

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

GIOVANA DE ARRUDA MOURA PIETROWSKI

ISOLAMENTO, SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE
LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS COM POTENCIAL PARA A
PRODUÇÃO DE AROMAS EM FERMENTADO DE MAÇÃ

CURITIBA

2011

GIOVANA DE ARRUDA MOURA PIETROWSKI

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE
LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS COM POTENCIAL PARA A
PRODUÇÃO DE AROMAS EM FERMENTADO DE MAÇÃ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, como requisito à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

CURITIBA

2011

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário Elson Heraldo Ribeiro Junior (CRB-9/1413)

P626 Pietrowski, Giovana de Arruda Moura

Isolamento, seleção, identificação e aplicação de leveduras não-convencionais com potencial para a produção de aromas em fermentado de maçã / Giovana de Arruda Moura Pietrowski. – Curitiba, 2011.

198 f. : il. ; 30 cm.

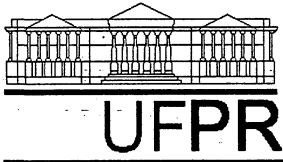
Orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

1. Não-*Saccharomyces*. 2. Compostos voláteis. 3. Fermentado de maçã. I. Wosiacki, Gilvan. II. Nogueira, Alessandro. III. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. IV. Título.

CDD 660.6



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos
Biotecnológicos

Aos seis dias do mês de dezembro de 2011, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Septuagésima Segunda Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Jorge Luiz Ninow (UFSC), Juliana Vitória Messias Bittencourt (UTFPR), Alessandro Nogueira (UEPG), Adriane Bianchi Pedroni Medeiros (UFPR), Michele Rigon Spier (UFPR) e Gilvan Wosiacki (UEPG - orientador da tese).

Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Giovana de Arruda Moura Pietrowski** a fazer a apresentação da Tese intitulada: **“Isolamento Seleção, Identificação e Aplicação de Leveduras Não-convencionais com Potencial para a Produção de Aromas em Fermentado de Maçã”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a argüição, a banca composta pelos professores Dr Jorge Luiz Ninow, Drª Juliana Vitória Messias Bittencourt, Dr Alessandro Nogueira, Drª Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, Drª Michele Rigon Spier e Dr Gilvan Wosiacki declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 06 de Dezembro de 2011

Prof Dr Jorge Luiz Ninow

Prof Dr Alessandro Nogueira

Profª Drª Juliana Vitória M Bittencourt

Profª Drª Adriane Bianchi P Medeiros

Profª Drª Michele Rigon Spier

Prof Dr Gilvan Wosiacki

Dedico este trabalho ao meu esposo Isaac, pelo
apoio irrestrito, paciência, abnegação,
companheirismo e, sobretudo, amor.
Aos meus filhos Renan e Vítor, os melhores
presentes da minha vida.

Amo vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua infinita presença em minha vida, pelas oportunidades que me foram dadas, por me amparar e mostrar o caminho nos momentos difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná; à Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Ponta Grossa; à Universidade Estadual de Ponta Grossa - Grupo de Trabalho sobre Maçã, por disponibilizarem recursos físicos, humanos e financeiros para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Gilvan Wosiacki, meu orientador, exemplo de pesquisador e rigor científico, pela contribuição com seus conhecimentos e pela confiança e oportunidade de participar do Grupo de Trabalho sobre Maçã;

Ao Prof. Dr. Alessandro Nogueira, meu co-orientador, pela acolhida e confiança, pelas idéias e sugestões, conhecimentos transmitidos, paciência, atenção, estímulo e constante apoio, o meu reconhecimento;

À minha grande amiga Prof^a Dra. Denise Milleo Almeida, exemplo de dinamismo, força e determinação, pelas sugestões, ensinamentos e apoio, mas acima de tudo, pelo carinho, companheirismo e preciosa amizade;

À Caroline Mongruel Eleutério dos Santos, pela parceria perfeita que conseguimos desenvolver neste trabalho, pelo companheirismo e amizade;

À Prof^a. Dra. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, pela atenção, ensinamentos valiosos e oportunidade de realizar em seu laboratório as primeiras análises cromatográficas;

Ao Prof. Dr. Carlos Rosa da UFMG, pela acolhida e oportunidade de conhecer um pouco do trabalho em seu laboratório;

A Prof^a. Dra. Elenise Sauer, pelo apoio e auxílio nas análises cromatográficas, correções e sugestões, sempre com uma imensa competência e tranquilidade;

À Prof^a. Dra. Juliana Vitória Bittencourt, pelas sugestões valiosas, pela disponibilidade e contribuições em biologia molecular;

As minhas queridas alunas de iniciação científica Tatiane Gomes, Gabriela Sartori e Mayara Grochoski, pela agradável convivência, pela contribuição, empenho e seriedade dedicados a este trabalho;

À Marly Aparecida Ranthum, pela amizade e apoio em assumir minhas aulas para minha dedicação ao doutorado;

À Adriana Guimarães, Adriane Penteado, Eliana Bortolozo, Eliane Pietrovski, Marcela Fonseca, Maria Carolina Oliveira, Maria Helene Canteri, Simone Bowles, Virgínia Baroncini, pela amizade, apoio e palavras de incentivo.

Às estagiárias do Laboratório de Microbiologia da UTFPR, Pamela Freitas, Rafaela Gorski e Franciele Casanova Monteiro, pelo empenho e disposição em cumprir o que foi solicitado;

Aos alunos de iniciação científica no Laboratório da UEPG: Aline Alberti, Cintia Maia Braga, Henrique Jaster, Frederico Souza e Renan da Luz, pelo apoio, acolhida e valiosa ajuda prestada.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub, por ter cedido o Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Fruticultura (UEPG), para a realização das extrações de DNA;

À Amanda Milléo Almeida, por sempre eficiente e prontamente auxiliar no que foi solicitado;

À Elisângela Serenato, pela amizade, carinho e grandes contribuições com a microextração em fase sólida;

À Prof^ª. Dra. Rosilene Prestes pelos ensinamentos sobre métodos cromatográficos que abriram caminho para a realização das análises, e pelo apoio no laboratório;

À Dra. Marli da Silva Santos, pelo apoio e companheirismo em momentos difíceis no Laboratório de Métodos Instrumentais;

Ao meu querido pai Amaury “*in memoriam*”, por ter me ensinado valores e princípios de integridade, caráter e dignidade que levo sempre comigo;

À minha mãe Lígia, exemplo de força e determinação, que me incentivou e apoiou desde o início da minha caminhada, pelas orações e por todos os estudos com seus netos;

Às minhas irmãs Rita, Rosana e Rosário, meu porto seguro, socorro aos meninos nas minhas ausências, muro de lamentações, pelo carinho e amor que sempre me dedicaram;

A todos os meus familiares, pelo apoio, carinho e alegria que sentem em todas as minhas conquistas;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito Obrigada!!!!

RESUMO

O fermentado de maçã consiste em um dos principais sub-produtos da agroindústria da maçã. Entretanto, no Brasil este produto além de recente, apresenta baixa qualidade aromática. A microbiota natural das maçãs apresenta uma população de leveduras variando de $10^1 - 10^5$ ufc.cm⁻² ou g, entre espécies *Saccharomyces* sp. e não-*Saccharomyces*. As leveduras não convencionais são reconhecidas na literatura como produtoras de compostos voláteis frutados capazes de melhorar o perfil sensorial de bebidas fermentadas. O presente trabalho teve como objetivo isolar cepas de leveduras não-*Saccharomyces* a partir do mosto de maçãs, selecionar, conservar e identificar as eminentes produtoras de aromas frutados para avaliá-las na elaboração do fermentado de maçã, em culturas puras, mistas e sequenciais, com relação à cinética de crescimento, atributos físico-químicos e perfil aromático dos fermentados obtidos. O isolamento foi realizado em meio seletivo a partir do mosto bruto de maçãs das cultivares Gala e Fuji. Foram selecionadas cepas não-convencionais por meio de teste sensorial de produção de aromas frutados ou florais. Na identificação das leveduras foram consideradas preliminarmente suas características morfológicas, fisiológicas e posteriormente por metodologia molecular foi realizado o sequenciamento das regiões D1/D2 da subunidade maior do rRNA. Testes de preservação dos isolados ocorreram por liofilização e a -80°C, com armazenamento por 12 meses, à temperatura ambiente e em ultra-freezer, respectivamente. Para as fermentações foi utilizado mosto de maçã da cv. Gala e monitorado o crescimento das leveduras, parâmetros físico-químicos, cinéticos e perfil aromático ao longo de 10 dias de fermentação. As técnicas de *headspace* estático e microextração em fase sólida (SPME) foram utilizadas para a captura dos compostos voláteis dos fermentados, analisados em CG. Os resultados da identificação revelaram a presença de dez espécies, sendo *Candida oleophila*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*, das quais, cinco foram pela primeira vez relatadas em mostos de maçãs. Na fermentação pura foi confirmado que as cepas do gênero *Hanseniaspora* contribuem positivamente com o perfil aromático de fermentados de maçã. Em fermentação mista e sequencial, os resultados evidenciaram uma boa interação entre as leveduras fermentativas e oxidativas. A análise cromatográfica dos compostos voláteis permitiu identificar etanoato de etila, butanoato de etila acetato de isopentila, etanoato de hexila, 2-hidróxi propanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, 1,4-butanoato de etila, dodecanoato de etila, etanal, ácido butanóico e octanóico, etanol, 3-metil-1-butanol, 2-hexanol, 1-hexanol, 2-fenil etanol e 2-heptanona, nos fermentados elaborados por fermentação mista e sequencial. Foi verificado que tanto a liofilização quanto a conservação a -80°C garantiram a viabilidade das leveduras durante o tempo estudado. Desta forma, considerando a presença do grupo dos ésteres e, principalmente, dos álcoois superiores, responsáveis por aromas frutados e florais, os ensaios de culturas mistas e sequenciais revelaram a possibilidade de contribuir para a qualidade aromática do fermentado de maçã.

Palavras-chave: Não-*Saccharomyces*. Compostos voláteis. Fermentado de maçã.

ABSTRACT

The fermented apple is one of the main by-products of the apple industry. However, in Brazil, this product is recent and has low aromatic quality. The natural apples microbiota has a yeast population oscillating between $10 - 10^5$ ufc.cm⁻² or g, between species *Saccharomyces* sp. and non-*Saccharomyces*. The non-conventional yeasts are recognized in the literature as fruity volatiles compounds producers able of improve with the sensory profile of fermented beverages. This work aims to isolate non-*Saccharomyces* yeast strains from the apple must, select, preserve and identify the main fruity flavors producers to evaluate them in the preparation of apple wine, in pure, mixed and sequential cultures, with respect to growth kinetics, physical-chemical attributes and aromatic profile of the fermented obtained. The isolation occurred in the selective medium from the raw apple must of Gala and Fuji cultivars. Non-conventional strains were selected by sensory testing for the fruity or floral aroma production. In the yeasts identification, were preliminarily considered their morphological and physiological characteristics and, then, by molecular methodology it was made the sequencing of D1/D2 regions of the large subunit of rRNA. Conservation tests of the isolates occurred by freeze drying and frozen at -80°C, with storage for 12 months at room temperature and ultra-freezer, respectively. For the fermentations were used apple must of Gala cultivar and it was monitored the yeast growing, physical-chemical parameters, kinetics and the aroma profile along 10 days of fermentation. The static headspace and solid phase microextraction (SPME) technique were used for the volatile compounds capture of the fermented, and it was analyzed by gas chromatography. The identification results revealed the presence of ten species, being *Candida oleophila*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* and *Rhodotorula mucilaginosa*, of which, five were reported for the first time in apples musts. In the pure fermentation it was confirmed that the strains of the genus *Hanseniaspora* contribute positively to the aromatic profile of apple wine. In the mixed and sequential fermentation the results showed a good interaction between the fermentative and oxidative yeasts. The chromatographic analysis of volatile compounds identified ethanoate, ethyl butanoate, ethyl acetate isopenthyl, hexylethanoate, 2-hydroxy ethyl propanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl 1,4-butanoate, ethyl dodecanoate, butanoic and octanoic acid, ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-hexanol, 1-hexanol, 2-phenyl ethanol and 2-heptanone in the fermented made by mixed and sequential fermentation. It was notice that both freeze drying and conservation at -80°C ensured the yeasts viability during the period studied. Thus, considering the presence of the esters group and, especially, the superior alcohols, responsible by fruity and floral aromas, the mixed and sequential cultures testing revealed the possibility to contribute to the aromatic quality of apple wine.

Keywords: Non-*Saccharomyces*. Volatiles compounds. Apple fermented.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

- Figura 1 - Esquema demonstrativo do processamento da sidra brasileira..... 24
- Figura 2 - Rotas básicas pelas quais as leveduras formam os principais compostos de *flavour* durante a fermentação..... 49

Capítulo III

- Figura 1 - Aspectos macroscópicos das colônias de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas..... 76

Capítulo IV

- Figura 1 - Esquema dos fermentadores em anaerobiose..... 99
- Figura 2 - Evolução de açúcares e etanol nos fermentados de maçã realizados sob a ação de diferentes leveduras oxidativas. (A) Evolução dos açúcares redutores totais. (B) Evolução de etanol..... 105
- Figura 3 - Resultados de contagem de colônias de duas leveduras oxidativas diferentes em mosto de maçã..... 106
- Figura 4 - Resultados de perda de massa por liberação de CO₂ nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes concentrações de SO₂ no mosto. (A) Resultados para a cepa *H. uvarum*. (B) Resultados para a cepa *H. guilliermondii*..... 112
- Figura 5 - Resultados de perda de massa por liberação de CO₂ nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes temperaturas durante o processo fermentativo. (A) Resultados para a cepa *H. uvarum*. (B) Resultados para a cepa *H. guilliermondii*..... 113
- Figura 6 - Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da levedura *H. guilliermondii*..... 114

Capítulo V

- Figura 1 - Esquema dos fermentadores em anaerobiose..... 128

Capítulo VI

Figura 1 -	Esquema dos fermentadores em anaerobiose.....	151
Figura 2 -	Contagem de colônias nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. uvarum</i> . A) Contagem de colônias de <i>H. uvarum</i> . B) Contagem de colônias de <i>S. cerevisiae</i>	157
Figura 3 -	Contagem de colônias nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. guilliermondii</i> . A) Contagem de colônias de <i>H. guilliermondii</i> . B) Contagem de colônias de <i>S. cerevisiae</i>	158
Figura 4 -	Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. uvarum</i> . A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.....	159
Figura 5 -	Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. guilliermondii</i> . A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.....	160
Figura 6 -	Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação sequencial de <i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 3º dia.....	173
Figura 7 -	Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação sequencial de <i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 0d.....	175

Capítulo VII

Figura 1 -	População de <i>H. uvarum</i> expressa em ufc.mL ⁻¹ (média de três replicatas C.V. < 5%).....	187
------------	--	-----

LISTA DE QUADROS

Capítulo II

- Quadro 1 - Principais compostos voláteis encontrados na maçã, suco e sidra..... 46
- Quadro 2 - Compostos voláteis majoritários do fermentado de maçã e sidra..... 50

Capítulo III

- Quadro 1 - Caracterização das cepas de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas e selecionadas de mostos de maçãs..... 78
- Quadro 2 - Características morfológicas das cinco cepas de leveduras selecionadas... 79

Capítulo VII

- Quadro 1 - Resultados das características macro e microscópicas da cepa de *H. uvarum* preservada sob dois métodos diferentes..... 190

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1 -	Classes de compostos de aromas e seus limites de percepção de odor.....	44
Tabela 2 -	Número de compostos aromáticos identificados em bebidas alcoólicas....	48

Capítulo III

Tabela 1 -	Crescimento das leveduras não- <i>Saccharomyces</i> a 30°C e 37°C e capacidade de fermentação da glicose.....	80
Tabela 2 -	Testes bioquímicos das cepas de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> isoladas e selecionadas de mostos de maçãs.....	81
Tabela 3 -	Identificação e diversidade de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> isoladas de mosto de maçãs.....	83

Capítulo IV

Tabela 1 -	Resultados das análises físico-químicas do mosto e dos diferentes fermentados de maçã da cultivar Gala após 10 dias de fermentação.....	104
Tabela 2 -	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzidos sob ação de duas diferentes cepas oxidativas.....	106
Tabela 3 -	Compostos voláteis capturados por <i>headspace</i> estático do mosto e fermentados de maçã elaborados com cepas de <i>Hanseniaspora uvarum</i> e <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	107
Tabela 4 -	Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados com diferentes cepas oxidativas.....	114

Capítulo V

Tabela 1 -	Composição da solução estoque de referência para análise dos compostos voláteis de fermentado de maçã.....	130
Tabela 2 -	Concentração de compostos voláteis do <i>headspace</i> e extraídos por SPME, de fermentados de maçã elaborados com cepas de <i>Hanseniaspora uvarum</i> e <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	131
Tabela 3 -	Concentração de compostos voláteis não identificados do <i>headspace</i> e extraídos por SPME, de fermentados de maçã elaborados com <i>Hanseniaspora uvarum</i> e <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	137

Capítulo VI

Tabela 1 -	Resultados das análises físico-químicas do mosto de maçã da cultivar gala.....	156
Tabela 2 -	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	160
Tabela 3 -	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inoculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	161
Tabela 4 -	Resultados das análises físico-químicas (10º dia) dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	161
Tabela 5 -	Resultados das análises físico-químicas (10º dia) do fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	162
Tabela 6 -	Compostos voláteis analisados por <i>headspace</i> em mosto de maçã.....	163
Tabela 7 -	Compostos voláteis do <i>headspace</i> de fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	165
Tabela 8 -	Compostos voláteis do <i>headspace</i> de fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	169
Tabela 9 -	Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	172
Tabela 10 -	Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	174
Tabela 11 -	Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados pela ação de fermentações sequenciais com diferentes cepas oxidativas e tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	175

Capítulo VII

Tabela 1	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzidos sob ação de <i>H. uvarum</i> preservada sob dois métodos diferentes.....	191
----------	---	-----

LISTA DE SIGLAS

CG	Cromatografia Gasosa
cv	Cultivar
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DVB	Divinilbenzeno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GPYB	Caldo Glucose Peptona e Extrato de Levedura
GYMP	Caldo Glucose Peptona Extrato de Malte e Levedura
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LSP	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
NTS	<i>Non-Spacer transcrita</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDMS	Polidimetilsiloxano
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SPME	Microextração em fase sólida
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
SSRP	<i>Simple Sequence Repeat Polymorphisms</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
ufc	Unidade formadora de colônia
VAO	Valor de Atividade de Odor
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
YA-LYS	Ágar extrato de levedura e lisina
YMA	Ágar extrato de malte e levedura
MSP-PCR	Mini-microsatélite - Reação em cadeia da polimerase
PPB	Parte por bilhão
PPM	Parte por milhão

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA TESE.....	19
CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1 A MAÇÃ.....	21
2 O FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA.....	22
2.1 ASPECTOS DE PRODUTO/QUALIDADE.....	22
2.2 FERMENTAÇÕES.....	25
2.2.1 Fermentação Alcoólica.....	25
2.2.1.1 Fase oxidativa.....	25
2.2.1.2 Fase fermentativa.....	28
2.3 FERMENTAÇÃO MISTA E SEQUENCIAL.....	28
3 LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS.....	31
3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS.....	31
3.2 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	32
3.2.1 Isolamento do DNA Genômico.....	34
3.2.2 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	35
3.2.3 Sequenciamento do DNA.....	38
3.3 CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS.....	40
4 AROMA.....	41
4.1 PERFIL DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS.....	43
4.2 AROMAS PRIMÁRIOS DA MAÇÃ.....	44
4.3 AROMAS SECUNDÁRIOS EM FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA...	47
4.4 MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS.....	50
REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO III - ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS COM APTIDÃO PARA A PRODUÇÃO DE AROMAS EM FERMENTADOS DE MAÇÃS.....	70
RESUMO.....	70

	ABSTRACT.....	70
1	INTRODUÇÃO.....	71
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
2.1	MATERIAIS.....	73
2.2	MÉTODOS.....	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	86

CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* NA ELABORAÇÃO DE FERMENTADO DE MAÇÃ..... 95

	RESUMO	95
	ABSTRACT.....	95
1	INTRODUÇÃO.....	96
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
2.1	MATERIAIS	97
2.2	MÉTODOS.....	98
2.2.1	Processos.....	98
2.2.2	Experimentos.....	100
2.2.3	Análises Instrumentais.....	101
2.2.4	Análises Físico-Químicas.....	102
2.2.5	Análises Microbiológicas.....	102
2.2.6	Análise Sensorial.....	103
2.2.7	Análises Estatísticas.....	103
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
4	CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS.....	115

CAPÍTULO V - A AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE *HEADSPACE* E *SPME* NO PERFIL AROMÁTICO DE FERMENTADOS DE MAÇÃ ELABORADOS COM LEVEDURAS *Hanseniaspora* sp. 122

	RESUMO	122
	ABSTRACT	122
1	INTRODUÇÃO.....	123
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	126
2.1	MATERIAIS.....	126
2.2	PROCESSOS.....	127
2.2.1	Análises Instrumentais.....	128

3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	131
3.1	PERFIL AROMÁTICO DOS FERMENTADOS DE MAÇÃ.....	131
3.2	COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE <i>HEADSPACE</i> E SPME....	134
4	CONCLUSÕES.....	140
	REFERÊNCIAS.....	140

CAPÍTULO VI - AVALIAÇÃO DE *H. guilliermondii* E *H. uvarum* NA ELABORAÇÃO DE FERMENTADOS DE MAÇÃS POR FERMENTAÇÕES MISTAS E SEQUENCIAIS..... **147**

	RESUMO.....	147
	ABSTRACT.....	147
1	INTRODUÇÃO.....	148
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	149
2.1	MATERIAIS	149
2.2	MÉTODOS.....	150
2.2.1	Processos.....	150
2.2.2	Experimentos.....	152
2.2.3	Análises Instrumentais.....	153
2.2.4	Análises Físico-Químicas.....	154
2.2.5	Análises Microbiológicas.....	154
2.2.6	Análise Sensorial.....	155
2.2.7	Análises Estatísticas.....	155
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	155
4	CONCLUSÕES.....	176
	REFERÊNCIAS.....	176

CAPÍTULO VII - AVALIAÇÃO DA CONSERVAÇÃO POR LIOFILIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO NA VIABILIDADE DA LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum*..... **181**

	RESUMO.....	181
	ABSTRACT.....	181
1	INTRODUÇÃO.....	182
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	184
2.1	MATERIAIS.....	184
2.2	MÉTODOS.....	184
2.2.1	Conservação de <i>H. uvarum</i> por Liofilização.....	184
2.2.2	Conservação de <i>H. uvarum</i> a -80°C.....	185
2.2.3	Recuperação de <i>H. uvarum</i> Preservada por Liofilização e a -80°C.....	185

2.2.4	Avaliação da Viabilidade das Cepas.....	186
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	187
4	CONCLUSÕES.....	191
	REFERÊNCIAS.....	192
	CAPÍTULO VIII - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	196

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura no Brasil tem se destacado como um dos mais dinâmicos setores do agronegócio, crescendo a cada ano e consolidando-se como um dos grandes vetores de desenvolvimento do país. Dentre as espécies de clima temperado, a maçã passou a ser um negócio altamente competitivo, pois num espaço de pouco mais de 30 anos, o Brasil passou de importador para exportador, principalmente porque produz as cultivares Gala e Fuji, maçãs de alta aceitação no mercado internacional.

Para o consumo *in natura*, o setor agroindustrial da maçã realiza uma rigorosa seleção que acaba desqualificando cerca de 30% da produção. Estas maçãs desclassificadas, denominadas industriais, apresentam defeitos fisiológicos e morfológicos, de tamanho e forma inadequados, com marcas e cicatrizes, mas que conservam suas propriedades intrínsecas. São disponibilizadas ao setor industrial da maçã para a produção de sucos e fermentados alcoólicos de maçãs, que consistem em matéria-prima na elaboração de sidras, filtrados doces, vinagres e destilados.

Portanto, para elaboração de fermentados de maçãs no Brasil são utilizadas maçãs descartadas no processo de classificação para consumo *in natura*, de diferentes cultivares, com diversos defeitos, incluindo os fitossanitários, que acabam determinando a quantidade de SO₂ a ser adicionada no mosto de fermentação. Todos estes fatores colaboram para a obtenção de produtos sem padronização e com características sensoriais pouco atrativas, de baixa aceitação pelos consumidores que estão cada vez mais exigentes com a qualidade dos produtos.

A qualidade de um produto resulta da avaliação sensorial que determina ao consumidor a possibilidade de aceitá-lo ou não. A primeira observação que o consumidor faz em um produto refere-se a sua aparência, seguida das percepções de aroma e sabor, que serão obtidas ao degustar o alimento. Assim, o aroma é uma das características que contribui para aceitação dos alimentos e bebidas pelos consumidores.

Leguerinel *et al* (1987 *apud* WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010) comentam que sidras de qualidade superior apresentam gosto doce e aromas frutados e perfumados, enquanto produtos com aromas picantes e sufocantes e com sabores ácidos, adstringentes, não são bem aceitos.

O aroma dos alimentos depende da presença de compostos voláteis capazes de estimular os receptores olfativos. Sua composição em um alimento é muito complexa, pois

consiste em um grande número e variedade de substâncias orgânicas, presentes em concentrações muito pequenas, da ordem de ppm e até ppb. Variam grandemente quanto à sua natureza química e também ao limiar mínimo de percepção.

Em bebidas alcoólicas parte desses compostos aromáticos tem origem no próprio fruto, outros são formados durante o processo fermentativo e existem aqueles que são provenientes de reações químicas ocorridas durante o envelhecimento (GARRUTI, 2001).

O aroma tem um papel significativo na qualidade do fermentado de maçã e da sidra (MANGAS *et al*, 1996). A fermentação alcoólica do mosto de maçã feita somente com leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. proporciona resultados sensoriais como aroma neutro e/ou pouco típico. Porém, com a presença da cepa *Hanseniaspora* sp. aparecem notas sensoriais como “frutada”, ou seja, com aroma de frutas, devido à presença de ésteres, como acetato de etila e fenil-etila (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010).

Os estudos de biodiversidade e dinâmica populacional dos ecossistemas fermentativos, bem como a identificação de leveduras selecionadas por interesses diversos, como produção de enzimas, funções probióticas, produção de aromas, podem revelar cepas com excelente potencial tecnológico.

Estudos têm investigado a influência das espécies de leveduras, incluindo as não-*Saccharomyces*, na formação de compostos aromáticos em processos fermentativos, tanto em meios sintéticos quanto naturais para a produção de diferentes bebidas alcoólicas (ANDORRÀ *et al*, 2010; RODRÍGUEZ *et al*, 2010; VIANA *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2008; CIANI *et al*, 2006; VILANOVA; SIEIRO, 2006; XU *et al*, 2006; XUFRE *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2005; ROJAS *et al*, 2003; ROMANO *et al*, 2003; ZOHRE; ERTEN, 2002). No entanto, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de melhorar a qualidade aromática do fermentado de maçãs.

Considerando as diversas pesquisas que utilizaram leveduras oxidativas ou não-*Saccharomyces* para a produção de aromas frutados, sempre ressaltando o potencial destes microrganismos para esta finalidade, a quantidade de matéria prima disponível ao setor industrial da maçã, a necessidade de produzir um fermentado de maçã com qualidade aromática capaz de despertar o interesse do consumidor pelo produto, justifica-se a necessidade de desenvolver o presente trabalho. Dessa forma, este trabalho buscou isolar do mosto de maçãs leveduras não-convencionais, selecionar e identificar dentre os isolados aquelas capazes de produzir aroma frutal ou floral, para aplicação no processamento de

fermentado de maçã, com vistas a melhorar o perfil aromático da bebida, agregando qualidade e valor ao produto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, selecionar, identificar e testar leveduras oxidativas produtoras de bioaromas do mosto de maçãs para aplicação no processamento de fermentado de maçã.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras não-*Saccharomyces* de mostos de diferentes cultivares de maçãs;
- Selecionar por teste sensorial olfativo cepas de leveduras oxidativas isoladas de mostos de maçãs, como produtoras de aromas frutados;
- Identificar as leveduras isoladas do mosto de maçãs que apresentam potencial para a produção de aromas no processamento do fermentado de maçã;
- Avaliar em fermentado de maçãs Gala o perfil de voláteis formados pelos isolados selecionados;
- Avaliar a interação das leveduras não-*Saccharomyces* selecionadas com inóculo de leveduras fermentativas comerciais nas condições brasileiras de processamento do fermentado de maçã;
- Analisar o efeito de inóculos sequenciais de leveduras não-convencionais (apiculadas) e convencionais (*Saccharomyces* sp.) em condições brasileiras de processamento de fermentado de maçã;
- Avaliar o efeito da conservação por liofilização à temperatura ambiente e por congelamento a -80°C sobre a viabilidade de levedura não-*Saccharomyces*.

3 ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese está estruturada em oito capítulos apresentados na forma de artigos, salvo os capítulos I, II e VIII.

O capítulo I apresenta o setor agroindustrial da maçã no contexto econômico do país de uma maneira geral, o problema da baixa qualidade dos fermentados de maçã, evidenciando os objetivos que nortearam o presente trabalho, bem como a forma como foi estruturado.

No capítulo II, revisão de literatura, faz-se uma abordagem sobre a matéria-prima destinada ao processo de produção do fermentado de maçã, e as principais características deste processo. Considerações sobre isolamento, seleção, identificação e conservação de leveduras. A seguir realiza-se uma abordagem sobre aroma, abrangendo principais compostos aromáticos presentes na maçã e em fermentados, bem como metodologias de isolamento e identificação destes compostos.

O capítulo III trata de descrever a forma utilizada neste trabalho para o isolamento, seleção e identificação de leveduras não-convencionais do mosto de maçãs, e comparar com os resultados obtidos em outros estudos de biodiversidade e dinâmica populacional do ecossistema da maçã.

O capítulo IV traz informações sobre o crescimento das cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* em diversas temperaturas, sensibilidade ao SO₂, parâmetros físico-químicos e cinéticos ao longo de 10 dias de fermentação, além do perfil aromático dos fermentados obtidos.

No capítulo V, o perfil aromático de fermentado de maçã, obtido pela ação de cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, é avaliado a partir do método de microextração em fase sólida e da análise do *headspace* estático.

No capítulo VI foram avaliadas fermentações mistas de *Saccharomyces cerevisiae* com *Hanseniaspora uvarum*, e de *Saccharomyces cerevisiae* com *Hanseniaspora guilliermondii*, utilizando-se de inoculações sequenciais diferenciadas. Foram monitorados o crescimento das cepas, parâmetros físico-químicos e cinéticos, e avaliados os compostos voláteis produzidos ao longo de 10 dias de fermentação.

O capítulo VII apresenta resultados da aplicação de dois métodos de conservação de cepas de *Hanseniaspora uvarum*, liofilização e congelamento a -80°C, verificando a viabilidade destas cepas frente à preservação a longo prazo.

Para finalizar, o capítulo VIII apresenta as considerações finais do trabalho, além de sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA

1 A MAÇÃ

A maçã consiste no fruto de clima temperado mais importante comercializado como fruta fresca tanto no contexto internacional quanto brasileiro, e sua produção firmou-se como uma das atividades mais expressivas do sul do país ao longo dos últimos 30 anos com a implantação dos pomares comerciais (WOSIACKI, 2001; WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000).

Segundo o acervo do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSP) a área plantada de maçãs no Brasil em 2010 e 2011, é respectivamente, de 39.129 e 39.910 hectares. Os dados de previsão de safra de produção em toneladas são de 1.275.852 e 1.382.817, desta maneira o País produz mais de 90% da maçã consumida além de exportar o produto para mais de 50 países. Com este desempenho a cadeia de insumo da maçã gera emprego para mais de 150 mil pessoas (ABPM, 2011; IBGE, 2011).

A maioria dos pomares de maçã no Brasil está localizada nos planaltos e montanhas do sul, com destaque para o Estado do Paraná, Planalto e Centro-Oeste de Santa Catarina e nordeste do Estado do Rio Grande do Sul. Estas regiões estão localizadas a mais de 1.000 metros acima do nível do mar, sofrendo influência do clima subtropical, expondo as maçãs a uma grande quantidade de luz solar e um intervalo de temperatura entre o dia e a noite, o que faz com que as maçãs Fuji e Gala brasileiras, sejam mais coloridas, mais doces e crocantes do que qualquer outra variedade no mundo (ABPM, 2011).

As cultivares *Golden Delicious* e *Red Delicious* têm uma participação dominante na produção mundial da maçã. No entanto, as cultivares Gala e Fuji representam 95% da produção no Brasil, dos quais 40% corresponderam a cultivar Fuji e 55% a Gala na safra 2009/2010 (ABPM, 2011; WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

O abastecimento do mercado interno, face ao nível de exigência do consumidor brasileiro, mobiliza um procedimento agroindustrial de beneficiamento rigoroso que desqualifica cerca de 20 a 30% da produção, para o consumo *in natura*, compreendendo as denominadas maçãs industriais e o descarte propriamente dito. As maçãs conhecidas como “industriais” atualmente são utilizadas no processamento de sucos e de bebidas fermentadas, pois mantém suas propriedades intrínsecas com relação a parâmetros de qualidade como teor

de açúcares, ácidos e compostos fenólicos (ABPM, 2011; WOSIACKI *et al*, 2004; WOSIACKI, 2001; NAGY *et al*, 1993).

