coluna representa a levedura 1B da qual foi extraído o material genético.

O isolamento do dsRNA da levedura 26B foi realizado para confirmar a extração do L-dsRNA. Por ser uma linhagem sensível, não há presença do M-dsRNA. Paralelamente, foram executados os protocolos sem acetato de sódio, com fenol acidificado, e com fenol acidificado sem a etapa de adição de LiCl 2M. Os resultados estão expressos na figura 27. O isolamento do dsRNA da levedura sensível 26B resultou em apenas na banda correspondente ao L-dsRNA, confirmando a extração deste plasmídeo pelos testes anteriores.

O acetato de sódio é encontrado em alguns protocolos de extração de RNA (SCHMITT; BROWN; TRUMPOWER, 1990; LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987). As concentrações dessa substância variam conforme o protocolo. Na literatura são encontrados os usos de acetato de sódio 0,3M, 1M, 2M e 3M (SCHMITT; BROWN; TRUMPOWER, 1990; LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987; CHOMCZYNSKI; SACCHIT, 1987; CURY; KOO, 2007). O protocolo de Logemann, Schell e Willmitzer (1987) utiliza o acetato de sódio 1M e 3M. O primeiro é adicionado à fase aquosa formada após o uso do fenol, enquanto o segundo é acrescentado sobre o RNA precipitado. Em menor concentração e junto com etanol, o acetato de sódio age precipitando o RNA e deixando o DNA e as proteínas residuais em suspensão. Em maior concentração dissolve polissacarídeos e RNAs de baixo peso molecular, enquanto o RNA intacto é coletado por precipitação após centrifugação. Cury e Koo (2007) usaram acetato de sódio 3M visando eliminar a contaminação por polissacarídeos. Schmitt, Brown, Trumpower (1990) empregaram acetato de sódio 0,3M da mesma forma que o protocolo selecionado no presente trabalho. Como visualizado na figura 27, a eliminação dessa substância do método selecionado não alterou o perfil das bandas observadas. Dessa forma, a precipitação do RNA é independente do acetato de sódio nas condições testadas. O etanol precipita todos os ácidos nucleicos (AKIN; WU; LIN, 1998) e sua ação foi suficiente neste experimento.

O fenol foi acidificado (pH 5,0), visando à redução de contaminantes. Não houve extração do L-dsRNA. Flegr (1987) comparou o uso do fenol em pH 4,0 e 8,0 na técnica de extração de dsRNA e os resultados obtidos mostraram que nessas condições as proteínas são retidas na fase fenólica, e tanto o DNA como o RNA permanecem na fase aquosa. Montenegro (2010) também realizou este experimento e obteve o mesmo resultado. O autor observou vantagem no uso do fenol acidificado pela ausência da banda de DNA genômico e aumento da purificação do dsRNA.

Dessa forma, além de proteínas, o DNA também seria removido, podendo ser eliminadas algumas etapas do protocolo original em testes subsequentes. A eliminação da etapa de adição do LiCl 2M, quando utilizado o fenol acidificado, foi o primeiro teste. O LiCl 2M precipita o ssRNA (FENG *et al.*, 2012). Entretanto, como o DNA já foi removido, estariam em solução somente o ssRNA e o dsRNA. O uso do etanol após a etapa fenólica foi mantido para aumentar o nível de pureza do material. Dessa forma, após a adição de LiCl 4M restaria em solução o ssRNA, enquanto o dsRNA estaria precipitado. Após a eliminação do sobrenadante e ressuspensão do precipitado, o resultado foi revelado no gel de agarose. A coluna 3 da figura 27 mostra que não houve isolamento de dsRNA. Este resultado foi ainda menos promissor que o teste em que houve apenas acidificação do fenol, sem alteração das demais fases. Neste, a banda na região de 4,5 kb foi mantida. Sugere-se que, nessas condições, o fenol também esteja retendo o plasmídeo codificador do capsídeo viral. Assim, o L-dsRNA de *Sacch. cerevisiae* parece ser ainda mais sensível à ação do fenol acidificado, pois a banda que corresponde a 4,6 kb não foi revelada.

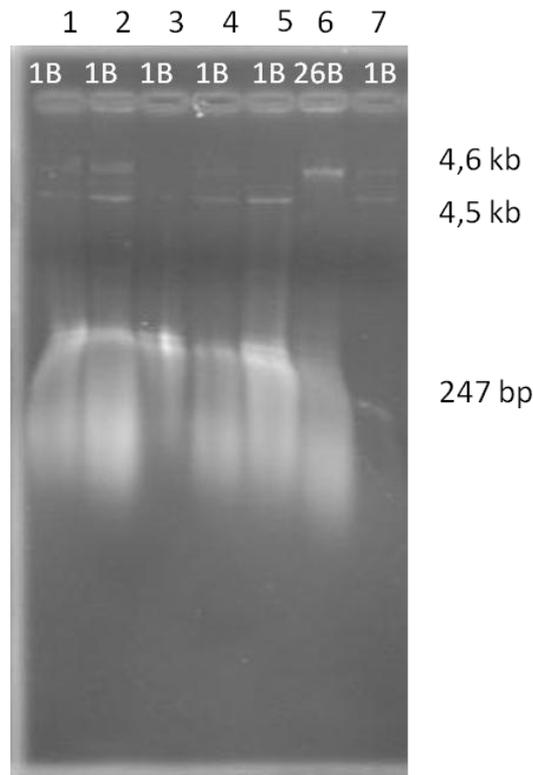


FIGURA 27 - COMPARAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ORIGINAL COM TÉCNICAS SEM ACETATO DE SÓDIO, FENOL ACIDIFICADO E FENOL ACIDIFICADO SEM ETAPA DE ADIÇÃO DE LiCl 2M

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Coluna 1 e 4: Protocolo padrão; Coluna 2: Protocolo sem Acetato de Sódio; Coluna 3: Protocolo com fenol pH 5,0 e sem a etapa de LiCl 2M; Coluna 5: Protocolo com fenol pH 5,0; Coluna 6: Protocolo padrão realizado com a levedura sensível 26B; Coluna 7: Amostra controle (obtida em testes prévios a partir do protocolo padrão). A marcação em branco acima de cada coluna representa a levedura 1B, da qual foi extraído o material genético.

O teste com fenol acidificado foi repetido e executado em novas condições, visando à busca por melhores resultados. A quantidade e concentração de HCl foi aumentada, pois o pH 4,0 é o informado na literatura como uma técnica de extração de dsRNA (MONTENEGRO, 2010; FLEGR, 1987). O fenol com pH 3,0 e pH 2,0 foi testado, visando verificar a influência do potencial hidrogeniônico na extração. As colunas 1, 2 e 3 da figura 28 ilustram o resultado. Da mesma forma que os testes anteriores, não houve isolamento do dsRNA, reforçando a hipótese, de que nas condições de execução do teste, o material genético está sendo retido pela fase fenólica, a qual é descartada de acordo com o protocolo. Mais uma tentativa de eliminar o fenol do teste foi executada. O resultado está explicitado na coluna 4 da figura 28. Não houve extração de nenhum tipo de material genético. Apesar dos

dados da literatura afirmarem que o fenol dissolve a maioria das proteínas, mas não moléculas carregadas negativamente (BEHREND, 1998), os resultados obtidos no presente trabalho parecem mostrar o contrário. Além de indispensável para a extração do dsRNA nessas condições, o fenol acidificado parece reter também o dsRNA.

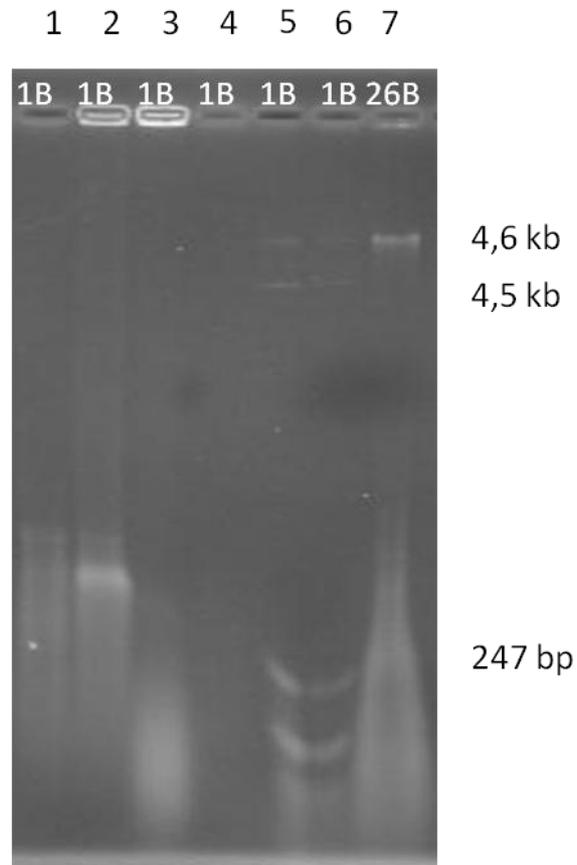


FIGURA 28 - COMPARAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ORIGINAL COM PROTOCOLOS COM FENOL ACIDIFICADO COM HCl EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E PROTOCOLO SEM FENOL

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Coluna 1: Fenol pH 5,0; Coluna 2: Fenol pH 3,0; Coluna 3: Fenol pH 2,0; Coluna 4: Protocolo com SDS, sem fenol e demais etapas inalteradas; Coluna 5 e 6: Amostra controle; Coluna 7: Amostra controle com levedura sensível 26B.

A ausência de banda na região do M-dsRNA, 1,6 a 1,8 kb, caracteriza uma falha e mostra a necessidade de ajuste do método. Este plasmídeo está relacionado com as linhagens *killer* (WICKNER; LEIBOWITZ, 1976). A levedura 1B, utilizada como padrão *killer*, tem sua ação sobre as células sensíveis, claramente, visualizada no teste proteína/célula do presente trabalho. Dessa forma, a ausência da banda no

gel de agarose só se justifica por problemas na técnica. As duas leveduras continham a banda referente ao L-dsRNA. A consequência disso é a caracterização equivocada de linhagens desconhecidas, pois uma linhagem *killer* poderia ser classificada como sensível. O protocolo testado não foi capaz de diferenciar uma levedura *killer* de uma sensível ou neutra. Alguns autores também não encontraram a banda referente ao M-dsRNA no gel de agarose. Kitano *et al.* (1984) sugeriu que a ausência da banda M-dsRNA em leveduras K^+R^+ se deve a uma base genética de produção da toxina *killer* diferente da padrão. Soares e Sato (1999) foram além. Atribuíram o fato a genes cromossomais. Essa sugestão também foi a de Baeza, Sanhueza e Cifuentes (2008) diante desta situação, o que pode não ser verdadeira. Na foto, gentilmente, cedida por Silva (1998), é possível observar a banda referente aos plasmídeo L-dsRNA e M-dsRNA da levedura *killer* 1B. Assim, seria precipitado ligar a ausência deste plasmídeo (M-dsRNA) com herança cromossômica. Por ser um método laborioso, podem ocorrer problemas durante o processo que impeçam o isolamento do M-dsRNA. A foto de Silva (1998) prova a existência do plasmídeo mesmo que este não tenha sido observado (Figura 29) neste trabalho. Da mesma forma, Flegr (1987) mostrou que, dependendo do método utilizado, a extração do M-dsRNA pode ser ineficaz. O autor verificou diferenças quanto ao material extraído quando a guanidina ou o fenol ácido eram utilizados. A banda referente a este plasmídeo foi detectada apenas na técnica com guanidina. Segundo o autor, proteínas covalentemente ligadas ao M-dsRNA poderiam ter contribuído para sua migração da fase aquosa para a fase fenólica. Esta hipótese pode ser válida também para a ausência da banda do L-dsRNA, além do M-dsRNA, quando aplicados os protocolos com fenol acidificado. Portanto, embora com os mesmos propósitos, metodologias diferentes influem diretamente no resultado.

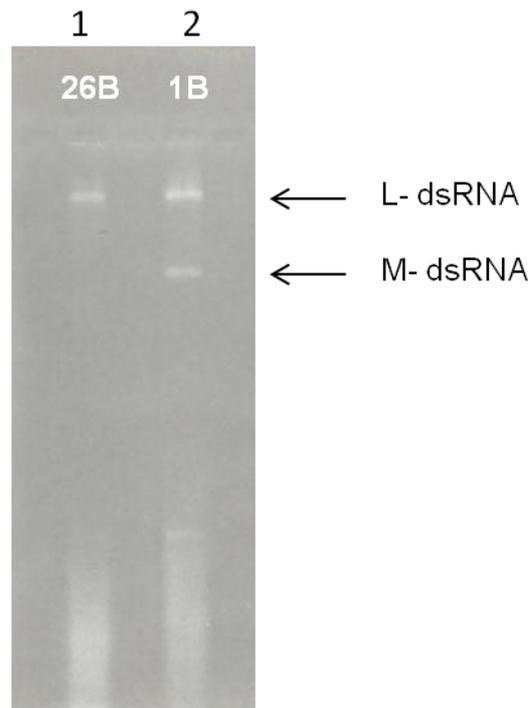


FIGURA 29 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DA EXTRAÇÃO DE dsRNA DAS LEVEDURAS 26B E 1B

FONTE: Silva (1998)

NOTA: O protocolo de extração utilizou fenol pH 8,0, o mesmo escolhido como padrão para este trabalho. Coluna 1: Resultado da extração do material genético da levedura 26B; Coluna 2: Resultado da extração com a levedura 1B.

Foi possível eliminar somente o uso do acetato de sódio nos testes executados. O fenol parece ser essencial para a técnica. Isso confirma os dados da literatura que mostram a extração clássica por este composto como um método eficiente (XU *et al.*, 2011). Entretanto, ajustes ainda devem ser feitos para expor o M-dsRNA. Apesar da redução das etapas ter sido pequena, os testes realizados permitiram visualizar quais substâncias são essenciais para a técnica, o que facilitará o desenvolvimento de testes futuros.

5.10 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

As uvas são a fonte primária de leveduras naturais para a fermentação vínica (LI *et al.*, 2010). Foram isoladas 17 linhagens com potencial para a vinificação e 10

linhagens *killer*. A identificação da levedura *Sacch. cerevisiae* foi baseado no estudo de Guillamón *et al.* (1998). De acordo com este, o fragmento de DNA gerado por amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 tem 880 pb, ou em torno disso, para *Sacch. cerevisiae*. Não há outros microrganismos isolados do vinho que gerem fragmentos com este tamanho após reação de PCR com os iniciadores ITS1 e ITS4. Ros-Chumillas *et al.* (2007) também aplicaram a PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 para a identificação de linhagens *Sacch. cerevisiae*.

Dos 175 microrganismos analisados, 35 corresponderam à espécie *Sacch. cerevisiae* (Figura 30). Destas 17 podem ser utilizadas na elaboração de vinhos. As demais têm o perfil *killer*. Apenas 3 leveduras são de outras espécies e duas não foram identificadas. Todas estas compreendem linhagens com baixa capacidade fermentativa e são K⁺R⁺.

A identificação das leveduras se baseou no perfil eletroforético de bandas no gel de agarose. Os tamanhos dos fragmentos são estimados.

No município de Pinto Bandeira, todas as leveduras isoladas da cultivar Ancellotta, com alta capacidade fermentativa, são *Sacch. cerevisiae* (Tabela 7). Isso confirma os dados da literatura em que a levedura *Sacch. cerevisiae* é a principal responsável pela transformação do mosto de uva em vinho (SHI *et al.*, 2012). Das três linhagens *killer* isoladas nessa região, apenas uma foi identificada e pertence a esta espécie. As demais, A24 e a CF3, isolada da cultivar Cabernet Franc, não responderam a técnica de amplificação da reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS 1 e ITS 4. A disponibilidade do DNA e a ausência de inibidores da *Taq* polimerase são essenciais para o sucesso da amplificação do material genético por PCR. Como esta não ocorreu após diversas tentativas, suspeitou-se que a extração não tivesse sido efetiva para estas linhagens. Para confirmar esta hipótese, foram utilizados os iniciadores YEAST F e YEAST R que se alinham a região 18S do rDNA para amplificar um fragmento de 375 bp (SILVA *et al.*, 2012). Novamente, não houve sucesso na amplificação, gerando suspeita de que o DNA não fora extraído. O método de extração seguiu o protocolo descrito por Silva *et al.* (2012). A extração do DNA envolve o congelamento/descongelamento consecutivo das células. É um método de extração rápido. Tais técnicas dependem da amostra e do microrganismo analisado (RUIZ-BARBA; MALDONADO; JIMÉNEZ-DÍAZ, 2005). Os microrganismos A24 e CF3 podem ser espécies diferentes da *Sacch. cerevisiae* com uma parede celular que não responda ao choque térmico aplicado na técnica. A lise

celular por detergentes ou enzimas líticas pode ser uma alternativa neste caso (RUIZ-BARBA; MALDONADO; JIMÉNEZ-DÍAZ, 2005). Dessa forma, a técnica de extração deve ser adaptada em estudos futuros.

TABELA 7 – RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO DE PINTO BANDEIRA

Linagem	Resultado do Genótipo com IT1-ITS4	Capacidade de Fermentação	Comportamento <i>Killer</i>
A1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baixa	<i>killer</i>
A12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A24	Não identificada	Baixa	<i>killer</i>
A25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A33	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
A40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutro
CF3	Não identificada	Baixa	<i>killer</i>

FONTE: O autor (2013)

No total, foram isoladas 16 leveduras *Sacch. cerevisiae* autóctones para a região de Pinto Bandeira. Até o momento, não havia nenhuma linhagem isolada para esta localidade. Por estarem mais adaptadas às uvas da região e refletirem a biodiversidade desta (CAPECE *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2008a), estas linhagens favorecem tanto o processo de vinificação quanto a qualidade do produto acabado. O isolamento destas leveduras representa um avanço para o trabalho da Embrapa Uva e Vinho, demonstrando o elo entre a pesquisa científica e a comunidade.

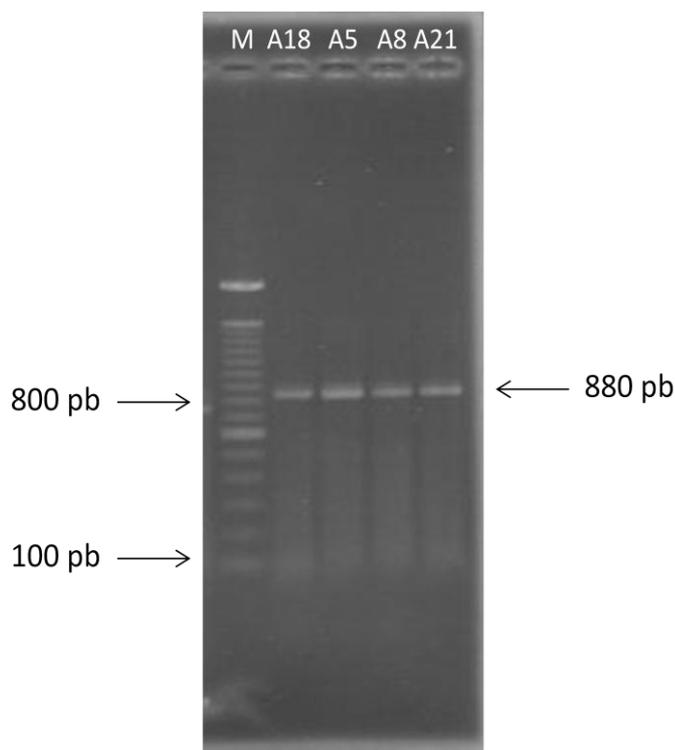


FIGURA 30 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA REGIÃO rDNA ITS1-5.8S-ITS2 AMPLIFICADA PELOS INICIADORES ITS1 E ITS4 DE LINHAGENS ISOLADAS DA CULTIVAR ANCELLOTTA

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Fotografias de eletroforese em gel de agarose 1%. As marcações acima de cada coluna representam, respectivamente, o marcador de massa molecular (M) e as linhagens isoladas.

As 13 leveduras isoladas na região metropolitana de Curitiba na safra de 2003 foram identificadas por Lima (2011) com sendo *Sacch. cerevisiae*. Entretanto, apenas uma reúne os atributos para a elaboração de vinhos. Na safra de 2012, foram identificadas sete leveduras *killer* (Tabela 8) entre as 55 isoladas. A banda de 880 pb foi encontrada em 4 linhagens, confirmando a espécie *Sacch. cerevisiae*. Apenas uma destas, a CB1.031.71, mostrou boa capacidade fermentativa. O produto de PCR da levedura CB1.031.27 apresentou banda na região 420 pb, enquanto as linhagens CB1.031.50 e CB1.041.26 apresentaram banda em de 760 pb (figura 31). Esta banda corresponde à levedura *Hanseniaspora uvarum* (GUILLÁMON *et al.*, 1998). A identificação de leveduras isoladas da cultivar Campbell, na Coreia, revelou que a espécie majoritária foi a *H. uvarum* (HONG; PARK, 2013). Esta é a espécie encontrada com maior frequência em uvas (LI *et al.*, 2010; BELTRAN *et al.*, 2002). É produtora de ésteres e glicerol e pode secretar enzimas que clivam glicosídeos. Terpenos livres contribuem positivamente com o

aroma do vinho (LI *et al.*, 2010). A banda de 420 pb corresponde a espécie *Candida rugosa* (GUILLÁMON *et al.*, 1998). Ambos os gêneros *Hanseniaspora* e *Candida* são importantes por dominarem o estágio inicial do processo fermentativo espontâneo (REDZEPOVIC *et al.*, 2002; ZOHRE; ERTEN, 2002; WANG; LIU, 2013).

TABELA 8 - RESULTADO DA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

Linhagem	Resultado do Genótipo com IT1-ITS4	Capacidade de Fermentação	Comportamento <i>Killer</i>
CB1.031.12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baixa	<i>Killer</i>
CB1.031.27	<i>Candida rugosa</i>	Baixa	<i>Killer</i>
CB1.031.50	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Baixa	<i>Killer</i>
CB1.031.71	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	<i>Killer</i>
CB1.031.97	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baixa	<i>Killer</i>
CB1.041.04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baixa	<i>Killer</i>
CB1.041.26	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Baixa	<i>Killer</i>

FONTE: O autor (2013)