Wosiacki e Nogueira (2010) enfatizam que a maçã, quer se destine ao consumo *in natura* ou ao processamento de produtos nobres, deve apresentar a mesma qualidade quanto aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

2 O FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA

2.1 ASPECTOS DE PRODUTO/ QUALIDADE

No Brasil a produção do fermentado de maçã ocorre em grandes empresas especializadas na extração e fermentação alcoólica. Após exaustão completa de açúcares e com presença, ou não, de uma fermentação malolática natural, a bebida passa a ser comercializada para empresas que a utilizam como matéria-prima na elaboração de sidras, filtrados doces, vinagres e destilados (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; WOSIACKI *et al*, 2008). Dentre estes produtos os de maior produção são os fermentados alcoólicos frisantes de maçãs ou sidras.

Sidra consiste em uma bebida com graduação alcoólica de quatro a oito por cento em volume, a 20°C, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã fresca, sã e madura, do suco concentrado de maçã ou de ambos, com ou sem a adição de água. Pode ser adicionada de açúcares, somente para adoçamento, e de outros aditivos. Sendo proibida a denominação sidra-champanha, espumante ou expressão semelhante (BRASIL, 2009).

É produzida em vinte e cinco países europeus e dentre eles os mais importantes são a Inglaterra (maior produtor), a França, a Alemanha, a Espanha, e a Irlanda. Em outros países como Brasil, Bélgica, Áustria, Suíça, Suécia, Finlândia, África do Sul, Austrália, Argentina e Chile a produção é pequena. Os Estados Unidos e o Canadá também produzem sidra, mas incluem nessa denominação um suco de maçãs espumante e não alcoólico (SILVA, 2004).

A produção da sidra brasileira é realizada praticamente por cinco empresas localizadas nos estados do sul do país (SILVA, 2004). O consumo de sidra apresenta uma característica interessante no Brasil, apesar de estar disponível no mercado consumidor durante todo o ano, apenas é consumida em festas, em particular, de fim de ano. Nestas ocasiões, o consumo de sidra compete com o de vinhos espumantes, do tipo champanha, assim como com outras bebidas gaseificadas, como cervejas e refrigerantes. Não existe hábito

de consumo sistemático, nem rotineiro, sequer esporádico, em nenhuma região do país e toda a produção é voltada para atender o mercado interno, não existindo ainda processos ou tentativas de exportação e nem de importação (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; WOSIACKI *et al*, 1997).

O processamento de sidra no Brasil, como apresenta a Figura 1, segue em linhas gerais, e de maneira simplificada, a seguinte sequência de produção: as frutas desclassificadas para consumo de mesa são conduzidas ao processo através de dutos com água, passam para elevadores de canecas onde são lavadas com água potável por aspersão e, posteriormente, são trituradas em moinhos de martelos. Durante a trituração é adicionado dióxido de enxofre para prevenir o processo de oxidação. Após a trituração é feita a extração do suco em prensas de pistão ou de esteira. O suco recebe a adição de enzimas pectinolíticas em dosagens recomendadas pelos fabricantes. Na sequência, o mosto recebe o inóculo de leveduras sob a forma seca ativa a uma razão de 20 g.hL^{-1} , que corresponde a uma população inicial $2,0 \times 10^6 \text{ ufc.mL}^{-1}$ (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

A fermentação alcoólica ocorre em dornas à temperatura ambiente por um período de aproximadamente dez dias, durante os meses de fevereiro, março e abril, ou seja, durante o final do verão e começo do outono. Ao término da fermentação, o fermentado de maçã é filtrado e transferido para outros tanques, para que ocorra a fermentação secundária ou malolática, fase no mínimo de 30 dias, conhecida por período de maturação. Esta fermentação é conduzida por bactérias lácticas, presentes naturalmente no epicarpo das frutas ou inoculadas, que reduzem a sensação de acidez do fermentado por conversão do ácido málico em ácido láctico, melhorando o sabor da bebida (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; DRILLEAU, 1995).

Terminada a maturação pode ser adicionada a sacarose, com variações de 75 a 100 g.L^{-1} e, caso seja necessário, é corrigida a acidez com a adição de ácido láctico. Os agentes de conservação usados compreendem o metabissulfito de potássio, com 20 e 80 mg.L^{-1} de SO_2 livre e o ácido sórbico na concentração de 500 mg.L^{-1} (WOSIACKI *et al*, 1997; BRASIL, 1988).

Para finalizar o processo, o fermentado é clarificado, normalmente com bentonita e gelatina, e após o resfriamento passa pela adição de dióxido de carbono (CO_2) e o envase em garrafas especiais (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010).

Existem diferenças significativas entre o processamento da sidra brasileira e da sidra francesa, considerada como uma das melhores do mundo (DRILLEAU, 1991; LEA; DRILLEAU, 2003).

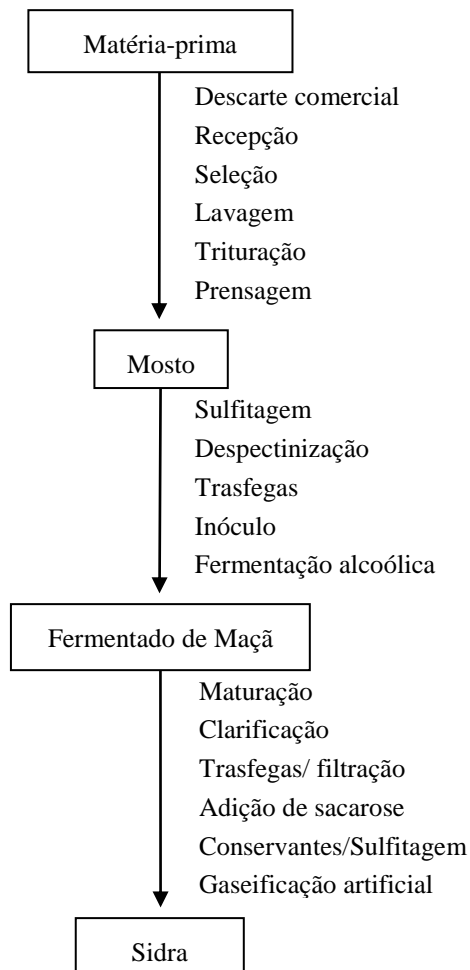


Figura 1 - Esquema demonstrativo do processamento da sidra brasileira
 Fonte: modificado de Nogueira; Wosiacki (2010)

Na França, ou em outros países europeus, são utilizadas maçãs de cultivares selecionadas, usando como marcadores de qualidade industrial os teores de fenóis, ácidos, taninos e açúcares. A fermentação oxidativa é considerada como parte do processo microbiológico, pois as leveduras oxidativas, de baixa atividade fermentativa, produzem aromas que recebem notas frutais e florais que melhoram a qualidade do produto final. A fermentação naquele país caracteriza-se como mista, lenta e parcial, mantendo açúcares residuais da própria fruta na bebida, ressalta-se o tempo de fermentação, que leva de 60 a 120 dias (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; PAGANINI *et al*, 2004; NOGUEIRA, 2003; LEQUÉRÉ e DRILLEAU, 1998; MICHEL *et al*, 1990).

No Brasil, em primeiro lugar pode-se citar a qualidade da matéria-prima, que é resultante de descarte comercial. O mosto obtido após a prensagem é submetido à sulfitagem,

impedindo a ação de leveduras não-convencionais, além disso, a fermentação ocorre em apenas 5 a 20 dias (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010)

Assim pode-se dizer que o processo de fermentação da sidra compreende duas etapas: a fermentação alcoólica e a malolática (DRILLEU, 1995). A fermentação alcoólica, processo principal de fermentação da sidra francesa, ocorre em duas fases: oxidativa, fase de formação de aromas, e a fase fermentativa, onde grande parte do açúcar é convertido em etanol (NOGUEIRA, 2003).

2.2 FERMENTAÇÕES

2.2.1 Fermentação Alcoólica

Nas regiões da Bretanha e da Normandia, diversas espécies de leveduras foram identificadas dentre as 500 cepas isoladas do mosto e de equipamentos utilizados na produção artesanal e industrial da sidra francesa. Entre as principais encontram-se *Brettanomyces* sp., *Hanseniaspora valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* (LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1993; MICHEL, 1988). Beech (1993) confirmou esses resultados analisando a microbiota natural dos mostos de maçãs na Inglaterra e observou a presença de *Saccharomyces cerevisiae* e espécies como *Pichia*, *Torulopsis*, *Hansenula* e *Kloeckera apiculata*, que é uma variação da *Hanseniaspora valbyensis*.

2.2.1.1 Fase oxidativa

Esta fase da fermentação alcoólica resulta da ação de leveduras de baixa ação fermentativa, chamadas de não-convencionais, não-*Saccharomyces* ou oxidativas. Para Nogueira (2003) e Michel (1988) as leveduras oxidativas encontradas nessa fase, principalmente *Metschnikowia pulcherrima* e *Hanseniaspora valbyensis*, participam do processo de clarificação por flotação, através da liberação de CO₂. São leveduras que dominam o meio por alguns dias antes de diminuírem por mortalidade, e serem suplantadas por leveduras fermentativas (*S. uvarum* e, às vezes, *S. cerevisiae*) (NOGUEIRA, 2003; LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998; MICHEL *et al*, 1990).

Esta fase da fermentação traz contribuições significativas para o aroma final do produto e pode durar de 5 a 15 dias após a extração do mosto e corresponde, em geral, ao consumo de aproximadamente 10 g.L⁻¹ de açúcares e 30 a 40 mg.L⁻¹ de nitrogênio (NOGUEIRA, 2003; LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998).

Entretanto, este tempo de ação das leveduras oxidativas varia segundo a espécie, o tamanho da população inicial e, conforme o oxigênio disponível, durante a fase de crescimento (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010). Outros fatores como a concentração de etanol e sulfito, o pH, e a temperatura também influenciam o crescimento (CIANI; FATICHENTI, 1999).

As leveduras não-*Saccharomyces* também são responsáveis pela fermentação alcoólica mas, sobretudo, contribuem para as características sensoriais do produto final, pois são produtoras de compostos secundários (PLATA *et al* 2003; ZOHRE; ERTEN, 2002; LILLY *et al* 2000; ROMANO *et al* 1997).

As leveduras não-*Saccharomyces* influenciam no perfil aromático de vinhos pois produzem e secretam enzimas (esterases, β -glucosidases, lipases, proteases, entre outras) que interagem com os precursores de aromas presentes na uva, produzindo compostos voláteis e não voláteis, contribuindo para o aroma dos vinhos (HERNÁNDEZ-ORTE *et al*, 2008; CIANI *et al*, 2006; JOLLY *et al*, 2006; ROMANO *et al*, 2003; CHAROENCHAI *et al*, 1997). Ciani *et al* (2006) destacam as pectinases, proteases e glicosidases como algumas das enzimas secretadas por *H. uvarum*, responsáveis por melhorar a clarificação, estabilização e aroma dos vinhos.

Trabalhos têm demonstrado um interesse na aplicação industrial das leveduras não-convencionais, em função de sua capacidade de contribuir com o sabor e aroma do vinho tinto e branco (ANDORRA *et al*, 2010; RODRIGUEZ *et al*, 2010; HERNÁNDEZ-ORTE *et al*, 2008; FLEET, 2003; MINGORANCE-CAZORLA *et al*, 2003; ESTEVE-ZARZOSO *et al*, 1999; ROMANO *et al*, 1997). A habilidade de formar ésteres de acetato é considerada como um critério para uma seleção adequada das cepas, pois estes compostos são majoritários na contribuição aromática do produto final (BILBAO *et al*, 1997).

Neste sentido Coton *et al* (2006) isolaram de sidra francesa espécies não-convencionais como *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea cidri*, *Dekkera anomala*, *Candida oleophila*, *Candida stellata*, *Pichia delftensis*, *Pichia misumaiensis*, *Pichia nakasei*, *Candida sake*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus*.

Suárez Valles *et al* (2007) tendo buscado caracterizar as espécies de leveduras ao longo do processo de fermentação de sidra, encontraram espécies não-*Saccharomyces* classificadas em duas categorias: leveduras apiculadas, com baixa atividade de fermentação (*Hanseniaspora osmophila*, *H. valbyensis* e *H. uvarum*), e com um metabolismo oxidativo (*M. pulcherrima* e *Pichia guilliermondii*).

Para Bedriñana *et al* (2010) uma grande abundância de leveduras não-*Saccharomyces* foi detectada normalmente nas fases iniciais de fermentação e sobretudo no mosto de maçãs. A espécie *H. valbyensis* foi sempre predominante, seguida por *H. uvarum* e *M. pulcherrima*; também foram encontradas *C. parapsilosis* e *Pichia guilliermondii*.

Sabe-se que a fermentação da sidra sob a ação apenas de leveduras fermentativas proporciona resultados sensoriais como aroma neutro e/ou pouco típico, porém com a presença da cepa *Hanseniaspora valbyensis* aparecem notas como frutada (aromas de frutas) pela presença de ésteres (acetato de etila e fenil-etila). Entretanto, algumas vezes, nas condições francesas de processamento, a fermentação alcoólica é desenvolvida unicamente sob influência de leveduras oxidativas (apiculadas) o que pode resultar em uma produção de acetato de etila, prejudicial ao aroma do produto (DRILLEAU, 1996). Ferreira *et al* (2001) não recomendam a utilização de espécies não-*Saccharomyces* para vinificação, advertem que a maioria delas são, produtoras ao mesmo tempo, de baixo teor de etanol e de subprodutos, como acetato de etila.

Para Andorra *et al* (2010) as espécies de *Hanseniaspora sp.* foram consideradas produtoras de ésteres, a maioria deles contribuindo para o aroma frutado e floral de vinhos. No entanto, relataram que o principal éster produzido foi o acetato de etila, que em altas concentrações produz um aroma desagradável de cola e solvente. Ciani *et al* (2006) confirmaram o aumento do teor de acetato de etila em cultura mista de *H. uvarum* com *S. cerevisiae* em vinho na Itália.

O trabalho de Viana *et al* (2009) revelou o potencial de leveduras não-*Saccharomyces* do vinho para produzir ésteres de acetato, especificamente, os gêneros *Hanseniaspora* e *Pichia*. Estes autores destacam que a produção de 2-feniletil acetato parece estar restrito ao gênero *Hanseniaspora*.

Zohre e Erten (2002), tendo trabalhado com fermentações em suco de uva utilizando culturas puras e mistas, verificaram que culturas puras de *Kloeckera apiculata* e *Candida pulcherrima* produziram grandes quantidades de acetato de etila.

Mamede e Pastore (2004) estudaram culturas puras de *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de mosto de uva. Verificaram que *Kloeckera apiculata* produziu quantidades significantes de compostos importantes para a qualidade aromática do vinho como o acetato de etila mas, por outro lado, a produção de etanol foi muito baixa, configurando um ponto negativo. Constataram assim que a presença de leveduras não-*Saccharomyces* durante a fermentação, em virtude da produção de compostos voláteis, pode ser de grande interesse para a aplicação biotecnológica da fabricação de vinho, conclusão que pode ser estendida à sidra, devido à semelhanças nos processos de fermentação.

2.2.1.2 Fase fermentativa

No início da fase fermentativa as leveduras oxidativas são suplantadas pelas cepas fermentativas. A fermentação alcoólica acontece na totalidade dos casos, sob ação da microbiota indígena (presente na fruta e material de processamento) em outros casos, pela adição de leveduras industriais na forma seca ativa (SUÁREZ VALLES *et al*, 2007; NOGUEIRA, 2003).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* mostram crescimento durante a fase oxidativa com população inicial de $6,0 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, estabilizando sua população após um consumo de 10 a 15 g.L⁻¹ de açúcares com a população máxima de aproximadamente $1,0$ a $4,0 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹, onde a velocidade de fermentação atinge seu valor máximo (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; LEQUÉRE; DRILLEAU, 1998; DRILLEAU, 1996).

2.3 FERMENTAÇÃO MISTA E SEQUENCIAL

A fermentação mista de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* tem despertado um crescente interesse na aplicação industrial, pela possibilidade de fornecer características particulares de *flavour* ao produto, revelando contribuições positivas e interessantes para melhorar a qualidade final de vinhos e outras bebidas (ANDORRA *et al*, 2010; CIANI; COMOTINI, 2010; DOMIZIO *et al*, 2010; MENDOZA *et al*, 2009; VIANA *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2008; CIANI; BECO; COMITINI, 2006; XU *et al*, 2006; ROJAS *et al*, 2001).

Apesar da fermentação com culturas puras de *S. cerevisiae* prover vantagens de facilidade de controle e fermentações homogêneas, a produção de vinhos nestas condições resulta em falta de complexidade nos aromas e de novidade no produto final, o que é promovido pela microbiota silvestre. A inclusão de leveduras oxidativas como parte de culturas mistas juntamente com *S. cerevisiae* para melhorar a qualidade dos vinhos tem sido sugerida como uma maneira de se aproveitar uma fermentação espontânea (CIANI; BECO; COMITINI, 2006; JOLLY *et al*, 2003; ROJAS *et al*, 2003; ROMANO *et al*, 2003; LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

Diversos autores advertem sobre os efeitos negativos provocados por leveduras não-*Saccharomyces* em bebidas com fermentações em culturas puras, como baixo teor de etanol e grande produção de subprodutos, como ácido acético, acetoína e acetato de etila, que em grandes quantidades são prejudiciais ao aroma do produto (ANDORRA *et al*, 2010; CIANI; COMITINI, 2010; ZOHRE; ERTEN, 2002; FERREIRA *et al*, 2001; PRETORIUS, 2000; DRILLEAU, 1996). Entretanto, em culturas mistas com *S. cerevisiae*, a produção destes compostos é consideravelmente reduzida, e substâncias aromáticas tais como níveis baixos de acetato de etila e 2-feniletil acetato, passam a contribuir positivamente para o sabor e aroma geral do vinho (ROMANCINO *et al*, 2008; CIANI; BECO; COMITINI, 2006; ROJAS *et al*, 2003; ROMANO *et al*, 2003).

Xu *et al* (2006) investigaram o efeito de fermentação pura e mista por *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora valbyensis* (levedura oxidativa apiculada) na formação dos principais componentes voláteis da sidra, bem como sobre a fermentação alcoólica. Verificaram que *S. cerevisiae* apresentou uma conversão de açúcar a álcool de 11,5%, enquanto *H. valbyensis* não ultrapassou 6%. No entanto concentrações mais altas de etil acetato e fenil acetato foram obtidas com *H. valbyensis*. Consequentemente, uma combinação destas duas espécies de leveduras em fermentação sequencial foi usada para aumentar a concentração de etil ésteres em 7,41 - 20,96% e para diminuir a concentração de álcool em 25,06 - 51,38%.

Neste sentido, Suárez Valles *et al* (2007) reforçam que o perfil aromático da sidra é marcado pela relação entre a baixa concentração de álcool e de acetato de etila, fato observado em experimento realizado com leveduras fracamente fermentativas durante a fermentação do mosto de maçã.

Trabalhos de fermentação com culturas mistas de leveduras apiculadas e *S. cerevisiae* têm mostrado aumento no acetato de isoamila, em presença de *H. uvarum*

(MOREIRA *et al*, 2008), enquanto o uso de *Hanseniaspora osmophila* fornece melhorias na produção de 2-feniletil acetato (VIANA *et al*, 2009).

Entretanto, Andorra *et al* (2010), tendo trabalhado com culturas mistas de *S. cerevisiae* com *C. zemplinina* e *H. uvarum*, verificaram uma produção de ácido acético acima dos níveis aceitáveis, capaz de neutralizar os benefícios da alta produção de ésteres. Ciani *et al* (2006) tendo avaliado culturas mistas verificaram em ensaios sequenciais com *H. uvarum*, um aumento excessivo de acetato de etila, excedendo o limiar aceitável (150 mg.L⁻¹) (JACKSON, 1994) e também que baixas temperaturas (15° C) influenciam negativamente a evolução da fermentação. Estes autores concluíram que fermentações *multi-starter* de *H. uvarum*, *K. thermotolerans* e *T. delbrueckii* são influenciadas pelo nível e persistência destas leveduras durante a fermentação.

Os resultados obtidos por Andorra *et al* (2010), indicam claramente que *S. cerevisiae* tem um efeito antagônico sobre cepas não-*Saccharomyces* (*C. zemplinina* e *H. uvarum*). A presença de *S. cerevisiae* reduziu fortemente as outras espécies em culturas mistas.

Sabe-se que após os primeiros dias de fermentação, as cepas de leveduras oxidativas morrem devido ao aumento da concentração de etanol e então as espécies *Saccharomyces* sp. terminam a fermentação (HEARD; FLEET, 1986, 1985). Entretanto, Pina *et al* (2004) verificaram a alta resistência ao etanol exibida pela cepa *H. guilliermondii* em trabalho com vinho, o que não está de acordo com estudos anteriores, que relatam que leveduras apiculadas (*Kloeckera* sp. e *Hanseniaspora* sp.), são espécies de baixa tolerância ao etanol. Contudo, alguns estudos recentes sobre ecologia quantitativa da vinificação têm mostrado que as espécies não-*Saccharomyces* sobreviveram em níveis significativos por períodos mais longos durante a fermentação (CIANNI; PICCIOTTI, 1995; FLEET, 1990).

O teor de álcool tem sido muitas vezes considerado uma das principais razões para a mortalidade das leveduras oxidativas em fermentação alcoólica. No entanto, Nogueira *et al* (2008) constataram a mortalidade das leveduras tão logo haviam crescido, e que 90% delas tinham morrido antes que 1% de álcool fosse produzido. Assim, sugerem que a mortalidade das leveduras oxidativas no processamento da sidra provavelmente não ocorre somente devido à toxicidade do álcool, mas também pode estar reforçada por uma competição por nutrientes, tais como oxigênio, esteróis ou vitaminas.

Entretanto, Nissen e Arneborg (2003) verificaram que a depleção de nutrientes e a presença de compostos tóxicos não foram responsáveis pela morte precoce das leveduras não-*Saccharomyces* estudadas em fermentações de vinho. Constataram que as mortes precoces

pareciam ser mediadas por um mecanismo de contato célula-célula em densidades elevadas de células de *S. cerevisiae*, e devido a uma menor capacidade de *K. thermotolerans* e *T. delbrueckii* para competir por espaço.

Pérez-Nevado *et al* (2006) estudaram o mecanismo envolvido na morte celular de *Hanseniaspora guilliermondii* e *H. uvarum*, durante fermentações mistas com *S. cerevisiae* sob condições de crescimento enológicas. Quando *S. cerevisiae* alcançam densidades celulares de cerca de 10^7 ufc.mL⁻¹, uma forte redução da população de *Hanseniaspora* sp. foi observada independentemente da concentração de etanol. Os autores consideram a hipótese de que um ou mais compostos tóxicos, de natureza ainda não identificada, produzidos por *S. cerevisiae* possam provocar a morte prematura das células de *Hanseniaspora* sp..

O efeito da interação de leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* sp. em fermentação mista da sidra, mostrou-se eficiente na produção de aromas, se for ajustado o tempo de inóculo das duas leveduras, resultando em uma melhor eficiência de conversão alcoólica, com teores de açúcares residuais adequados, e uma melhor concentração de compostos voláteis majoritários para a qualidade do produto final (XU *et al*, 2006).

3 LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS

3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos relativamente fáceis de isolar a partir de seus ecossistemas naturais. A técnica consiste em suspender uma amostra do substrato desejado em água estéril e estriar ou espalhar uma diluição adequada em um meio de cultura não seletivo. Sugere-se o ágar extrato de malte acidificado para evitar o crescimento de bactérias, onde após incubação a uma temperatura adequada, serão obtidos espécimes da população total. Crous *et al* (2009) recomendam a utilização de pelo menos dois meios diferentes para o isolamento de bolores e leveduras. Na sequência, selecionar pelo menos uma de cada tipo de colônia obtida, embora muitas leveduras não possam ser distinguidas de imediato pelo exame visual. (SPENCER; SPENCER, 1996).

Dois princípios importantes para desenvolver um meio seletivo são a inibição do crescimento de bactérias e a redução do diâmetro das colônias dos bolores que apresentam um crescimento rápido. No entanto, outros princípios seletivos podem ser introduzidos para

selecionar grupos mais específicos de fungos ou mesmo determinadas espécies de fungos (CROUS *et al*, 2009).

A pureza dos isolados é avaliada pela observação da estrutura e cor das colônias e exame das células vegetativas sob um microscópio ótico. As colônias com variações de estrutura devem ser repicadas em meio de cultura não seletivo, e posteriormente examinadas e testadas novamente (CROUS *et al*, 2009).

Para a seleção de leveduras torna-se essencial estabelecer as propriedades enológicas de interesse. Se o objetivo da seleção são culturas iniciadoras, as cepas selecionadas deverão apresentar propriedades fermentativas, tecnológicas e metabólicas especializadas, como por exemplo: rápida iniciação do processo fermentativo, alta tolerância a etanol, osmotolerância, baixa produção de biomassa, alta estabilidade genética, baixa formação de espuma, pouca quantidade de sulfeto de hidrogênio, entre outros (PRETORIUS, 2000).

Estas leveduras também devem ter outras características desejáveis como tolerância ao dióxido de enxofre, habilidade de fermentar açúcares eficientemente a uma concentração em torno de 20% (p/v) e produzir grandes quantidades de glicerol (CARRASCO; QUEROL, 2001). O glicerol é considerado fonte de carbono e energia, agente crioprotetor e osmorregulador para os microrganismos, além de ter implicações sensoriais positivas em vinhos na suavidade e corpo da bebida (ARRUDA *et al*, 2007; PRETORIUS, 2000; NOBLE; BURSICK, 1984). Estes critérios podem ser insuficientes, havendo necessidade de se utilizar outros como, por exemplo, a temperatura de fermentação, a finalização correta do processo e as análises organolépticas dos vinhos produzidos (TORIJA, 2002).

O interesse ainda pode estar na produção de enzimas (esterases, β -glucosidases, lípases e proteases, entre outras) pelas leveduras não-*Saccharomyces* que influenciam largamente no perfil aromático de vinhos (HERNÁNDEZ-ORTE *et al*, 2008; CIANI; BECO; COMITINI, *et al*, 2006; JOLLY *et al*, 2006; ROMANO *et al*, 2003). Uma estratégia possível para seletivamente isolar ou diferenciar leveduras pode ser a formulação de meios de cultura com utilização de inibidores, corantes e substratos específicos (DEAK, 2003).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

A identificação e a classificação de leveduras ocorrem, principalmente, pelo emprego de métodos fenotípicos convencionais, baseados nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das células (FREYDIERE *et al*, 2001; SANDVEN, 1990). Muito destes

métodos são trabalhosos e exigem maior tempo, requerem operadores experientes e qualificados. Estes métodos podem sofrer influências pelo tempo de armazenamento das amostras e estar sujeitos a variações na expressão das características, bem como das condições de realização, tais como: tamanho do inóculo utilizado, condição de incubação, etc (CROUS *et al*, 2009).

A capacidade de utilizar certos compostos como única fonte de carbono e nitrogênio permite uma diferenciação mais fina das espécies. São utilizadas para testes, até quarenta e sete fontes de carbono e nove de nitrogênio na descrição de espécies. Estes testes de crescimento, geralmente chamados de testes de assimilação, podem ser realizados em meio sólido em placas, também conhecidos como auxanogramas, em meio líquido ou em microplacas. Outras características adicionais podem ser examinadas como crescimento sem vitaminas, em altas concentrações de glucose, produção de urease, resistência a antibióticos, ou reação ao corante azul de diazônio B, entre outras (CROUS *et al*, 2009; KURTZMAN; FELL, 1998).

Métodos moleculares, baseados no estudo do DNA e na caracterização genotípica dos microrganismos, constituem grande avanço para a caracterização das espécies com diferentes finalidades, permitindo também a avaliação da variabilidade intra-específica entre amostras, sendo importante recurso para os laboratórios de microbiologia e pesquisa. Estes métodos oferecem vantagens por apresentarem maior estabilidade dos caracteres ao longo do tempo, alta reprodutibilidade e objetividade na interpretação dos resultados (PFALLER, 1995; MAGEE; BOWDIN; STAUDINER, 1992). As técnicas moleculares tornaram-se mais acessíveis nos últimos anos e têm sido extensivamente aplicadas para a classificação e a caracterização genética de leveduras das mais diversas áreas de pesquisas.

Assim, algumas destas metodologias moleculares foram empregadas para identificação de leveduras com potencial para o controle biológico (TAQARORT *et al*, 2008), para a indústria de malte (LAILILA *et al*, 2006), por interesse biotecnológico na atividade enzimática das leveduras (FERNÁNDEZ *et al*, 2000; CHAROENCHAI *et al*, 1997), identificação para monitoramento de leveduras contaminantes do processo de fabricação de etanol (BASÍLIO *et al*, 2008), para tipagem de leveduras isoladas de leite fermentado e queijos (ANDRIGHETTO *et al*, 2000 *apud* MARIANO, 2006), de espécies patogênicas (ZHANG *et al*, 2010; NOSEK *et al*, 2009), identificação da biodiversidade de leveduras e produção de aroma em vinhos e da sidra (CHAVAN *et al*, 2009; HERNÁNDEZ-ORTE *et al*,

2008; SUARES VALLES *et al*, 2008, 2007; COTON *et al*, 2006; BALEIRAS COUTO *et al*, 2005).

A caracterização molecular de leveduras envolve o isolamento do DNA genômico, amplificação do DNA isolado por reação de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento do fragmento amplificado (CROUS *et al*, 2009).

3.2.1 Isolamento do DNA Genômico

A etapa de isolamento do DNA genômico envolve algumas etapas básicas com pequenas variações, conforme o protocolo utilizado. Em uma primeira etapa é necessário utilizar um tampão de extração contendo algum detergente, antioxidantes, EDTA e agente tamponante, visando a solubilização de membranas lipoproteicas e desnaturação de proteínas, enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação. Normalmente esta suspensão é submetida a uma temperatura entre 50 e 65°C durante 15 a 60 minutos para facilitar a solubilização e homogeneização da suspensão. A seguir esta suspensão é submetida a uma extração com um solvente orgânico, por exemplo, clorofórmio-álcool isoamílico. As fases orgânica e aquosa são separadas por meio de centrifugação. Nesta extração, lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos são retidos na fase orgânica inferior, enquanto que o DNA, RNA e alguns polissacarídeos são retidos na fase aquosa superior. Numa próxima etapa, um álcool (isopropanol ou etanol) é adicionado à fase aquosa. O DNA na presença de sal e álcool forma um precipitado frequentemente visível que pode ser pescado ou sedimentado por centrifugação. Após lavagens do precipitado com álcool, o DNA/RNA é suspenso em um tampão Tris-EDTA contendo RNase para degradar o RNA, restando apenas o DNA genômico desejado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Diversos protocolos para extração de DNA de leveduras são criados variando o tampão de lise (CTAB - brometo de cetil-trimetil-amônio, SDS - dodecil sulfato de sódio), tempo e temperatura de solubilização de membranas e desnaturação de proteínas, número de lavagens, tempo e velocidade de centrifugação, conforme as especificidades das cepas estudadas. Entretanto, independente do protocolo utilizado, o pH utilizado para extração deve evitar a ação de enzimas degradativas, portanto, normalmente entre pH 8,0 e 9,0, pois a DNase nucleares tem pH ótimo em torno de 7,0, enzimas lipolíticas e lipoxigenases tem pH ótimo entre 5,0 e 6,0. O EDTA (etileno diamino tetra-acetato) é incluído para inibir enzimas dependentes de metais principalmente DNases, o EDTA quelata cátions divalentes tais como

Mg²⁺ e Ca²⁺ (BRANDÃO *et al*, 2011; KURZTMAN *et al*, 2003; ESPENSHADE, 2001 *apud* SAMBROOK; RUSSELL, 2001; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995)

3.2.2 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

A reação de polimerase em cadeia (PCR) envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta reação se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (*primers*), sintetizados artificialmente, de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares a sequências específicas que flanqueiam a região alvo da ampliação (VAN DER VOSSEN *et al*, 2003)

Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla de DNA é desnaturada através da elevação da temperatura para 92-95°C. Na etapa de anelamento a temperatura é rapidamente reduzida para 35-60°C, dependendo do tamanho e sequência do *primer* utilizado. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia é feita. Este ciclo pode ser repetido por dezenas de vezes e a quantidade de DNA de interesse, dobra a cada ciclo, permitindo uma ampliação em progressão geométrica. PCR permite iniciar o processo com quantidades mínimas de DNA (ordem de picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com uma grande quantidade de uma sequência específica do DNA de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Para que a reação da polimerase em cadeia (PCR) ocorra de maneira adequada, são utilizados sete componentes essenciais: [1] a DNA polimerase termoestável para catalisar a síntese do DNA modelo, variam na fidelidade, eficiência e habilidade em sintetizar o DNA de tamanhos diversos, a Taq polimerase é normalmente utilizada; [2] um par de oligonucleotídeos sintéticos para iniciar a síntese de DNA, o design dos *primers* vai determinar a especificidade e eficiência da reação de amplificação; [3] desoxinucleotídeos (dNTPs) contendo quantidades equimolares de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, adequadas ao produto a ser amplificado, pois altas concentrações de dNTPs são inibitórias para a amplificação; [4] toda DNA polimerase termoestável requer cátions divalentes, para sua atividade, usualmente Mg²⁺; [5] tampão para manter o pH entre 8,3 e 8,8 a temperatura ambiente, Tris-Cl, incluído no padrão PCR na concentração de 10mM; [6] cátions

monovalentes contendo 50mM KCl no tampão padrão PCR, quantidade adequada para amplificação de segmentos de DNA maiores que 500 pares de base de comprimento, e [7] fita molde do DNA, denominadas de templates, contendo a sequência alvo para PCR, pode ser adicionada em forma de simples ou dupla fita, templates de DNA circulares são amplificados menos eficientemente que DNAs lineares (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados e ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR, com utilização de marcadores (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Uma destas variações é a tecnologia RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), que utiliza apenas um *primer* no lugar de um par de *primers* da PCR. O *primer* único tem sequência arbitrária e portanto, pode possibilitar a análise de polimorfismos de DNA. Um número definido de produtos de amplificação é gerado, devido ao fato de as sequências parcialmente complementares à sequência do *primer* estarem em fitas opostas no DNA. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese, com brometo de etídeo, em luz ultravioleta ou autoradiografia, dependendo do gel utilizado. Esta técnica tem a vantagem adicional de que nenhum conhecimento específico do genoma a ser amplificado é necessário. Diferenças no padrão de amplificação refletem polimorfismos que se acumularam durante a evolução, sendo a RAPD-PCR útil para mapeamento genético, taxonomia, filogenética e para detecção de mutações. Um dos problemas da técnica de RAPD-PCR, frequentemente citado, é a sua reprodutibilidade (KURZTMAN *et al*, 2003; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Outra derivação da PCR bastante utilizada para identificação molecular na análise de DNA e RNA, consiste no polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*). A técnica compreende a quebra do DNA por enzimas de restrição em regiões com determinadas sequências de bases e a separação dos fragmentos resultantes por eletroforese. Diferentes perfis de bandas, ou polimorfismos, podem ser observados diretamente sob luz ultravioleta após coloração do gel com brometo de etídeo, ou indiretamente após transferência das bandas para membranas, sobre as quais se faz hibridação com sondas específicas de DNA ou RNA marcado. A detecção da hibridação poderá ser efetuada posteriormente por película de raios-X ou por quimiluminescência, referente à marcação utilizada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Este tipo de análise possibilitou também a elaboração de mapas de restrição e a estimativa das relações filogenéticas. A análise de restrição do DNA mitocondrial tem tido uma grande aplicação no estudo de leveduras, por originar um pequeno número de fragmentos (quando comparado com o DNA genômico) e devido ao elevado polimorfismo dos perfis obtidos. Este último aspecto tem-se revelado bastante útil na diferenciação de estirpes, nomeadamente enológicas (CASAL *et al*, 2010).