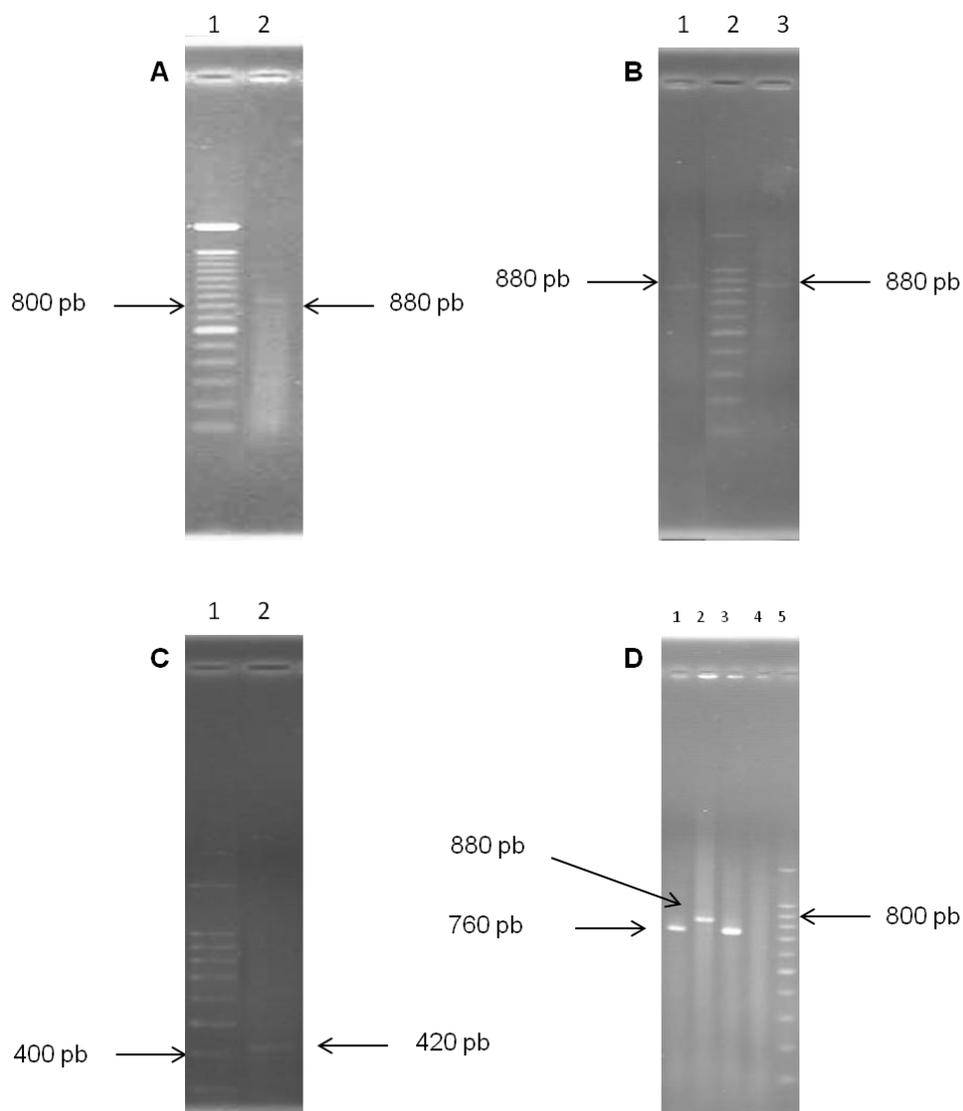


FIGURA 31 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DE LEVEDURAS *KILLER* ISOLADAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA NA SAFRA DE 2012.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: As colunas A1, B2, C1, D5 correspondem ao marcador de massa molecular λ DNA/PSTI. A2- CB1.031.71; B1- CB1.031.12; B3- CB1.031.97; C2- CB1.031.27; D1- CB1.031.50; D2- CB1.041.04; D3- CB1.041.26, D4- vazio;

Apesar de terem sido escolhidas para identificação somente leveduras com alta capacidade fermentativa e perfil K^+R^+ , o ecossistema da uva se mostrou diversificado. Foram identificadas três espécies. Na região metropolitana de Curitiba (PR) e no município de Pinto Bandeira (RS) foram identificadas, respectivamente, uma e 16 linhagens autóctones.

5.11 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS VINHOS

5.11.1 Determinação de Açúcar Residual, teor alcoólico, acidez volátil e pH

As leveduras selecionadas para a vinificação foram A38, 27 e 1vvt/97. A escolha das linhagens foi baseada nos fatores enológicos desejáveis mostrados neste trabalho. Alta velocidade de fermentação, fenótipo K^+R^+ , ausência de H_2S , capacidade de flocular e aroma agradável foram as características escolhidas.

O teste de aromas é importante para se estimar a capacidade aromática das linhagens que haviam apresentado potencial de uso para a elaboração de vinhos. O resultado deste pode ser visualizado na figura 32. As linhagens A5 e A38 produziram os aromas mais agradáveis (nível 3). O desempate resultou na escolha da levedura A38. A linhagem 27, única linhagem da região metropolitana de Curitiba que reuniu todos os atributos desejados, apresentou aroma agradável (nível 2).

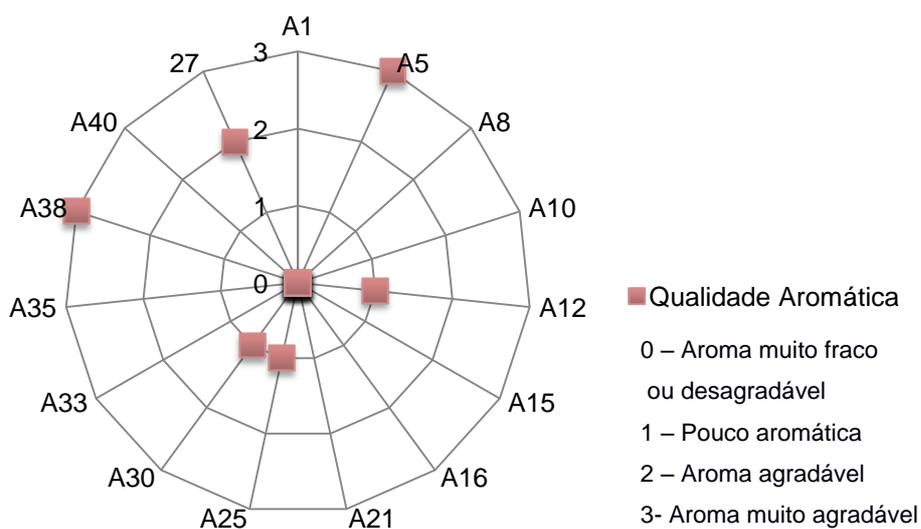


FIGURA 32 – QUALIDADE AROMÁTICA DE LINHAGENS COM CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DESEJÁVEIS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHOS

FONTE: O autor (2013)

A uva de escolha para o processo de vinificação foi a Pinot Noir. É uma cultivar que se caracteriza pela alta sensibilidade a períodos de estiagem e por necessitar de um mesoclima ideal para a expressão de sua potencialidade enológica (ZARDO, 2009). A sua maturação é precoce (MANDELLI, 1999) e, está relacionada com a concentração de carboidratos (RIZZON; MIELE, 2002). A estimativa de teor de açúcar inicial do mosto desta uva foi 14,5° BABBO. Esta quantidade resultaria em um vinho com teor alcoólico de 8,7 °GL. Efetuou-se o processo de chaptalização, visando à obtenção de um vinho com 11,7 °GL (BRASIL, 2004). A legislação brasileira permite a correção do teor alcoólico, durante a elaboração do vinho, em até três graus (BRASIL, 1990). O teor alcoólico obtido em cada vinho pode ser visto na tabela 9. A concentração mínima de etanol foi alcançada em todos os testes. Embora não tenha sido efetuada análise estatística por uma questão do fator tempo, o valor de etanol obtido no vinho elaborado pela linhagem 1vvt/97 foi numericamente mais elevado e a acidez volátil mais baixa que os demais vinhos elaborados com as outras leveduras. Convém salientar que todos os valores de etanol e acidez volátil estão dentro dos estabelecidos para vinhos, ou seja, maior que 8,6°GL e menor que 20 mEq.L⁻¹, respectivamente (BRASIL, 1988; BRASIL, 2004). Após a fermentação alcoólica, procedeu-se a fermentação maloláctica. Apenas o início desta foi acompanhado no presente trabalho.

TABELA 9 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE AÇÚCAR RESIDUAL, TEOR ALCOÓLICO, ACIDEZ VOLÁTIL e pH NOS VINHOS ELABORADOS COM AS LINHAGENS A38, 27 E 1VVT/97

Análise	A38	27	1 vvt/97
Açúcar Residual (g.L ⁻¹)	2,06	2,95	1,96
Teor Alcoólico (°GL)	12,91	13,11	13,30
Acidez Volátil (mEq.L ⁻¹)	5,45	7,85	4,51
pH	3,31	3,39	3,33

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Todas as análises foram efetuadas após o término da fermentação alcoólica.

Segundo o decreto nº 113/1991, o vinho é denominado seco quando o teor de açúcares totais for de até 5 g.L⁻¹ (BRASIL, 1991). Ao final da fermentação alcoólica, nenhum vinho permaneceu com mais de 3,0 g.L⁻¹ de açúcar residual (Tabela 9). Portanto, a fermentação alcoólica foi concluída de forma eficiente em 5 dias. Esta é

afetada pela composição do mosto e pela linhagem selecionada. Algumas causas de parada de fermentação são falta de nitrogênio no mosto (TAILLANDIER *et al.*, 2007), acúmulo de intermediários da glicólise e alteração da relação D-glicose/D-frutose (ZINNAI *et al.*, 2013). Como o mosto e as condições de fermentação foram as mesmas para as três leveduras, os resultados alcançados são fruto, exclusivamente, do metabolismo das leveduras utilizadas. Vários estudos buscam a seleção de leveduras autóctones com propriedades enológicas desejáveis. Settanni *et al.* (2012), ao testar a capacidade fermentativa de 14 linhagens promissoras, encontraram em três delas boa aptidão tecnológica. Estas apresentaram capacidade fermentativa superior à linhagem padrão. Dessa forma, os resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura. Linhagens selecionadas, além de transmitirem um caráter regional e tipicidade ao vinho, podem conferir vantagens tecnológicas (SILVA; SILVA, 1987; LOPES *et al.*, 2007; SANGORRÍN *et al.*, 2007).

A acidez volátil máxima para vinhos de mesa é 20 mEq.L^{-1} (PORTARIA 229, 1988). Como pode ser verificado na tabela 9, todas as amostras estão de acordo com o estabelecido em lei. A baixa acidez volátil pode estar relacionada com o uso de metabissulfito de potássio durante a elaboração do vinho problema (LUO *et al.*, 2012). Rizzon e Miele (2009) estudaram as características de vinhos Merlot elaborados na Serra Gaúcha nas safras de 2000 a 2003. Embora os vinhos se enquadrassem nos padrões de Identidade e Qualidade do MAPA, os teores de acidez volátil detectados foram considerados médios. Portanto, ressalta-se a importância dos cuidados com a uva e a tecnologia de elaboração na redução dos teores de acidez volátil.

O pH de cada vinho pode ser visto na tabela 9. É uma das características importantes do vinho, pois interfere nas propriedades organolépticas e na qualidade microbiológica do produto (AERNY, 1985; CHAVARRIA *et al.* 2008). Ao final da fermentação alcoólica, Rizzon e Miele (2002) encontraram um valor de pH de, aproximadamente, 3,1 e 3,35 e 3,4 para os vinhos elaborados, na Serra Gaúcha, com as cultivares Isabel, Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, respectivamente. Ao comparar o pH dos três vinhos elaborados no presente trabalho entre eles, os valores encontrados foram bastante próximos. Dessa forma, o pH parece depender mais do tipo de cultivar do que da linhagem inoculada no mosto. O estudo de Barnabé (2006) considerou os vinhos com pH 3,13; 3,21 e 3,25 com maior intensidade de coloração se comparado com os de pH 3,31 e 3,43. Estes últimos

valores são próximos aos encontrados no presente trabalho. De acordo com o estudo de Sims e Morris (1984), há menor concentração de antocianinas coloridas conforme o pH aumenta.

5.11.2 Compostos Voláteis

Os compostos voláteis analisados foram o metanol, acetato de etila e os alcoóis superiores (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) (Tabela 10). A soma deste grupo de substâncias foi superior a 300 mg.L⁻¹ em todos os vinhos. Na literatura, os limiares para a percepção de aroma e sabor desagradáveis provocados pela presença de alcoóis superiores no vinho variam conforme o autor. Ribéreau-Gayon *et al.* (1982) cita que os valores encontrados no vinho podem variar de 150 a 500 mg.L⁻¹. O estudo de Ferreira (2011) preconiza que o limite máximo deve ser 300 mg.L⁻¹. Mendes-Ferreira *et al.* (2011) considera o limite de 300 mg.L⁻¹ como ótimo, e que alterações organolépticas são percebidas acima de 400 mg.L⁻¹. De outra forma, em vinhos elaborados com a cultivar Cabernet Sauvignon, teores de alcoóis isoamílicos acima de 300 mg.L⁻¹ favorecem o produto. A presença destes alcoóis contribui para a formação de aroma herbáceo que é característico destes vinhos (RIZZON; MIELE, 2002). Vinhos elaborados com a cultivar Tannat se caracterizam por apresentarem elevados teores dessas substâncias, sempre superior a 350 mg.L⁻¹ (RIZZON; MIELE, 2004). O estudo de Bindon *et al.* (2013) mostrou que o teor de alcoóis secundários no vinho varia conforme a época de colheita da uva. Os vinhos elaborados com uvas mais maduras apresentaram teor médio de alcoóis secundários de 320 mg.L⁻¹, enquanto nos elaborados com uvas mais jovens o teor foi 269 mg.L⁻¹. A variedade de uva utilizada na elaboração de vinho no presente trabalho foi a Pinot Noir. Em 2013, o clima quente e seco na serra gaúcha antecipou a safra da uva (MONTEIRO; SANTOS, 2013). As uvas estavam maduras e não foi ultrapassado o tempo de colheita. Dessa forma, a alta produção de alcoóis superiores não deve ser atribuída à fase de colheita. Vale ressaltar que a análise foi efetuada logo após a fermentação alcoólica, caracterizando um vinho jovem. Dessa forma, por serem voláteis, a concentração

destes álcoois nos vinhos elaborados tende a diminuir ao longo do tempo, com o envelhecimento.

A soma dos álcoois isoamílicos apresentou resultado superior ao normalmente encontrado em vinhos brasileiros envelhecidos. Estes são constituídos pelo 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol. Estas duas substâncias formam picos muito próximos no cromatograma, e por ser difícil defini-las, o cálculo considera a soma de suas concentrações. Como os três vinhos apresentaram teor de álcool isoamílico elevado, a causa pode ser a composição do mosto de uva. Os aminoácidos isoleucina e valina são precursores do 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol. A formação de álcoois superiores a partir do metabolismo de açúcares via piruvato, tem como intermediários os ácidos cetônicos. Se houver deficiência dos aminoácidos citados, haverá acúmulo de α -cetácidos, o que conduzirá a maior síntese destes álcoois (OLIVEIRA, 2000).

TABELA 10 – RESULTADO DO TEOR DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS NOS VINHOS ELABORADOS COM AS LINHAGENS 1VVT/97, 27 E A38

Amostras	Acetaldeído	Acetato de Etila	MetOH	1-PropOH	2-Me-1-PropOH	Álcoois Amílicos	SAS
1vvt/97 (mg.L ⁻¹)	5,77	35,00	107,43	21,47	64,69	382,35	468,50
27 (mg.L ⁻¹)	7,75	39,15	93,73	34,70	83,88	315,46	434,05
A38 (mg.L ⁻¹)	6,67	37,73	104,68	21,51	62,79	415,61	499,91
Amplitude de valores encontrados na literatura (mg.L ⁻¹)	Traços a	40 a	40 a	1 a	20 a	80 a	100 a
	50	180	250	40	120	250	500

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os valores indicados na tabela como extraídos da literatura são do estudo de Rizzon (2010) em vinhos brasileiros, e a da soma de álcoois superiores (SAS) que está de acordo com RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1982).

O teor de acetaldeído foi baixo nos três vinhos. O estudo de Miele e Rizzon (2002) com vinhos que também foram elaborados na Serra Gaúcha mostrou resultado semelhante. Os autores justificam a baixa utilização de dióxido de enxofre como causa. As concentrações de metanol e acetato de etila também foram baixas. A baixa concentração de acetato de etila corresponde ao adequado estado sanitário da uva e as condições favoráveis à fermentação alcoólica (RIZZON; MIELE, 2003). O metanol é uma substância que apresenta risco para a saúde humana.

Dependendo da concentração ingerida, pode provocar cegueira e até a morte (NAGATO *et al.*, 2001). O estudo de Escobal *et al.* (1998) encontrou teor médio de metanol $31,22 \text{ mg.L}^{-1}$ em vinhos da Espanha. Na Serra Gaúcha, os estudos de Manfroi *et al.* (2006) e Rizzon e Miele (2004) mostraram concentração média de metanol de $101,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e $149,2 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. O metanol presente nos vinhos é resultado da hidrólise de pectinas da uva e liberado principalmente na maceração (MANFROI *et al.*, 2006). Nesse contexto, os vinhos da Serra Gaúcha apresentam teor de metanol superior ao vinho espanhol, o que pode ser devido ao processo de elaboração do vinho.

A quantificação dos compostos foi feita com base em um padrão interno, o 4-metil-2-pentanol. De acordo com a literatura, o padrão interno deve ser uma substância que não faz parte dos componentes da amostra, não interfira com os picos e não aumente o tempo de ensaio (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Silva (1995) investigou o potencial dos ácidos butanóico, pentanóico e hexanóico como padrões internos para a quantificação dos produtos da fermentação do *Bacillus stearothermophilus*, encontrando melhores resultados com os dois últimos compostos. O autor cita que as dificuldades encontradas no uso desse tipo de padrão estão associadas com fisiologia microbiana e o processo cromatográfico. O padrão interno utilizado no presente trabalho correspondeu aos requisitos da literatura e não sofreu interferência da mistura complexa resultante da fermentação pela levedura *Sacch. cerevisiae* (Figura 33).

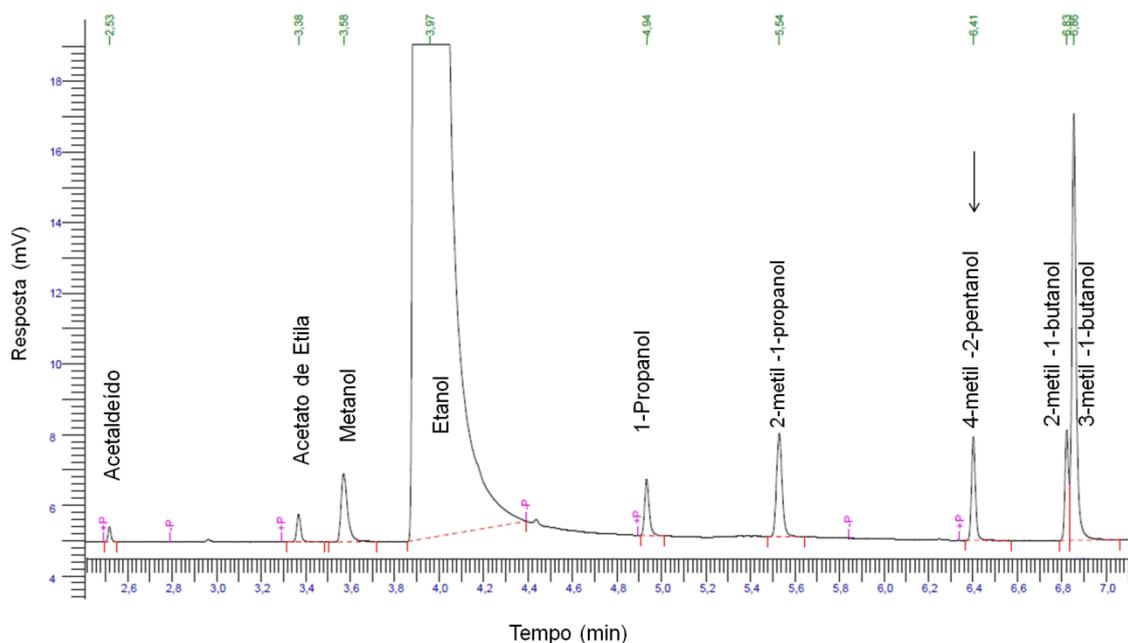


FIGURA 33 – PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DO VINHO ELABORADO COM A LINHAGEM 27 EM CROMATOGRAFIA GASOSA COM DESTAQUE PARA O PADRÃO INTERNO (SETA)

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A marcação em verde no topo da figura corresponde ao tempo de eluição de cada composto.

5.11.3 Minerais

A tabela 11 mostra os teores dos minerais K, Na, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, Li, Zn, Rb e P detectados nos três vinhos. A maioria dos valores analíticos obtidos para estes elementos está de acordo com os limites encontrados na literatura (RIZZON, 2010; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1982).

TABELA 11 – TEORES DE CÁTIONS NOS VINHOS ELABORADOS COM A CULTIVAR PINOT NOIR E AS LINHAGENS A38, 27 E 1VVT/97

Cátion	A38	27	1vvt/97	Amplitude de valores encontrados na literatura
K (mg.L ⁻¹)	1024	1037,2	984,6	400 a 1.500
Na (mg.L ⁻¹)	3,8	3,7	3,7	5 a 50
Ca (mg.L ⁻¹)	78,04	74,65	75,62	60 a 110
Mg (mg.L ⁻¹)	58,5	58,5	57,2	50 a 90
Mn (mg.L ⁻¹)	4,4	2,6	2,7	0,5 a 3,5
Cu (mg.L ⁻¹)	0,2	0,3	0,3	traços a 5
Fe (mg.L ⁻¹)	1,1	1	0,9	traços a 15
Zn (mg.L ⁻¹)	21,7	20,9	28,8	0,4 a 2,0
Li (µg.L ⁻¹)	3,8	3,8	4,1	traços a 30
Rb (mg.L ⁻¹)	6,2	6,2	6,1	traços a 8
P (mg.L ⁻¹)	42,9	39,9	42	70 a 500

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os valores indicados na tabela como extraídos da literatura são do estudo de Rizzon (2010) em vinhos brasileiros, com exceção do teor de fósforo que está de acordo com Ribéreau-Gayon *et al.* (1982).

Em ordem decrescente, os minerais mais encontrados no vinho foram K > Ca > Mg > P > Zn > Rb > Na > Fe > Cu > Li. O potássio também foi o componente encontrado em maior quantidade nos vinhos da República Tcheca (KMENT *et al.*, 2005) e Espanha (MORENO *et al.*, 2008). A concentração de potássio detectada em todos os vinhos elaborados foi próxima ou superior a 1,0 g.L⁻¹. De acordo com Rizzon e Miele (2002), teores de K superiores a este valor podem ser devido à liberação desse mineral pelas cascas e sementes da uva durante a maceração pelicular.

O teor de sódio está abaixo do limite mínimo encontrado. A sua concentração está relacionada com a procedência da uva. Regiões mais úmidas e mais afastadas da costa marítima apresentam vinhos com baixo teor de sódio (RIZZON, 2010). Estudo realizado na República Tcheca também encontrou teores de sódio abaixo dos encontrados na literatura, o que foi atribuído à baixa influência marítima (KMENT *et al.*, 2005). O município de Pinto Bandeira e a região metropolitana de Curitiba se encontram em região continental a, aproximadamente, 247 e 126 km do litoral, respectivamente, o que explicaria o resultado. A concentração de sódio também está relacionada com os aditivos utilizados durante a vinificação. Produtos enológicos como o metabissulfito de sódio, a bentonita, a gelatina e a caseína podem aumentar o teor deste cátion (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998). No presente

trabalho, apenas o metabissulfito de sódio foi acrescentado durante o processo, o que também justificaria o baixo teor encontrado.

Diversos minerais estão relacionados com a instabilidade do vinho. Sedimentos causados pelos sais bitartarato de potássio e bitartarato de cálcio são uma das principais causas de instabilidade em vinhos engarrafados (RIZZON, 2010). É conhecido que altas concentrações de Fe e Cu afetam a qualidade do vinho por causarem precipitação (HARJU; RONKAINEN, 1980). A combinação de ferro com fósforo também é causa conhecida desse problema (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1982). Como os minerais Fe, Cu e Ca estão dentro dos limites encontrados na literatura, e o fósforo está abaixo dos limites, o vinho elaborado não deve sofrer desestabilização química com relação a estes elementos minerais. O teor de cobre também pode ser resultado do tipo de tratamento fitossanitário recebido pela videira. O estudo de Garcia-Esparza *et al.* (2006) relata que 18% das amostras de vinho de uma região da Itália excederam o máximo teor permitido de cobre. De acordo com este estudo, o cobre é utilizado em fungicidas agrícolas para o controle de doenças da videira. Dessa forma, como este cátion não foi detectado em excesso no presente trabalho, a aplicação fungicidas contendo cobre deve ter sido baixa na cultivar Pinot Noir.

A concentração de manganês nos vinhos produzidos com as linhagens 1vvt/97 e 27 estavam de acordo com os valores encontrados na literatura. O teor encontrado no vinho elaborado com a linhagem A38 foi de 4,4 mg.L⁻¹. Em vinhos gregos, a concentração detectada desse mineral foi de até 2,2 mg.L⁻¹, com exceção de uma amostra que atingiu 10 mg.L⁻¹. Contaminação durante as etapas de processamento na vinícola justificaria esta discrepância (GALANI-NIKOLAKI; KALLITHRAKAS-KONTOS; KATSANOS, 2002). A análise do vinho elaborado com as leveduras utilizadas no presente trabalho resultou em valores semelhantes nos ensaios com os demais elementos. Dessa forma, a contaminação da amostra A38 ou da vidraria utilizada durante alguma etapa do teste pode ter resultado no valor superior de Mn dessa amostra.