Esta técnica tem sido aplicada na diferenciação entre espécies de leveduras, para a amplificação de genes e regiões de informações ribossomal RNA, tais como ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e NTS (*Non-Spacer transcrita*), seguido por análise de restrição com endonucleases (BALEIRAS COUTO *et al*, 2005; ESTEVE-ZARZOSO *et al*, 1999; GRANCHI *et al*, 1999). A sequência da subunidade grande (26S) rDNA, especialmente D1/D2 região, também é aplicada para estudar a filogenia dos diferentes grupos de levedura e é uma ferramenta importante na identificação de leveduras (BALEIRAS COUTO *et al*, 2005; KURTZMAN e ROBNETT, 1997; BOEKHOUT; BOSBOOM, 1994)

O uso de marcadores moleculares, que promovem a hibridização de regiões polimórficas, fornecem padrões de bandas diferentes de indivíduo para indivíduo. Baseada neste polimorfismo, a técnica do DNA *fingerprinting* ou caracterização genética de um genótipo representa outra aplicação destes marcadores. A técnica de DNA *fingerprinting* tem sido utilizada com alto grau de especificidade e confiabilidade, no entanto, para garantir estas características, três requisitos básicos são essenciais: a distinção, ou seja, diferentes genótipos devem apresentar distintos padrões de bandas; a uniformidade, quando um mesmo padrão de bandas deve ser obtido se o procedimento for repetido; e estabilidade, que vai garantir o padrão de bandas inalterado mesmo que o genótipo for cultivado em diferentes ambientes. PCR-*fingerprinting* utilizando *primers* de repetição simples (GAC)₅ e (GTG)₅ e a sequência nuclear do bacteriófago M13, tem sido bastante útil para discriminação de leveduras a nível específico. Este método foi desenvolvido com base em resultados obtidos previamente de análise do DNA *fingerprinting* (LIBKIND *et al*, 2003; VAN DER VOSSSEN *et al*, 2003).

Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de sequências repetidas, umas mais complexas e outras mais simples (TAUTZ; RENZ, 1984; HAMADA *et al*, 1982). As sequências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats* ou STR - *Short Tandem Repeat* ou SSRP - *Simple Sequence Repeat Polymorphisms*), denominadas também de microsatélites (LITT; LUTY, 1989), consistem em pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de

comprimento, repetidas em tandem, espalhadas pelo genoma de um indivíduo. São altamente polimórficos em plantas, animais e microrganismos. Em genomas de eucariotos, estas sequências simples são mais frequentes, melhor distribuídas ao acaso e formam locos hipervariáveis constituídos por minissatélites. Assim, cada região genômica que contenha um determinado número de repetições de uma destas sequências constitui-se num loco genético, altamente variável entre indivíduos e multialélico, portanto, altamente informativo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Comparativamente aos RFLPs, os microssatélites proporcionam 3 a 4 vezes mais polimorfismo ou informação. Entretanto, para o uso rotineiro dos microssatélites, há a necessidade de primeiro amplificar uma região, posteriormente sequenciá-la e em terceiro lugar, sintetizar os iniciadores específicos para cada locus. Uma vez feito isto, o locus marcador pode ser utilizado indefinidamente naquela espécie. Desta forma, existe um custo elevado e trabalho no início, mas o custo subsequente é baixo e a simplicidade a posteriori, é muito grande (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Os minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) são regiões dispersas no genoma que contém um número variável de sequências repetidas e enfileiradas (tandem) de DNA que têm um núcleo comum de 10 a 15 pares de bases (JEFFREYS *et al*, 1985). Muitos dos minissatélites são altamente polimórficos, produzindo um grande número de bandas. Por estarem espalhadas por todo o genoma e apresentarem um número variável de repetições em diferentes indivíduos em relação a uma mesma região cromossômica (locus), os minissatélites simultaneamente proporcionam um conjunto de marcadores genéticos que se constitui no que tem sido denominado de impressões digitais de DNA, conseqüentemente, indivíduo-específicos. Para a obtenção do padrão de bandas utiliza-se o mesmo procedimento utilizado para o RFLP, com exceção de que a sonda contendo repetições de sequência conhecida (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Isoladamente os mini ou microssatélites ou em conjunto com outros marcadores moleculares, podem ser utilizados para caracterizar e distinguir uma espécie de outra.

3.2.3 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA compreende uma série de processos bioquímicos que tem por finalidade determinar a ordem dos nucleotídeos (adenina, guanina, citosina e timina) em uma amostra de DNA, muitas informações sobre a estrutura e expressão gênica podem ser

obtidas pela determinação direta da sequência de bases numa molécula de DNA (CROUS *et al*, 2009)

Os primeiros métodos de sequenciamento contaram com degradação química, foram desenvolvidos por Allan Maxam e Walter Gilbert em 1976-1977, que utilizaram tratamento com substâncias químicas para cortar a molécula de DNA em nucleotídeos específicos, sendo os fragmentos visualizados através do processo de eletroforese. Era necessário marcar as moléculas com radiação, devido à baixa produção de material, não podendo ser detectada de outra maneira. Dois anos depois Sanger e Coulson criaram o método enzimático, chamado de técnica do dideoxi ou didesoxi, que promove a síntese enzimática de uma fita complementar, cujo crescimento é interrompido pela adição de um dideoxinucleotídeo. Essa técnica, de imediato, tomou o lugar da anterior, possibilitando o desenvolvimento de sequenciadores automáticos de DNA. O sequenciamento manual ainda existe, mas é muito mais trabalhoso, caro e arriscado, pois se utilizam substâncias radioativas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Nos anos 80 houve a substituição das técnicas de detecção por radioatividade pelo uso de marcadores fluorescentes. Dessa forma, após preparação do gel e aplicação das amostras, a utilização de dNTPs fluorescentes podem ser lidos automaticamente durante a eletroforese, além disso, os corantes fluorescentes, desenvolvem reações no mesmo poço no gel.

Hoje existem os sequenciadores completamente automatizados e muito mais rápidos. Os sequenciadores capilares contam com a associação de capilares preenchidos com gel, a um sistema de detecção através de fluorescência excitada por laser. O sequenciador a laser permite que todas as reações (A, C, G, T) sejam corridas juntas, pois se utiliza uma cor fluorescente diferente para cada base. O desenvolvimento e utilização de sequenciadores automáticos tornam mais eficientes e rápidos o sequenciamento de DNA na medida em que as etapas de leitura do gel e o processamento de sequências são realizados através de computadores. Alguns sequenciadores conseguem ler cerca de 1000 bases numa separação (KURTZMAN *et al*, 2003).

Segundo Casal *et al* (2010) são utilizados quatro fluorocromos diferentes e uma vez excitados por um feixe de laser emitem luz em comprimentos de onda distintos. É possível marcar com estes fluorocromos o *primer* universal M13 ou então cada um dos nucleotídeos (terminadores). Assim, uma vez que em cada uma das reações (A, T, C, G) é empregado um fluorocromo diferente, torna-se possível juntar estes produtos e realizar uma corrida num único gel. Os produtos da reação de sequenciamento, marcados com os fluorocromos, ao

serem submetidos à eletroforese passam pelo feixe de laser, que promove a excitação dos fluorocromos. A luz emitida pelos fluorocromos é detectada por um fotomultiplicador e a informação é processada através de um computador.

As aplicações do sequenciamento do DNA são inúmeras, mas pode-se destacar: análise genômica, genoma completo, ciência forense, análise filogenética, conservação de espécies, resolução de epidemias virais e descoberta de drogas, entre outras.

3.3 CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS

De maneira geral as leveduras são organismos de fácil manutenção nas coleções, entretanto, repiques sucessivos podem resultar em alterações das características fisiológicas e bioquímicas, impedindo caracterizações acertivas destes microrganismos (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

A manutenção de culturas de leveduras sugere não apenas a conservação da viabilidade desses organismos, mas a preservação de suas características metabólicas, com possibilidade de recuperação rápida de sua taxa de crescimento e reprodução, para fins industriais, de estudos e pesquisas (KAWAMURA *et al.*, 1995). A baixa viabilidade celular de leveduras estocadas, pode estar relacionada ao grande tamanho das células em relação às células bacterianas, e à ausência de esporos de resistência dos tipos encontrados nos fungos superiores (SPENCER; SPENCER, 1996; KIRSOP; SNELL, 1984).

Uma das técnicas de conservação mais simples que se dispõe consiste na transferência seriada de meios de cultura, periodicamente. Este método, embora simples, é trabalhoso e consome um tempo relativamente grande, além de ser economicamente inadequado. Deve-se ainda considerar a transição entre forma leveduriforme e micelial, no pleomorfismo, além de risco de contaminação. Contudo, ele pode ser ainda muito útil para culturas não muito numerosas, destinadas ao uso constante (YARROW, 1998; KIRSOP; SNELL, 1984).

A liofilização é um processo de remoção da maior parte da água contida em um material previamente congelado, por sublimação. Quando comparada a outros métodos de desidratação, reduz de modo significativo a desnaturação de proteínas e ações enzimáticas, sendo extremamente recomendada para materiais biológicos (PITOMBO, 2005). Este processo tem sido aplicado para leveduras e fungos filamentosos com bons resultados de recuperação, preservando as características fenotípicas e genotípicas dos microrganismos por

períodos prolongados (CAVALCANTE *et al*, 2007; MCGINNIS *et al*, 1974). Porém, alguns autores relataram modificações morfológicas após a liofilização ou até mesmo inviabilidade do fungo no congelamento que antecede a liofilização (VOYRON *et al*, 2009; PAOLI, 2005; FIGUEIREDO, 2001).

Para se obter bons resultados com a liofilização, alguns fatores devem ser observados, como a escolha do meio de crescimento da cultura inicial, do meio de reativação e a temperatura de pré-congelamento, entre outros (SILVA *et al*, 2008). Este processo é bastante agressivo e apresenta alguns efeitos indesejáveis, tais como a desnaturação de proteínas e o decréscimo da viabilidade de diversos tipos celulares. Para se prevenir e reduzir estes efeitos adversos, substâncias protetoras tais como leite desnatado, sacarose e glicerol, entre outras, são comumente adicionados nas amostras antes de serem congeladas ou liofilizadas (DINIZ-MENDES *et al*, 1999).

O preparo de culturas para o congelamento apresenta procedimentos simples e fáceis. Em geral a espécie a ser congelada, tanto em nitrogênio líquido quanto em ultrafreezer, deve ser submetida a crescimento em 3 mL de meio líquido por 24 horas, em seguida o frasco sofre agitação e acréscimo 1 mL de solução de glicerol a 60%. Esta cultura deve ser colocada em frascos apropriados ao congelamento, esterilizados, identificados e totalmente selados. As culturas são então congeladas a uma temperatura de aproximadamente -30°C por 30 a 60 minutos e a seguir podem ser colocadas em ultrafreezer à temperatura de -80°C, ou em tanques de nitrogênio líquido (KURTZMAN *et al*, 2003; YARROW, 1998).

Tanto o congelamento quanto a liofilização são técnicas frequentemente utilizadas para preservação e estocagem de material biológico, não somente pela qualidade microbiológica dos materiais armazenados, mas também porque permitem uma redução drástica do tempo gasto em transferências de culturas. Robert *et al* (2006) comentam que embora para a distribuição a liofilização ofereça vantagens sobre o congelamento, o método de escolha para a preservação de leveduras tem sido o congelamento em temperaturas ultrabaixas, técnica considerada extremamente confiável.

4 AROMA

O aroma consiste em uma das características que contribui amplamente para aceitação dos alimentos e bebidas pelos consumidores, os quais têm se tornado cada vez mais exigentes influenciados pela qualidade sensorial dos produtos. Para Simões *et al* (2009),

aroma é a sensação percebida pelos sentidos do gosto e olfato, produzida quando se ingere o alimento. A sensação do gosto é atribuída à presença de compostos não voláteis nos alimentos (tais como açúcares, sais, ácidos), determinando os cinco gostos básicos descritos como doce, salgado, ácido, umami e amargo. A sensação do aroma é bem mais complexa, pois o olfato humano pode discriminar milhares de compostos voláteis.

Segundo Gatfield (1995) e Pinheiro e Pastore (2003), os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são: alcóois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas ou podem ser obtidas de fontes animais.

Segundo Welsh *et al* (1989) os processos biotecnológicos de síntese de compostos aromáticos podem ser classificados em dois grupos: microbiológicos e enzimáticos. A biosíntese e a biotransformação, são consideradas subdivisão dos métodos microbiológicos. Os processos enzimáticos são utilizados na obtenção de aromas, envolvem a hidrólise de determinados compostos, porém, sem o desenvolvimento microbiano (MEDEIROS, 2003).

A biosíntese ou síntese de novo consiste na produção de compostos químicos através de microrganismos, seja por metabolismo secundário ou pela fermentação de nutrientes simples, como açúcares e aminoácidos (SOARES *et al*, 2000; KEMPLER, 1983). Na biotransformação, diferentes reações (oxidação, redução, reações hidrolíticas, formação de novas ligações C-C e reações de degradação) são desenvolvidas por microrganismos na produção de aromas, a partir de substratos específicos (MEDEIROS, 2003).

A vantagem de se produzir um aroma por via biotecnológica está no mesmo ser considerado natural, e com o mercado consumidor cada vez mais exigente e preocupado com a saúde o uso de aditivos naturais nos alimentos é uma forma de agregar valor ao produto (MEDEIROS, 1998).

Entre os compostos mais importantes na indústria de aromas de alimentos destacam-se os ésteres, que conferem aromas de flores e frutas a alimentos fermentados. Ésteres são produzidos em pequenas quantidades por alguns microrganismos. Os ésteres são compostos importantes de aromas de frutas e nelas estão presentes em baixas concentrações (em torno de 1 a 100 ppm). Alguns microrganismos são capazes de sintetizar 3-metilbutil 3-metilbutirato, que apresenta aroma de maçã (MARQUES; PASTORE, 1999).

4.1 PERFIL DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS

O aroma de um alimento é resultante do estímulo aos receptores olfativos realizado por uma complexa combinação de compostos voláteis, composta por um grande número de substâncias orgânicas, presentes em concentrações muito pequenas, da ordem de ppm ou até ppb que variam grandemente quanto à sua natureza química. A intensidade e qualidade de um aroma são dependentes do “*threshold*” das moléculas, ou seja, da concentração mínima para sua percepção. O olfato humano possui um sistema bastante sensível e alguns compostos podem ser reconhecidos em concentrações molares da ordem de 10^{-18} (FACUNDO, 2009; MONTEIRO, 1984).

Para Ferreira *et al* (2003) e Baldwin *et al* (2000) a volatilidade e a percepção de compostos aromáticos são significativamente afetadas pela composição química de diferentes produtos, que podem mascarar o odor devido a alguns compostos de impacto presentes em concentrações acima de seus limiares de percepção e favorecer a percepção de outras moléculas presentes em concentrações menores do que seus limiares de percepção.

Cortes e Blanco (2011) tendo calculado a contribuição dos compostos voláteis para o aroma global de vinho de uva da variedade Treixadura, utilizando o valor da atividade de odor (VAO), obtiveram resultados que indicaram entre nove compostos que tinham relevância significativa o octanoato de etila, hexanoato de etila e acetato de isoamila como os mais influentes para os aromas secundários destes vinhos. No entanto, acrescentaram que alguns compostos que apresentaram concentrações inferiores ao limiar de odor, podem contribuir para o aroma do vinho devido aos efeitos sinérgicos com os outros compostos.

Os microrganismos que são capazes de produzir aromas geralmente sintetizam uma variedade muito complexa de substâncias em diferentes meios de cultivo. Dentre os compostos químicos formados podem ser citados os seguintes grupos: alcoóis, ésteres, lactonas, terpenos, carbonilas, ácidos, aldeídos e cetonas (MEDEIROS, 2003).

A Tabela 1 apresenta algumas classes de compostos voláteis, seus respectivos aromas e limiares de percepção.

Tabela 1 - Classes de compostos de aromas e seus limites de percepção de odor

CLASSE	COMPOSTO	AROMA	LIMIAR DE PERCEPÇÃO (ppb)
Álcoois	(R) 2-metil-1-butanol	Fermentado, gorduroso, fresco, éter	ND
	Trans-2-hexenol	Fruta	ND
	Cis-hexenol	Grama fresca cortada	400
Aldeídos	Etanal (acetaldéido)	Pungente, nota de noz, alcoólico quando diluído	15 – 120
	(S) 2-metil-butanal	Pungente, fruta, fresco	ND
	Hexanal	Fruta não amadurecida	4,5 - 5,0
	n-octanal	Amargo, fruta cítrica	0,7
Ácidos carboxílicos	(S) ácido-2-metil-butanóico	Fruta, doce	ND
	(R) ácido-2-metil-butanóico	Queijo, doce	ND
Ésteres	Butanoato de etila	Fruta de abacaxi	1
	Acetato de etila	Éter, conhaque	5000
	Propionato de etila	Fruta, nota de rum, doce	10
	Valerato de etila	Forte, fruta, maçã	1,5 - 5,0
	Octanoato de etila	Fruta, doce	15
	Dodecanoato de etila	Gordura, óleo, floral	2000

Nota: ND - não detectado

Fonte: Simões; Waszczynskyj e Wosiacki (2009)

4.2 AROMAS PRIMÁRIOS DA MAÇÃ

A qualidade sensorial em frutas consiste na somatória de muitas propriedades como doçura, acidez, aroma, cor e firmeza determinados durante o processo de amadurecimento das mesmas (FACUNDO, 2009; ALTISENT *et al*, 2008).

O desenvolvimento da qualidade sensorial de frutas depende de diversos fatores, como a variedade, condições de crescimento, estágio de colheita e condições de armazenamento. Durante o amadurecimento, muitas mudanças na composição da fruta ocorrem, incluindo a síntese e degradação de pigmentos, mudanças na concentração de ácidos orgânicos e açúcares, e o acúmulo de compostos voláteis. Estas mudanças contribuem para percepção global da qualidade, pelo consumidor, a qual inclui aparência, textura, aroma e sabor (DEFILIPPI *et al*, 2009).

Na maçã, o perfil de aroma contém mais de 300 compostos voláteis, identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, incluindo principalmente ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e, destes, os ésteres são quantitativa e qualitativamente, o mais importante composto volátil que contribui para o aroma de maçã (DIXON; HEWETT, 2000; DIMICK; HOSKIN, 1982). Entretanto, a contribuição de um composto ao aroma global de uma fruta, depende do seu limiar de odor (nível no qual um composto pode ser detectado pelo cheiro) e da sua concentração na fruta. O valor de atividade de odor (VAO) define a

razão entre a concentração de um composto e seu limiar de percepção (FERREIRA *et al*, 2003; BALDWIN *et al*, 2000).

Fellman *et al* (2000) acrescentam que o perfil aromático da fruta muda durante o seu desenvolvimento de uma abundância de aldeídos voláteis, por exemplo, Z-2-hexanal, para um perfil dominado por ésteres. Defilippi *et al* (2009) complementam afirmando que um pequeno número desses compostos, com diferentes limiares e concentrações, determina o aroma característico de cada cultivar, sendo que alguns voláteis são encontrados em baixas concentrações, mas geram uma contribuição significativa ao aroma final, como por exemplo, 2-metilbutil butanoato.

Janzantti; Franco e Lanças (2000) investigaram os compostos voláteis da maçã da cultivar Fuji por 2 anos consecutivos e encontraram 84 compostos. Destacaram que a classe química predominante de compostos voláteis foi a dos ésteres, compreendendo, butanoato de metila, acetato de isobutila, 2-metil butanoato de metila, butanoato de etila, propionato de propila, acetato de butila, 2-metil butanoato de etila, acetato de 2-metil butila, butanoato de propila, valerato de etila, propionato de butila, acetato de amila, hexanoato de metila, 2-metil butanoato de propila, butanoato de butila, hexanoato de etila, acetato de hexila, acetato de ciclo hexila, 2-metil butanoato de butila, hexanoato de propila, propionato de hexila, 2-metil butanoato de amila, hexanoato de butila, butanoato de hexila, 2-metil butanoato de hexila, hexanoato de isoamila, hexanoato de hexila e octanoato de isoamila.

Young *et al* (1999; 1996) identificaram na maçã Royal Gala 30 compostos voláteis aromáticos e listaram como compostos majoritários desta cultivar o butanoato de etila, o acetato de butila, o acetato de 2-metil-butila, o butanol, o hexanoato de etila e o hexanol. Por outro lado, Mattheis, Buchanan e Fellman (1998) encontraram na maçã da cultivar Gala um total de 20 ésteres voláteis, entretanto, concluíram que somente uma pequena parte destes compostos tem efeito na qualidade sensorial aromática da fruta.

Percebe-se que diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com cultivares específicas de maçãs, para identificar os compostos aromáticos presentes tanto na fruta *in natura*, quanto em produtos obtidos a partir de seu processamento. Simões; Waszczynsky e Wosiacki (2009) elaboraram um resumo dos principais compostos voláteis encontrados por diversos autores na maçã, no suco e na sidra, apresentado no Quadro 1.

MAÇÃ	SUCO	SIDRA
Hexanal	2-metil butanoato de amila	1-butanol
1-hexanol	2-metil butanoato de butila	1-propanol
Butilacetato	2-metil butanoato de etila	1-Hexanol
Hexilacetato	2-metil butanoato de hexila	Etil Acetato
2-Metilbutilacetato	2-metil butanoato de metila	Etil hexanoato
2-Metilpropilacetato	2-metil butanoato de propila	Metanol
Butil butanoato	Acetato de 2-metil butila	Etil lactato
Butil propionato	Acetato de amila	Álcool Isoamílico
Etil 2-metilbutanoato	Acetato de butila	Álcool Amílico
Etil butanoato	Acetato de ciclo hexila	2-metil butil acetato
Butilhexanoato	Acetato de hexila	Butil Acetato
Etilhexanoato	Acetato de isobutila	Butil butanoato
Hexil hexanoato	Butanoato de butila	Etil 2-metil butanoato
2-metilbutil butanoato	Butanoato de etila	Etil butanoato
2-metil-1-propanol	Butanoato de hexila	Hexanal
Ácido Acético	Butanoato de metila	Hexil acetato
Etilacetato	Butanoato de propila	Hexil butanoato
Hexil 2-metilbutanoato	Hexanal	Hexil-2-metil-butanoato
Hexil butanoato	Hexanoato de butila	Pentil acetato
Hexil propanoato	Hexanoato de etila	α -farnesene
Metil 2-metilbutanoato	Hexanoato de hexila	
Metil butanoato	Hexanoato de isoamila	
Pentil acetato	Hexanoato de metila	
Propilacetato	Hexanoato de propila	
Propil hexanoato	Octanoato de isoamila	
	Propanoato de hexila	
	Propionato de butila	
	Propionato de propila	
	Valerato de etila	
	α -farneseno	

Quadro 1 - Principais compostos voláteis encontrados na maçã, suco e sidra

Fonte: Simões; Waszczynskij e Wosiacki (2009)

De acordo com Meroy (1968 *apud* JANZANTTI; FRANCO e WOSIACKI, 2003) a qualidade do suco de maçã depende das características do sabor da fruta. São muitos os fatores que afetam a composição e concentração desses compostos voláteis: condições ambientais, variedade, grau de maturação da matéria-prima, etapas do processamento (prensagem, tratamento enzimático, clarificação e tratamentos térmicos) e condições de armazenamento. As diferentes etapas do processamento podem causar mudanças no perfil do aroma do produto final quando comparado com a fruta fresca (JANZANTTI; FRANCO e WOSIACKI, 2003).

4.3 AROMAS SECUNDÁRIOS EM FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA

De acordo com a procedência do aroma em vinhos, considera-se como primário, o aroma resultante de compostos procedentes da própria fruta. O aroma secundário, considerado o que apresenta um maior número de compostos, refere-se aos compostos formados durante o processo de fermentação do mosto, pela ação de leveduras e bactérias. Por fim, o aroma terciário “o *bouquet*” é o que se forma durante a conservação e envelhecimento da bebida (SUÁREZ LEPE, 1997). Estas considerações são aplicáveis não somente para vinhos, mas para qualquer bebida fermentada.

Várias pesquisas têm investigado a influência das espécies de leveduras na formação de compostos aromáticos em processos fermentativos, tanto em meios sintéticos quanto naturais para a produção de diferentes bebidas alcoólicas (ANDORRA *et al*, 2010; RODRÍGUEZ *et al*, 2010; VIANA *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2008; CIANI; BECO e COMITINI, 2006; VILANOVA; SIEIRO, 2006; XU *et al*, 2006; XUFRE *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2005; ROJAS *et al*, 2003; ROMANO *et al*, 2003; ZOHRE e ERTEN, 2002;).

O aroma de bebidas alcoólicas é complexo, com mais de 400 compostos químicos diferentes, que incluem ácidos, ésteres, compostos carbonílicos, acetatos, fenóis, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, compostos de enxofre, lactonas, açúcares, além de álcoois e uma série de outros compostos não classificados que estão listados na Tabela 2 (DICKINSON, 2003; GARAFOLO, 1992; BERRY, 1995, 1989; SUOMALAINEN; LEHTONEN 1978, 1979).

O aroma original de muitas bebidas alcoólicas é produzido por leveduras. Com algumas exceções são frequentemente o resultado de um padrão ou proporções específicas dos componentes listados anteriormente, e não causado pela presença, ausência ou uma concentração específica de um ou alguns componentes (NOBLE, 1978).

Tabela 2 - Número de compostos aromáticos identificados em bebidas alcoólicas

Composto	Número	Taxa de Contribuição (%)
Alcoóis	38	9,34
Ácidos	80	19,66
Ésteres	118	28,99
Compostos carbonílicos	41	10,07
Acetais	17	4,18
Fenóis	41	10,07
Hidrocarbonetos	11	2,70
Compostos nitrogenados	18	4,42
Compostos sulfurosos	11	2,70
Lactonas	17	4,18
Açúcares	4	0,98
Compostos não classificados	11	2,70
Total	407	100,00

Fonte: adaptado de ABBAS (2006)

O aroma tem um papel significativo na qualidade do fermentado de maçã e da sidra (MANGAS *et al*, 1996). A fermentação alcoólica do mosto de maçã realizada somente com leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. proporciona resultados sensoriais como aroma neutro e/ou pouco típico, porém com a presença da cepa *Hanseniaspora* sp. aparecem notas sensoriais como frutada, ou seja, com aroma de frutas, com a presença de ésteres, como acetato de etila e fenil-etila (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010).

As leveduras oxidativas ou não-*Saccharomyces* são conhecidas pela sua contribuição na produção de compostos voláteis aromáticos, principalmente ésteres em bebidas fermentadas. Segundo Viana *et al* (2008) as leveduras do gênero *Hanseniaspora* sp. são as melhores produtoras de ésteres de acetato, que são efetivos para a qualidade aromática dos vinhos mesmo em pequenas quantidades (NYKANEN, 1986). Ciani; Beco e Comitini (2006), Rojas *et al* (2003) e Bilbao *et al* (1997) também destacam que os ésteres formados em fermentações são os maiores impactantes no aroma dos produtos.

Compostos voláteis são geralmente metabólitos secundários, isto é, substâncias produzidas pelas leveduras, mas que não são essenciais para o seu metabolismo, conseqüentemente, diferenças significativas na sua produção têm sido demonstradas pelo uso de diferentes gêneros, espécies e variedades. Além da levedura, vários outros fatores como condições de cultivo, composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação e aeração, foram identificados como fatores determinantes do tipo e da quantidade dos compostos aromáticos produzidos (MARQUES, PASTORE, 1999; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979).

Durante a fermentação, as leveduras sintetizam um grande número de compostos que contribuem significativamente para o aroma e sabor dos alimentos conforme pode ser

observado na Figura 2 (BERRY, 1995; SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979). Os maiores grupos de compostos de aroma sintetizados por leveduras consistem de álcoois, ácidos graxos e seus ésteres (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1978, 1979). Estes são geralmente compostos com um peso molecular de menos de 300 (NOBLE, 1978).

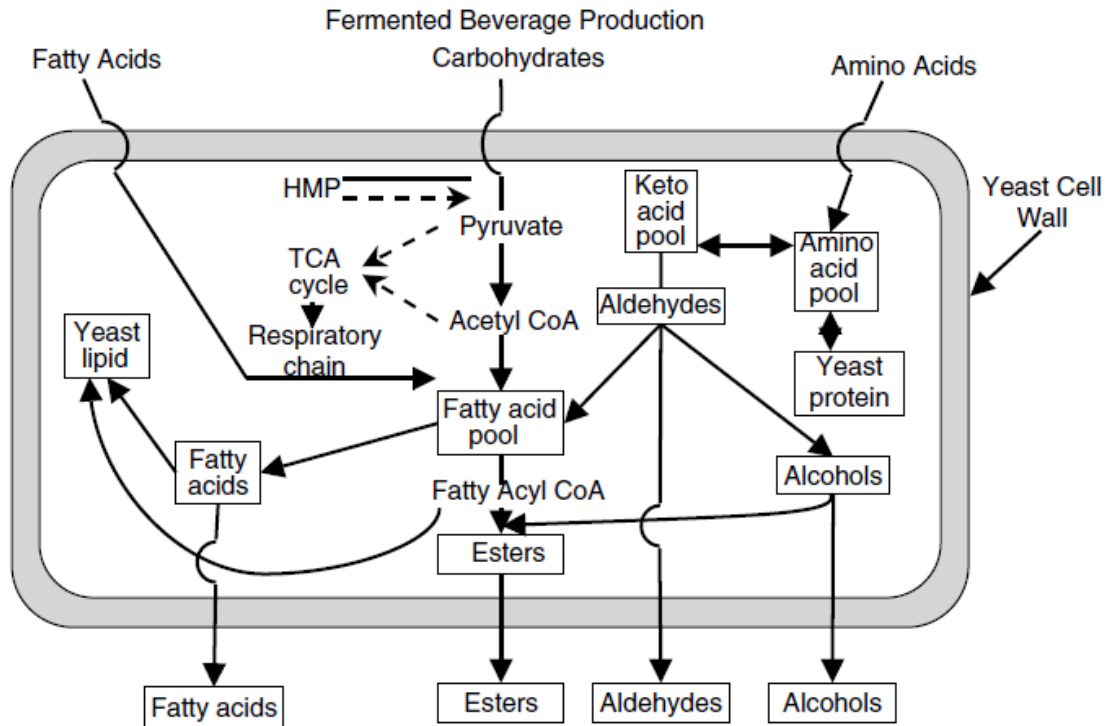


Figura 2 - Rotas básicas pelas quais as leveduras formam os principais compostos de *flavour* durante a fermentação
Fonte: ABBAS (2006)

Para Rojas *et al* (2001) o sabor e aroma frutados característicos de bebidas alcoólicas, do vinho e da uva são principalmente derivados de uma mistura de acetato de hexila, caproato e caprilato etílico (maçã como aroma), acetato de isoamila (banana como aroma), e 2-feniletil acetato (frutado e floral). Viana *et al* (2008) afirmam que os ésteres de acetato, que são efetivos para a qualidade aromática dos vinhos mesmo em pequenas quantidades (NYKANEN, 1986).

De acordo com Leguerinel *et al*, (1987), o isobutanol aumenta os aromas frutados e perfumados e o 2-3-butanodiol apresenta ação inibidora sobre o aroma de sidras. Segundo dos Santos (2011) os compostos voláteis majoritários em fermentado de maçã e sidra que contribuem para o aroma do produto, podem ser resumidos conforme apresenta o Quadro 2.

COMPOSTO AROMÁTICO	DESCRIÇÃO
Álcoois isoamílicos	Frutado
Etanal	Pungente, alcoólico
2-fenil-etanol	Rosas, mel
Hexanol	-
Álcool isobutílico	Fermentado
Acetato de etila	Abacaxi
Acetato de 2-fenil-etila	Rosas, floral
Acetato de hexila	Frutado, floral
Acetato de isoamila	Frutado
Butirato de etila	Abacaxi
Lactato de etila	-
Octanoato de etila	Frutado, doce
Succinato de dietila	-
Decanoato de etila	Frutado, uva
Dodecanoato de etila	Gordura, óleo, floral
Ácido butírico	Ranço, queijo
Ácido octanóico	Doce, queijo

Quadro 2 - Compostos voláteis majoritários do fermentado de maçã e sidra
Fonte: Santos (2011)

Para Picinelli *et al* (2000) o aroma da sidra resulta de uma combinação de alcoóis superiores, tais como os amílicos, 2-fenil-etanol, butanol, 2-3 butanodiol, e isobutanol, e ésteres como o acetato de etila. Alguns desses compostos são próprios da maçã como o butanol, enquanto que outros como os alcoóis amílicos e o acetato de etila são produtos da fermentação.

4.4 MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS

A etapa de isolamento dos compostos voláteis do aroma é crítica, já que esses constituintes normalmente são termolábeis. Quando submetidos a uma determinada temperatura, podem sofrer uma série de reações químicas indesejáveis, como rearranjos e oxidações. Assim, em muitos casos, o isolado de compostos de aroma pode ter uma composição muito diferente daquela originalmente presente na amostra. Dessa forma, os métodos de isolamento devem ser eficientes e brandos, simples, rápidos e de baixo custo, compreendendo, se possível, uma única etapa que separe os componentes voláteis da matriz do alimento ao mesmo tempo em que os concentre e com a menor manipulação possível (GARRUTI, 2001).

Franco e Janzantti (2003) reportaram a existência de duas abordagens para o isolamento dos compostos voláteis de um alimento, a Análise Total, que compreende a análise de todos os compostos voláteis presentes na matriz do alimento, e a Análise do *Headspace*, que envolve apenas a análise dos componentes voláteis presentes na fase gasosa em equilíbrio com a amostra (líquida ou sólida), representando mais fielmente o que é percebido pelo olfato.

A escolha da técnica a ser utilizada para isolamento dos compostos voláteis depende do tipo de amostra, das informações e sensibilidade necessárias (quantitativas ou qualitativas), da necessidade de automação, e ainda do orçamento disponível (SLACK *et al apud* MITRA, 2003).

Diversas formas de extração dos compostos aromáticos têm sido utilizadas para os estudos em sidra, como extração em fase sólida (SPE), *purge and trape* ou *headspace* dinâmico (P&T ou DHS), injeção direta, extração líquido-líquido (LLE), evaporação de solvente assistida (SAFE), *headspace* estático (SHS), microextração em fase sólida (SPME) (VERSINI *et al*, 2009; PENG *et al*, 2009, 2008; MADRERA *et al*, 2008; XU *et al*, 2007; MADRERA; ALONSO, 2005; BOYLSTON *et al*, 2003; MANGAS *et al*, 1996).

Mamede e Pastore (2006) sugerem a combinação de técnicas de extração para obter um extrato representativo dos voláteis de uma amostra. Em trabalho desenvolvido verificaram que procedimentos como *headspace* dinâmico e extração líquido-líquido são métodos complementares na determinação de perfis aromáticos em fermentados, contudo, cada um deles contém desvantagens com relação à qualidade do extrato obtido.

O procedimento de *headspace* dinâmico ou “*purge and trape*” há uma coleta contínua dos compostos voláteis, realizada por um sistema a vácuo ou pela passagem de um gás inerte. Uma armadilha, recheada com material adsorvente, coleta e concentra os compostos voláteis. Nesse sistema, as condições ótimas de coleta dos compostos voláteis dependem do tempo de captura, da dimensão e tipo de polímero da armadilha. Posteriormente, os compostos voláteis são eluídos da armadilha por um solvente orgânico adequado, ou são desorvidos termicamente (THOMAZINI; FRANCO, 2000). Para Sides *et al* (2000) a dificuldade do *headspace* dinâmico reside na dessorção dos voláteis, pois os compostos podem ser degradados ou perdidos.

Na técnica do *headspace* ou *headspace* estático, a fase de vapor onde estão concentrados os compostos voláteis, deve ser coletada com auxílio de uma seringa após ocorrer o equilíbrio da fase gasosa com a fase sólida ou líquida da amostra, e injetada

diretamente no cromatógrafo. Desta maneira, há pouco manuseio da amostra e a perda dos voláteis é minimizada. No entanto, compostos de alto ponto de ebulição e encontrados apenas em traços não são, por esta técnica, captados com facilidade (FRANCO; JANZANTTI, 2003; THOMAZINI; FRANCO, 2000).

O princípio de extração líquido-líquido consiste na distribuição da amostra entre dois solventes imiscíveis, em que o analito e a matriz têm diferentes solubilidades. As principais vantagens desta técnica são a ampla disponibilidade de solventes, e o uso de aparelhos de baixo custo. Esta técnica auxilia no isolamento de produtos e pode ser utilizada para purificação parcial de solutos, quando utilizado no modo de múltiplos estágios (HARRISON *et al.*, 2003; DEAN, 1998).

A microextração em fase sólida (SPME) consiste em um método de extração e introdução de amostra, desenvolvido por Pawliszyn e colaboradores em 1989 e comercialmente disponíveis em 1993. O dispositivo SPME consiste em um pedaço de fibra de sílica fundida com 10 mm ou 20 mm de comprimento e diâmetro de até cerca de 160 µm, recoberta com filmes de até 100 µm de espessura de solventes poliméricos como PDMS (polidimetilsiloxano) e poliacrilato, ou de dispersões de sólidos adsorventes como Carboxen (carvão ativo grafitizado) ou DVB (resina poliestireno-divinilbenzeno) em aglutinantes poliméricos. Essa fibra recoberta deve ser fixada na ponta de um microtubo de aço inox adaptado a uma agulha hipodérmica, formando o conjunto de fibra para SPME. Para sua utilização, o conjunto de fibra precisa ser montado em um aplicador (*holder*) similar a uma microseringa convencional. A pressão no êmbolo do *holder* faz a fibra de sílica deslocar-se no interior da agulha, permitindo sua exposição na amostra. Existem duas formas para amostragem de compostos orgânicos voláteis por SPME, direto da amostra e do *headspace* (VALENTE; AUGUSTO, 2000; ZHANG; PAWLISZYN, 1993; PAGE; LACROIX, 1993; BERLARDI; PAWLISZYN, 1989;).

Para Dean (1998) microextração em fase sólida ou SPME é o processo pelo qual uma substância é adsorvida na superfície de uma fibra revestida de sílica, configurando-se num método de concentração. Na sequência há dessorção dos analitos em um instrumento adequado para a separação e quantificação. A fase mais importante deste processo de dois estágios é a adsorção de analitos na fibra, portanto a escolha do adsorvente é essencial, pois deve ter uma forte afinidade para os compostos orgânicos alvo, de modo que a pré-concentração pode ocorrer a partir de qualquer amostra aquosa ou da sua fase gasosa.

McLaren *et al* (1995), comentam que são muitas as variáveis que devem ser consideradas no processo de extração por SPME como: a espessura do revestimento de fibra, as condições físicas do revestimento de fibra (rachaduras, contaminação); a umidade na agulha; a temperatura de extração; os componentes da matriz da amostra; o tipo de agitação; o tempo de amostragem (especialmente importante se o equilíbrio não é atingido); o volume de amostra e volume do *headspace* no frasco, e, ainda, o tempo decorrido entre a extração e análise propriamente dita.

Os mesmos autores comentam que na etapa de dessorção da fibra no GC, diversos fatores precisam ser considerados como a geometria da entrada do GC, bem como do tipo de revestimento do pórtilco de injeção; do volume; da temperatura de dessorção; da temperatura inicial da coluna e também de suas dimensões; da posição da fibra na entrada do GC; das possíveis contaminações na entrada do GC; da estabilidade do detector e por fim, do fluxo do gás de arraste utilizado.

Para Slack *et al* (*apud* MITRA, 2003) a análise por SPME tem várias vantagens na análise de compostos orgânicos voláteis, que podem assim ser resumidas: instrumentos adicionais ou hardwares não são necessários; o custo de fibras é baixo quando comparado com o custo de outros métodos de extração de analitos voláteis; as fibras podem ser reutilizadas milhares de vezes, dependendo da extração e das condições de dessorção; o SPME requer mínimo treinamento para começar, embora possa haver muitas variáveis envolvidas no desenvolvimento e validação de um método; é portátil e dispositivos de amostragem de campo estão prontamente disponíveis; oferece uma variedade de revestimentos químicos de fibras, podendo ser aplicado a uma grande variedade de analitos orgânicos voláteis.

Seja qual for a técnica utilizada para o isolamento dos compostos aromáticos, a mistura complexa de compostos voláteis, requer para a sua separação a aplicação de metodologias ou técnicas bastante seletivas, sensíveis e eficientes (THOMAZINI; FRANCO, 2000).

Neste sentido, a cromatografia gasosa consiste em um método físico de separação diferenciada dos componentes de uma mistura através de uma fase gasosa móvel sobre um sorvente estacionário (AQUINO NETO; NUNES, 2003). A pesquisa do aroma e sabor recebeu um grande impulso com a introdução da espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa. Assim, CG-EM tem se tornado a principal ferramenta na pesquisa do sabor e aroma, uma vez que aliou duas técnicas eficientes, uma de separação e outra de

identificação. Nesse sistema, a saída da coluna capilar é introduzida diretamente na fonte de íons do espectrômetro de massas, o qual funciona como um detector, ou seja, detecta, quantifica e identifica cada uma das substâncias que estão eluindo da coluna cromatográfica (GARRUTI, 2001).

REFERÊNCIAS

ABBAS, C.A. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. In: QUEROL, A.; FLEET, G.H. (Eds.): **Yeasts in food and beverages**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. Chapter 10, p.285-334.

ABPM (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ). **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: 14 set. 2011.

ALTISENT, R.; GRAELL, J.; LARA, I.; LÓPEZ, L.; ECHEVERRÍA, G. Regeneration of volatile compounds in fuji apples following ultra low oxygen atmosphere atorage and its effect on sensory acceptability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.8490-8497, 2008.

ANDORRA, I.; BERRADRE, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVEZARZOSO, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. **European Food and Residual Technology**, v.231, p.215-224, 2010.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C. L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, 2007.

BALDWIN, E. A.; SCOTT, J. W.; SHEWMAKER, C. H. K.; SCHUCH, W. Flavour trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **Horticultural Science**, v.35, p.1013-1021, 2000.

BALEIRAS COUTO, M.M.; REIZINHO, R.G.; DUARTE, F.L. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, n.1, p.49-56, 2005.

BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O.F.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v.56, p.322-326, 2008.

BEDRIÑANA R.P.; SIMÓN A. Q.; SUÁREZ VALLES, B. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. **Food Microbiology**, v.27, p.503-508, 2010.

BEECH, F. W. English Cidermaking: technology, microbiology and biochemistry. In: BEECH, F.W. (Ed.). **Progres in Industrial Microbiology**. Long Ashton. 1993. p.133-213.

BERLARDI, R; PAWLISZYN, J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. **Water Quality Research Journal of Canada**, v.24, p.179-181, 1989.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H, PIGGOTT, JR. **Fermented beverage production**. Glasgow, (UK): Blackie, 1995. p.32-44.

BERRY, D. R. Manipulation of flavor production by yeast: physiological and genetic approaches. In: PIGGOTT, J.R.; PATERSON, A. (Eds.). **Distilled beverage flavour**. Chichester (UK): Harwood, 1989. p.299-307.

BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter of Applied Microbiology**, v.24, p.37-39, 1997.

BOEKHOUT, T.; BOSBOOM, R.W. Karyotyping of *Malassezia* yeasts: taxonomic and epidemiological implications. **Systematic and Applied Microbiology**, v.17, p.146-153, 1994.

BOYLSTON, T. D.; WANG, H.; REITMEIER, C. A.; GLATZ, B. A. Effects of processing treatment and sorbate addition on the flavor characteristics of apple cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.7, p.1924-1931, 2003.

BRANDÃO, L.R.; LIBKIND, D.; VAZ, A.B.M.; ESPÍRITO SANTO, L.C.; MOLINÉ, M.; GARCÍA, V.; BROOCK, M.V.; ROSA, C. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.76, n.1, p.1-13, 2011.

BRASIL. **Resolução nº 04/88 - CNS/MS**, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1995. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, 19 dez. 1988. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cns.pdf>. Acesso em: 18 nov.2011.

BRASIL. Casa Civil. **Decreto nº 6871 de 04 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8918 de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, 5 jun.2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>. Acesso em: 15 jul. 2010.

CARRASCO, P.; QUEROL, A. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Archives of Microbiology**, v.175, p.450-457, 2001.

CASAL, M.; SCHULLER, D.; PAIS, C. **Métodos moleculares de identificação de leveduras do vinho**. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2237/1/U7.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2010.

CAVALCANTE, S.C.; FREITAS, R.S.; VIDAL, M.S.M.; DANTAS, K.C.; LEVI, J.E.; MARTINS, J.E.C. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102-1, p.41-47, 2007.

CHAROENCHAI, C.; FLEET, G. H.; HENSCHKE, P. A.; TODD, B. E. N. Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.3, p.2-8, 1997.

CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNIC, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**, v.26, n.8, p.801-808, 2009.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Itália, v.108, p.239-245, 2006.

CIANI, M.; FATICHENTI, F. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.203-206, 1999.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annual Microbiology**, 2010.

CIANI, M.; PICCIOTTI, G. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. **Biotechnology Letters**, v.17, p.1247-1250, 1995.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n.4, p.925-932, 2011.

COTON, E.; COTON, M.; LEVERT, D.; CASAREGOLA, S.; SOHIER, D. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, n.108, p.130-135, 2006.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. **Fungal Biodiversity**. Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009.

DEAK, T. Detection, enumeration and isolation of yeasts. In: BOEKHOUT, T; ROBERT, V. **Yeast in food. Beneficial and detrimental aspects**. Cambridge: CRC Press, 2003.

DEAN, J.R. **Extraction methods for environmental analysis**. New York : John Wiley & Sons, 1998.

DEFILIPPI, B.G.; MANRIQUEZ, K.L.; GONZÁLEZ-AGÜERO, M. Aroma volatiles: biosíntesis and mechanisms of modulation during fruit ripening. **Advances in Botanical Research**, v.50, 2009.

DICKINSON, J. R. The formation of higher alcohols. In: SMART, K.A. (Ed.). **Brewing yeast fermentation performance**. 2. ed. Oxford (UK): Blackwell, 2003. p.196-205.

DIMICK, P. S.; HOSKIN, J.C. Review of apple flavor-state of the art. **CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v.18, n.4, p.387-409, 1982.

DINIZ-MENDES, L.; BERNARDES, E.; de ARAÚJO, P.S.; PANEK, A.D.; PASCHOALIN, V.M.F. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n. 5, p. 572-578, 1999.

DIXON, J.; HEWETT, E.W. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.28, p.155-173, 2000.

DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; COMITINI, F.; GOBBI, M.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, Short communication, DOI 10.1007/s13213-010-0125-1, 2010.

DRILLEAU, J. F. Produits cidricoles. Quelques mots sur les composés phénoliques (tanins). **Technologie**, v. 23, p. 21-22, 1991.

DRILLEAU, J.F. La cidrerie. In: BOUGEOIS, C.M. ; LARPENT, J.P. **Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires**, p.138-161, 1996.

DRILLEAU, J.F. La sidra. In: BOUGEOIS, C.M. ; LARPENT, J.P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: Acribia, 1995. p.113-123.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. 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.

FACUNDO, H.V.V. **Mudanças no perfil sensorial e de voláteis do suco de abacaxi concentrado durante o processamento**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

FELLMAN, J.K.; MILLER, T.W.; MATTISON, D.S.; MATTHEIS, J.P. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. **HortScience**, v. 35, p. 1026–1033, 2000.

FERNÁNDEZ, M.; ÚBEDA, J.F.; BRIONES, A.I. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.29-36, 2000.

FERREIRA, A.M.; CLÍMACO, M.C.; FAIA, A.M. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.67-71, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.

FERREIRA, V.; PET'KA, J.; AZNAR, M.; CACHO, J. Quantitative gas chromatography-olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative scale as gas chromatography detector. **Journal of Chromatography A**, v.1002, n.1-2, p.169-178, 2003.

FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v.63, p.73-82, 2001.

FLEET, G.H. Growth of yeasts during wine fermentations. **Journal of Wine Research**, v.1, n.3, p.211-223, 1990.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.11-22, 2003.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. p.17-28.

FREYDIERE, A.M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Medical Mycology**, v. 39, p. 9-33, 2001.

GARAFOLO, A. The ester synthesizing activity of yeast under different nutrient conditions. **Rivista di Viticoltura ed Enologia**, v.45, n.3, p.41-58, 1992.

GARRUTI, D.S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. 218 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.

GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavor. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.5-14, 1995.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, n.6, p.949-956, 1999.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukariotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.79, p.6465-6469, 1982.

HARRISON, R.G.; TODD, P.; RUDGE, S.R.; PETRIDES, D.P. **Bioseparations Science and Engineering**. New York: Oxford, 2003.

HEARD, G.M. ; FLEET, G.H. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines, **Food Technology in Australia**, v.38, p.22-25, 1986.

HEARD, G.M.; FLEET, G.H. Growth of natural flora during the fermentation of inoculated wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.727-728, 1985.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CERSOSIMO, M.; LOSCOS, N.; CACHO, J.; GARCIA-MORUNO, E.; FERREIRA, V. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeast of different genera. **Food Chemistry**, v.107, p.1064-1077, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2011.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.523-528, 2003.

JANZANTTI, N.S.; FRANCO, M.R.B.; LANÇAS, F.M. Identificação de compostos voláteis de maçãs (*Malus domestica*) cultivar fuji, por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.2, 2000.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. **South African Society for Enology & Viticulture**, v.24, p.63-69, 2003.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.27, p.15-39, 2006.

KAWAMURA, S.; MURAKAMI, Y.; MIYAMOTO, Y.; KIMURA, K. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Freeze-drying of yeasts. **Methods in Molecular Biology**, v.38, p.31-37, 1995.

KEMPLER, G. M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, 29-51, 1983

KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J.S. **Maintenance of microorganisms**: a manual of laboratory methods. London: Academic Press Inc.; 1984.

KURTZMAN, C.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.; FELL, J. W.; DEAK, T. Methods to identify yeast. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeast in food**: beneficial and detrimental aspects. Cambridge: CRC, 2003.

KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast**: a taxonomic study. 4. ed. Florida: Elsevier, 1998.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, J. Identification of clinically important ascomycetous yeast based on nucleotide divergence in the 5’ end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.5, p.1216-1223, 1997.

LAITILA, A; WILHELMSON, A.; KOTAVIITA, E.; OLKKU, J.; HOME, S.; JUVONEN, R. Yeasts in an industrial malting ecosystem. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.953-966, 2006.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeasts and its importance to wine aroma - a review. **South African Society for Enology & Viticulture**, v.21, p.97-129, 2000.

LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J.F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H. P., J. R., **Fermented Beverage Production**, Blackie Academic & Professional: London, ed. 2, 2003.

LEGUERINEL, J. J; CLERET, C. M.; BORGEOUIS, P.; MAFART, I. Essai d’évaluation des caractéristiques organoleptiques des cidres par analyses instrumentales. **Sciences des Aliments**, v.7, n.2, p.223-239, 1987.

LE QUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F. Fermentation of french cider, the process and yeast species. **Fermentation: food, drink and waste management - the future**. Britt'Atlantic Conference, England. 1993.

LE QUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiologie et technologie du cidre. **Revue des Oenologues**, v.88, p.17-20, 1998.

LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; VAN BROOCK, M.; SAMPAIO, J.P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.313-322, 2003.

LILLY, M.; LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.2, p.744-753, 2000.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.

MADRERA, R. R.; HAVIA, A. G.; GARCÍA, N. P.; VALLES, B. S. Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 2064 – 2069, 2008.

MADRERA, R.R.; ALONSO, J.J.M. Typification of cider brandy on the basis of cider used in its manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.8, p.3071-3075, 2005.

MAGEE, P.T.; BOWDIN, L.; STAUDINER, J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2674-2679, 1992.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must. **Food Chemistry**, v.96, p.586-590, 2006.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Evaluation of the major compounds formed during grape must fermentation by yeast isolated from "Serra Gaúcha" (RS) region. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.3, July/Sept, 2004.

MANGAS, J.; RODRÍGUEZ, R.; MORENO, J.; BLANCO, D. Volatiles in distillates of cider aged in american oak wood. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.268-273, 1996.

MARIANO, P.D.L.S.A. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras: estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica.** 118 f. Tese (Doutorado em Biologia Bucodental - Área de Microbiologia e Imunologia). Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, 2006.

MARQUES, D. B.; PASTORE, G. M. Produção de aromas naturais por microrganismos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.33, n.1, p.80-85, 1999.

MATTHEIS, J. P.; BUCHANAN, D. A.; FELLMAN, J. K. Volatile compounds emitted by 'Gala' apples following dynamic atmosphere storage. **Journal American Society of Horticultural Science**, v.123, p.426-432, 1998.

MCGINNIS, M.R.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. **Applied Microbiology**, v.28, p.218-222, 1974.

MCLAREN, J.W.; METHVEN, B.A.J.; LAM, W.H.; BERMAM, S.S. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry in the production of environmental certified reference materials. **Mikrochimica Acta**, v.119, p.287-295, 1995.

MEDEIROS, A.B.P. **Desenvolvimento tecnológico para a produção e recuperação de bioaromas com características frutais por *Ceratocystis fimbriata* cultivado sobre resíduos sólidos da agroindústria do café.** 87 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.

MEDEIROS, A.B.P. **Produção de compostos voláteis aromáticos por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação no estado sólido.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química - Setor de Tecnologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 1998.

MENDOZA, L. M.; MANCA DE NADRA, M. C.; BRU, E.; FARIAS, M. E. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.229-237, 2009.

MICHEL, A. Production du cidre a la ferme. **Pomme**, v.17, n.9, p.12, 1988.

MICHEL, A.; BIZEAU, C.; DRILLEAU, J.F. Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. Belg. **Journal of Food Chemistry Biotechnology**, Lunuwila, v.45, n.3, p.98-102, 1990.

MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J.M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F.J. LAS; RODRÍGUEZ-VICO, F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.297-304, 2003.

MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. Hoboken (N.J.) John Wiley & Sons, 2003. (Chemical analysis, v.162).

MONTEIRO, C.L.B. **Técnicas de avaliação sensorial**. 2. ed. Curitiba: UFPR, Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, 1984. p.1-19.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, Portugal, v.124, n.3, p.231-238, 2008.

NAGY, S.; CHEN, C.S.; SHAW, P.E. **Fruit juice processing technology**. Auburndale: Agscience, 1993. p.271-317.

NISSEN, P.; ARNEBORG, N. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v.5, p.65-71, 2003.

NOBLE, A.C. Aroma. In: PETERSON M, S.; JOHNSON A, H. **Encyclopedia of food science**. Westport: AVI, 1978. p.50-51.

NOBLE, A. C.; BURSICK, G. F. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 35, p. 110–112, 1984.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola: efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 210 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais). Setor de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.

NOGUEIRA, A.; LE QUERE, J. M.; GESTIN, P.; MICHEL, A.; WOSIACKI, G.; DRILLEAU, J. F. Slow fermentation in french cider processing due to partial biomass reduction. **Journal Institute of Brewing**, v.114, n.2, p.102-110, 2008.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Blücher, v.1, p.113-142, 2010.

NOSEK, J.; HOLESOVA, Z.; KOSA, P.; GACSER, A.; TOMASKA, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v.55, p.497-509, 2009.

NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.37, p.84-96, 1986.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1569-1576, 2005.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs considerando suas avaliações físico-químicas (Dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 28, n. 6, p. 1336-1343, 2004.

PAGE, B.D.; LACROIX, G. Application of solid-phase micro extraction to the *headspace* gas chromatographic analysis of halogenated volatiles in selected foods. **Journal of Chromatography**, v.648, p.199-211, 1993.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnostics and research. **FEMS Microbiology**, v.29, p.817-910, 2005.

PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. A fuzzy comprehensive evaluation for selecting yeast for cider making. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.140-144, 2008.

PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) Fuji apple. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.610-615, 2009.

PÉREZ-NEVADO, F.; ALBERGARIA, H.; HOGG, T.; GIRIO, F. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.336-345, 2006.

PFALLER, M.A. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.1535-1539, 1995.

PICINELLI, A.; SUÁREZ, B.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, R.; CASO-GARCÍA, L. M.; MANGAS, J.J. Chemical characterization of asturian cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3997-4002, 2000.

PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J.A.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, v.21, p.439-447, 2004.

PINHEIRO, D. M.; PASTORE, G. M. Produção biotecnológica de compostos de aromas. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela. 2003. p.195-206.

PITOMBO, R.N.M. Liofilização. In: PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri (SP): Manole, 2005.

PLATA, C.; MILLÁN, C.; MAURICIO, J.C.; ORTEGA, J.M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiology**, v.20, p.217-224, 2003.

PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. **Yeast**, v.16, p.675-729, 2000.

ROBERT, V.; STALPERS, J.; BOEKHOUT, T.; TAN, S. Yeast biodiversity and culture collections. In: ROSA, C.A.; PÉTER, G. (Eds.). **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.

RODRÍGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BARBAGELATA, R. J.; BARDA, N. B.; CABALLERO, A. C. Influence of *Candida pulcherrima* patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.19-25, 2010.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v.86, p.181-188, 2003.

ROJAS, V.; GIL, J.V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.3, p.283-289, 2001.

ROMANCINO, D. P.; DI MAIO, S.; MURIELLA, R.; OLIVA, D. Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.2248-2254, 2008.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.169-180, 2003.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; DOMIZIO, P.; FATICHENTI, F. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.71, p.239-242, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 48, p. 27-36, 1990.

SANTOS, C.M.E. **Influência da microbiota no perfil aromático de fermentado de maçã.** 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2011.

SIDES, A.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, n.5, p.322-329, 2000.

SILVA, J.O.; COSTA, P.P.; RECHE, S.H.C. Yeasts maintenance for freezing at – 20°C. **RBAC**, v. 40, n.1, p. 73-74, 2008

SILVA, N. C. C. **Avaliação do processo biotecnológico e determinação das condições de desalcoholização da bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

SIMÕES, D. R. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Aromas em maçãs, sucos e sidras: uma revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.27, n.1, p.153-172, 2009.

SLACK, G.; SNOW, N.H.; KOU, D. Extraction of volatile organic compounds from solids and liquids. In: MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry.** New Jersey: Wiley-Interscience, 2003. p.183-223. (Chemical analysis, v.162).

SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Fruity flavor production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.35, p.857-861, 2000.

SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M. Isolation and identification of yeasts from natural habitats. In: EVANS, I.H. **Yeast protocols: methods in cell and molecular biology**, v.53, p.1-4, Totowa, NJ, 1996.

SUAREZ LEPE, J.A. **Levaduras vínicas: funcionalidad y uso en bodega.** Madrid: Mundi-Prensa, 1997.

SUÁREZ VALLES, B.; BEDRIÑANA, R.P.; QUEIPO, A.L.; ALONS, J.J.M. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). **Food Microbiology**, v.25, n.5, p.690-697, 2008.

SUÁREZ VALLES, B.; BEDRIÑANA, R.P.; TASCÓN, N.F.; SIMÓN, A.Q.; MADRERA R.R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiology**, v.24, p.25-31, 2007.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN M. Yeast as a producer of aroma compounds. **Dechema Monographs**, v.82, n.1693/1703, p.207-220, 1978.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal Institute of Brewing**, v.85, n.3, p.149-156, 1979.

TAQARORT, N.; ECHAIRI, A.; CHAUSSOD, R.; NOUAIM, R.; BOUBAKER, H.; BENAOUMAR, A.A.; BOUDYACH, E. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.24, p.3031-3038, 2008.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.4127-4138, 1984.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.34, n.1, p.52-59, 2000.

TORIJA, M.J. **Ecologia de levaduras**: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. 260 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, 2002.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, Campinas, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

VAN DER VOSSEN, J. M. B. M.; RAHAQUI, H.; NIJS, M. W. C. M.; HARTOG, B. J. PCR methodes for tracing and detection of yeasts in the food chain. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeast in food**: beneficial and detrimental aspects. Cambridge: CRC, 2003.

VERSINI, G.; FRANCO, M.A.; MOSER, S.; BARCHETTI, P.; MANCA, G. Characterisation of apple distillates from native varieties of Sardinia island and comparison with other Italian products. **Food Chemistry**, v.113, p.1176-1183, 2009.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v.25, p.778- 785, 2008.

VIANA, F.; GILA, J. V.; VALLÉSA, S.; MANZANARES, A. P. Increasing the levels of 2 phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.68-74, 2009.

VILANOVA, M.; SIEIRO, C. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative Xavour compounds in wines from cv. Albariño. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.929-933, 2006.

VOYRON, S.; ROUSSEL, S.; MANAUT, F.; VARESE, G.C.; GINEPRO, M.; DECLERCK, S.; FILIPELLO MARCHISIO, V. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. **Mycology Research**, v.113, p.1027-1038, 2009.

WELSH, F.W.; MURRAY, W.D.; WILLIAMS, R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.9, n.2, p.105-169, 1989.

WOSIACKI, G. Apple varieties growing in subtropical areas: the situation in Paraná - Brazil. **Fruit Processing**, v.5, p.177-182, 2001.

WOSIACKI, G.; CHERUBIN, R. A.; SANTOS, D. S. Cider processing in Brazil. **Fruit Processing**, v.7, n.7, p.242-249, 1997.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Blücher, 2010. v.1, p.113-142.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C. Brazilian apple production: a few years later. **Fruit Processing**, Chicago, v.12, p.472-475, 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v.37, n.1, p.9-22, 2008.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C.; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.3, p.347-352, 2004.

XU, Y.; FAN, W.; QIAN, M. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oregon. v. 55, p. 3051 – 3057, 2007.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.192-196, 2006.

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.376-384, 2006.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998. p.77-100.

YOUNG, H.; GILBERT, J. M.; MURRAY, S. H.; BALL, R. D. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. **Journal of Science Food Agriculture**, v.71, p.329-336, 1996.

YOUNG, H.; ROSSITER, K.; WANG, M.; MILLER, M. Characterization of royal gala apple aroma using electronic nose technology potential maturity indicator. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v.47, p.5173-5177, 1999.

ZHANG, H.; RAN, Y.; LI, D.; LIU, Y.; XIANG, Y.; ZHANG, R.; DAI, Y. *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atrobrunneum* as rare agents of cutaneous infection. **Mycopathologia**, v.169, p.373-380, 2010.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v.65, p.1843-1852, 1993.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, p.319-324, 2002.

CAPÍTULO III - ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS COM APTIDÃO PARA A PRODUÇÃO DE AROMAS EM FERMENTADOS DE MAÇÃS

RESUMO

A maçã representa o fruto de clima temperado mais importante comercializado como fruta fresca tanto no contexto internacional quanto brasileiro. As cultivares Gala e Fuji representam 95% da produção no Brasil. A microbiota silvestre natural das maçãs apresenta uma população de leveduras oscilando de $10 - 10^5$ ufc.cm⁻² ou g, entre espécies *Saccharomyces* sp. e não-*Saccharomyces*. O presente trabalho teve como objetivo isolar cepas de leveduras não-*Saccharomyces* a partir do mosto de maçãs, selecionar e identificar as eminentes produtoras de aromas frutados. Foram coletadas 35 amostras de maçãs das cultivares Gala e Fuji, as quais foram centrifugadas e a partir do mosto bruto foram isoladas colônias de leveduras não-convencionais. A seleção dos isolados ocorreu com o teste de produção de aromas frutados ou florais, desenvolvido em mosto de maçã despectinizado, filtrado e pasteurizado. Das 53 cepas selecionadas como produtoras de aroma frutado ou floral, cinco demonstraram maior potencial na produção do aroma desejado. Para a identificação os isolados foram preliminarmente agrupados com base em suas características morfológicas, fisiológicas e posteriormente, por metodologia molecular, realizou-se o sequenciamento das regiões D1/D2 da subunidade maior do rRNA. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados (GenBank) usando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn). Os resultados da identificação indicaram a presença de dez espécies sendo *Candida oleophila*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Foram obtidas informações valiosas sobre a biodiversidade do mosto de maçãs, onde cinco espécies (*P. anomala*, *P. fermentans*, *H. guilliermondii*, *L. elongisporus* e *C. lusitaniae*) foram pela primeira vez encontradas no ecossistema da maçã. Tais resultados apontam para a necessidade de estudos cuidadosos sobre a possibilidade de utilização dos isolados no setor industrial da maçã sem o comprometimento da saúde do homem.