O teor de Mg depende, principalmente, da sua concentração no solo do vinhedo (KMENT *et al.*, 2005). A concentração encontrada nos três vinhos variou de 57,2 a 58,5 mg.L⁻¹. No estudo de Santos *et al.* (2010) realizado com a cultivar Cabernet Sauvignon cultivada no Rio Grande do Sul, o valor médio obtido foi 58 mg.L⁻¹. A análise de vinho elaborado com a cultivar Cabernet Sauvignon, na Serra

Gaúcha, encontrou teor médio de Mg de 77 mg.L⁻¹ (RIZZON; MIELE, 2002). Dessa forma, a concentração média deste composto parece ter diminuindo no solo sul-riograndense no período de 2002 a 2013.

O lítio foi o mineral presente em menor quantidade no vinho. Em estudo anterior realizado na Serra Gaúcha o teor de lítio encontrado em vinho tinto foi semelhante, variando de 4,3 a 4,7 µg.L⁻¹ (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Na região de Stellenbosch, na África do Sul, a concentração de Li em vinhos tintos variou de 0,48 a 1,60 µg.L⁻¹ (COETZEE *et al.*, 2005). Estudo na República Tcheca encontrou 5 µg.L⁻¹ nos vinhos da região (KMENT *et al.*, 2005). É um mineral que tem sido pesquisado recentemente na caracterização do vinho em função da região vitícola (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Nesse contexto, observa-se maior concentração de Li nos vinhos brasileiros e Tchechos em relação aos sul africanos.

O teor de Rb também está relacionado à origem geográfica dos vinhos (GALGANO *et al.*, 2008; RIZZON; MIELE; SCOPEL, 2009). No presente trabalho, as concentrações encontradas foram 6,1 e 6,2 mg.L⁻¹. Rizzon, Salvador e Miele (2008), na Serra Gaúcha, encontraram uma média de 6,0 mg.L⁻¹ enquanto na República Tcheca, obteve-se 0,7 mg.L⁻¹ (KMENT *et al.*, 2005). Como visto, os vinhos brasileiros possuem teores de Rbo bem acima dos vinhos tchechos.

O valor de zinco detectado está acima daqueles normalmente obtidos para vinho brasileiro (RIZZON, 2010). No entanto, Amerine e Joslyn (1970) citam quantidades de zinco no mosto que vão de 9 a 19 mg.L⁻¹, com a faixa mais comum estando entre 1 e 6 mg.L⁻¹. No estudo de Ribereau-Gayon *et al.* (1982) varia de 0,9 a 4,5 mg.L⁻¹ em vinhos da região de Bordelaise, na França. Segundo Kment *et al.* (2005), o uso de pesticidas pode aumentar o teor de zinco do vinho. Como a qualidade do vinho depende grandemente da qualidade da uva, muitos vitivinicultores recorrem ao uso de agrotóxicos para obter uvas saudáveis no correto estágio de maturação (CABONI; CABRAS, 2010). Nos vinhedos, é comum o uso dos seguintes fungicidas que contém zinco: Antracol contém 16% de Zn, Mancozeb 2,5% Zn, Bercema-Zineb 17% de Zn e Supertol 12% de Zn (WEINGERL; KERIN, 2000). Costa *et al.* (2009) pesquisaram as alterações nos teores totais de Zn em solos cultivados com videira. Os resultados mostraram valores elevados de Zn nas áreas cultivadas quando comparada com a área de referência (vizinha aos vinhedos, sem interferência antrópica). Segundo Weingerl e Kerin (2000), a concentração deste cátion em solos cultivados aumenta anualmente de 0,5 a 1 mg.kg⁻¹ devido ao

uso de fungicidas e fertilizantes. Portanto, a cultivar Pinot Noir pode ter absorvido o zinco presente no solo resultante de aplicações anteriores de fungicida, assim como ter retido o metal em suas partes aéreas devido à aplicação direta do mesmo. O período de carência é de 7 dias para a maioria dos agrotóxicos que contém zinco na formulação (UVIBRA, 2012). Dessa forma, se respeitado pelo agricultor, o princípio ativo não deve estar presente, restando apenas o metal na superfície da baga de uva. O teor de 7 mg/dia de Zn é o recomendado pela legislação brasileira (BRASIL, 2005). Dessa forma, uma taça do vinho elaborado (120 ml) com as linhagens A38, 27 e 1vvt/97 contribui com, respectivamente, 37,1 %, 35,8 % e 49,31 % da ingestão diária recomendada de Zn. Cabe ressaltar que o teor deste cátion foi medido em vinhos que não passaram pelo processo de envelhecimento. Considerando que nesta etapa, o zinco precipita (GALANI-NIKOLAKI; KALLITHRAKAS-KONTOS; KATSANOS, 2002) a concentração deste mineral nos vinhos elaborados tende a diminuir ao longo do tempo.

6 CONCLUSÃO

Linhagens de *Sacch. cerevisiae* aptas para a elaboração de vinhos não são tão frequentes como se possa imaginar e a presença de tais linhagens nas bagas de uva depende de vários fatores. Parece não depender da safra e nem da região geográfica, mas da cultivar da qual estas leveduras são isoladas.

A designação do fenótipo *killer* numa determinada levedura é a mais difícil de ser efetuada, porque a detecção deste fator depende da linhagem sensível selecionada, do tipo de meio de cultura utilizado e da interação entre leveduras presentes no mosto. Além disso, a detecção do M-dsRNA por técnicas moleculares não é sempre eficaz, o que pode gerar dúvidas quanto ao fenótipo da linhagem e discussões sobre o tipo de herança genética envolvida, se é citoplasmática ou cromossomal.

A formação de H₂S pelas leveduras parece depender, principalmente, do tipo de cultivar. Esta pode privilegiar a presença de determinada microbiota pela sua composição química, a qual poderá ou não favorecer a formação deste gás.

Com relação aos teores de etanol final, acidez volátil e ART do vinho elaborado, as leveduras aqui selecionadas se equivalem, restando determinar qual das 17 leveduras selecionadas melhor sobreviveria a ciclos sequenciais de reutilização sem a perda das três ou cinco características mais desejáveis.

REFERÊNCIAS

- AERNY, J. Définition de la qualité de la vendage. **Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture**, v. 17, p. 219-223, 1985.
- AGUILERA, F. *et al.* Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 34-42, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160506001747>> Acesso: 16/09/2011.
- AGNOLUCCI, M. *et al.* Genetica and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces spp.* Strains associates to natural fermentation of 'Malvasia delle Lipari'. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 657-662, 2007.
- AGUSTINI, B. C. **Caracterização de vinhos de uvas *Vitis labrusca* por meio do seu conteúdo em aminoácidos e aminos bioativas**. Curitiba, 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- AKIN, A.; WU, C.C.; LIN, T.L. A comparison of two RNA isolation methods for double-stranded RNA of infectious bursal disease virus. **Journal of Virology Methods**, v. 74, n. 2, p. 179-184, 1998.
- AMERINE, M.A.A.; JOSLYN, M.A. **Table Wines**. 2 ed. Los Angeles: University of California Press, 1970.
- AMRI, M.A. *et al.* Yeast flocculation: Influence of nutritional factors on cell wall composition. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 2001-2009, 1982.
- BAEZA, M.E.; SANHUEZA, M.A.; CIFUENTES, V.H. Occurrence of *killer* yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. **Biological Research**, v. 42, n. 2, p. 172-183, 2008.
- BALIJJA, A.; KVARNHEDEN, A.; TURCHETTI, T. A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 152, p. 32-37, 2008.
- BARBOSA, C. *et al.* Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 99-104, 2009.
- BARNABÉ, D. **Produção de vinho de uvas dos cultivares Niágara rosada e bordô: as análises físico-químicas, sensorial e recuperação de etanol a partir do bagaço**. Botucatu, 2006. 106 p. Tese (Doutor em Agronomia) – Setor de Agronomia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- BARNARD, H., *et al.* "Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands." **Journal of Archaeological Science**, v.38, n.5, p.977-984, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WH8-51KK98H-1/2/5ff9c3d30b42b1ea5cfcea060c95e3cc>>. Acesso: 12/05/2011.
- BARNETT, J.A, PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and identification**. 2 ed. New York: Cambridge University Press, 1990.
- BARTOWSKY, E, J.; HENSCHKE, P.A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 60-70, 2008.
- BAXTER, M.J. *et al.* The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 443-450, 1997.

BEHREND, F.G. **Selective isolation of linear plasmids from *Streptomyces spp.* by concentration at a phenol-buffer interface.** Alberta, 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Biotecnologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Alberta.

BELTRAN, G. *et al.* Analysis of yeast population during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 287-293, 2002.

BEROVIC, M.; HERGA, M. Heat shock on *Saccharomyces cerevisiae* inoculum increases glycerol production in wine fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 891-894, 2007.

BERTHELS, N.J. *et al.* Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 77, p. 1083-1091, 2008.

BEVAN, E.A., MAKOVER, M. (1963) The physiological basis of killer character in yeast. In: *Genetics Today Xth International Congress for Genetics* ed. Geets, S.J. pp. 53–58. Oxford: Pergamon Press.
BEVAN, E.A.; MAKOVER, M. The physiological basis of killer character in yeast.

BINDON, K. *et al.* Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 1. Grape and wine chemistry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1696-1705, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612016391>>. Acesso em: 04/02/2013.

BOBAN, N. *et al.* Antimicrobial Effects os Wine: Separating the Role of Polyphenols, pH, Ethanol, and Other Wine Components. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, p. 322-326, 2010.

BONFIM, T. M. *et al.* Qualidade do vinho produzido no município de Colombo na safra 2001. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2002.

BOQUETE, L., *et al.* "Portable system for temperature monitoring in all phases of wine production." **ISA Transactions**, v. 49, n. 3, p. 270-276, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V3P-4YTM6D3-1/2/844dbc2e0d7fcd6e99798e963f9edbc3>>. Acesso em: 11/10/2011.

BOWEN, S.; ZAPATA, A.V. Geographical indications, *terroir*, socioeconomic and ecological sustainability: The case of tequila. **Journal of Rural Studies**, v. 25, p. 108-119, 2009.

BRASIL. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Complementa os padrões de Identidade e Qualidade do vinho. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 1988.

BRASIL. Decreto nº 99.066, de 08 de março de 1990. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 1990.

BRASIL. Decreto nº 113, de 6 de maio de 1991. Altera o Decreto nº 99066, de 8 de março de 1990, que regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 1991.

BRASIL. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 2005.

BREINIG, F. TIPPER, D.J.; SCHMITT, M.J. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast k1 viral toxin. **Cell**, v. 108, n. 3, p. 395-405, 2002.

BRITES, A.S.M. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator killer, H₂S e o caráter floculante**. Piracicaba, 2003. (Dissertação – Mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

BUIARELLI, F. *et al.* Identification of hydroxycinnamic acid-tartaric esters in wine by HPLC- tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 827-833, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610005777>>. Acesso em: 14/09/2011.

BUTZKE, C.; PARK, S.K. Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 519-524, 2011.

CABONI, P.; CABRAS, P. Pesticides' influence on wine fermentation. **Advances in food and nutrition research**, v. 59, p. 43-62, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043452610590028>>. Acesso em: 01/02/2013.

CAPECE, A., *et al.*, Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation, **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 187-192, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510005131>>. Acesso em: 10/09/2011.

CAPECE, A.; SALZANO, G., ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 33-39, 2003.

CARROLL, K.; WICKNER, R.B. Translation and m1 double-stranded RNA propagation: Mak18=rp141b and cycloheximide curing. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 10, p. 2887-2891, 1995.

CARVALHO, A.C. **Análise de Processos de Microvinificação da cultivar Cabernet Sauvignon por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR) e Quimiometria**. Curitiba, 2007. 86 f. (Dissertação- Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.

CASTILLO, A. *et al.* Rapid isolation of mycoviral double-stranded RNA from *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Virology Journal**, v. 8, n. 38, 2011. Disponível em: < <http://www.virologyj.com/content/8/1/38>>. Acesso em: 28/11/2012.