Palavras-chaves: Identificação. Leveduras não-*Saccharomyces*. Maçãs. Aromas frutais.

ABSTRACT

The apple is the most important fruit of temperate climate, which is marketed as fresh fruit as in the international as in the Brazilian context. The Gala and Fuji cultivar represents 95% of Brazilian production. The natural and wild microbiota of the apples shows a yeast population between 10 to 10^5 ufc.cm⁻² or g, of *Saccharomyces* sp. and non-*Saccharomyces* species. This work aims to isolate non-*Saccharomyces* yeasts strains from apple must, select and identify those that produce fruity aromas. Non-conventional yeast colonies were isolated from 35 samples of Gala and Fuji apples musts. The selection of strains was done by testing for production of floral or fruity aromas in despectinizado, filtered and pasteurized apple must. Of the 53 producing fruity or floral strains selected, five showed the greatest potential to

produce the desired flavor. To identify the strains were preliminarily grouped based on their morphological, physiological and then by molecular methodology, by carried out the sequencing of the D1/D2 regions of the large subunit rRNA. The sequences were compared with the database (GenBank) using the *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn). The identification results indicated the presence of 10 species, which was *Candida oleophila*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* and *Rhodotorula mucilaginosa*. Were obtained valuable information over the biodiversity of the apple must, where five species (*P. anomala*, *P. fermentans*, *H. guilliermondii*, *L. elongisporus* e *C. lusitaniae*) were found for the first time in the apple's ecosystem. These results indicate the need for studies on the possibility of using the isolated in the apple industry without causing harm to human health.

Keywords: Identification. Non-*Saccharomyces* yeast. Apples. Fruity flavors.

1 INTRODUÇÃO

A maçã consiste no fruto de clima temperado mais importante comercializado como fruta fresca tanto no contexto internacional quanto brasileiro, e sua produção firmou-se como uma das atividades mais expressivas do Sul do país ao longo dos últimos 30 anos com a implantação dos pomares comerciais (WOSIACKI, 2001; WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000).

Sabe-se que a produção de fermentado de maçã realizada somente com leveduras fermentativas proporciona resultados sensoriais como aroma neutro e/ou pouco típico, porém com a presença de cepas não-*Saccharomyces* aparecem notas como “sidra frutada” (aromas de frutas) e a presença de ésteres (acetato de etila e fenil-etila). A sensação dos aromas neste tipo de bebida tem se tornado um dos pontos de maior interesse na busca de um fermentado de maçã com elevada qualidade. (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; DRILLEAU, 1996).

Muitos fatores físicos e químicos afetam a sobrevivência e população de leveduras na superfície dos frutos como: acessórios do fruto, disponibilidade de nutrientes, disponibilidade de água e dessecação, tolerância das variações de temperatura, luz solar e irradiação, tolerância de inibidores naturais e agroquímicos e competição com outras espécies microbianas (DICKINSON, 1986; LAST; WARREN, 1972 *apud* FLEET, 2003).

A superfície de maçãs intactas tem população de leveduras variando de 10 a 10⁵ ufc.cm⁻² ou g (BEECH, 1993; RIORDAN *et al*, 2001). As leveduras aumentam sua população em frutas maduras, mas variações nas contagens ocorrem durante o crescimento na macieira e provavelmente refletem a influência do clima, práticas de cultivo e aplicações de fungicidas

(TEIXIDO *et al*, 1999; BEECH; DAVENPORT, 1970; MARSHALL; WALKLEY, 1951 *apud* FLEET, 2003).

Segundo Nogueira *et al* (2007) a população de leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. em mostos de maçãs após a prensagem pode variar de $6,5 \times 10^4$ a $1,35 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ e o de leveduras não-*Saccharomyces* ou apiculadas de $5,5 \times 10^6$ a $2,2 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹. Esta variação está diretamente relacionada com o grau de maturação, injúrias, temperatura e a qualidade fitopatológica das frutas.

Trabalhos têm demonstrado um crescente interesse na aplicação industrial das leveduras não-convencionais, também chamadas de não-*Saccharomyces* ou oxidativas, em função de sua capacidade de contribuir positivamente para o sabor e aroma dos vinhos e da sidra (ANDORRA *et al*, 2010; RODRIGUEZ *et al*, 2010; HERNÁNDEZ-ORTES *et al*, 2008; XU *et al*, 2006; FLEET, 2003; MINGORANCE-CAZORLA *et al*, 2003; BILBAO *et al*, 1997; ROMANO *et al*, 1997), no interesse biotecnológico em sua atividade enzimática (FERNÁNDEZ *et al*, 2000; CHAROENCHAI *et al*, 1997), no uso de suas funções probióticas (TIAGO *et al*, 2009) e ainda em fermentações com culturas mistas (ANDORRA *et al*, 2010; DOMIZIO *et al*, 2010; MENDOZA *et al*, 2009; BELY *et al*, 2008; MOREIRA *et al*, 2008; CIANI; BECO; COMITINI, 2006; ROMANO *et al*, 2003; ROJAS *et al*, 2001).

Segundo Coton *et al* (2006), a identificação de leveduras é importante para o estudo da biodiversidade e dinâmica populacional dos ecossistemas fermentativos, bem como para a seleção de leveduras com potencial tecnológico. As leveduras são normalmente identificadas com base nas suas características fenotípicas (método que inclui reações de fermentação com diferentes açúcares, respostas de crescimento a diferentes fontes de carbono/nitrogênio, caracterização microscópica das células vegetativas e a forma de reprodução) ou a partir de métodos moleculares (KURTZMAN *et al*, 2003).

Atualmente um dos métodos moleculares aplicados na diferenciação entre espécies de leveduras é a amplificação de genes e regiões de informações ribossomal RNA, tais como ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e NTS (*Non-Spacer transcrita*), seguido por análise de restrição com endonucleases (BALEIRAS COUTO *et al*, 2005; ESTEVE-ZARZOSO *et al*, 2001; GRANCHI *et al*, 1999). A sequência da subunidade grande (26S) rDNA, especialmente D1/D2 região, também é aplicada para estudar a filogenia dos diferentes grupos de levedura e é uma ferramenta importante na identificação de leveduras (CHAVAN *et al*, 2009; OSORIO-CADAVID *et al*, 2008; COTON *et al*, 2006; BALEIRAS COUTO *et al*, 2005; ESTEVE-ZARZOSO *et al*, 1999; BOEKHOUT *et al*, 1994).

Assim, o propósito do presente estudo foi isolar leveduras não convencionais de mosto de maçãs produzidas no Brasil, bem como selecionar e identificar aquelas produtoras de aromas com potencial para aplicação em sidrologia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Para a realização do isolamento a matéria-prima consistiu em 35 amostragens (1,5 Kg) de maçãs das cultivares Gala e Fuji adquiridas no comércio local (supermercados e feiras livres) da cidade de Ponta Grossa, Estado do Paraná-PR e de pomares comerciais da cidade de Fraiburgo, Estado de Santa Catarina-SC, durante a safra de 2008. Os meios de cultura e reativos foram de pureza comprovada.

2.2 MÉTODOS

Isolamento das leveduras. As leveduras não-*Saccharomyces* foram isoladas de mostos de maçãs, do mês de maio a dezembro de 2008, utilizando o meio seletivo para leveduras oxidativas, Meio YA-LYS formulado com 11,75 g de extrato de levedura (Himédia), 2,3 g de lisina (Biotec), 20,0 g ágar-ágar (Himédia) e 1000 mL água destilada (KURTZMAN *et al*, 2003). O mosto foi obtido por trituração seguida de centrifugação, em processador de bancada (Juicer Philips Walita). A partir de cada mosto de maçã foram preparadas diluições seriadas até 10^{-4} , em água peptonada a 0,1%, previamente esterilizada em autoclave (Marca Phoenix, Modelo AV75, Série 4726) a 121°C por 15 minutos. As diluições foram semeadas em superfície do Meio YA-LYS e as placas de Petri foram incubadas a 25°C por 48 horas (estufa Quimis, Modelo 316B24, Série 6520). Para a obtenção de culturas puras as colônias obtidas foram diferenciadas visualmente e repicadas no mesmo meio de cultura para purificação e isolamento (CROUS *et al*, 2009; KURTZMAN; FELL, 1998). Os isolados foram conservados em tubos inclinados de Ágar Extrato de Malte e Extrato de Levedura (YMA), à temperatura de 7-10°C, e a recuperação para seleção aconteceu em Caldo Glucose Peptona e Extrato de Levedura (GPYB) (KURTZMAN *et al*, 2003). Foram

acrescentadas aos isolados da maçã duas leveduras isoladas do jambolão (*Syzygium cumini*) doadas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Londrina.

Seleção dos isolados. As maçãs da cultivar Gala (20 Kg) foram selecionadas, lavadas e trituradas em microprocessador (Processador Metvisa, Tipo MPA) e a massa ralada foi acondicionada em pacotes de tela plástica porosa que, sobrepostos, foram submetidos a uma pressão de $3,0 \text{ kgf.cm}^{-2}$ em prensa hidráulica (Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado com pectinase (Pectinex Ultra SP, atividade $9.500 \text{ PGU.mL}^{-1}$, Novozymes do Brasil), a uma proporção de $3,0 \text{ mL.hL}^{-1}$ (120 minutos a $20\text{-}25^\circ\text{C}$) e, após sedimentação, trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo, envasado em garrafas de vidro de 200 mL, lacradas com tampa metálica e pasteurizado ($80\text{-}85^\circ\text{C}/20 \text{ min.}$). (WOSIACKI *et al*, 1989). Para a avaliação da produção de aroma inoculou-se uma colônia isolada das culturas puras obtidas em tubos de ensaio com 20 mL do mosto de maçã obtido e após 72 horas de incubação à 25°C , realizou-se a seleção das cepas produtoras de aromas frutados por análise olfativa simples realizada por três julgadores utilizando a técnica sensorial descritiva do perfil livre (BENASSI; DAMÁSIO; CECCHI, 1998). As cepas selecionadas foram multiplicadas em GPYB e armazenadas em YMA inclinado sob refrigeração (SILVA *et al*, 2010; BOEKHOUT; ROBERT, 2003; LEPE, 1997), para posterior identificação.

Identificação das leveduras. Os isolados de leveduras foram classificados de acordo com o aspecto macroscópico de suas colônias e pela caracterização morfológica realizada com preparações microscópicas coradas (CROUS *et al*, 2009). Foram ainda agrupadas com base em suas características fisiológicas e bioquímicas observadas em testes de assimilação de carbono e nitrogênio de acordo com YARROW, 1998. Posteriormente, os grupos formados a partir das características citadas acima foram submetidos à análise de perfis moleculares (PCR *fingerprinting*) empregando a técnica de PCR mini/microsatélite (MSP-PCR) utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅ (LIBKIND *et al*, 2003).

Extração de DNA. O DNA total foi extraído utilizando a técnica descrita por Brandão *et al* (2011), com adaptações, conforme apresentado a seguir. As colônias foram crescidas em meio YMA (glicose 20 g.L^{-1} , peptona 10 g.L^{-1} , extrato de levedura 5 g.L^{-1} , e ágar 20 g.L^{-1}) a 25°C por 24h. Após esse período, três alçadas de massa celular foram colocadas em tubos plásticos estéreis contendo $600 \mu\text{L}$ de solução tampão de lise ($50 \text{ mmol Tris L}^{-1}$; $250 \text{ mmol NaCl L}^{-1}$; $50 \text{ mmol EDTA L}^{-1}$; 0.3%, w/v SDS; pH 8), e incubados a 65°C por 30 min. Após incubação foi adicionado $700 \mu\text{L}$ de CIA (clorofórmio/ álcool isoamílico,

na proporção 24:1, respectivamente) e agitado vigorosamente por 5 minutos. A seguir a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 7 minutos. Seguiram mais dois procedimentos de extração, o primeiro com 200 µL de SDS + 650 µL de CIA, o segundo apenas com 650 µL de CIA, o tempo e velocidade de centrifugação foram o mesmo entre ambos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 100 µL de etanol 96 % gelado, homogeneizado por inversão e centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos. Depois de retirado o etanol e deixado secar *overnight*, o DNA foi ressuspenso em 100 µL de TE pH 8,0.

PCR *fingerprinting*. O oligonucleotídeo sintético (GTG)₅ foi utilizado nos experimentos MSP-PCR. As reações de PCR foram realizadas de acordo com Libkind *et al* (2003). Os isolados com padrões de banda idênticos de DNA foram agrupados, e considerados como da mesma espécie (GADANHO; SAMPAIO, 2002; SAMPAIO *et al*, 2001). Isolados de cada grupo molecular formado pelo PCR-*fingerprinting* tiveram os domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA sequenciados. Isolados fisiologicamente distintos e com padrões únicos (apenas um isolado com determinado perfil molecular) após a análise do PCR *fingerprinting* também foram selecionados para a direta identificação pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

Sequenciamento. Os domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA foram amplificados segundo os protocolos previamente descritos por Lachance *et al* (1999) utilizando os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os produtos de PCR obtidos após as reações foram purificados e sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBacetm (Amersham Biosciences, USA). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas na base de dados GenBank utilizando o “Basic Local Alignment Search Tool” (ALTSCHUL *et al*, 1997).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados obtidos a partir das 35 amostras de mosto de maçãs, coletadas de maio a dezembro de 2008, pertencentes às cultivares Gala, Fuji evidenciaram basicamente os mesmos tipos morfológicos e macroscópicos de colônias, apresentando cores, tamanho e aspecto variado, conforme se verifica na Figura 1.

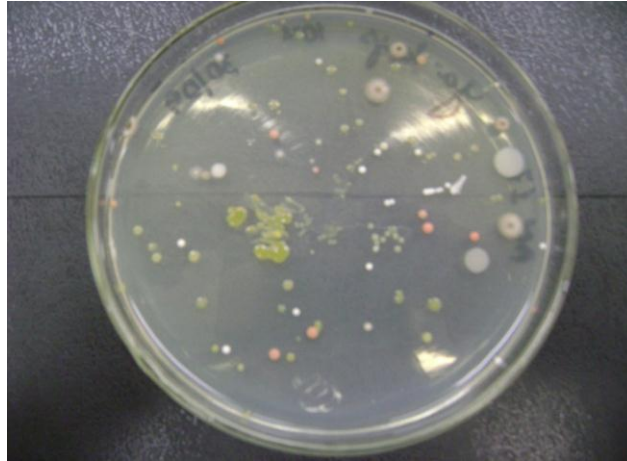


Figura 1 - Aspectos macroscópicos das colônias de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas

Estas características macroscópicas de textura, superfície, margem e cor das colônias nas placas também foram utilizadas por diversos autores que isolaram cepas de leveduras a partir de uvas, mostos de uva, bebida fermentada de milho, destilarias de cachaça e de sidra francesa (CHAVAN *et al*, 2009; OSORIO-CADAVID *et al*, 2008; ROMANCINO *et al*, 2008; SANGORRÍN *et al*, 2007; COTON *et al*, 2006; RASPOR *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2005).

As diferentes colônias obtidas durante a etapa de isolamento foram submetidas ao teste de produção de aroma em dois momentos. O primeiro momento ocorreu durante a etapa de isolamento, onde 82 cepas produtoras de aromas frutados foram selecionadas, multiplicadas e armazenadas em YMA inclinado a 4°C, conforme descreve Silva *et al* (2010). As cepas de leveduras que no teste de produção de aroma evidenciaram aroma desagradável e diferente do frutado foram descartadas. As 82 cepas foram agrupadas a partir de 7 categorias morfológicas distintas, as quais foram: colônias brancas, transparentes, amareladas, rosadas, esbranquiçadas, beges e cerosas.

Em trabalho semelhante Coton *et al* (2006), isolaram 208 leveduras de mostos de sidra francesa, considerando também, as características morfológicas das colônias observadas em placas, porém, sem interesse na produção de aromas, apenas para determinação da biodiversidade. Suáres Valles *et al* (2008), trabalharam com um total de 350 colônias isoladas a partir de uma adega de sidra em Astúrias (Espanha), com interesse nas características enológicas, incluindo a produção de aromas, no entanto, com *Saccharomyces* sp.

Chavan *et al* (2009) agruparam 117 cepas selecionadas a partir de seis variedades de uva, na Índia, em seis diferentes tipos morfológicos de colônias. Romancino *et al* (2008) trabalharam com um total de 2.575 colônias de leveduras de mostos de uva coletados na Itália,

analisados inicialmente de acordo com a morfologia das colônias e cor, para posterior identificação. Raspor *et al* (2006) isolaram leveduras a partir de três cultivares de uva de cinco vinhedos, e obtiveram 752 cepas diferenciadas por sua morfologia em placas. Sangorrín *et al* (2007) isolaram 92 tipos de leveduras associadas às paredes internas de cubas de fermentação de diferentes adegas da Patagônia, tendo encontrado de 20 a 30 colônias diferentes de cada adega, considerando suas características macroscópicas de textura, superfície, margem de elevação e cor. Osorio-Cadavid *et al* (2008) isolaram 235 cepas de leveduras diferenciadas em treze grupos de acordo com características fenotípicas, de uma bebida fermentada de milho, na Colômbia.

Em todos estes trabalhos citados percebe-se que os grupamentos formados estão baseados em características fenotípicas, o que não necessariamente reflete a diversidade de espécies das cultivares pesquisadas. Contudo, no presente trabalho, após considerar tais características utilizou-se à análise de perfis moleculares para novo agrupamento por GTG₅ e posterior sequenciamento.

Os 82 isolados conservados à temperatura de 7-10°C foram recuperados em Caldo Glucose Peptona e Extrato de Levedura e semeados em Ágar Extrato de Malte e Levedura, para o segundo momento do teste de produção de aroma e também para sua caracterização microscópica. Os resultados obtidos nesta etapa realizada de acordo com as sete categorias morfológicas do aspecto macroscópico das colônias estão registrados no Quadro 1.

Salienta-se que muitos dos isolados armazenados apresentaram a produção de aromas indesejáveis neste segundo momento de seleção, no qual os três julgadores utilizaram um maior rigor na avaliação do aroma floral ou frutal. É importante considerar que a concentração dos diversos compostos formados durante a fermentação, os quais definem o perfil aromático do fermentado, bem como fatores como disponibilidade e consumo de nutrientes e oxigênio dentre outros, não foram monitorados nesta etapa do trabalho.

Cortes e Blanco (2011), Andorra *et al* (2010), Rodríguez *et al* (2010), Xu *et al* (2006) e Beltran *et al* (2008) investigaram o perfil aromático de bebidas fermentadas considerando fatores como as cepas utilizadas no processo, cinética de crescimento e interação entre cepas diferentes, nutrientes consumidos, temperatura de fermentação, dentre outros.

Na observação ao microscópio ótico, foi verificado pelo aspecto alongado de algumas cepas selecionadas, que apesar do meio YA-LIS ser considerado seletivo para leveduras oxidativas, por não conter nenhum componente antibacteriano, poderia ter

proporcionado o crescimento também de bactérias. Desta maneira, todos os isolados foram semeados no meio Rosa Bengala Cloranfenicol (Merck), que inibe o crescimento de bactérias pela presença de 0,1 % do antibiótico cloranfenicol. Este mesmo antibiótico foi utilizado nos trabalhos de Osorio-Cadavid *et al* (2008) e Zott *et al* (2008), como componente do meio de cultura utilizado para o isolamento de leveduras.

Aspecto macroscópico das colônias	N ° de cepas	Classificação sensorial do aroma	Descrição da morfologia microscópica
Transparentes	02	50.0% frutado 50.0% alcoólico frutado	100.0% alongada
Beges	08	25.0 % frutado 37.5% alcoólico frutado 37.5% desagradável	25.0% globosa/oval 75.0% alongada
Cerosas	08	62.5% frutado 12.5% alcoólico.frutado 25.0% desagradável	37.5% globosa/oval 62.5% alongada
Esbranquiçadas	10	60.0% frutado 30.0% alcoólico frutado 10.0% desagradável	80.0% globosa/oval 20.0% alongada
Rosadas	11	72.7% frutado 18.2% alcoólico.frutado 9.1% desagradável	100.0% globosa/oval
Amarelas	30	63.3% frutado 6.7% alcoólico frutado 30.0% desagradável	60.0% globosa/oval 40.0% alongada
Branças	13	30.8% frutado 53.8% alcoólico.frutado 15.4% desagradável	76.9% globosa/oval 23.1% alongada
TOTAL	82	54.9% frutado 23.1% alcoólico. frutado 22.0% desagradável	63.4% globosa/oval 36.6% alongada

Quadro 1 - Caracterização das cepas de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas e selecionadas de mostos de maçãs

Assim, considerando os isolados que passaram a produzir aroma indesejável, aqueles que não obtiveram crescimento no Rosa Bengala Cloranfenicol e ainda a inserção de duas leveduras isoladas a partir do jambolão (*Syzygium cumini* - fruto de origem indiana adaptado ao clima do nordeste brasileiro), o trabalho seguiu com 53 cepas produtoras de aromas frutais, distribuídas segundo o aspecto macroscópico das colônias em 10 cepas com colônias brancas, 12 amareladas, 13 rosadas, 7 esbranquiçadas, 3 cerosas, 2 transparentes e 6 beges. Destaca-se que nesta etapa de seleção realizada por grupo do aspecto macroscópico das colônias, cinco

cepas de leveduras evidenciaram maior potencial na produção de aromas frutados. A caracterização morfológica e fisiológica destas cepas selecionadas podem ser verificadas no Quadro 2 e Tabelas 1 e 2.

Aspectos	<i>C. oleophila</i> (isolado nº05)	<i>R. mucilaginosa</i> (isolado nº 32)	<i>P. fermentans</i> (isolado nº 39)	<i>H. uvarum</i> (isolado nº 52)	<i>H. guilliermondii</i> (isolado nº 53)
Descrição colonial	Branças, bordos inteiros e lisos	Rosadas, salmons, cremosas	Esbranquiçadas para creme, com bordos lobados	Esbranquiçadas, brilhantes e bordos lisos	Esbranquiçadas, brilhantes e bordos lisos
Crescimento em meio líquido	Formação de fina e delicada película	Formação de um anel rosado e sedimentos	Formação de fina película	Formação de fino anel, sedimentos presentes	Formação de sedimento e sem anel
Forma	Células ovóides ou alongadas	Células ovóides a esféricas	Células ovóides ou elipsoidais	Células apiculadas ou alongadas	Células apiculadas
Brotamento/ Esporos	Pequenas ramificações brotamentos	Brotamento multilateral	Brotos e presença de ascósporos	Ascósporos presents	Brotamento Bipolar

Quadro 2 - Características morfológicas das cinco cepas de leveduras selecionadas

Considerando as características morfológicas das cepas selecionadas foram constatadas pequenas diferenças entre os resultados verificados e os dados da literatura. Assim pelas descrições de Smith (1998) a cepa *H. guilliermondii* diferiu somente no quesito formação de anel, enquanto *H. uvarum* não apresentou diferenças entre os resultados e suas definições. Quanto à espécie *P. fermentans* o único item não observado na espécie selecionada foi o aspecto rugoso das colônias à que se referiu Kurtzman (1998). Para *Rhodotorula mucilaginosa*, descrita por Fell e Statzell-Tallman (1998) todas as características observadas foram correspondentes. Em *Candida oleophila* não foram encontrados tufo de pseudo-hifas nos bordos das colônias, conforme descrito por Meyer; Payne; Yarrow (1998).

Cadez *et al* (2002) observaram comportamento diferente do previsto por Smith (1998) quanto ao crescimento nas temperaturas de 34 e 37°C de cepas *H. uvarum*, *H. vineae*, *H. osmophila* e *H. guilliermondii*. Resultado também encontrado neste trabalho, onde foi observado um fraco crescimento de *H. uvarum*, quando era esperada sua ausência e o crescimento de *H. guilliermondii*, quando a cepa deveria estar ausente, na temperatura de 37°C. Por outro lado, Miki *et al* (2008) verificou ausência da cepa de *H. uvarum* a 37°C e presença a 30°C, assim como Bujdosó *et al* (2001) ao caracterizarem espécies de *Hanseniaspora* sp. isoladas de vinícolas verificaram ausência de crescimento a 37°C.

Tabela 1 - Crescimento das leveduras não-*Saccharomyces* a 30°C e 37°C e capacidade de fermentação da glicose

Teste	<i>C. oleophila</i> (05)	<i>R. mucilaginosa</i> (32)	<i>P. fermentans</i> (39)	<i>H. uvarum</i> (52)	<i>H. guilliermondii</i> (53)
Caldo Sabouraud 37°C - 24h	-	w	w	w	-
Caldo Sabouraud 37°C - 48h	-	w	w	w	-
Caldo Sabouraud 30°C - 24h	+	w	+	w	+
Caldo Sabouraud 30°C - 48h	+	w	+	w	+
Fermentação - 24h	-	-	-	+	+
Fermentação - 48h	-	-	-	+	+
Fermentação - 14dias	+	-	-	+	+
Fermentação - 21 dias	+	+	+	+	+

Nota: + crescimento positivo; - crescimento negativo; w: crescimento fraco

As espécies *R. mucilaginosa* e *P. fermentans* no crescimento a 37°C apresentaram um fraco crescimento, entretanto Fell e Statzell-Tallman (1998) e Kurtzman (1998), respectivamente, previam um crescimento positivo destas cepas a esta temperatura. Senses-Ergul *et al* (2006) não constataram fermentação da glicose pela cepa *R. mucilaginosa* conforme resultado aqui encontrado.

Em relação à fermentação de glicose e crescimento em presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, foram observadas diferenças entre o resultado deste estudo e aqueles obtidos por Meyer; Payne; Yarrow (1998); Fell e Statzell-Tallman (1998); Kurtzman (1998) e Smith (1998), respectivamente, para as cepas *C. oleophila*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans*, *H. uvarum* e *H. guilliermondii*. *C. oleophila* apresentou habilidade de crescimento aeróbico em presença de galactiol e não na presença de maltose. *R. mucilaginosa* não teve habilidade de crescimento com os açúcares trealose, D-xilose e rafinose, no entanto cresceu em presença do glicosídeo N-acetilglicosamina. A cepa *P. fermentans* assimilou os açúcares L-sorbose, sacarose, cellobiose, trealose e melizitose, demonstrou habilidade de crescimento em presença dos álcoois D-manitol e D-glucitol, do glicosídeo salicina e ainda em presença do ácido orgânico gluconato. *H. uvarum* assimilou a pentose L-arabinose, e também os ácidos orgânicos succinato e citrato. *H. guilliermondii* foi capaz de assimilar os trissacarídeos rafinose e melizitose, os álcoois etanol, glicerol e D-glucitol, além ácidos orgânicos succinato e citrato.

Tabela 2 - Testes bioquímicos das cepas de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas e selecionadas de mostos de maçãs

Leveduras	YNB-b	Glicose	Galactose	L-sorbose	Maltose	Sacarose	Cellobiose	Trehalose	Lactose	Melibiose	Rafinose	Melzitose	Inulina	Amido solúvel	D-xylose	L-arabinose	D-arabinose	D-ribose	L-ramnose	Etanol	Glicerol	Galactitol	D-manitol	D-glucitol	Salicina	DL-lactato	Succinato	Citrato	M-inositol	Metanol	Hexadecano	Glucosamina	Xylitol	Acetona	Etil-acetato	Isopropanol	Gluconato	N-acetilglicosamina	YNB-S/aa	YCB- branco	Nitrato	Nitrito	Lisina	10%NaCl	Carbonato	Ác.Acético	50%Glicose	0,01cicloheximida	
5	0	+	+	+	-	+	+	+	-	0	0	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	0	0	0	+	+	-	0	+	+		
32	0	+	-	0	0	+	-	-	-	0	-	0	0	0	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	*	+	+	+	-	+	+	0	0	0	*	+	-	0	0	0	
39	0	+	-	+	-	+	+	+	-	0	0	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0		
52	0	+	0	*	*	-	+	-	-	0	-	-	-	-	-	+	0	-	-	0	0	0	-	-	+	0	+	+	-	-	-	0	0	0	0	0	0	+	0	-	0	0	0	+	0	+	0	0	+
53	0	+	0	0	0	+	+	-	-	0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	0	-	+	+	0	+	+	-	-	-	0	+	0	0	0	0	+	+	-	0	0	0	+	0	+	0	0	+

Nota: (+) crescimento abundante; (0) ausência de crescimento; (-) crescimento fraco ou pouco abundante; (*) não determinado; levedura 5- *C. oleophila*; 32- *R. mucilaginosa*; 39 - *P. fermentans*; 52- *H. uvarum*; 53 - *H. guilliermondii*.

O trabalho de Senses-Ergul *et al* (2006), que caracterizaram dentre outras cepas isoladas de alimentos *R. mucilaginosa*, constatou os mesmos resultados de assimilação de nitrato, glicose, celobiose, galactose, melobiose e manitol encontrados para esta espécie neste trabalho. Porém, o teste para a resistência a cicloheximida e para assimilação de rafinose e maltose, não foi positivo, conforme encontraram os mesmos autores.

Chavan *et al* (2009) que isolaram leveduras de diversas variedades de uva, constataram a presença de 14 cepas de *H. guilliermondii* e uma de *H. uvarum*, todas as quais revelaram crescimento pela assimilação de glicose, celobiose e salicina. As mesmas espécies não foram capazes de assimilar galactose, maltose, ramnose, sucrose e lactose, com exceção de um isolado de *H. guilliermondii* que apresentou crescimento fraco em galactose, ramnose e salicina e três cepas em maltose. Os resultados de assimilação das cepas de *H. guilliermondii* e *H. uvarum* isoladas neste estudo ratificam os encontrados por Chavan e colaboradores, salvo para a assimilação de sucrose que *H. guilliermondii* foi capaz de realizar.

Miki *et al* (2008) que investigaram as características enológicas de leveduras isoladas no suco de uva, constaram o crescimento de *H. uvarum* em presença de glicose e L-lisina, além de constatar crescimento negativo para sucrose, rafinose, glicerol, etanol, e succinato. Com exceção do succinato, todos estes resultados coincidem com aqueles encontrados neste trabalho.

Segundo Yarrow (1998) não há um único método padronizado para muitos desses testes de fermentação e crescimento de fontes de carbono, crescimento em diversas fontes de nitrogênio, resistência a antibióticos, crescimento em várias temperaturas, etc. Assim, os resultados de tais testes são frequentemente dependentes das técnicas empregadas.

Desta maneira, percebe-se pela análise dos resultados de diversos autores, que uma mesma cepa apresenta respostas diferentes em relação ao crescimento perante uma mesma fonte de carbono, por exemplo. Portanto, acredita-se que perante estas divergências de respostas, não foi possível apenas por meio das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas levantadas neste estudo, realizar a identificação em nível específico pelo método fenotípico, portanto, foram necessários métodos moleculares para identificar as espécies isoladas e selecionadas.

Kurtzman *et al* (2003) salientam que na ausência de equipamentos para comparações moleculares, as identificações podem ser feitas satisfatoriamente a partir de fenótipo, no entanto, as identificações baseadas em DNA são muito mais precisas e rápidas.

Neste trabalho do total de 53 cepas selecionadas foram identificadas por taxonomia molecular 84,9% correspondendo a 45 cepas selecionadas conforme Tabela 3. As demais cepas não foram identificadas em virtude de problemas com amplificação do DNA extraído. Dentre as espécies identificadas destaca-se o gênero *Hanseniaspora* sp., que segundo os autores Moreira *et al* (2008), Viana *et al* (2008), Xu *et al* (2006), Xufre *et al* (2006) e Moreira *et al* (2005) são eficientes na produção de compostos voláteis em bebidas fermentadas.

Tabela 3 - Identificação e diversidade de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de mosto de maçãs

Nº de Isolados	Tamanho do fragmento (a)	Nome da Espécie	Número GenBank	Similaridade (b) (%)
03	613	<i>Candida oleophila</i>	TJY 25-1	98
01	570	<i>Candida parapsilosis</i>	LM099	95
01	570	<i>Candida tropicalis</i>	HXX1	95
05	517	<i>Clavispora lusitaniae</i>	LM083	100
02	517	<i>Clavispora lusitaniae</i>	LM083	98
03	541	<i>Clavispora lusitaniae</i>	IMAU5Y028	99
02	578	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	A17-1-2	99
01	564	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> *	A17-1-2	93
01	590	<i>Hanseniaspora uvarum</i> *	M8	99
09	588	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	FS1-3	99
02	561	<i>Pichia anomala</i> (<i>Wickerhanomyces anomalus</i>)	NY12	100
02	581	<i>Pichia fermentans</i>	IMAU6Y0 (JZ9-1)	99
01	571	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CRUB0299	99
06	564	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CTD462-214	99
02	564	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CTD462-214	98
03	614	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	PTD3	97
01	561	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NY10	99

Nota: (a) Valor referente ao número de pares de bases por fragmento; (b) Porcentagem de nucleotídeos idênticos na sequência obtida da região D1/D2 do gene 26S rRNA e a sequência encontrada no Genbank; * leveduras isoladas a partir do jambolão.

De um total de 45 isolados identificados 13 pertenceram ao gênero *Rhodotorula* sp., 9 ao *Lodderomyces* sp., 10 *Clavispora* sp., 5 ao gênero *Candida*, 4 *Hanseniaspora* sp. e 4 *Pichia* sp.. Vale ressaltar que três destes gêneros (*Rhodotorula* sp., *Lodderomyces* sp. e

Clavispora sp.) foram, neste trabalho, isolados pela primeira vez em mosto de maçãs e constituíram juntos 71,2 % das cepas identificadas.

Em relação ao gênero *Candida* sp., diversos autores isolaram leveduras deste gênero em seus estudos a partir de mosto de maçã e sidra (COTON *et al*, 2006; ROMANO *et al*, 1997) de uvas, mosto de uva e vinho (CHAVAN *et al*, 2009; STRINGINI *et al* 2009; ROMANCINO *et al*, 2008; NISIOTOU; NYCHAS, 2007; SANGORRÍN *et al*, 2007; BALEIRAS COUTO *et al*, 2005; CLEMENTE-JIMENEZ *et al*, 2004), de semente de côco (JESPERSEN *et al*, 2005), de cacau (NIELSEN *et al*, 2005) e na indústria de malte (LAITILA *et al*, 2006).

Contudo das três espécies de *Candida* sp. encontradas neste trabalho duas espécies (*Candida oleophila* e *Candida tropicalis*) foram detectadas em suco de maçã e sidra por Coton *et al* (2006). A terceira espécie (*Candida parapsilosis*) foi pela primeira vez encontrada em sidra por Bedriñana *et al* (2010), mas foi isolada de semente de coco por Jespersen *et al* (2005), em vinho por Stringini *et al* (2009); Zott *et al* (2008) e, em suco de cenoura fermentado por Senses-Ergul *et al* (2006).

No trabalho de Nosek *et al* (2009) os autores referem-se à *Candida parapsilosis*, como um patógeno humano oportunista frequentemente associado com infecções hospitalares em recém-nascidos e pacientes com imunidade baixa. Dessa forma a presença dessa espécie pode representar um risco às pessoas que consomem suco de maçã, sobretudo sem passar pelo processo de pasteurização.

A única espécie identificada do gênero *Clavispora* sp., foi encontrada pela primeira vez em mosto de maçã neste trabalho. Laitila *et al* (2006), isolaram a espécie *Clavispora lusitaniae*, porém em indústria de malte. Gente *et al* (2007) que trabalharam no desenvolvimento de *primers* para detecção de leveduras dominantes em esfregaços de queijos curados, utilizaram uma espécie de *Clavispora lusitaniae* isolada do ceco de porco. Zhang *et al* (2010) relataram o primeiro caso de infecção cutânea causada por *Clavispora lusitaniae*, em um menino de um ano e meio, que apresentou inflamação aguda e grave em torno de sua pálpebra. Dessa forma, tendo este relato de patogenicidade, pode-se considerar esta espécie um patógeno oportunista, oferecendo risco a saúde dos consumidores de sucos de maçã.

O gênero *Hanseniaspora* tem sido isolado de diversas fontes: de mosto de maçã e sidra (BEDRIÑANA *et al*, 2010; SUÁREZ VALLES *et al*, 2007; COTON *et al*, 2006) de uva, mostos de uvas e vinhos (LI *et al*, 2010; OCÓN *et al*, 2010; CHAVAN *et al*, 2009; ROMANCINO *et al*, 2008; ZOTT *et al*, 2008; NISIOTOU; NYCHAS, 2007; BALEIRAS

COUTO *et al*, 2005), de bebida de milho (OSORIO-CADAVID *et al*, 2008) de semente de côco (JESPERSEN *et al*, 2005), de alimentos e suco de cenoura (SENSES-ERGUL *et al*, 2006), na indústria de malte (LAITILA *et al*, 2006).

Quanto às espécies de *Hanseniaspora* sp. encontradas nesta pesquisa foi constatado que a espécie *Hanseniaspora guilliermondii* (*Kloeckera apiculata* ou *Kloeckera apis*) ainda não havia sido isolada de mosto de maçãs, mas foi isolada de uva, mosto de uvas e vinho (LI *et al*, 2010; OCÓN *et al*, 2010; CHAVAN *et al*, 2009; ROMANCINO *et al*, 2008; NISIOTOU; NYCHAS, 2007; SANGORRÍN *et al*, 2007; COMBINA *et al*, 2005; ROMANO *et al*, 1997), de frutas cítricas (TAQARORT *et al*, 2008), de ambientes agroindustriais (TIAGO *et al*, 2009), de semente de côco (JESPERSEN *et al* 2005) e de cacau (NIELSEN *et al*, 2005). A espécie *Hanseniaspora uvarum* foi isolada de mosto de maçã e sidra (BEDRIÑANA *et al*, 2010; SUÁREZ VALLES *et al*, 2007; COTON *et al*, 2006), em uva, suco de uva e vinho (LI *et al*, 2010; CHAVAN *et al*, 2009; STRINGINI *et al*, 2009; ROMANCINO *et al*, 2008; ZOTT *et al*, 2008; NISIOTOU; NYCHAS, 2007; SANGORRÍN *et al*, 2007; RASPOR *et al*, 2006; BALEIRAS COUTO *et al*, 2005; CLEMENTE-JIMENEZ *et al*, 2004) em frutas cítricas (TAQARORT *et al*, 2008), e na indústria de malte (LAITILA *et al*, 2006).

Quanto à espécie *Lodderomyces elongisporus*, que ainda não havia sido isolada de mosto de maçã e sidra, os autores Zott *et al* (2008) e Malfeito-Ferreira *et al* (1997) conseguiram seu isolamento a partir de mosto de uva e também do vinho. No trabalho de Ji *et al* (2009), *Lodderomyces elongisporus* foram isoladas a partir do intestino de besouros (Cetoniidae), visitantes de flores em montanhas de Pequim na China.

O gênero *Pichia* apareceu em isolados de maçã, e sidra nos trabalhos de Bedriñana *et al* (2010), Suárez Valles *et al* (2007) e Coton *et al* (2006). Foi detectado a partir de uva e vinho nos trabalhos de Li *et al* (2010), Ocón *et al* (2010), Chavan *et al* (2009), Zott *et al* (2008), Raspor *et al* (2006) e Baleiras Couto *et al* (2005).

De outras fontes como bebida de milho, ambientes agroindustriais, semente de côco e indústria de malte, nos isolados de Tiago *et al* (2009), Osorio-Cadavid *et al* (2008), Laitila *et al* (2006), Jespersen *et al* (2005) e Nielsen *et al* (2005).

No entanto, as espécies *Pichia anomala* (*Wickerhanomyces anomalus*) e *Pichia fermentans* ainda não haviam sido isoladas de mosto de maçã, apenas de suco de uva, vinho, frutas cítricas, bebida de milho, groselha preta, semente de côco e na indústria de malte (LI *et al*, 2010; OCÓN *et al*, 2010; STRINGINI *et al*, 2009; OSORIO-CADAVID *et al*, 2008;

TAQARORT *et al*, 2008; ZOTT *et al*, 2008; SANGORRÍN *et al*, 2007; LAITILA *et al*, 2006; SENSES-ERGUL *et al*, 2006; JESPERSEN *et al*, 2005; CLEMENTE-JIMENEZ *et al*, 2004).

A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* foi encontrada em fontes como uva e vinho, suco de cenoura e groselha preta por Zott *et al* (2008), Sangorrín *et al* (2007) e Senses-Ergul *et al* (2006). Outras espécies deste gênero (*R. aurantiaca*; *R. glutinis*) foram isoladas de ambientes agroindustriais, semente de côco e de uva e vinhos (LI *et al*, 2010; OCÓN *et al*, 2010; TIAGO *et al*, 2009; RASPOR *et al*, 2006; COMBINA *et al*, 2005; JESPERSEN *et al*, 2005). Entretanto, foi pela primeira vez isolada do mosto de maçãs neste trabalho.

4 CONCLUSÕES

Os resultados da caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica, não permitiram a identificação dos isolados em nível específico, pois em alguns testes de assimilação de diversas fontes de carbono, nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas e capacidade de fermentação da glicose dentre outros, as leveduras apresentaram resultados diferentes daqueles descritos na literatura.

Neste trabalho, foi utilizado o sequenciamento da região D1/D2, para verificar a biodiversidade de leveduras não-*Saccharomyces* em mostos de maçãs. Foram obtidas informações valiosas sobre a biodiversidade do mosto de maçãs, onde cinco espécies (*P. anomala*, *P. fermentans*, *H. guilliermondii*, *L. elongisporus* e *C. lusitaniae*) das dez identificadas, nunca haviam sido isoladas neste ecossistema.

As leveduras não-convencionais selecionadas nos testes de produção de aromas frutados e florais confirmaram o seu potencial em melhorar a qualidade aromática de bebidas fermentadas, descrito na literatura. Entretanto, torna-se necessária a realização de pesquisas que contemplem a aplicação das leveduras identificadas nesta etapa do trabalho, na produção de fermentados de maçã, para identificar e quantificar os compostos aromáticos percebidos apenas sensorialmente.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ANDORRA, I.; BERRADRE, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVE-ZARZOSO, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. **European Food and Residual Technology**, v.231, p.215-224, 2010.

BALEIRAS COUTO, M.M.; REIZINHO, R.G.; DUARTE, F.L. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, n.1, p.49-56, 2005.

BEDRIÑANA R.P.; SIMÓN A. Q.; SUÁREZ VALLES, B. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. **Food Microbiology**, v.27, p.503-508, 2010.

BEECH, F. W.; ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. Yeast in cider-making. **Yeast Technology**, Academic Press: London, U.K. v.5. p.169-214. 1993.

BELTRAN, G.; NOVO, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A.; ROZÈS, N. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.2, p.169-177, 2008.

BELY, M.; STOECKLE, P.; MASNEUF-POMARÈDE, I.; DUBOURDIEU, D. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii* - *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, p.312-320, 2008.

BENASSI, M.T.; DAMÁSIO, M.H.; CECCHI, H.M. Avaliação sensorial de vinhos riesling itálico nacionais utilizando perfil livre. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.265-270, ago./out. 1998.

BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter of Applied Microbiology**, v.24, p.37-39, 1997.

BOEKHOUT, T.; BOSBOOM, R.W. Karyotyping of *Malassezia* yeasts: taxonomic and epidemiological implications. **Systematic and Applied Microbiology**, v.17, p.146-153, 1994.

BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeast in food: beneficial and detrimental aspects**. Cambridge: CRC Press, 2003.

BRANDÃO, L.R.; LIBKIND, D.; VAZ, A.B.M.; ESPÍRITO SANTO, L.C.; MOLINÉ, M.; GARCÍA, V.; BROOCK, M.V.; ROSA, C. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS Microbiology Ecology**, p.1-13, 2011.

BUJDOSO, G.; EGLI, C.M.; HENICK-KLING, T. Characterization of *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) strains isolated in Finger Lakes wineries using physiological and molecular techniques. **Food Technology and Biotechnology**, v.39, n.2, p.83-91, 2001.

CADEZ, N.; RASPOR, P.; COCK, A. W. A. M.; BOEKHOUT, T.; SMITH, M. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. **FEMS Yeast Research**, p.279-289, 2002.

CHAROENCHAI, C.; FLEE, G. H.; HENSCHKE, P. A.; TODD, B. E. N. Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.3, p.2-8, 1997.

CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNI, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**, p.1-8, 2009.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.239-245, 2006.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F. J. L.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, v.21, n.2, p.149-155, 2004.

COMBINA, M.; MERCADO, L.; BORGIO, P.; ELIA, A.; JOFRE, V.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Yeast associated to Malbec grapes berries from Mendoza, Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1055-1061, 2005.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n 4, p.925-932, 2011.

COTON, E.; COTON, M.; LEVERT, D.; CASAREGOLA, S.; SOHIER, D. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, n.108, p.130-135, 2006.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. **Fungal Biodiversity**. Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009.

DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; COMITINI, F.; GOBBI, M.; LENCIONI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, Short communication, DOI 10.1007/s13213-010-0125-1, 2010.

DRILLEAU, J.F. La cidrerie. In: BOUGEOIS, C.M. ; LARPENT, J.P. **Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires**, p.138-161, 1996.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. 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.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; PERIS-TORÁN, M.J.; RAMON, D.; QUEROL, A. Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.80, p.85-92, 2001.

FELL, J.W.; STATZELL-TALLMAN, A. *Rhodotorula* F.C. Harrison. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier, 1998, p.800-827.

FERNÁNDEZ, M.; ÚBEDA, J.F.; BRIONES, A.I. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.29-36, 2000.

FLEET, G. H. Yeasts in fruit and fruit products. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeast in food**. Cambridge: CRC Press, 2003. p.267-287.

GADANHO, M.; SAMPAIO, J.P. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. **FEMS Yeast Research**, v.2, p.47-58, 2002.

GENTE, S.; LARPIN, S.; CHOLET, O.; GUÉGUEN, M.; VERNOUX, J.; DESMASURES, N. Development of *primers* for detecting dominant yeasts in smear-ripened cheeses. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.137-145, 2007.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, n.6, p.949-956, 1999.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CERSOSIMO, M.; LOSCOS, N.; CACHO, J.; GARCIA-MORUNO, E.; FERREIRA, V. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeast of different genera. **Food Chemistry**, v.107, p.1064-1077, 2008.

JESPERSEN, L.; NIELSEN, D.S.; HONHOLT, S.; JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.441-453, 2005.

Jl, Z.; JIA, J.H.; BAI, F. Four novel *Candida* species in the *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade isolated from the gut of flower beetles. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.95, p.23-32, 2009.

KURTZMAN, C. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998, p.273-352.

KURTZMAN, C.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.; FELL, J. W.; DEAK, T. Methods to identify yeast. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeast in Food: beneficial and detrimental aspects**. Cambridge: CRC, 2003.

KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier, 1998.

LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T.; BARKER, J.S. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.172-177, 1999.

LAITILA, A; WILHELMSON, A.; KOTAVIITA, E.; OLKKU, J.; HOME, S.; JUVONEN, R. Yeasts in an industrial malting ecosystem. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.953-966, 2006.

LEPE, J.S. **Levaduras vinicas: funcionalidad y uso en bodega**. Madrid: Mundi Prensa, 1997.

LI, S; CHENG, C.; LI, Z.; CHEN, J.; YAN, B.; HAN, B.; REEVES, M. Yeast species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 85–90, 2010.

LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; VAN BROOCK, M.; SAMPAIO, J.P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.313-322, 2003.

MALFEITO-FERREIRA, M.; TARECO, M.; LOUREIRO, V. Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. **International Journal of Food Microbiology**, v.16, n.38, p.143–155, 1997.

MENDOZA, L. M.; MANCA DE NADRA, M. C.; BRU, E.; FARIAS, M. E. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.229-237, 2009.

MEYER, S.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998, p.454-573.

MIKI, T.; ITO, Y.; KUROHA, K.; IZAWA, S.; SHINOHARA, T. Potential of yeasts isolated in botrytized grape juice to be new wine yeasts. **Food Science and Technology Research**, v.14, n.4, p.345, 2008.

MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J.M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F.J. LAS; RODRÍGUEZ-VICO, F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.297-304, 2003.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, n.3, p.231-238, 2008.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.285- 294, 2005.

NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with *Ghanaian cocoa* fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, v.22, p.271-284, 2005.

NISIOTOU, A.A.; NYCHAS, G.E. Yeast populations residing on healthy or *botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. **Applied And Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2765-2768, 2007.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C.N.; SIMÕES, D.R.S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.1089-1098, 2007.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Alcoólicas - Ciência e Tecnologia**. 1 ed. São Paulo: Blücher, v. 1, 2010, p. 113-142.

NOSEK, J.; HOLESOVA, Z.; KOSA, P.; GACSER, A.; TOMASKA, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v.55, p.497-509, 2009.

OCÓN, E.; GUTIÉRREZ, A.R.; GARIJO, P.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. **Food Microbiology**, v. 27, p.1023-1027, 2010.

OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1569-1576, 2005.

OSORIO-CADAVID, E.; CHAVES-LÓPEZ, C.; TOFALO, R.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. **Food Microbiology**, v.25, p.771- 777, 2008.

RASPOR, P.; MILEK, D.M.; POLANC, J.; MOZINA, S.S.; CADEZ, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.1-2, p.97-102, 2006.

RIORDAN, D.C.R.; SAPERS, G.M.; HANKINSON, T.R.; MAGEE, M.; MATTRAZZO, A.M.; ANNOUS, B.A. A study of U.S. orchards to identify potential sources of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.64, n.9, p.1320-1327, 2001.

RODRÍGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BARBAGELATA, R. J.; BARDA, N. B.; CABALLERO, A. C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.19-25, 2010.

ROJAS, V.; GIL, J.V.; PINÁGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.3, p.283-289, 2001.

ROMANCINO, D. P.; DI MAIO, S.; MURIELLA, R.; OLIVA, D. Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.2248-2254, 2008.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.169-180, 2003.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; DOMIZIO, P.; FATICHENTI, F. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.71, p.239-242, 1997.

SAMPAIO, J.P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F.L.; PAIS, C.; FONSECA, A. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.2, p.687-697, 2001.

SANGORRÍN, M.P.; LOPES, C.A.; GIRAUDO, M.R.; CABALLERO, A.C. Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. **International Journal of Food Microbiology**, n.119, p.351-357, 2007.

SENSES-ERGUL, S.; ÁGOSTON, R.; BELÁK, A.; DEÁK, T. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.1, p.120-124, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R. GOMES, R. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela. 2010.

SMITH, M.T. *Hanseniaspora* Zikes. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998, p.214-220.

STRINGINI, M.; COMITINI, F.; TACCARI, M.; CIANI, M. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. **Food Microbiology**, v.26, n.4, p.415-420, 2009.

SUÁREZ VALLES, B.; BEDRIÑANA, R.P.; QUEIPO, A.L.; ALONS, J.J.M. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). **Food Microbiology**, v.25, n.5, p.690-697, 2008.

SUÁREZ VALLES, B.; BEDRIÑANA, R.P.; TASCÓN, N.F.; SIMÓN, A.Q.; MADRERA R.R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiology**, v.24, p.25–31, 2007.

TAQARORT, N.; ECHAIRI, A.; CHAUSSOD, R.; NOUAIM, R.; BOUBAKER, H.; BENAOUMAR, A.A.; BOUDYACH, E. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.24, p.3031-3038, 2008.

TIAGO, F.; MARTINS, F.S.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Physiological characterization of non-*Saccharomyces* yeasts from agro-industrial and environmental origins with possible probiotic function. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.4, p.657-666, 2009.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v.25, p.778- 785, 2008.

WOSIACKI, G. Apple varieties growing in subtropical areas: the situation in Paraná - Brazil. **Fruit Processing**, v.5, p.177-182, 2001.

WOSIACKI, G.; CHERUBIN, R.A; HILGENBERG, C. Characterization of the apple juice of some new varieties growing in Brazil. **Fruit Processing**, v.6, n.8, p.306-310, 1996.

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.32, n.4, p.775-786. 1989.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C. Brazilian apple production: a few years later. **Fruit Processing**, Chicago. v.12, p.472-475, 2000.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.192-196. 2006.

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.376-384, 2006.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998, p.77-100.

ZHANG, H.; RAN, Y.; LI, D.; LIU, Y.; XIANG, Y.; ZHANG, R.; DAI, Y. *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atrobrunneum* as rare agents of cutaneous infection. **Mycopathologia**, v.169, p.373-380, 2010.

ZOTT, K.; MIOT-SERTIER, C.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; MASNEUF-POMAREDE, I. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.2, p.197-203, 2008.

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces* NA ELABORAÇÃO DE FERMENTADO DE MAÇÃ

RESUMO

A sidra brasileira consiste em um fermentado de maçã fricante de baixo teor alcoólico, com cor e aroma pouco intenso, necessitando de correção do teor de açúcar final. O método francês de fabricação desta bebida valoriza a fermentação oxidativa natural, realizada pelas leveduras não-*Saccharomyces*, que contribuem com os compostos aromáticos, valorizando assim o produto final. Neste trabalho foram avaliadas duas cepas de leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* com relação à cinética de crescimento, os atributos físico-químicos e evolução aromática durante a fermentação de mosto de maçã. Foi utilizado mosto despectinizado e pasteurizado de maçã da cv. Gala e as leveduras foram inoculadas com uma população inicial de aproximadamente $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹. Foi monitorado o crescimento das cepas em diversas temperaturas, sensibilidade ao SO₂, parâmetros físico-químicos e cinéticos ao longo de 10 dias de fermentação e perfil aromático dos fermentados obtidos. Os resultados revelaram sensibilidade das cepas do gênero *Hanseniaspora* ao SO₂ e a temperatura ideal para o processo fermentativo foi de 25°C. Ambas as cepas apresentaram atividade fermentativa em mosto de maçã, porém os açúcares não foram totalmente consumidos durante o período de avaliação. A análise cromatográfica dos compostos voláteis, pelo método de *headspace* permitiu identificar ésteres, aldeídos, ácidos, álcoois e cetonas nos fermentados obtidos tanto por *H. uvarum* quanto por *H. guilliermondii*. Na análise olfativa a cepa *H. guilliermondii* foi a mais preferida, embora sem diferença significativa na preferência entre as amostras dos fermentados. Desta forma, ambas as cepas apresentam atividade fermentativa e formação de aromas com notas frutais em mosto de maçãs e podem ser usadas na elaboração de fermentados de maçãs com baixo grau alcoólico e açúcares residuais.

Palavras-chaves: *Hanseniaspora uvarum*. *Hanseniaspora guilliermondii*. Fermentação. Compostos voláteis. *Headspace*.

ABSTRACT

The Brazilian cider consists in a sparkling apple fermented with low alcohol content, color and flavor of low intensity, requiring correction of final sugar content. The French method of manufacturing this beverage enhances the natural oxidative fermentation, carried out by non-*Saccharomyces* yeasts, which contribute to the aromatic compounds, thus enhancing the final product. In this paper, it was evaluated two strains of the oxidative yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* with respect to grown kinetics, physical and chemical attributes and aromatic evolution during the fermentation of the apple's must. It was used apple must of Gala cultivar and yeasts were inoculated with an initial population of approximately $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹. It was monitored the strains growing in different temperatures, SO₂ sensibility, physical and chemical parameters and kinetics for 10 days of fermentation and aromatic profile of the fermented obtained. The results showed sensibility of *Hanseniaspora* strains to SO₂ and the ideal temperature for the fermentative

process was at 25°C. Both strains showed fermentative activity in the apples must, however the sugars were not totally consumed during the evaluation period. The chromatograph analysis of the volatiles compounds by headspace method allowed the identification of esters, aldehydes, acids, alcohols and ketones in the fermented obtained such in the *H. uvarum* as in the *H. guilliermondii*. In the olfactory analysis the strain *H. guilliermondii* was the preferred, however without significant difference in the preference between the fermented samples. In this way, both strains showed fermentative activity and formation of fruity aromas with notes in the apples must and can be used in the elaboration of the apples wines with low alcohol content and residual sugar.

Keywords: *Hanseniaspora uvarum*. *Hanseniaspora guilliermondii*. Fermentation. Volatiles compounds. *Headspace*.

1 INTRODUÇÃO

Sidra, uma bebida frisanter obtida da fermentação alcoólica do mosto de maçãs, com baixo teor alcoólico, consiste em um dos principais produtos da indústria de processamento da maçã em países da Europa como a França, país que recebe o título de melhor produtor mundial. A diferença mais expressiva do produto francês está no fato de que os produtores deste país valorizam a fermentação oxidativa devido à grande contribuição desta etapa em termos de compostos aromáticos (NOGUEIRA *et al*, 2008; NOGUEIRA *et al*, 2003).

A fase oxidativa, realizada por leveduras de baixa ação fermentativa, denominadas de não-convencionais, não-*Saccharomyces* ou oxidativas, pode durar de 5 a 15 dias após a preparação do mosto, quando dominam o meio de fermentação por alguns dias antes de serem suplantadas pelas leveduras fermentativas, *Saccharomyces cerevisiae* (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010).

Ciani; Beco e Comitini (2006), analisando fermentação oxidativa verificaram que as leveduras não-*Saccharomyces* apresentam uma cinética de fermentação reduzida quando comparadas com cepas fermentativas, ou seja, ocasionam uma fermentação mais lenta. Este fato resulta em um produto de melhor qualidade, devido à presença de açúcares residuais na bebida, manutenção e produção de compostos aromáticos e menor conteúdo alcoólico (NOGUEIRA *et al*, 2007).

Diversos trabalhos têm sido realizados em vinho, utilizando cepas não-*Saccharomyces*, do gênero *Hanseniaspora*, obtendo resultados que evidenciam uma melhora na qualidade aromática do produto (VIANA *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2008; XU *et al*, 2006; XUFRE *et al*, 2006; MOREIRA *et al*, 2005). No entanto, faltam dados a esse respeito

com relação à utilização destas cepas na fermentação do mosto de maçã, nas condições de processamento brasileiro, para tornar o fermentado de maçã mais aromático.

A levedura *Hanseniaspora* sp. é considerada excelente produtora de ésteres, a maioria deles contribuintes para aromas frutais e florais nos vinhos. Entretanto o éster majoritário é o acetato de etila, que em altas concentrações pode ser prejudicial ao aroma, dando notas de cola ou solvente. Outro resultado do excessivo crescimento de *Hanseniaspora* sp. durante a fermentação dos vinhos é o aumento na acidez volátil como resultado da síntese de ácido acético e acetato de etila (CSOMA; SIPICZKI, 2008).

Moreira *et al* (2008) constataram que a cepa de *Hanseniaspora guilliermondii* é capaz de consumir maiores quantidades de açúcar (127 g.L^{-1}) do que cepas de *H. uvarum* (105 g.L^{-1}). Durante a fermentação, *H. uvarum* consome de maneira similar os açúcares glucose e frutose, entretanto *H. guilliermondii* apresenta um comportamento diferente (frutofílico), consumindo frutose mais rapidamente que glucose. O conteúdo máximo de etanol encontrado por estes autores foi de 5,4% para *H. uvarum* e 7,2% para *H. guilliermondii*.

Assim, considerando todas as contribuições do gênero *Hanseniaspora* sp. na produção de compostos que conferem aroma frutais e florais em vinhos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização destas leveduras na elaboração de fermentado de maçã nas condições de processamento brasileiras, com relação aos aspectos de cinética de crescimento, parâmetros físico-químicos e compostos voláteis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram utilizadas amostras de maçãs da cultivar Gala (90 Kg), safra 2009/2010, obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

Os microrganismos utilizados foram: *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, identificados neste trabalho e conservados em tubos inclinados contendo *yeast malt agar* (YMA) à temperatura de 7-10°C.

Os meios de cultura e reativos utilizados nas análises foram de pureza comprovada, e os padrões foram de grau cromatográfico ($\geq 99,7\%$ - Fluka; $\geq 98,5\%$ - Merck; $\geq 97-99\%$ - Aldrich; grau analítico - Interchim).

Os padrões de aromas foram os seguintes: etanal (Interchim), etanoato de etila (Fluka), etanol (Merck), propanoato de etila (Interchim), 3-metil butanoato de etila (Interchim), etanoato de propila (Interchim), etanoato de isobutila (Interchim), butanoato de etila (Interchim), etanoato de butila (Fluka), hexanona (Interchim), acetato de isopentila (Aldrich), 2-heptanona (Interchim), 3-metil-1-butanol (Merck), 2-metil-1-butanol (Interchim), 2-hexanol (Interchim), etanoato de hexila (Fluka), 2-octanona (Interchim), 3-hexanoato de etila (Interchim), 2-hidróxi propanoato de etila (Aldrich), 1-hexanol (Fluka), octanoato de etila (Aldrich), decanoato de etila (Aldrich), ácido butanóico (Fluka), 1,4-butanoato de etila (Fluka), 2-fenil-etanol (Aldrich), dodecanoato de etila (Aldrich) e ácido octanóico (Fluka).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Processos

Processamento do suco de maçã. As maçãs foram selecionadas, lavadas e trituradas em microprocessador (Processador Metvisa, Tipo MPA). A massa triturada foi acondicionada em pacotes de tela plástica porosa que, superpostos, foram submetidos a uma pressão de 3,0 kgf.cm⁻² em prensa hidráulica (Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado com pectinase (Pectinex Ultra SP, atividade 9.500 PGU.mL⁻¹, Novozymes do Brasil), a uma proporção de 3,0 mL.hL⁻¹ (120 minutos a 20-25°C) e, após sedimentação, o sobrenadante foi trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo, envasado em garrafas de vidro de 600 mL, lacradas com tampa metálica e pasteurizado a 80-85°C por 20 minutos (WOSIACKI *et al*, 1989).

Processamento do fermentado de maçã. O mosto clarificado foi acondicionado em fermentadores de vidro de 1450 mL com volume útil de 1200 mL, conforme apresentado na Figura 1, esterilizados em autoclave (121°C / 15 min.) e mantidos em sala climatizada à temperatura de 20°C (SOUZA *et al*, 2011). No mosto foi adicionado antibiótico cloranfenicol a 0,01 % (99%, Henrifarma - São Paulo) para controle do crescimento bacteriano. As leveduras foram inoculadas com uma população inicial de aproximadamente 4,0 x 10⁶ ufc.mL⁻¹. Para atingir esta população foi inoculada uma colônia de cada cepa de *Hanseniaspora sp*, isolada em YMA (Merck), em 5 mL de Caldo GPBY - glucose peptone broth yeast (Merck) e depois de 24h de incubação a 25 °C, esta cultura foi transferida para

100 mL do mesmo caldo, tempo e temperatura atingindo a população de aproximadamente 10^{12} ufc.mL⁻¹ (SCHMIDELL *et al*, 2001). A partir desta população foi coletado um volume suficiente para obter a população desejada nos fermentadores (em torno de $2,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹).

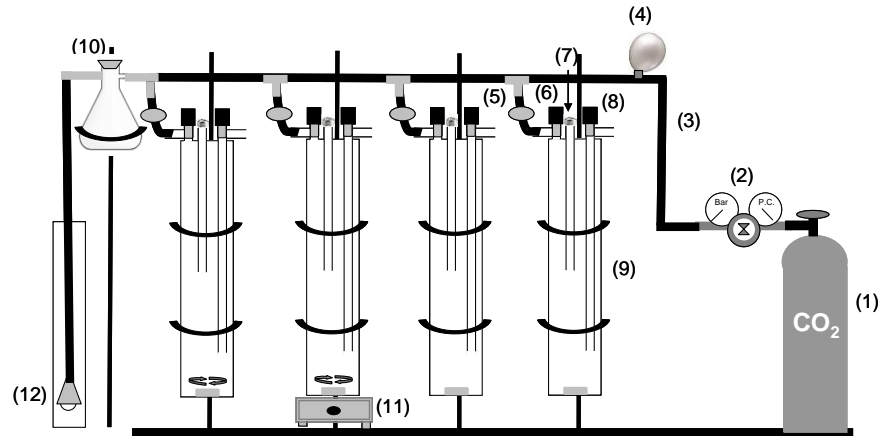


Figura 1 - Esquema dos fermentadores em anaerobiose

(1): Cilindro de gás carbônico para pressurizar sistema. (2): Manômetro/Registro. (3): Tubulação de passagem de gás carbônico pelo sistema. (4): Válvula de segurança contra vazamento de gás. (5): Filtro de 0,20 µm. (6): Tampa rosca para entrada de saída de gás no fermentador. (7): Tampa de borracha para inoculação das leveduras no mosto. (8): Válvula tipo rosca para retirada de amostra. (9): Fermentador de 1450 mL. (10): Recipiente de segurança contra retorno de água no sistema de fermentação. (11): Agitador magnético (Quimis). (12): Batoque para manutenção da anaerobiose no sistema de fermentação.

No décimo dia, as fermentações foram interrompidas e o fermentado de maçã foi centrifugado a 10200 g à 5°C (Centífuga Himac CR21GII) durante 20 minutos, em seguida trasfegado, engarrafado e armazenado sob baixa temperatura (-18 °C).

Pontos de amostragem. Nos tempos de fermentação com 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias foram retirados 10 mL de amostras do fermentado para contagem de células; e nos dias 3, 5, 7 e 10 foram retirados 40 mL para análises físico-químicas. A análise cromatográfica dos compostos voláteis foi realizada em amostras do tempo de 10 dias.

Antes da coleta das amostras o fermentado de cada fermentador (Figura 1) era colocado sob agitação na velocidade 3 do agitador (11) durante 20 minutos. A seguir, a saída do fermentador destinada à coleta era desinfetada com álcool 70%, seguida de lavagem com 40 mL de água destilada para retirada do álcool residual, sempre com a válvula tipo rosca (8) fechada.