CHAVARRIA, G. *et al.* Caracterização físico-química do mosto e do vinho Moscato Giallo em videiras cultivadas sob cobertura de plástico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 911-916, 2008.

CHIVA, R. *et al.* Analysis of low temperature-induced genes (LTIG) in wine yeast during alcoholic fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 7, p. 831-843, 2012.

CHOMCZYNSKY, P.; SACCHIT, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol – chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHRISTAKI, T; TZIA, C. Quality and safety assurance in winemaking. **Food Control**, v. 13, n. 8, p. 503-517, 2002.

CLARO, F.B.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 693-700, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2006.03130.x/pdf>>. Acesso em: 19/11/2012.

CLAVIJO, A.; CALDERÓN, I.; PANEQUE, P. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 241-245, 2010.

CNPUV, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM UVA E VINHO (CNPUV). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/>>. Acesso em: 15/12/2012.

COETZEE, P.P. *et al.* Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5060-5066, 2005. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf048268n>>. Acesso em: 31/01/2013.

COLEMAN, M.C.; FISH, R.; BLOCK, D.E. Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5875-5884, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COLOMBO, Prefeitura de Colombo. Disponível em: <<http://www.colombo.pr.gov.br/pagina.asp?id=166>>. Acesso em: 14/7/2011.

CONDE, C. *et al.* Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2007.

CORDEnte, A.G. *et al.* Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production, **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 446-459, 2009.

COSTA, W.P.L.B. *et al.* Alterações nos teores de totais de Cu e Zn em solos cultivados com videira. XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 2009, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: Embrapa, 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/256745/1/OPB2409.pdf>>. Acesso em: 01/02/2013.

CPATSA, CENTRO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA TRÓPICO SEMI-ÁRIDO (CPATSA). Disponível em: <<http://www.cpatsoa.embrapa.br/>>. Acesso em: 15/12/2012.

CSOMA, H. *et al.* Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, n.2-3, p.239-248, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510001650>>. Acesso:23/01/2012.

CURY, J.A.; KOO, H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. **Analytical Biochemistry**, v. 365, n. 2, p. 208-214, 2007.

CUINER, M.C.; GROS, C. Enquete sur la repartition des levures "killer" en France. **Vignes vins**, v. 318, p. 25-27, 1983.

CUNHA, A. F. *et al.* Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 2, p. 280-287, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1567-1364.2006.00038.x/pdf>>. Acesso em: 16/10/2012.

CURY, J.A.; KOO, H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. **Analytical Biochemistry**, v. 365, p. 208-214, 2007.

CUS, F. *et al.* Pesticide residues in grape and during vinification process. **Food Control**. v. 21, p. 1512-1518, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510001453>>. Acesso: 27/03/2011.

CUS, F.; RASPOR, P. The effect of pyrimethanil on the growth of the wine yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 54-59, 1998.

DAUDT, C.E.; SIMON, J.A. Um método rápido para análise de glicose em mostos de uva e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 697-701, 2001. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n4/a23v31n4.pdf>>. Acesso: 01/02/2013.

DESPLOBINS, G.; SILVA, A.L. Construção de qualidade e de reconhecimento na vitivinicultura tradicional do Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 22, n. 2, 2005).

DIAZ-RUIZ, J.R.; KAPER, J.M. Isolation of viral double-stranded RNAs using a LiCl fractionation procedure. **Preparative Biochemistry**, v. 8, n. 1-7, 1978.

DOMINGUES, L. *et al.* Applications of yeast flocculation in Biotechnological process. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, p. 288-305, 2000.

ESCOBAL, A. *et al.* Determination of acids and volatile compounds in red Txakoli wine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1-2, p. 349-354, 1998.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Síntese Tecnologias Geradas pelo Sistema Embrapa: **Determinação qualitativa da produção de sulfeto de nitrogênio por leveduras vinícas**. Brasília, p. 243, 1984.

ESTEVE-ZARZOSO, B. *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 329-337, 1999.

FAO. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/a1176e/a1176e.pdf>> Acesso em: 27/03/2012

FENG, Q. *et al.* MDA5 Detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. **Cell Reports**, v. 2, n. 5, p. 1187-1196, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124712003415>>. Acesso em: 11/01/2013.

FERNANDEZ-ESPINAR *et al.* RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 87-97, 2000.

FERREIRA, D.M.L. **Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de castas portuguesas**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Viticultura e Enologia) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

FISHER, J.A.; FAVREAU, M.B.R. Plasmid purification by phenol extraction from guanidium thiocyanate solution: development of an automated protocol. **Analytical Biochemistry**, v. 194, p. 309-315, 1991.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 11-22, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503002459>>. Acesso em: 12/09/2011.

FLEGR, J. A rapid method for isolation of double stranded RNA. **Preparative Biochemistry**, v. 17, n. 4, p. 423-433, 1987.

FRIED, H.; FINK, G. Electron microscopic heteroduplex analysis of “killer” double-stranded RNA species from yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 9, p. 4224-4228, 1978.

GALANI-NIKOLAKI, S.; KALLITHRAKAS-KONTOS, N.; KATSANOS, A.A. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. **Science of The Total Environment**, v. 285, n. 1-3, p. 155-163, 2002.

GALGANO, F. *et al.* Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to provenance. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1808-1815, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643808000455>>. Acesso em: 01/02/2013.

GALOPIER, A.; DENMAT, S.H. Mitochondria of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* contain nuclear rDNA-encoded proteins. **Plos One**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2011.

GARCIA-ESPARZA, M.A. *et al.* Copper content of grape and wine from Italian farms. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 3, p. 274-280, 2006. Disponível em: < http://peer.ccsd.cnrs.fr/docs/00/57/75/60/PDF/PEER_stage2_10.1080%252F02652030500429117.pdf>. Acesso em: 30/01/2013.

GEORGOPOULOS, D.E.; LEIBOWITZ, M.J. Nucleotide phosphotransferase, nucleotide kinase and inorganic pyrophosphatase activities of killer virions of yeast. **Yeast**, v. 3, n. 2, p. 117-129, 1987.

GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C. Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 4, p. 370-374, 1992.

GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 563-567, 1996.

GOVENDER, P.; KROPPESTEDT, S.; BAUER, F. Novel wine-mediated *FLO11* flocculation phenotype of commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with modified *FLO* gene expression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 317, n. 2, p. 117-126, 2011.

GUERRA, C.C. Influência de parâmetros enológicos da maceração na vinificação em tinto sobre a evolução da cor e qualidade do vinho. X CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2003a, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2003a.

GUERRA, C.C. Processamento. In: GUERRA, C.C. *et al.* **Uva para processamento pós colheita**. Brasília: Embrapa, 2003b. p. 30-35.

GUILLAMÓN, J.M. *et al.* Rapid Identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, v. 169, p. 387-392, 1998.

GUIMARÃES.T.M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. Curitiba, 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GUTIERREZ, L.E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 3, p. 464-472, 1993. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v50n3/21.pdf>>. Acesso em: 27/01/2013.

HAMERSVELD, E. H. V. *et al.* On the measurement of the flocculation characteristics of brewers' yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 333-342, 1996.

HANNIG, E.M.; THIELE, D.J.; LEIBOWITZ, M.J. *Saccharomyces cerevisiae* killer virus transcripts contain template-coded polyadenylate tracts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, n. 1, p. 101-109, 1984.

HANSSON, M. C.; FOLEY, B. P. "Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck." **Journal of Archaeological Science**, v. 35, n. 5, p. 1169-1176, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WH8-4PVY30R-2/2/3fb984ea3fba246e61232899974e78a9>>. Acesso em: 08/05/2011.

HARJU, K.; RONKAINEN, P. Analysis of wines for metals using atomic-absorption spectrophotometry. **Lebensmittel – Untersuchung und – Forschung**, v. 170, p. 445-448, 1980.

HEARD, G.M.; FLEET, G.H. Occurrence and growth of *killer* yeasts during wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, 1987.

HEINTEL, T.; ZAGORC, T.; SCHMITT, M.J. Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 165-172, 2001.

HERNANDEZ, A. *et al.* Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 178-188, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507006034>>. Acesso em: 23/11/2012.

HIDALGO, P.; FLORES, M. Occurrence of the *killer* character in yeasts associated with Spanish wine production. **Food Microbiology**, v. 11, 161-167, 1994.

HONG, Y.A.; PARK, H.D. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. **Food Microbiology**, *In Press*, 2013.

HOU, C.Y. *et al.* Addition of Phenolic Acids on the Reduction of Methanol Content in Wine. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 432-437, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2008.00768.x/pdf>>. Acesso em: 14/09/2011.

IBRAVIN, **Instituto Brasileiro do Vinho**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/cadastroviticola.php?secao=1&m2=true>>. Acesso em: 30/8/2011.

ICHO, T.; WICKNER, R.B. The mak11 protein is essential for cell growth and replication of M-double strandend RNA and is apparently a membrane-associated protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 3, p. 1467-1475, 1988.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; YUCELIS, A. Identification and *killer* activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. **Food Microbiology**, v. 14, p. 125-131, 1997.

JACKSON, R.S. **Wine Science**. 2 ed. Ontario: Academic Press, p. 232-280, 2000.

JACOBS, C.J.; FOURIE, I.; VAN VUUREN, H.J.J. Characterization of killer yeasts isolates from Chenin Blanc grapes and grape skins. **South African Journal of Enology & Viticulture**, v. 12, n. 2, 1991.

JAMES, S. A. *et al.* Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. **Genome Research**, v. 19, p. 626-635, 2009.

JIANG, H.-E., *et al.* "Evidence for early viticulture in China: proof of a grapevine (*Vitis vinifera* L., Vitaceae) in the Yanghai Tombs, Xinjiang." **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 7, p. 1458-1465, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WH8-4VR24BW-1/2/929d4b817e814578cbe860a9d6bfde28>>. Acesso em: 05/05/2011.

JIRANECK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, 1995.

JONES, P.R. *et al.* The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. **Food Quality and Preference**, v. 19, p. 596-607, 2008.

KAPSOPOULOU, K. *et al.* Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* *killer* yeasts in wine-producing areas of Greece. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1967-1971, 2008.

- KARUBE, J. *et al.* Size and shape of allophone particles in dispersed aqueous systems. **Clays Clay Minerals**, v. 44, n. 4, p. 485-491, 1996.
- KMENT, P. *et al.* Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. **Food Chemistry**, v. 91, p. 157-165, 2005.
- KIRBY, K.S. **Methods in enzymology**, v. 12, p. 87-98, Academic Press, New York, 1956.
- KITANO, K. *et al.* Occurrence of wild *killer* yeasts in Japanese wineries and their characteristics. **Journal of fermentation and Technology**, v. 64, n. 1, p. 1-6, 1984.
- KNOLL, C. *et al.* Influence of pH and ethanol on Malolatic Fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 2077-2086, 2011.
- KOTANI, H.; SHINMYO, A.; ENATSU, T. *Killer* toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'-diphosphate and calcium ion on *killing* action. **Journal of Bacteriology**, v.129, n. 2, p. 640-650, 1977.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.
- KREGIEL, D.; BERLOWSKA, J.; SZUBZDA, B. Novel permittivity test for determination of yeast surface charge and flocculation abilities. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2012.
- LI, Q. *et al.* Ethanol-induced yeast flocculation directed by promoter of *TPS1* encoding thalose-6-phosphate 1 for efficient ethanol production. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2012.
- LI, S.S. *et al.* Yeasts species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 85-90, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510000267>> Acesso: 13/01/2013.
- LIERMANN, T. *et al.* Improved purification of the double-stranded RNA from *killer* strains of yeast. **Biotechniques**, v. 28, n. 1, p. 64-65, 2000.
- LIMA, D.B. **Diferenciação genotípica e fenotípica de leveduras vínicas provenientes de Colombo, Estado do Paraná**. 99 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- LINDERHOLM, A. *et al.* Identification of met10-932 and characterization as an allele reducing hydrogen sulfide formation in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7699-7707, 2010.
- LLORENTE, P. *et al.* Effect of salt on the *killer* phenotype of yeasts from olive brines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1165-1167, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168407/pdf/631165.pdf>>. Acesso em: 22/11/2012.
- LODDER, J. **The yeasts: a taxonomic study**. 3 ed. Amsterdam: North-Holland publishing company, 1984.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 163, p. 16-20, 1987.
- LONGO, E., *et al.* Influence of the curing killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on the fermentative behaviour. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 147-150, 1992.

LOPES, C. A. *et al.* Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 139-149, 2007.

LOPES, C.A.; SANGORRÍN, M.P. Optimization of killer assays for yeast selection protocols. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, p. 298-206, 2010.

LOPES, M.B. Fermentation properties of a wine yeast over-expressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*GPD2*). **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.6, p.208-215, 2000.

LUO, H. *et al.* Variability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 415-420, 2012.

MAAN, S. *et al.* Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 143, p. 132-139, 2007.

MAMEDE, M.E.O; PASTORE, G.M. Avaliação da Produção dos Compostos Majoritários da Fermentação de mosto de Uva por leveduras isoladas da 'Serra Gaúcha'. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 453-458, 2004.

MANDELLI, F. Comportamento Meteorológico e sua influência na vindima de 1999 na Serra Gaúcha. **Comunicado Técnico – Embrapa**, n. 34, p. 1-4, 1999.

MANFROI, L. *et al.* Composição físico-química do vinho Cabernet Franc proveniente de videira conduzidas no sistema lira aberta. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 290-296, 2006.

MAQUEDA, M. *et al.* Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces Sensu Stricto killer* yeasts in the spontaneous grape must fermentations of southwestern Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 735-743, 2012.

MARO, E.D.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the catalanesca grape. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, v. 2, p. 201-210, 2007.

MARQUINA, D. *et al.* Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. **Microbiological Research**, v. 156, p. 387-391, 2001.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J.M. Biology of *killer* yeasts. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 65-71, 2002.

MARTIN, A.E.; WATLING, R.J.; LEE, G.S. The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 1081-1089, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612001781> >. Acesso em: 25/1/2013.

MARTIN, K.J.; RYEGIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, v. 5, n. 28, p. 1-11, 2005. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/28> >. Acesso em: 15/01/2013.

MARTINS, C.V.B; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por flocculação e produção de H₂S. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 64-72, 1998.

MARTINS, P.A. **Análises físico-químicas utilizadas nas empresas de vinificação necessárias ao acompanhamento do processo de elaboração de vinhos brancos**. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Viticultura e Enologia) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2007.

MATHIESON, W.; THOMAS, G.A. Simultaneously extracting DNA, RNA, and protein using kits: Is sample quantity or quality prejudiced? **Analytical Biochemistry**, v. 433, n. 1, p. 10-18, 2013.

MATURANO, Y.P. *et al.* Monitoring of *killer* yeast populations in mixed cultures: influence of incubation temperature of microvinifications samples. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3135-3142, 2012.

MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2010**. Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br/pdf/Panorama%202010%20-%20Vitivinicultura%20Brasileira.pdf>>. Acesso em: 21/05/2011.

MELLO, L.M.R. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola Mundial**. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2007a2012_out.pdf>. Acesso em: 21/05/2012.

MELVYDAS, V. *et al.* Search for biological control agents against *Candida* yeasts and other dermatomycetes. **Biologija**, v.18, n.1, p.45-49, 2007.

MENDES-FERREIRA, A. *et al.* The timing of diammonium phosphate supplementation of wine must affects subsequent H₂S release during fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 540-549, 2010.

MENDES-FERREIRA, A. *et al.* The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 26, n. 1, p. 17-32, 2011.

MENEGOTTO, M. A. **Ação do Cabrio Top sobre o crescimento e a atividade fermentativa da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97**. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso- Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Bento Gonçalves, 2009.

MIKI, B.L.A., *et al.* Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 878-889, 1982.

MONTEIRO, J.E.B.A.; SANTOS, H.P.S. dos. Tempo quente e seco antecipa parte da safra de uva de 2013 e o total produzido poderá superar 2012. **Cultivar**, 2013. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/945972/1/220113uva.pdf>>. Acesso em: 04/02/2013.

MONTENEGRO, D.H. RNA dupla fita em *Guignardia citricarpa*: Obtenção, cura, transmissão e alterações fenotípicas. 93 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MORENO, I.M. *et al.* Determination of Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn in red wine samples by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy: Evaluation of preliminary sample treatments. **Microchemical Journal**, v. 88, n. 1, p. 56-61, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X07001117>>. Acesso em: 01/02/2013.

MORENO-ARRIBAS, V.M.; POLO, C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. New York: Springer, 2008.

MOSSER, M. *et al.* Chromatographic fractionation of yeast extract: A strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell culture. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1178-1185, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135951131200164X>>. Acesso em: 19/01/2013.

MOURA, B. G. **Vinho Tinto, Suco de Uva e Etanol em Ratos Adultos Submetidos à Dieta Hiperlipidêmica**. Santa Maria, 2009. 55 f. (Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.

MUÑOZ-GONZÁLEZ, C. *et al.* Beyond the characterization of wine aroma compounds: looking for analytical approaches in trying to understand aroma perception during wine consumption. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1497-1512, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/24141wl255527185/fulltext.pdf>>. Acesso em: 14/09/2011.

NAGATO, L.A.F. Monitoramento da autenticidade de amostras alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 21, n. 1, 2001.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A.A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 275-278, 2005.

NIKOLAOU, E. *et al.* Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results, **Food Microbiology**, v. 23, p. 205-211, 2006.

NOVOTNÁ, D.; FLEGELOVÁ, H., JANDEROVÁ, B. Different action of killer toxins k1 and k2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, n. 8, p. 803-813, 2004.

NUNES, E.O. **População de fungos e filamentos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de Santa Catarina**. Florianópolis, 2008. 101 f. (Tese – Doutorado em Engenharia Química)- Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

OHTAKE, Y., WICKNER, R.B. Yeast virus propagation depends critically on free 60s ribosomal subunit concentration. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 5, p. 2772-2781, 1995.

OLIVEIRA, J.M.M. **Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho**. Braga, 2000. 267 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.

ORTEGA-HERAS, M., GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L. Binding capacity of Brown pigments present in special Spanish sweet wines. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1729-1737, 2009.

ORTIZ, J.M. *et al.*, Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 371-377, 2013.

PALFREE, G.E.; BUSSEY, H. Yeast killer toxin: Purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 93, n. 3, p. 487-493, 1979.

PARAPOULLI, M. *et al.*; Comparative proteomic analysis of alcoholic fermentation employing a new environmental strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biotechnology**, v. 45, p. 1094-1102, 2010.

PÉREZ-NEVADO, F. *et al.* Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 336-345, 2006.

PFEIFFER, P.; RADLER, F. Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. **Archives of Microbiology**, v. 137, n. 4, p. 357-361, 1984.

PERKIN-ELMER. **Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry**. Norwalk: PerkinElmer, 1976.

POLASKOVÁ, P.; HERSZAGE, J., EBELER, E. Wine flavor: chemistry in a glass. **Chem. Soc. Rev.**, v.37, p. 2478-2489, 2008. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2008/cs/b714455p>>. Acesso em: 14/09/2011.

POLETTI, C.M. **Capacidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em inibir a ação de *Brettanomyces custersianus* durante o processo de elaboração de vinho**. Porto Alegre, 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

POLI, J.S. **Condições para detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***. Porto Alegre, 2009. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A. **Vitivinicultura Brasileira - Panorama Setorial em 2010**. Brasília: SEBRAE, Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho, 2011. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/autor-u.html>>. Acesso em: 01/02/2013.

RADLER, F.; SCHMITT, M.J.; MEYER, B. *Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum**. **Archives of Microbiology**, v. 154, p. 175-178, 1990.

RATÓN, T.O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interes biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 15-19, 2004.

REDZEPOVIC, S. *et al.* Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 305-310, 2002.

REISCH, B.I. *et al.* **Wine and juice grape varieties for cool climates**. New York: Cornell Cooperative Extension Publication, 1993.

RIBAS, J.C.; WICKNER, R.B. The gag domain of the gag-pol fusion protein directs incorporation into the L-A double stranded RNA viral particles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 15, p. 9306-9311, 1998.

RIBÉREAU-GAYON, J. *et al.* **Traité d'oenologie: sciences et techniques du vin: analyse et contrôle des vins**. 2. ed. Paris: Dunod, v. 1, p. 645, 1982.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* **Traité d'oenologie: chimie du vin, stabilisation et traitements**. Paris: Dunod, 1998.

RIBÉREAU-GAYON, P., Dubourdiou, D., Done`che, B., Lonvaud, A., **Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications**, vol. 1, Wiley, West Sussex, England, 2000.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* **Handbook of Enology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006.

RIFFER, F.; *et al.* Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 148, p. 1317-1328, 2002.

RIZZON, L.A. **Metodologia para análise de vinho**. 1ª ed. Brasília: Embrapa, 2010.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cultivar Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 192-198, 2002.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Merlot para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, p. 156-161, 2003.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Tannat para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 223-229, 2004.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Características analíticas de vinhos Merlot da Serra Gaúcha. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1913-1916, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n6/a231cr1432.pdf> >. Acesso em: 26/01/2013.

RIZZON, L.A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 115-121, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612000000100022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18/7/2011.

RIZZON, L.A.; MIELE, A.; SCOPEL, G. Características analíticas de vinhos Chardonnay da Serra Gaúcha. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2555-2558, 2009.

RIZZON, L.A.; SALVADOR, M.B.G.; MIELI, A. Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 635-641, 2008.

RIZZON, L.A.; ZANUZ, M.C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1994.

RIZZON, L.A.; ZANUS, M.C.; MIELE, A. Efeito da fermentação malolática na composição do vinho. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 497-500, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781997000300022>. Acesso em: 16/01/2013.

RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glucosidase activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 84-95, 2004.

ROS-CHUMILLAS, M. *et al.* Evaluation of rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. **Food Control**, v. 18, n. 1, p. 33-39, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713505001805#>>. Acesso em: 15/01/2013.

ROSIER, J.P. **Manual de elaboração de vinho para pequenas cantinas**. 2 ed. Florianópolis: Epagri, 1995.

RUIZ-BARBA, J.L.; MALDONADO, A.; DÍAZ-JÍMENEZ, R. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. **Analytical Biochemistry**, v. 347, n. 2, p. 333-335, 2005.

SALVADÓ, Z. *et al.* Functional analysis to identify genes in wine yeast adaptation to low-temperature fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 76-88, 2012.

SAMPERMANS, S.; MORTIER, J., SOARES, E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 525-531, 2005.

SANGORRÍN, M.P. *et al.* Killer behavior in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 105-113, 2001.

SANGORRÍN, M.P. *et al.* Diversity and *killer* behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four patagonian wineries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 351-357, 2007.

SANTOS, C.E.I. *et al.* Elemental characterization of Cabernet Sauvignon wines using particle-induced X-ray emission (PIXE). **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 244-250, 2010.

SASIDHARAN, K. *et al.* Rapid DNA, RNA and protein extraction protocols optimized for slow continuously growing yeast cultures. **Yeast**, v. 29, p. 311-322, 2012.

SCHMIDT, S.A. *et al.* Impacts of variations in elemental nutrient concentration of Chardonnay musts on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation kinetics and wine composition. **Applied Microbiology and Cell Physiology**, 2011.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. The viral *killer* system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 257-276, 2002.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. Yeast viral *killer* toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 212-221, 2006.

SCHMITT, M.E.; BROWN, T.A.; TRUMPOWER, B.L. A rapid method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 10, p. 3091-3092, 1990.

SCHMITT, M.J.; TIPPER, D.J. Sequence of de M28 dsRNA: Preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. **Virology**, v. 213, n. 2, p. 341-351, 1995.

SCHNEIDER, L. **Dinâmica Locacional da Vitivinicultura: Novas Regiões do Rio Grande do Sul e Vale do São Francisco**. Piracicaba, 2006. 118 f. (Dissertação – mestrado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

SETTANNI, L. *et al.* Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (Western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, p. 1-9, 2012.

SHARMA, A.K.; SINGH, P.N.; SAWANT, S.D. Evaluation of fermentation efficiency of yeast strains and their effect on quality of young wines. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 495-499, 2012.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, v. 194, 1991.

SHI, H. *et al.* Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 81-86, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512001193>> Acesso em: 16/01/2012.