Para a retirada das amostras, o registro do manômetro (2) do cilindro de gás carbônico (1) era aberto para que o aumento da pressão interna de gás carbônico nos fermentadores proporcionasse condições para o fermentado subir no tubo de coleta ligado à válvula tipo rosca (8) que era aberta. Os primeiros 7 mL do fermentado correspondentes ao

volume total do tubo interno do fermentador eram desprezados para afastar a possibilidade de coletar amostra não homogeneizada e permanente no interior de tal tubulação; a seguir realizava-se a coleta do volume acima mencionado em tubos estéreis (SOUZA *et al*, 2011).

A cinética de fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa do fermentado (200mL) através da liberação de gás carbônico (CO₂) pelo batoque, durante o período de 10 dias de fermentação a temperatura de 20°C. Para as pesagens a agulha conectada na rolha de borracha foi retirada e o erlenmeyer fechado contendo o fermentado foi pesado a cada 2 horas, em balança analítica (0,001 g de sensibilidade, Bell Engineering- Mark 1300) até peso constante (ROGER *et al*, 2002; BELY *et al*, 1990). A velocidade de fermentação foi calculada pela variação da perda de gás carbônico em função do tempo (Equação 1).

$$V = \Delta\text{CO}_2 / \Delta t \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V = Velocidade de fermentação (gCO₂.L⁻¹.d⁻¹)

ΔCO₂ = Variação de produção de CO₂ (g.L⁻¹)

Δt = Variação de tempo (dias)

2.2.2 Experimentos

Verificação do efeito do SO₂ na cinética de fermentação oxidativa. As leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram inoculadas em fermentadores (*erlenmeyers* de 250 mL) simples com rolha e batoque em uma população inicial de 4,0 x 10⁶ ufc.mL⁻¹ em 200 mL de mosto de maçã despectinizado, filtrado e pasteurizado, com as seguintes concentrações de SO₂: 0, 44, 150, 256 e 300 mg.L⁻¹. Foi monitorada a cinética de fermentação, nas diferentes concentrações de SO₂, por perda de massa dos fermentadores.

Verificação do efeito da temperatura na cinética de fermentação oxidativa. As leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram inoculadas em fermentadores (*erlenmeyers* de 250 mL) simples com rolha e batoque numa população inicial de 4,0 x 10⁶ ufc.mL⁻¹ em 200 mL (volume útil) de mosto de maçã despectinizado, filtrado e pasteurizado, nas temperaturas de 10°, 15°, 20°, 25° e 30° C. Foi

monitorada a cinética de fermentação, nas diferentes temperaturas, por perda de massa dos fermentadores.

Avaliação de diferentes leveduras oxidativas no perfil volátil de fermentados de maçãs. Para avaliar o perfil volátil de fermentados de maçãs elaborados por cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, os compostos voláteis foram analisados por *headspace* estático, identificados e quantificados por cromatografia gasosa. Foram avaliados os compostos voláteis do fermentado final (10° dia de fermentação).

2.2.3 Análises Instrumentais

Coleta dos compostos voláteis - *Headspace*

As amostras do fermentado de maçã foram colocadas em frascos com capacidade de 20 mL, na quantidade de 6 mL, onde foram colocados 50 µL de padrão interno (Ácido heptanóico, Merck). Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção por comparação com padrões. Antes da coleta dos compostos voláteis, as amostras permaneceram a 60°C sob agitação no forno do injetor automático (cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument) durante 10 minutos.

Análise cromatográfica de compostos voláteis

A análise dos compostos aromáticos foi realizada em cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument - YL 6100 GC, equipado com detector de ionização de chama - FID, coluna capilar (Phenomenex) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 25 µm e filme de ZB-WAX com 0,25µm de espessura. A temperatura do injetor foi de 220°C, do detector de 230°C e o gás de arraste foi o nitrogênio a um fluxo de 2,5 mL.min⁻¹. A técnica de injeção foi split 1:1,2 e foi utilizado o modo de injeção automática do CG, com volume de 1500µL. As condições de análise foram com programação de temperatura inicial a 40°C por 5 minutos, elevação de 10°C.min⁻¹ até 150°C, permanecendo nesta temperatura por 10 min. A seguir uma elevação de 10°C.min⁻¹ até 200°C, permanecendo por 5 min. e nova elevação de 10°C.min⁻¹ até 220°C, onde permaneceu por 16 minutos.

Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os obtidos na solução de referência. Para a quantificação das concentrações dos compostos voláteis identificados, foi utilizada a seguinte relação:

$$C = A \cdot \frac{h_i}{H_i} \quad (\text{Equação 2})$$

$$H_i$$

Onde:

C = concentração do componente (mg.L^{-1})

A = concentração da substância na solução de referência (mg.L^{-1})

h = área do pico da substância na amostra

H = área do pico da substância na referência

I = área do pico do padrão interno na referência

i = área do pico do padrão interno na amostra.

A quantificação dos compostos não identificados foi realizada utilizando a equação 2, no entanto foi utilizada a concentração do etanol na solução de referência (A) e a área do pico do etanol na solução de referência (H), assim o valor obtido de cada composto foi em mg de equivalente de etanol.L⁻¹.

2.2.4 Análises Físico-Químicas

Nos pontos 0, 3, 5, 7 e 10 dias foram realizadas análises de **açúcares redutores** quantificados pelo método químico clássico de Somogyi-Nelson assim como os açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise da sacarose com HCl 1 N (50 °C / 5 min) e **álcool** através do uso do ebuliômetro. A **acidez titulável total** foi determinada por neutralização com NaOH 0,1 N até pH 8,33 com fenolftaleína e calculada como ácido málico, sendo expresso em g.100 mL^{-1} , e a **acidez volátil** foi calculada como ácido acético e expressa em g.100 mL^{-1} . O **nitrogênio total** foi determinado pelo método de Kjeldhal (IAL, 2008; BARON *et al*, 1977). Todas as análises físico-químicas foram realizadas nas amostras dos fermentados previamente centrifugadas para a separação da biomassa.

2.2.5 Análises Microbiológicas

As amostras dos fermentados de maçã foram coletadas e preparadas para contagem microbiológica conforme recomendado por Silva *et al* (2010). Foram preparadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1%, e semeadas em superfície, com alça de Drigalski, no meio seletivo para leveduras oxidativas YA-LYS (Ágar extrato de levedura e lisina) (CROUS *et al*, 2009; NOGUEIRA, 2003). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas. Para a contagem foram consideradas as placas que apresentaram de 25 a 250 colônias típicas da

levedura considerada, respeitando a diluição correspondente. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL⁻¹). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa.

2.2.6 Análise Sensorial

Nos produtos fermentados obtidos a partir da ação de leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram realizadas análise olfativa de preferência pareada, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), e teste de aceitação com escala hedônica de 7 pontos segundo metodologia descrita por Faria e Yotsuyanagi (2002). O número de participantes para esta análise foi igual a 50 pessoas.

2.2.7 Análises Estatísticas

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para diferenciação de médias em software Excell 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de análises físico-químicas do mosto de maçã utilizado no processo de fermentação estão apresentados na Tabela 1. Pelo teor de nitrogênio o mosto foi classificado como de alto teor (>150 mg.L⁻¹) (NOGUEIRA *et al*, 2007). As leveduras *Hanseniaspora valbyensis* utilizam no seu crescimento teores entre 30-40 mg.L⁻¹ de nitrogênio (NOGUEIRA, 2003). Desta forma, esta concentração de nitrogênio total não caracteriza este nutriente como um fator limitante de crescimento de leveduras, porém o seu residual pode afetar a estabilidade microbiológica, durante o armazenamento, de bebidas que não receberam tratamento térmico, podendo ocorrer alterações na qualidade do produto final (LEA; DRILLEAU, 2003).

Pode ser observado (Tabela 1) que o mosto de maçã da cultivar Gala, utilizado como meio de fermentação por leveduras apiculadas, apresentou baixo teor de açúcares (9,78 g.100mL⁻¹), quando comparado com os resultados de Wosiacki *et al* (2008) que encontrou um

valor médio para a mesma cultivar de $11,78 \pm 2,24 \text{ g.100mL}^{-1}$. Isto atesta que o grau de maturidade da fruta utilizada para o processamento do suco não estava no seu estágio completo de maturação, podendo afetar o rendimento de etanol. Com relação à acidez total, expressa em ácido málico, o resultado encontrado está próximo ao encontrado por Wosiacki *et al* (2008), classificando-o com baixa acidez (PAGANINI *et al*, 2004).

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas do mosto e dos diferentes fermentados de maçã da cultivar Gala após 10 dias de fermentação

Parâmetros físico-químicos	Mosto cv. Gala	Leveduras oxidativas	
		<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>
Nitrogênio (mg.L ⁻¹)	153,47 ± 0,02	106,32 ± 5,70 ^a	118,34 ± 3,46 ^a
AT (g.100mL ⁻¹)	0,34 ± 0,004	0,41 ± 0,00 ^a	0,36 ± 0,01 ^b
AV (g.100mL ⁻¹)	0,02 ± 0,008	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
AR (g.100mL ⁻¹)	9,23 ± 0,09	3,86 ± 0,04 ^a	2,47 ± 0,11 ^b
ART (g.100mL ⁻¹)	9,78 ± 0,05	3,70 ± 0,07 ^a	2,82 ± 0,02 ^b
Etanol (°GL)	-	1,9	1,3

Nota: AT: Acidez total; AV: Acidez volátil; AR: Açúcares redutores; ART: Açúcares redutores totais a, b = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras (p≤0,05).

Na Tabela 1, após 10 dias de fermentação pode ser observada a evolução de compostos presentes no mosto da cultivar Gala durante a fermentação com as cepas de leveduras apiculadas *H. uvarum* e *H. guilliermondii*. A fermentação foi realizada em condições próximas às observadas no processamento brasileiro de fermentado de maçã, contudo o mosto foi pasteurizado e obtido de frutas que foram selecionadas eliminando aquelas com pontos de podridão. Não foi adicionado metabissulfito ao mosto em virtude das duas cepas apresentarem baixa resistência a este composto.

As duas cepas aumentaram a acidez total do fermentado atingindo valores de 0,41 e 0,36 g.100mL⁻¹ expresso em ácido málico para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente. Houve aumento também da acidez volátil que apresentou o mesmo valor (0,05 g.100mL⁻¹) para ambas as cepas, valores próximos aos encontrados por Mendoza *et al* (2009) para *Kloeckera apiculata* (anamorfa de *H. uvarum*), com variação de 0.69 a 0.83 g.L⁻¹ de ácido acético em fermentação de mosto de uva.

O consumo de nitrogênio foi de 47,15 mg.L⁻¹ e 35,15 mg.L⁻¹ para as cepas *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente, estando próximo aos valores citados por Nogueira (2003). Entretanto, Bely *et al* (2008) encontraram um consumo superior para *T. delbrueckii* (levedura não-*Saccharomyces*) com variação de 89,5 a 113 mg.L⁻¹ em fermentação de mosto de uva.

Ambas as cepas mantiveram açúcares residuais no produto final (Figura 2), sendo o teor de 3,70 g.100mL⁻¹ para a cepa *H. guilliermondii* e 2,82 g.100mL⁻¹ para *H. uvarum*. No gráfico de evolução de etanol das duas cepas, é possível observar que há uma tendência de aumento do teor de etanol provavelmente devido à existência de açúcares residuais no processo. A cepa *H. uvarum* apresentou maior teor no produto final (1,9°GL) do que a cepa *H. guilliermondii* (1,3°GL). Assim percebe-se que a cepa *H. guilliermondii* consumiu maior quantidade de açúcares durante o processo, mas produziu menor teor de etanol, este fato poder ser devido a produção de compostos secundários ao metabolismo deste microrganismo.

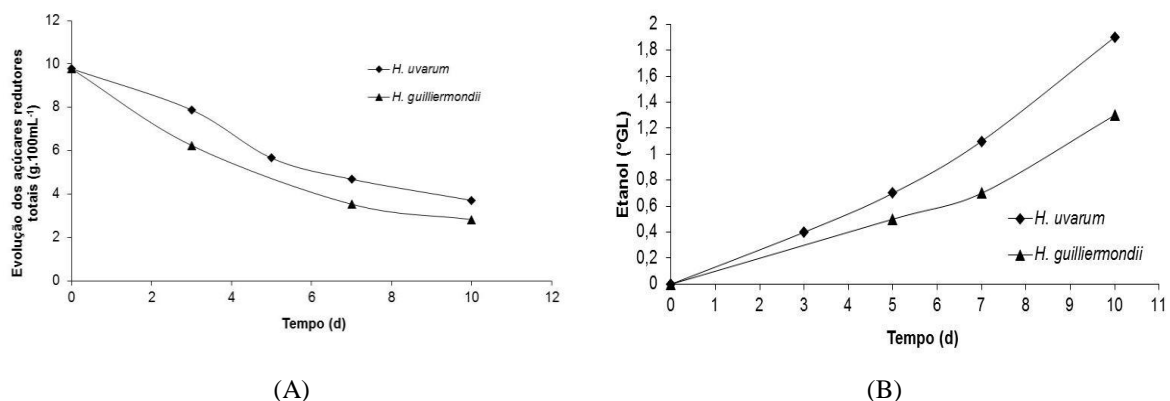


Figura 2 - Evolução de açúcares e etanol nos fermentados de maçã realizados sob a ação de diferentes leveduras oxidativas. (A) Evolução dos açúcares redutores totais. (B) Evolução de etanol.

Resultados de baixa produção de etanol por leveduras não-*Saccharomyces* foram encontrados por Ciani; Beco e Comitini (2006) e Ciani e Maccarelli (1998). Entretanto, Xu *et al* (2006) em fermentações puras de *H. valbyensis* obtiveram um teor de etanol de 6% (v/v) com 30,21 g.L⁻¹ de açúcares residuais na sidra, e em mosto de uva Moreira *et al* (2008) constataram teores de 5,4 e 7,2 % (v/v) de etanol para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente, Bely *et al* (2008) para cepas de *T. delbrueckii*, verificaram variação de 7,40 a 9,38 % (v/v) de etanol e 187,00 a 219,63 g.L⁻¹ de açúcar residual (com inicial em 360 g.L⁻¹).

Verifica-se que a cepa *H. uvarum* atingiu a mesma população máxima de leveduras do que a cepa *H. guilliermondii*, alcançando ao redor de 10¹¹ ufc.mL⁻¹, sendo no 3° e no 2° dias de fermentação, respectivamente (Figura 3). Resultados muito diferentes de Viana *et al* (2008), Mendoza *et al* (2009) e Nogueira (2003), que registraram populações máximas de 10⁸ ufc.mL⁻¹ (*H. guilliermondii*), 1,1 x 10⁸ ufc.mL⁻¹ (*Kloeckera apiculata*), 6,71 x 10⁶ ufc.mL⁻¹ (*H. valbyensis*), respectivamente. Quanto ao tempo para atingir tais populações, verificou-se semelhança com o trabalho de Mamede e Pastore (2004), onde *Kloeckera apiculata* em

mostos de uva apresentou um rápido crescimento nas 72 horas iniciais da fermentação e com Nogueira (2003) que verificou população máxima 1,6 a 2,0 dias após o inoculo de *H. valbyensis* em mosto de maçã.

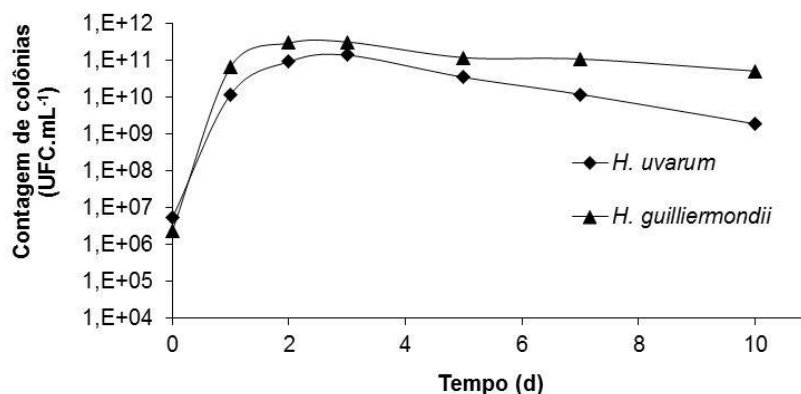


Figura 3 - Resultados de contagem de colônias de duas leveduras oxidativas diferentes em mosto de maçã

Em relação à cinética de crescimento das leveduras a cepa *H. uvarum* apresentou maior V_{\max} no processo fermentativo e mais rapidamente que *H. guilliermondii* (Tabela 2). Este dado comprova uma maior atividade fermentativa para primeira cepa, visto que foi a maior produtora de álcool.

Com relação às cepas *Hanseniaspora* sp. percebeu-se que a velocidade máxima foi atingida na sua fase estacionária, diferente das cepas fermentativas que normalmente apresentam a velocidade máxima do meio para o final da fase de latência (ZARDO *et al*, 2008; NOGUEIRA *et al*, 2008).

Tabela 2 - Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzidos sob ação de duas diferentes cepas oxidativas

Cepas	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo V_{\max} (dias)
<i>H. uvarum</i>	3,85	4,25
<i>H. guilliermondii</i>	2,33	4,75

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da análise cromatográfica do *headspace* tanto do mosto de maçã utilizado para a fermentação, quanto dos fermentados elaborados com cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*.

No mosto de maçã a análise cromatográfica permitiu quantificar ésteres, aldeídos e álcoois, além de 4 compostos não identificados. Foi possível constatar a contribuição do metabolismo secundário de *H. uvarum* e *H. guilliermondii* na produção de diversos compostos voláteis. Assim, com exceção do 1-hexanol e dois compostos não identificados,

que apareceram no mosto e não no fermentado, butanoato de etila que mesmo estando presente no suco, foi detectado na mesma concentração no fermentado elaborado por *H. guilliermondii*, e do acetato de isopentila presente apenas no produto de *H. uvarum*, todos os demais compostos detectados no suco tiveram sua concentração aumentada no fermentado elaborado com as cepas oxidativas.

Tabela 3 - Compostos voláteis capturados por *headspace* estático do mosto e fermentados de maçã elaborados com cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*.

Compostos voláteis	Mosto de maçãs	<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>
Ésteres			
Etanoato de etila	1,14 ± 0,11	146,99 ^a ± 0,75	9,90 ^b ± 0,60
Butanoato de etila	0,05 ± 0,00	nd	0,05 ± 0,00
Acetato de isopentila	0,06 ± 0,01	0,63 ± 0,03	nd
Etanoato de hexila	0,07 ± 0,01	0,18 ± 0,01	nd
2-hidróxi propanoato de etila	16,07 ± 0,64	47,99 ^a ± 3,96	45,17 ^b ± 3,73
Octanoato de etila	nd	0,10 ^a ± 0,01	0,02 ^b ± 0,00
Decanoato de etila	nd	0,29 ^a ± 0,03	0,09 ^a ± 0,00
1,4-butanoato de etila	2,90 ± 0,03	6,24 ^a ± 0,37	4,33 ^a ± 0,21
Dodecanoato de etila	1,34 ± 0,00	4,26 ^a ± 0,36	2,94 ^a ± 0,22
Aldeídos			
Etanal	3,50 ± 0,30	38,04 ^a ± 0,56	21,47 ^b ± 0,56
Ácidos			
Ácido butanóico	nd	4,85 ^a ± 0,25	3,30 ^a ± 0,27
Álcoois			
Etanol	84,32 ± 6,82	17459,91 ^a ± 618,97	8876,94 ^b ± 462,49
3-metil-1-butanol	0,88 ± 0,08	21,99 ^a ± 0,15	12,41 ^b ± 0,37
1-hexanol	0,61 ± 0,01	nd	nd
2-hexanol	nd	0,28 ^a ± 0,02	0,13 ^a ± 0,01
Cetonas			
2-heptanona	nd	nd	0,04 ± 0,00
2-octanona	nd	0,06 ± 0,00	nd
Não identificados			
1	nd	5,16 ± 0,18	nd
2	nd	11,41 ± 0,40	nd
3	47,38 ± 3,83	70,17 ± 2,49	nd
4	nd	24,12 ^a ± 0,86	22,21 ^a ± 1,16
5	52,23 ± 4,22	93,64 ^a ± 3,32	81,42 ^a ± 4,24
6	nd	1,27 ± 0,04	nd
7	nd	10,63 ^a ± 0,38	11,01 ^a ± 0,57
8	nd	nd	1,10 ± 0,06
9	nd	nd	0,83 ± 0,04
10	nd	20,56 ^a ± 0,73	5,53 ^b ± 0,29
11	nd	nd	1,14 ± 0,06
12	0,79 ± 0,06	nd	nd
13	0,82 ± 0,07	nd	nd

Nota: Concentração dos compostos voláteis identificados em mg.L⁻¹, nd = não detectado; compostos não identificados: mg de equivalente de etanol. L⁻¹; dados mostram a média de três replicatas ± DP; a,b = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras dos fermentados (p <0,05).

Desta forma ficou evidente que octanoato e decanoato de etila, ácido butanóico, 2-heptanona, 2-octanona e 2-hexanol são compostos produzidos por leveduras do gênero *Hanseniaspora*, pois não foram detectados no mosto de maçã. Estes resultados estão de acordo com Simões (2008) que apresenta um quadro resumo dos principais compostos voláteis encontrados por diversos autores na maçã, suco e sidra, no qual os compostos citados não são listados para o produto analisado. No entanto, estes compostos também não são citados para a sidra.

Diversos estudos têm demonstrado que o processo de pasteurização pode causar perdas de compostos voláteis tanto no suco de maçã quanto na sidra. Nesse sentido Janzantii *et al* (2003), registraram perda total de octanoato de isoamila e de mais de 15 compostos não identificados em seus experimentos em suco clarificado de maçã Fuji. Boylston *et al* (2003) realizaram estudos em sidra e concluíram que a pasteurização realmente afeta os atributos sensoriais da bebida.

Neste trabalho não foi possível avaliar perda de compostos voláteis no mosto de maçã, em virtude da análise cromatográfica ter sido realizada apenas no mosto já pasteurizado.

A análise cromatográfica dos compostos voláteis extraídos pelo método de *headspace* nos fermentados de maçã, permitiu captar vários ésteres e dois álcoois superiores, dentre outros compostos, confirmando dados da literatura, que afirmam que cepas de leveduras oxidativas são altamente produtoras de ésteres e álcoois superiores (Tabela 3). Foi verificado que a cepa de levedura utilizada influencia o perfil de voláteis, pois foram encontrados resultados que diferenciaram significativamente uma cepa da outra em sete dos quinze compostos captados nos fermentados produzidos tanto por *H. uvarum* quanto por *H. guilliermondii*, além de que foram identificados compostos diferentes em cada uma das cepas.

Foi também verificada uma maior concentração dos compostos quantificados na cepa *H. uvarum* em relação à concentração dos compostos de *H. guilliermondii* (com exceção do butanoato de etila, 2-heptanona e os compostos não identificados 8, 9 e 11, que foram encontrados apenas nos fermentados de *H. guilliermondii*). Rojas *et al* (2001) tendo trabalhado com as mesmas espécies de leveduras com fermentações em meios sintéticos, encontraram resultado oposto, em que a cepa *H. guilliermondii* produziu maiores quantidades de compostos como acetato de isopentila, etanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de

etila e etanoato de isobutila, em relação a *H. uvarum*, o que neste trabalho ocorreu apenas com o composto não identificado 7.

Neste estudo foi constatado que o etanoato de etila (146,99 e 9,90 mg.L⁻¹), 2-hidróxi propoanoato de etila (47,99 e 45,17 mg.L⁻¹), 1-4-butanoato de etila (6,24 e 4,33 mg.L⁻¹) e dodecanoato de etila (4,26 e 2,94 mg.L⁻¹), foram os ésteres detectados em maior quantidade nos fermentados elaborados com ambas as cepas (*H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente), assim como o octanoato de etila (0,10 e 0,02 mg.L⁻¹) e decanoato de etila (0,29 e 0,09 mg.L⁻¹) foram encontrados em menores proporções. Rojas *et al* (2001) encontrou resultado semelhante para o etanoato de etila, tanto para *H. guilliermondii* quanto para *H. uvarum*, embora a diferença de quantidade entre as cepas tenha sido grande, este composto foi o mais abundante dentre os compostos produzidos por ambas as cepas.

Neste sentido Xu *et al* (2006) verificaram que o etanoato de etila, 2-hidróxi propoanoato de etila e 3-hexanoato de etila foram também os ésteres produzidos em maiores concentrações em sidras elaboradas por cepas de *Hanseniaspora valbyensis*, sugerindo ser uma característica deste gênero de leveduras. Entretanto, Mingorance-Cazorla *et al* (2003) utilizaram cepas de *H. uvarum* para fermentar mosto de uva e suco de laranja e obtiveram o etanoato de etila apenas na fermentação do suco de laranja.

No entanto, pequena concentração de butanoato de etila (0,05 mg.L⁻¹) foi constatada apenas para *H. guilliermondii*, enquanto acetato de isopentila (0,63 mg.L⁻¹) e etanoato de hexila (0,18 mg.L⁻¹) estiveram presentes apenas no fermentado de *H. uvarum*.

Cortes e Blanco (2011) afirmam ser o octanoato de etila, hexanoato de etila e acetato de isopentila os compostos mais influentes e determinantes para os aromas secundários, com notas frutais em vinhos de uva da variedade Treixadura. Para Garruti *et al* (2001) o acetato de isopentila determina aroma doce, de banana, frutal. As fermentações de vinho e sidra compartilham muitas similaridades do ponto de vista microbiológico, assim como os compostos voláteis formados nestas fermentações, terão um mesmo efeito no limiar de percepção do aroma, seja qual for a sua origem (FACUNDO, 2009; MORRISSEY *et al*, 2004; ROJAS *et al*, 2003; HEARD; FLEET, 1986).

Com relação à presença destes compostos no fermentado de maçã, percebe-se que somente octanoato de etila (0,10 e 0,02 mg.L⁻¹) foi produzido em pequena quantidade por *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente. O acetato de isopentila (0,63 mg.L⁻¹) foi detectado apenas para a cepa de *H. uvarum* e o hexanoato de etila não foi produzido por nenhuma das cepas estudadas.

Peng *et al* (2009), constataram que são nove os componentes chave para o aroma da sidra (Shaanxi-China) obtida de maçãs Fuji: etanoato de etila, ácido isobutirato etanóico, etanoato de dimetil propanol ou acetato isopentílico, octanoato de etila, 4-etil hidroxibutanoato, 3-metil-1-butanol ou álcool isopentílico, 3,4,5-trimetil-4-heptanol, 1-nonanol e 3-metil-tio-1-propanol, os quais poderiam ser responsáveis por 85,61% do total de variação nos componentes do aroma do produto. Destes compostos, quatro (etanoato de etila, acetato isopentílico, octanoato de etila e 3-metil-1-butanol) foram encontrados nos fermentados de maçã deste estudo.

Para a cepa de *H. uvarum* foi quantificado um maior teor de etanol em comparação com a cepa *H. guilliermondii*, confirmando o resultado já encontrado por ebulliômetro, e na análise estatística onde a diferença foi considerada significativa. Este resultado foi contrário ao trabalho desenvolvido por Moreira *et al* (2008) que encontraram teor maior para a cepa *H. guilliermondii*.

Xu *et al* (2006) perceberam que *Saccharomyces* apresenta uma conversão de açúcar para álcool de 11,5%, enquanto *Hanseniaspora valbyensis* produz álcool com uma conversão que não ultrapassa 6% (v/v). Neste estudo encontramos um teor de 17459,91 mg.L⁻¹ para *H. uvarum* e 8876,94 mg.L⁻¹ para *H. guilliermondii*, correspondendo a 2,2% (v/v) e 1,1% (v/v), respectivamente. Oliveira *et al* (2005) tendo realizado fermentação de caldo de cana com diversas cepas diferentes de *Saccharomyces* sp. e também com cepas não-*Saccharomyces*, considerou o perfil na formação de voláteis da espécie *Hanseniaspora occidentalis* muito semelhante ao das *Saccharomyces* sp., tendo encontrado valores que vão de 2,1 a 8,3% (v/v) de etanol para esta cepa.

O etanal, considerado o aldeído mais importante na produção de vinhos, foi quantificado nas duas cepas de leveduras. Este composto, normalmente conhecido como um subproduto da fermentação alcoólica, tem sua produção influenciada pela cepa de levedura. Em concentrações menores, o etanal (acetaldeído) contribui com notas frutais, entretanto em altas concentrações (>200 mg.L⁻¹) este composto influencia negativamente o aroma (GIL *et al*, 2006). Os resultados encontrados neste trabalho 38,04 mg.L⁻¹ para *H. uvarum* e 21,47 mg.L⁻¹ para *H. guilliermondii* evidenciam, de acordo com este autor, sua contribuição com notas frutais ao fermentado de maçã obtido.

Segundo Garden-Cerdan e Ancin-Azpilicueta (2006), as cepas selvagens ou não-*Saccharomyces* pouco contribuem para a formação de álcool isoamílico (composto que contribui para o aroma frutal), o que é contraditório ao resultado encontrado para a cepa *H.*

uvarum que demonstrou ser capaz de produzir uma concentração de 21,99 mg.L⁻¹, bem como para *H. guilliermondii* que produziu 12,41 mg.L⁻¹ deste composto. Neste sentido Xu *et al* (2006) verificaram que a cepa de *H. valbyensis* foi capaz de produzir 45,35 mg.L⁻¹ de álcool isoamílico em fermentações de culturas puras e quando combinada com *Saccharomyces* sp., esta produção chegou a atingir 232,05 mg.L⁻¹, dependendo do tempo de inóculo.

Romano *et al* (2003) relatam que a cepa *Hanseniaspora* sp. produziu uma menor quantidade de álcool isoamílico (40 mg.L⁻¹) e uma maior concentração de etanoato de etila (100 mg.L⁻¹) do que a cepa *Saccharomyces* (250 mg.L⁻¹, <10 mg.L⁻¹, respectivamente), evidenciando que *S. cerevisiae* produziu uma concentração muito maior de álcoois superiores. No presente trabalho obteve-se uma concentração abaixo de 40 mg.L⁻¹ de álcool isoamílico para ambas as cepas, porém em relação ao etanoato de etila, *H. uvarum*, produziu quase 50% a mais que os dados relatados por estes autores.

Em relação aos compostos não identificados verificou-se que quatro deles (compostos 4, 5, 7 e 10) foram detectados tanto nos fermentados de *H. uvarum* quanto de *H. guilliermondii*, em concentrações consideráveis, três deles não apresentaram diferença significativa, indicando ser um composto típico das cepas deste gênero. No entanto, quatro compostos estiveram presentes apenas no fermentado de *H. uvarum* e três compostos apenas em *H. guilliermondii*, podendo sugerir tratar-se de diferenças em nível de espécie.

Na Figura 4 encontram-se os resultados da análise de diferentes concentrações de SO₂ no mosto para fermentação de leveduras oxidativas. Percebe-se que em concentrações maiores que 44 mg.L⁻¹ de SO₂ a fermentação não ocorreu até o 9º dia de processo. Na concentração de 44 mg.L⁻¹, a fermentação aconteceu de maneira mais lenta e, na ausência de SO₂ o processo fermentativo ocorreu de maneira mais rápida, consumindo maiores teores de CO₂, observado no gráfico pela perda de massa. Assim, considerando a sensibilidade a este composto pelas cepas de *Hanseniaspora* sp., optou-se por não utilizá-lo no mosto dos demais ensaios de fermentação realizados neste trabalho.

Bedriñana *et al* (2010) que isolaram e identificaram uma grande variedade de espécies de leveduras, incluindo *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces*, no processo de produção de sidra, justificam a presença do gênero *Hanseniaspora* em fases avançadas de fermentação, pelo menor teor de açúcar do mosto de maçã, em relação ao suco de uva e também à não adição de SO₂. Romano *et al* (1994) endossam ao escrever que tanto a presença de SO₂, quanto a quantidade deste composto no mosto regula a atividade microbiana impedindo o crescimento de alguns microrganismos.

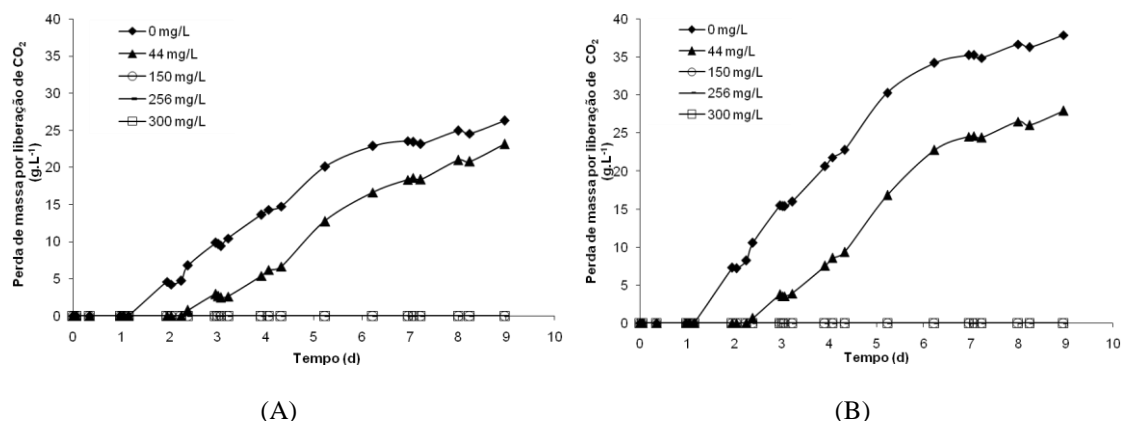


Figura 4 - Resultados de perda de massa por liberação de CO₂ nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes concentrações de SO₂ no mosto. (A) Resultados para a cepa *H. uvarum*. (B) Resultados para a cepa *H. guilliermondii*

Bedriñana *et al* (2010) que isolaram e identificaram uma grande variedade de espécies de leveduras, incluindo *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces*, no processo de produção de sidra, justificam a presença do gênero *Hanseniaspora* em fases avançadas de fermentação, pelo menor teor de açúcar do mosto de maçã, em relação ao suco de uva e também à não adição de SO₂. Romano *et al* (1994) endossam ao escrever que tanto a presença de SO₂, quanto a quantidade deste composto no mosto regula a atividade microbiana impedindo o crescimento de alguns microrganismos.