SILVA, G.A. Evaluation of butanoic, pentanoic, and hexanoic acids as internal standards for analysis of acidic fermentation end-products from *Bacillus stearothermophilus* by gas-liquid chromatography. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 626-631, 1995.

SILVA, G.A. The occurrence of *killer*, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Itálico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 112-121, 1996.

SILVA, G.A. **Eletroforese em gel de agarose 1% de extração de dsRNA com leveduras 26B e 1B**. 1998. 1 fotografia p&b, 13x13 cm.

SILVA, G.A. Comportamento de leveduras isoladas no vale dos vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade *killer*. IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1999a, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa, 1999a. p. 170.

SILVA, G.A. Evidência de uma linhagem de levedura com característica *killer*, neutra e sensível. IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1999b, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa, 1999b. p. 169a.

SILVA, G.A. Elaboração de vinho: Aspectos Microbiológicos. In: GUERRA, C.C. *et al.* **Uva para processamento pós colheita**. Brasília: Embrapa, p. 36-48, 2003.

SILVA, G.A. Cultivo da videira protegido com cobertura plástica e sua relação com a fermentação do mosto. **VI SINAIFERM e XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2007a.

SILVA, G.A.; Fungicidas empregados na viticultura e sua ação sobre atividade de leveduras autóctones e selecionada. VI SINAIFERM 2007 XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, **Resumos do VI SINAIFERM 2007 XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, Curitiba, 2007b.

SILVA, G.A., *et al.*; Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação da cv. Cabernet Sauvignon. XII CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2008a, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2008a. p.160.

SILVA, G.A., *et al.*; Composição do meio e sua relação com a expressão *killer*. XII CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2008b, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2008b. p. 158.

SILVA G. A., *et al.* Captan and folpan inhibition of PCR amplification of a 375 BP DNA fragment specific for the 18S region of *Saccharomyces cerevisiae*. In: ICCC-12 CONFERENCE 2010, 2010, Florianópolis. **ICCC-12 Conference 2010**, 2010.

SILVA, G.A., *et al.* Influence of *Brettanomyces custersianus* upon the activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the tumultuous phase of vinification. **Archives of Biology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 347-356, 2011a.

SILVA, G.A. *et al.* Production of functional *killer* protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 54, p. 601-612, 2011b.

SILVA, G. A. *et al.* Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 55, n. 2, 2012.

SILVA. G.A.; ALMEIDA, E. A. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 411-419, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132006000400009>. Acesso em: 21/01/2013.

SILVA, G.A.; DALARMI, L. **Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra 2003**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2003. X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, p. 214, Dez. 2003. Resumo.

SILVA, G. A.; EMBRAPA. **Composição para o controle biológico de fitopatógenos, processo de sua obtenção e seus usos**, 2002.

SILVA, G.A.; MURATORE, L. Influência da fermentação maloláctica espontânea sobre a evolução da acidez volátil em vinhos Cabernet Sauvignon. XIV SINAFERM, **Resumos do XIV SINAFERM**, Florianópolis, 2003. P. 1-7.

SILVA, G.A.; SILVA, M.A.A.A. Determinação Qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio. **Tecnologias geradas pelo sistema EMBRAPA**, Bento Gonçalves, UEPAE de Bento Gonçalves, 1984.

SILVA, G. A.; SILVA, M.A.A.A.; Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho. **Circular Técnica - Embrapa**, n. 14, 1987.

SIMS, C.A.; MORRIS, J.R. Color and color stability of red wine from Noble (*Vitis rotundifolia* Michx) and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) at various pH. **Proceedings Arkansas State of Horticultural Society**, v. 105, p. 90-96, 1984.

SHINOHARA, T.; MAMIYA, S.; YANAGIDA, F. Introduction of flocculation property into wine yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) by hybridization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 1, p. 96-101, 1997.

SOARES, E.V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 1-18, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x/pdf>>. Acesso em: 16/10/2012.

SOARES, G.A.M.; SATO, H.H. *Killer* toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischmann and Itaipuara commercial brands of yeast. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 253-257, 1999.

SOARES, G.A.M; SATO, H.H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L *killer* toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 291-297, 2000.

STARMER, W.T.; GANTER, P.F.; ABERDEEN, V. Geographic distribution and genetics of *killer* phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3., 1992.

STRATFORD, M. Genetic aspects of yeast flocculation : in particular, the role of *FLO* genes in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 2, p.151-158, 1994.

STRATFORD, M.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: Quantification. **Yeast**, v. 4, p.107-115, 1988.

SUGITA, T. *et al.* Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1826-1830, 2002.

TAILLANDIER, P. *et al.* Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. **Food Microbiology**, v. 24, p. 95-100, 2007.

TAYLOR, V.F. *et al.* Multielement analysis of canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and multivariate statistics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 856-860, 2003. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf025761v>>. Acesso em: 31/01/2013.

TEIXEIRA, A.H.C. *et al.* Aptidão agroclimática da cultura da videira no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 1, p. 107-111, 2002.

THIS, P., *et al.* "Historical origins and genetic diversity of wine grapes." **Trends in Genetics**, v. n. 9, p. 511-519, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCY-4KGX815-1/2/1dcf00f5f1d074c85851f13b00c1db7e>>. Acesso em: 31/04/2011.

THOMAS, D.; SURDIN-KERJAN, Y. Metabolism of sulfur aminoacids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 503-532, 1997.

TODESCHINI, A.P. *et al.* **Ação dos princípios ativos Tebuconazol e Tetraconazol sobre a atividade metabólica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97.** Bento Gonçalves: Embrapa, 2010. **8 Encontro de Iniciação Científica**, Bento Gonçalves, p.26, Nov. 2010. Resumo.

TOH-E, A., GUERRY, P.; WICKNER, R.B. Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 136, n. 3, p. 1002-1007, 1978.

TÔRRES, A.R. **Determinação da Acidez Total de Vinhos Tintos Empregando Titulações Baseadas em Imagens Digitais.** João Pessoa, 2010. 54 f. (Dissertação – Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology – An introduction.** 10 ed. São Francisco: Pearson, 2010.

TREDOUX, H.G.; TRACEY, R.P.; TROMP, A. *Killer* factor in wine yeasts and its effect on fermentation. **South Africa Journal of Enology and Viticulture**, v. 7, p. 105-112, 1986.

TRONCHONI, J. *et al.* Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 237-243, 2009.

TZANETAKIS, I.E.; MARTIN, R.R. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 167-170, 2008.

UGLIANO, M.; KOLOUCHOVA, R.; HENSHKE, P.A. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 423-429, 2011.

ULLIVARRI, M.F. Killer phenotype of indigenous yeasts isolated from Argentinian wine cellars and their potential starter cultures for winemaking. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 2177-2183, 2011.

UVIBRA. **Produção de uva, elaboração de vinhos e derivados.** Disponível em:<www.uvibra.com.br>. Acesso em: 3/5/2011.

UVIBRA. **Produção de uva, elaboração de vinhos e derivados.** Disponível em:<www.uvibra.com.br>. Acesso em: 4/2/2013.

VADKERTIOVÁ, R.; SLÁVIKOVÁ, E. *Killer* activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 39-43, 2007.

VAN MULDER, S.E. *et al.* Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.88, n.6, p. 1321-1331, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20809075>>. Acesso em: 16/11/2012.

VARIAN, **Analytical Methods.** Mulgrave Victoria: Varian Australia Ply Ltd., 1989.

VERO, L.D.; SOLIERI, L.; GIUDICI, P. Evolution-based strategy to generate non-genetically modified organisms *Saccharomyces cerevisiae* strains impaired in sulfate assimilation pathway. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, n.5, p.572-575, 2011.

VERSAVAUD, A. *et al.* Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3521-3529, 1995.

VICKERS, T.A.; ECKER, D.J. Enhancement of ribosomal frameshifting by oligonucleotides targeted to the HIV gag-pol region. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 15, p. 3945-3953, 1992.

VOUILLAMOZ, J.F.; GRANDO, M.S. Genealogy of wine grape cultivars: 'Pinot' is related to 'Syrah'. **Heredity**, v. 97, p. 102-110, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/hdy/journal/v97/n2/full/6800842a.html#bib7>>. Acesso em: 10/06/2011.

WANG, C.; LIU, Y. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during spontaneous fermentations os Muscat blanc in Jingyang, China. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 172-177, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002067>>. Acesso em: 14/01/2013.

WEINGERL, V.; KERIN, D. Distribution of zinc in vineyard areas treated with zinc containing phytopharmaceuticals. **Acta Chimica Slovenica**, v. 47, p. 453-467, 2000. Disponível em: <aacta.chem-soc.si/47/47-4-453.pdf>. Acesso em: 01/02/2013.

WESTHUIZEN, T. J.V.; AUGUSTYN, O.P.H.; PRETORIUS, I.S. Geographic distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.21, p. 3-9, 2000.

WHITE, C. **Flocculation Basics.** Disponível em: < www.whitelabs.com/beer/Flocculation_help.pdf>. Acesso em: 21/05/2012.

WHITE, T.J. **PCR Protocols – A guide to methods and applications.** London: Academic Press Limited, 1990.

WICKNER, R.B. “*Killer* character” of *Saccharomyces cerevisiae*: curing by growth at elevated temperature. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 3, p. 1356-1357, 1974.

WICKNER, R.B. Yeast virology. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 11, p. 2257-2265, 1989.

WICKNER, R.B. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 347-375, 1992.

WICKNER, R.B. Host control yeast dsRNA virus propagation and expression. **Trends in Microbiology**, v. 1, n. 8, p. 294-299, 1993.

WICKNER, R.B.; LEIBOWITZ, M.J. Two chromosomal genes required for killing expression in *killer* strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 82, p. 429-442, 1976. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/82/3/429.full.pdf+html>>. Acesso em: 28/11/2012.

WINGFIELD, B.D. *et al.* A K2 neutral *Saccharomyces cerevisiae* strain contains a variant K2 M genome. **Yeast**, v. 6, n. 2, p.159-169, 1990.

WLOCH-SALOMON, D. *et al.* Effect of dispersal and nutrient availability on the competitive ability of toxin-producing yeast. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1634, 2008.

WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the *killer* factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of general microbiology**, v.51, n.1, p.115-126, 1968.

XU, L. *et al.* Altered nucleic acid partitioning during phenol extraction or silica adsorption by guanidinium and potassium salts. **Analytical Biochemistry**, v. 419, n. 2, p. 309-316, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269711005793>>. Acesso em: 08/01/2013.

YAFFE, H. *et al.* LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. **Research Notes**, v. 5, p. 1-8, 2012.

YAMAMOTO *et al.* Eletrophoretic karyotypes of wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 4, p. 358-363, 1991.

YANNIOTIS, S. *et al.* Effect of ethanol, dry extract and glycerol on the viscosity of wine. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 399-403, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877406006959>>. Acesso em: 16/09/2011

YAP, N.A. *et al.* The incidence of *killer* activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 381-389, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2000.01124.x/pdf>>. Acesso em: 26/01/2013.

YILMAZ, R. *et al.* Optimization of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) RNA isolation method for real-time quantitative PCR and microarray analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 1046-1053, 2012.

YOUNG, T.W.; YAGIU, M. A comparison of the *killer* character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 44, n. 1, p. 59-77, 1978.

ZAGORC, T. *et al.* Indigenous wine *killer* yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology**, v. 18, p. 441-451, 2001.

ZARDO, K. **Vitivinicultura de precisão aplicada à produção e qualidade de uva Pinot Noir no Rio Grande do Sul**. Santa Maria, 2009. 96 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Santa Maria.

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 849-856, 2009.

ZINNAI, A. *et al.* Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 43-49, 2013.

ZIRKLER, D.; LANG, F.; KAUPENJOHANN, M. "Lost in filtration" – The separation of soil colloids from larger particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 399, p. 35-40, 2012.

ZOHRE, D.E.; ERTEN, E. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeast on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 319-324, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202000869>>. Acesso em: 15/01/2013.

ZORZAN, C.; ZANUS, M.C. Análise sensorial de vinhos Ancelotta e Tannat, Bento Gonçalves: Embrapa, 2006. **4° Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves, p.35, Out. 2006. Resumo.