As propriedades enológicas do SO₂ livre compreendem sua ação como anti-séptico, antioxidante e antioxidásico. O equilíbrio entre as formas de SO₂ livre e do bissulfito (HSO₃) depende do pH e da presença de moléculas que combinam com o dióxido de enxofre. Com o aumento de pH a forma ativa diminui, o que explica a necessidade de uma maior quantidade de sulfito em pH elevado (RIBERÉAU-GAYON *et al*, 1998; BEECH, 1993).

Na elaboração da sidra brasileira o SO₂ torna-se indispensável em virtude da qualidade fitopatológica das frutas e das temperaturas próximas de 25°C, durante o processamento, que facilitam a proliferação de microrganismos contaminantes (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005). Contudo, o nível de dióxido de enxofre em que o microrganismo é afetado varia muito entre espécies. Esta variação permite utilizar o dióxido de enxofre em vinhos ou mostos, e, seletivamente inibir ou inativar microrganismos indesejáveis sem ter um efeito sobre os desejáveis (HENDERSON, 2009).

Na Figura 5 estão apresentados os valores de liberação de CO₂ das duas cepas oxidativas analisadas em diferentes temperaturas. Percebe-se que na temperatura de 10°C a

liberação de CO₂ foi muito pequena até o 9º dia de processo, isto pode ser devido ao fato de baixas temperaturas inativarem a atividade fermentativa da levedura. Beltran *et al* (2008) endossam afirmando que em baixas temperaturas (7-15°C) as fermentações são mais longas porque o metabolismo das leveduras depende da absorção de nutrientes conduzida por permeases. Justificam que essas enzimas são altamente dependentes da temperatura, e que mudanças podem causar alterações conformacionais na sua estrutura.

Para D'Amato *et al* (2006) a temperatura influencia a atividade das leveduras e o seu aumento afeta a velocidade da fermentação, os autores consideram que entre 15 e 35°C a duração da fase latente torna-se curta. Este comportamento foi observado nas cepas de *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, entretanto, na faixa de 15 a 30°C, salientando que na temperatura de 30°C foi observado um efeito negativo, representado pela estabilização da perda de massa por liberação de CO₂ a partir do 5º dia de fermentação. A temperatura ideal para o processo fermentativo foi de 25°C, seguida de 20°C. Este ensaio determinou a temperatura a ser utilizada nos outros ensaios de fermentação realizados neste trabalho.

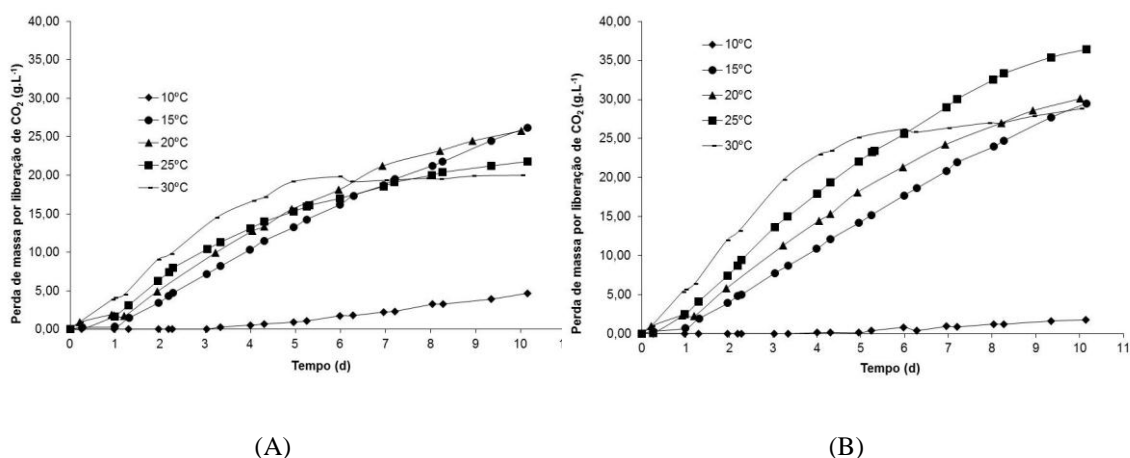


Figura 5 - Resultados de perda de massa por liberação de CO₂ nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes temperaturas durante o processo fermentativo. (A) Resultados para a cepa *H. uvarum*. (B) Resultados para a cepa *H. guilliermondii*

O efeito da temperatura, pH e concentração de açúcares na variação do crescimento e na formação de biomassa em diversas leveduras não-*Saccharomyces* (*Kloeckera apiculata*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia anomala*, *Candida sp*) têm sido estudados por diversos autores (ARROYO-LÓPEZ *et al*, 2006; D'AMATO *et al*, 2006; SERRA *et al*, 2005; CHAROENCHAI *et al*, 1998; SORENSEN; JAKOBSEN, 1997), os quais de uma maneira geral, verificaram que a temperatura é o fator mais preponderante no crescimento das leveduras.

As leveduras oxidativas ou não-*Saccharomyces* são conhecidas pela sua contribuição aos compostos voláteis aromáticos, principalmente ésteres em bebidas fermentadas. Segundo Viana *et al* (2008) as leveduras do gênero *Hanseniaspora* são as melhores produtoras de ésteres de acetato, que são efetivos para a qualidade aromática dos vinhos mesmo em pequenas quantidades (NYKANEN, 1986). Ciani; Beco e Comitini (2006), Rojas *et al* (2003) e Bilbao *et al* (1997) também destacam que os ésteres formados em fermentações são os maiores impactantes no aroma dos produtos. A contribuição destas leveduras aos compostos aromáticos foi percebida nos resultados de preferência destes produtos (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados com diferentes cepas oxidativas.

Fermentados de maçã	Cepas de leveduras	Σ das ordens
A	<i>H. uvarum</i>	24 ^a
B	<i>H. guilliermondii</i>	31 ^a

Nota: a = não há diferença significativa entre as amostras com mesma letra ($p < 0,05$)

A porcentagem de homens e mulheres que participaram da avaliação sensorial foi de 23,64 % e 73,91 %, respectivamente. Das pessoas que participaram da avaliação de aceitabilidade do fermentado de maçã, 63,64 % pertenciam à faixa etária menor que 25 anos. Do total de participantes, 80,00 % informaram idade inferior a 35 anos, caracterizando a predominância de público jovem. E 52 % afirmaram que raramente consomem vinhos.

Observa-se que não existe diferença significativa na preferência entre as amostras, mas devido ao fato da amostra produzida sob a ação de *H. guilliermondii* ter sido considerada preferida um maior número de vezes, foi realizado o teste de aceitabilidade com este produto (Figura 6). A média de aceitabilidade para a amostra foi de 5,45 (50 julgamentos), correspondendo a um percentual de 77,86 %. O percentual de respostas que ficaram classificadas entre os níveis gostei, gostei muito e gostei muitíssimo foi de 87,10 %, podendo assim concluir que esta amostra teve um resultado positivo em sua análise sensorial olfativa.

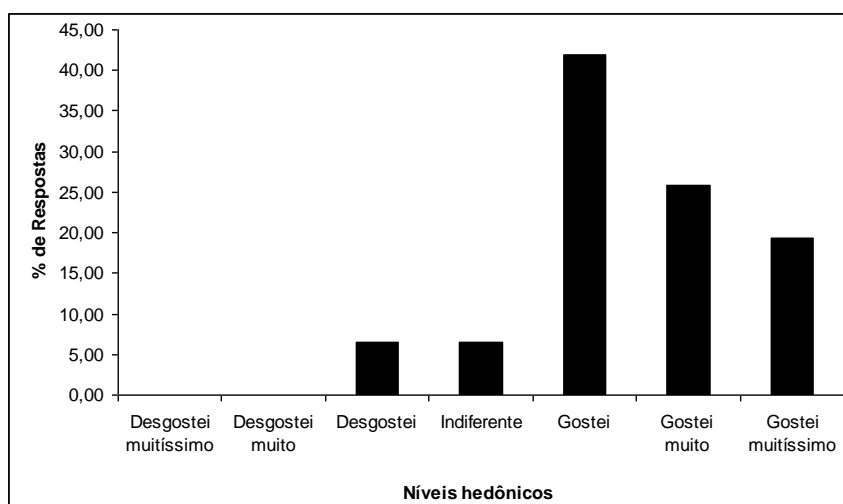


Figura 6 - Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da levedura *H. guilliermondii*

Na comparação dos resultados de análise olfativa e dos compostos voláteis detectados, percebeu-se conflito com os autores Ciani; Beco e Comitini (2006), Rojas *et al* (2003) e Bilbao *et al* (1997) que destacam que os ésteres formados são os maiores

impactantes no aroma dos produtos. Pois a quantidade total de ésteres produzidos nos fermentados de maçã obtidos por *H. guilliermondii*, que foi mais preferida, foi aproximadamente 3 vezes menor que *H. uvarum*.

Da mesma forma, a quantidade de álcoois superiores produzidos por *H. uvarum* foi aproximadamente 1,5 vezes maior que *H. guilliermondii*, não justificando a preferência do fermentado produzido com *H. guilliermondii*, já que estes compostos também contribuem positivamente para o aroma do produto, conforme destaca Moreira *et al* (2008). No entanto, de acordo com Rapp e Mandery (1987) que sustentam a tese de que álcoois superiores influenciam negativamente a avaliação sensorial.

Assim sugere-se pelos resultados deste trabalho que a maior concentração de álcoois superiores quantificada no fermentado elaborado com *H. uvarum*, possa ter interferido negativamente na percepção olfativa, fazendo do fermentado produzido por *H. guilliermondii* o de maior preferência entre os julgadores.

4 CONCLUSÕES

As cepas de *Hanseniaspora* sp. apresentaram elevada sensibilidade ao sulfito, temperatura ótima de fermentação entre 20-25° C, manutenção de açúcar residual na quantidade de 3,70 e 2,82 g.100mL⁻¹, para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente, após 10 dias de fermentação e elevada atividade fermentativa.

H. guilliermondii apresentou um perfil de voláteis bem aceito pela análise sensorial olfativa, entretanto, na análise cromatográfica foi a amostra que apresentou menores concentrações de ésteres (62,50 mg.L⁻¹, comparada a 206,67 mg.L⁻¹ no fermentado elaborado com *H. uvarum*) e de álcoois superiores (14,54 mg.L⁻¹, comparada a 22,27 mg.L⁻¹ no fermentado elaborado com *H. uvarum*), compostos considerados na literatura como maiores contribuintes de aroma em bebidas fermentadas.

REFERÊNCIAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR 13.170**: teste de ordenação em análise sensorial. São Paulo: ABNT, 1994.

ARROYO-LÓPEZ, F.N.; DURÁN QUINTANA, M.C.; GARRIDO FERNÁNDEZ, A. Use of the generalized z-value concept to study the effects of temperature, NaCl concentration and pH on *Pichia anomala*, a yeast related to table olive fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.45-51, 2006.

BARON, A.; BOHUON, G.; DRILLEAU, J.F. Note about formol index of apple juice concentrate. **Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique**, n.70, p.19-26. 1977.

BEDRIÑANA R.P.; SIMÓN A. Q.; SUÁREZ VALLES, B. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. **Food Microbiology**, v.27, p.503-508, 2010.

BEECH, F. W. Yeasts in cider-making. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts technology**. 2. ed. London: Academic Press, 1993. p.169-213.

BELTRAN, G.; NOVO, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A.; ROZÉS, N. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.2, p.169-177, 2008.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J.M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal of Enology and Viticulture**, n.41, p.319-324. 1990.

BELY, M.; STOECKLE, P.; MASNEUF-POMARÈDE, I.; DUBOURDIEU, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, p.312-320, 2008.

BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter of Applied Microbiology**, v.24, p.37-39. 1997.

BOYLSTON, T. D.; WANG, H.; REITMEIER, C. A.; GLATZ, B. A. Effects of processing treatment and sorbate addition on the flavor characteristics of apple cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.7, p.1924-1931. 2003.

CHAROENCHAI, C.; FLEET, G.; HENSCHKE, P.A. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.49, p.283-288, 1998.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Itália, v.108, p.239-245. 2006.

CIANI, M.; MACCARELLI, F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeast associated with winemaking. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.199–203, 1998.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n.4, p.925-932, 2011.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. **Fungal Biodiversity**. Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009.

CSOMA, H.; SIPICZKI, M.; Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.328-336. 2008.

D'AMATO, D.; CORBO, M.R.; DEL NOBILE, M.A.; SINIGAGLIA, M. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.1152-1157, 2006.

FACUNDO, H.V.V. **Mudanças no perfil sensorial e de voláteis do suco de abacaxi concentrado durante o processamento**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial**. 1. ed. Campinas: ITAL/Lafise, 2002. p.116.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research Technology**, v.222, p.15-25, 2006.

GARRUTI, D.; FRANCO, M.R.B.; SILVA, M.A.P.; JANZANTTI, N.S.; ALVES, G.L. Compostos voláteis do sabor de pseudofrutos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) CCP-76. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 4. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analitical Chemical Acta**, v.563, p.145-153, 2006.

HEARD, G.M. ; FLEET, G.H. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines, **Food Technology in Australia**, v.38, p.22-25, 1986.

HENDERSON, P. Sulfur dioxide science behind this anti-microbial, anti-oxidant, wine additive. **Practical winery & Vineyard Journal**, 2009. Disponível em: <<http://www.practicalwinery.com/janfeb09/page3.htm>>. Acesso em: 06 out. 2011.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: _____. **Normas analíticas**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.523-528, 2003.

LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J. F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H. **Fermented Beverage Production**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 2003.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Evaluation of the major compounds formed during grape must fermentation by yeast isolated from "Serra Gaúcha" (RS) region. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.3, July/Sept, 2004.

MENDOZA, L. M.; MANCA DE NADRA, M. C.; BRU, E.; FARIAS, M. E. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.229-237, 2009.

MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J.M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ; RODRÍGUEZ-VICO, F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.297-304, 2003.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.285- 294, 2005.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, Portugal, v.124, p.231-238, 2008.

MORRISSEY, W.F.; DAVENPORT, B.; DOBSON, A.D.W.; QUEROL, A. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations, **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.3, p.647-655, 2004.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola. Efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 210 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais). Setor de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.

NOGUEIRA, A.; LÊ QUERE, J. M.; GESTIN, P.; MICHEL, A.; WOSIACKI, G.; DRILLEAU, J. F. Slow fermentation in french cider processing due to partial biomass reduction. **Journal Institute of Brewing**, v.2, p.102- 110, 2008.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C.; SIMÕES, D. R.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**. v. 51, n.5, 2007.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n. 2, p.274-280, 2003.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher. 2005. p.255-292.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Alcoólicas - Ciência e Tecnologia**. 1 ed. São Paulo: Blücher. 2010. v. 1, p. 113-142.

NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.37, p.84-96, 1986.

OLIVEIRA, E. S.; CARDELLO, H. M. A.; JERONIMO, E. M.; SOUZA, E. L. R.; SERRA, G. E. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.707-715, 2005.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Aptidão industrial de seis cultivares de maçã (dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.6, p.1336-1343, 2004.

PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) Fuji apple. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.610-615, 2009.

RAPP, A.; MANDERY, H. New progress in wine and wine research. **Experientia**, v.42, p.873-884, 1987.

RIBERÉAU-GAYON, P.D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Traité d'oenologie: microbiologie du vin vinifications**. Paris: Dunod, 1998. p.617.

ROGER, J. M.; SABLAYROLLES, J. M.; STEYER, J. P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.79, n.7, p.804-815, 2002.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v.86, p.181- 188, 2003.

ROJAS, V.; GIL, J.V.; PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.3, p.283-289, 2001.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.169-180, 2003.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: FLEET, G.H. **Wine Microbiology and Biotechnology**, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, p.373-386, 1994.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocologia Industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2.

SERRA, A.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.257-265, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R. GOMES, R. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SIMÕES, D. R. S. **Abordagem tecnológica e sensorial nos produtos de maçã: suco, fermentado e sidra**. 174 f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

SORENSEN, B.J.; JAKOBSEN, M. The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of *Debaryomyces hansenii* analyzed by flow cytometry and predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.209-220, 1997.

SOUZA, F.K.F.; LUZ, R.O.; SANTOS, C.M.E.; PIETROWSKI, G.A.M.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Development of fermentator in series for the study of kinetic apple fermented. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, p.379-386, 2011.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v.25, p.778- 785, 2008.

VIANA, F.; GILA, J. V.; VALLÉSA, S.; MANZANARES, A. P. Increasing the levels of 2 phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.68-74, 2009.

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.32, n.4, p.775-786, 1989.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v.37, n.1, p.9-22, 2008.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, China, v.33, p.192-196, 2006.

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.376-384, 2006.

ZARDO, D.M.; ALBERTI, A.; DANTAS, A.P.C.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em fermentados de maçã. **Semina Ciências Agrárias**, v.29, p.829-838, 2008.

CAPÍTULO V - AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE HEADSPACE E SPME NO PERFIL AROMÁTICO DE FERMENTADOS DE MAÇÃ ELABORADOS COM LEVEDURAS *Hanseniaspora* sp.

RESUMO

A utilização de leveduras do gênero *Hanseniaspora*, reconhecidas como produtoras de compostos voláteis frutados tem sido recomendada na literatura para melhorar a qualidade de vinhos e fermentados de frutas. Embora existam avançados métodos de identificação e quantificação de compostos voláteis por cromatografia gasosa, as técnicas de extração dos mesmos parece ser a etapa mais complexa da análise. Desta forma, este trabalho tem o objetivo de avaliar o perfil aromático de fermentados de maçã, obtido pela ação de cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, a partir de dois métodos de análise: *headspace* estático e microextração em fase sólida (SPME). A análise dos compostos aromáticos foi realizada em cromatógrafo gasoso com identificação comparando o tempo de retenção dos compostos com a solução de referência. Os resultados obtidos permitiram confirmar que as cepas do gênero *Hanseniaspora* contribuem positivamente com o perfil aromático de fermentados de maçã, produzindo consideráveis quantidades de ésteres e álcoois superiores, que de acordo com a literatura são os principais impactantes para o aroma frutal de fermentados de frutas. Na comparação dos métodos de análise dos compostos aromáticos por *headspace* e SPME foi possível verificar que ao utilizar as mesmas condições de aquisição, pelo método *headspace* foi possível captar quantidades até dezesseis vezes maiores que o valor dos compostos voláteis adquiridos por SPME. No entanto, por SPME foram quantificados cinco vezes mais compostos do que por *headspace*. Mesmo assim, nas condições deste estudo, percebeu-se que o *headspace* foi mais eficiente na captura dos compostos aromáticos do fermentado de maçã, considerando a relação custo benefício de ambos os métodos.

Palavras-chave: Compostos voláteis. Não-*Saccharomyces*. *Headspace*. SPME

ABSTRACT

The use of *Hanseniaspora* yeasts, which are known to produce fruity volatile compounds, has been recommended in the literature to improve the quality of wine and fermented fruit. Although there are advanced methods for the identification and quantification of volatile compounds by gas chromatography, methods for their removal seems to be the most complex step of the analysis. Thus, this study aims to evaluate the aromatic profile of fermented apple, obtained by the action of strains of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* using two analysis methods: static headspace and solid phase microextraction (SPME). The analysis of aromatic compounds was performed by gas chromatography with identification by comparing the retention time of compounds with the reference solution. The results obtained confirm that the strains of the *Hanseniaspora* genus contribute positively to the aroma profile of fermented apple, producing considerable amounts of esters and higher alcohols, which, according to the literature, are the main elements in achieving a fruity aroma for fermented fruit. In comparing the methods of analysis of aromatic compounds by headspace and SPME

it was verified that by using the same acquisition conditions when using the headspace method it was possible to capture amounts that were up to sixteen times greater than the value of the volatile compounds obtained by SPME. However, when using SPME, five times more compounds were obtained than when using headspace. Even so, in the conditions of this study it was noted that headspace was more efficient in the extraction of the aromatics of fermented apple, when taking into consideration the cost effectiveness of both methods.

Keywords: Volatile compounds. Non-*Saccharomyces*. *Headspace*. SPME.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a produção do fermentado de maçã ocorre em grandes empresas especializadas na extração e fermentação alcoólica. Após exaustão completa de açúcares e com presença ou não de uma fermentação malolática natural, a bebida passa a ser comercializada para empresas que a utilizam como matéria-prima na elaboração de sidras, filtrados doces, vinagres e destilados (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; WOSIACKI *et al*, 2008). Dentre estes produtos, os de maior produção são os fermentados frisantes de maçãs ou sidras.

No entanto, desde o início do seu surgimento no Brasil, nos anos 70, a sidra mantém a mesma qualidade, que aliada à mudança de perfil de um consumidor cada vez mais exigente, vem resultando em uma baixa aceitação do produto. Os parâmetros que indicam esta baixa qualidade estão ligados a [1] matéria-prima, que consiste em frutas de descarte da classificação comercial com baixos teores de acidez (média de 0,3 g.100mL⁻¹) e compostos fenólicos (média de 300 mg.L⁻¹) (WOSIACKI *et al*, 2008); [2] adição de sulfito (máximo de 350 mg.L⁻¹) como agente antioxidante impedindo a formação de cor pelas reações de escurecimento enzimático, o qual afeta também a formação de aromas; [3] adições livre de água ao produto, operação permitida pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 2009); [4] correções de açúcar na bebida até a mesma quantidade encontrada em maçãs (120 g.L⁻¹) e [5] a falta de aromas com notas sensoriais de “frutado” ou “floral” que venham a tornar a bebida agradável ao paladar do consumidor (BELTRAN *et al*, 2008; NOGUEIRA, SWIECH; WOSIACKI, 2006; CLETO; CONSOLINI, 2005; MOREIRA *et al*, 2005; LE QUÉRÉ; DRILLEAU, 1998).

Na busca de melhorar a qualidade do fermentado frisante de maçã Carvalho *et al* (2010) adicionaram suco crioconcentrado ao fermentado, conseguindo criar uma harmonia entre o gosto e o aroma do produto, capaz de elevar a aceitação do consumidor (>85%).

Madrera *et al* (2008) estudaram a influência da espécie de levedura e o tempo de envelhecimento sobre a evolução de compostos voláteis em sidra. Xu *et al* (2006) buscaram compreender a fermentação mista de leveduras e sua interação metabólica na produção de sidra, de modo a permitir o controle da formação dos principais componentes voláteis, pelo ajuste do tempo de inoculação de espécies *S. cerevisiae* e leveduras *H. valbyensis*.

Percebe-se que a sensação dos aromas neste tipo de bebida se torna um dos pontos de maior interesse na busca de um fermentado de maçã com elevada qualidade. Portanto, para que este produto brasileiro atinja a qualidade dos vinhos, como é o caso de sidras em países da Europa, trabalhos não apenas com a matéria-prima e tecnologia são necessários, mas, sobretudo a valorização de aromas formados pelos processos de fermentação (oxidativa, fermentativa e malolática).

Desta forma, os diversos fatores, que afetam a composição e concentração dos compostos voláteis, precisam ser considerados na elaboração de fermentado de maçã como variedade, grau de maturação e qualidade da matéria-prima, etapas do processamento (prensagem, tratamento enzimático, clarificação e tratamentos térmicos) e condições de armazenamento (MEROY, 1968 *apud* JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003). Assim, torna-se primordial monitorar as diversas transformações bioquímicas que ocorrem no mosto de maçã, principalmente pela ação das leveduras que desempenham um papel importante na fabricação de fermentados de frutas (PENG *et al*, 2008; ROZA *et al*, 2003).

Várias pesquisas têm investigado a influência das espécies de leveduras na formação de compostos aromáticos em processos fermentativos, tanto em meios sintéticos quanto naturais para a produção de diferentes bebidas alcoólicas (ANDORRÀ *et al*, 2010; RODRÍGUEZ *et al*, 2010; VIANA *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2008; CIANI; BECO; COMITINI, 2006; VILANOVA e SIEIRO, 2006; XU *et al*, 2006; XUFRE *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2005; ROJAS *et al*, 2003; ROMANO *et al*, 2003; ZOHRE e ERTEN, 2002).

O aroma tem um papel significativo na qualidade do fermentado de maçã e da sidra (MANGAS *et al*, 1996). A fermentação alcoólica do mosto de maçã realizada somente com leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. proporciona resultados sensoriais como aroma neutro e/ou pouco típico, porém com a presença da cepa *Hanseniaspora* sp. aparecem notas sensoriais como “frutada”, ou seja, com aroma de frutas, com a presença de ésteres, como acetato de etila e fenil-etila (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010).

Os compostos aromáticos primários da maçã e do seu suco, obtido de várias formas foram estudados extensivamente nos últimos 30 anos; entretanto, com relação aos aromas secundários, oriundos do processo fermentativo, a quantidade de informações é muito menor. Os compostos voláteis majoritários em fermentados de maçãs e sidras são os álcoois, ésteres, ácidos graxos e cetonas. Entre eles, etanol, 1-butanol, 1-hexanol, 3-metil-butil acetato, 2-fenil-etil acetato, butil acetato e ácido hexanóico são tipicamente dominantes. Terpenos e derivados fenólicos também foram identificados, mas em menor quantidade (XU *et al*, 2007).

Para Simões *et al* (2009), o aroma de fermentados de maçãs e sidra constitui-se de alcoóis superiores, tais como os amílicos (2-fenil-etanol, butanol, 2,3-butanodiol e isobutanol) e ésteres (como o acetato de etila), sendo alguns compostos próprios da maçã (como o butanol) e outros oriundos da fermentação (como os alcoóis amílicos e o acetato de etila).

A análise cromatográfica de compostos orgânicos presentes em diferentes produtos, sendo alimentícios ou não, requer sempre um pré-tratamento da amostra. Isto devido à existência de macromoléculas como proteínas ou açúcares que são incompatíveis com as colunas cromatográficas ou mesmo a concentração de substâncias em nível de traços. As diversas técnicas de extração permitem que estas medidas de compostos se tornem possíveis, entretanto, escolher uma técnica analítica de extração adequada ainda é um desafio, pois os compostos voláteis são bastante instáveis e estão sujeitos a modificações e perdas durante a extração. Em alguns casos torna-se necessário combinar técnicas de extração para obter um extrato representativo dos voláteis da amostra (MAMEDE; PASTORE, 2006; HUBERT *et al*, 1999).

Diversas formas de extração dos compostos aromáticos têm sido utilizadas para os estudos em sidra, como extração em fase sólida (SPE), *purge and trap* ou *headspace* dinâmico (P&T ou DHS), injeção direta, extração líquido-líquido (LLE), evaporação de solvente assistida (SAFE), *headspace* estático (SHS), microextração em fase sólida (SPME) (BOYLSTON *et al*, 2003; VERSINI *et al*, 2009; PENG *et al*, 2008, 2009; MADRERA *et al*, 2005, 2008; XU *et al*, 2007; MANGAS *et al*, 1996).

A microextração em fase sólida (SPME) consiste em um método de extração e introdução de amostra, desenvolvido por Pawliszyn e colaboradores em 1989 e comercialmente disponível em 1993. Pode ser empregado na análise de compostos orgânicos voláteis. O método utiliza uma fibra de sílica fundida revestida com uma película fina de adsorvente (polidimetilsiloxano, poliacrilato ou dispersões de sólidos adsorventes em aglutinantes poliméricos como carvão ativo grafitizado-Carboxen e resina poliestireno-

divinilbenzeno-DVB), para extrair analitos voláteis a partir de uma matriz de amostra. A fibra fica alojada dentro da agulha de uma seringa que a protege e permite a fácil penetração da mesma nos septos, tanto do frasco da amostra quanto do injetor do cromatógrafo gasoso. Existem duas formas para amostragem por SPME de compostos orgânicos voláteis, direto da amostra e do *headspace* (VALENTE; AUGUSTO, 2000; PAGE; LACROIX, 1993; ZHANG; PAWLISZYN, 1993; BERLARDI; PAWLISZYN, 1989).

Na técnica do *headspace* ou *headspace* estático, a fase de vapor onde estão concentrados os compostos voláteis, deve ser coletada com auxílio de uma seringa após ocorrer o equilíbrio da fase gasosa com a fase sólida ou líquida da amostra, e injetada diretamente no cromatógrafo. Desta maneira, há pouco manuseio da amostra e a perda dos voláteis é minimizada. No entanto, compostos de alto ponto de ebulição e encontrados apenas em traços não são, por esta técnica, captados com facilidade (FRANCO; JANZANTTI, 2003; THOMAZINI; FRANCO, 2000).

O presente estudo tem o objetivo de avaliar o perfil aromático de fermentado de maçã, obtidos pela ação de cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, a partir de dois métodos de análise, *headspace* estático e SPME.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram utilizadas amostras de maçãs da cultivar Gala (90 Kg), safra 2009/2010, obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

Os microrganismos utilizados foram: *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, que depois de identificados em capítulo anterior deste trabalho, foram conservadas em tubos inclinados contendo *yeast malt agar* (YMA) à temperatura de 7-10°C.

Os reativos e padrões utilizados foram de grau cromatográfico ($\geq 99,7\%$ - Fluka; $\geq 98,5\%$ - Merck; $\geq 97-99\%$ - Aldrich; grau analítico - Interchim).

A fibra SPME utilizada foi de revestimento Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB) com 70 μm de espessura (Supelco).

Os padrões de aromas foram os seguintes: etanal (Interchim), etanoato de etila (Fluka), etanol (Merck), propanoato de etila (Interchim), 3-metil butanoato de etila (Interchim), etanoato de propila (Interchim), etanoato de isobutila (Interchim), butanoato de

etila (Interchim), etanoato de butila (Fluka), hexanona (Interchim), acetato de isopentila (Aldrich), 2-heptanona (Interchim), 3-metil-1-butanol (Merck), 2-metil-1-butanol (Interchim), 2-hexanol (Interchim), etanoato de hexila (Fluka), 2-octanona (Interchim), 3-hexanoato de etila (Interchim), 2-hidróxi propanoato de etila (Aldrich), 1-hexanol (Fluka), octanoato de etila (Aldrich), decanoato de etila (Aldrich), ácido butanóico (Fluka), 1,4-butanoato de etila (Fluka), 2-fenil-etanol (Aldrich), dodecanoato de etila (Aldrich) e ácido octanóico (Fluka).

2.2 PROCESSOS

Processamento do suco de maçã. As maçãs foram selecionadas, lavadas e trituradas em microprocessador (Processador Metvisa, Tipo MPA). A massa ralada foi acondicionada em pacotes de tela plástica porosa que, superpostos, foram submetidos a uma pressão de $3,0 \text{ kgf.}(\text{cm}^2)^{-1}$ em prensa hidráulica (Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado com pectinase (Pectinex Ultra SP, atividade $9.500 \text{ PGU.mL}^{-1}$, Novozymes do Brasil), a uma proporção de $3,0 \text{ mL.hL}^{-1}$ (120 minutos a $20\text{-}25^\circ\text{C}$) e, após sedimentação, o sobrenadante foi trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo, envasado em garrafas de vidro de 600 mL, lacradas com tampa metálica e pasteurizado a $80\text{-}85^\circ\text{C}$ por 20 minutos (WOSIACKI *et al*, 1989).

Processamento do fermentado de maçã. O mosto clarificado foi acondicionado em fermentadores de vidro de 1450 mL com volume útil de 1200 mL, conforme apresentado na Figura 1, esterilizados em autoclave (121°C / 15 min) e mantidos em sala climatizada à temperatura de 20°C (SOUZA, *et al*, 2011). No mosto foi adicionado antibiótico cloranfenicol a 0,01 % (99%, Henrifarma - São Paulo) para controle do crescimento bacteriano. As leveduras foram inoculadas com uma população inicial de aproximadamente $4,0 \times 10^6 \text{ ufc.mL}^{-1}$. Para atingir esta população foi inoculada uma colônia de cada cepa de *Hanseniaspora* sp., isolada em YMA (Merck), em 5 mL de Caldo glucose peptona extrato de levedura (GPBY) e depois de 24h de incubação a 25°C , esta cultura foi transferida para 100 mL do mesmo caldo, tempo e temperatura atingindo a população de aproximadamente $10^{12} \text{ ufc.mL}^{-1}$ (SCHMIDELL *et al*, 2001). A partir desta população foi coletado um volume suficiente para obter a população desejada nos fermentadores (em torno de $2,0 \times 10^6 \text{ ufc.mL}^{-1}$).

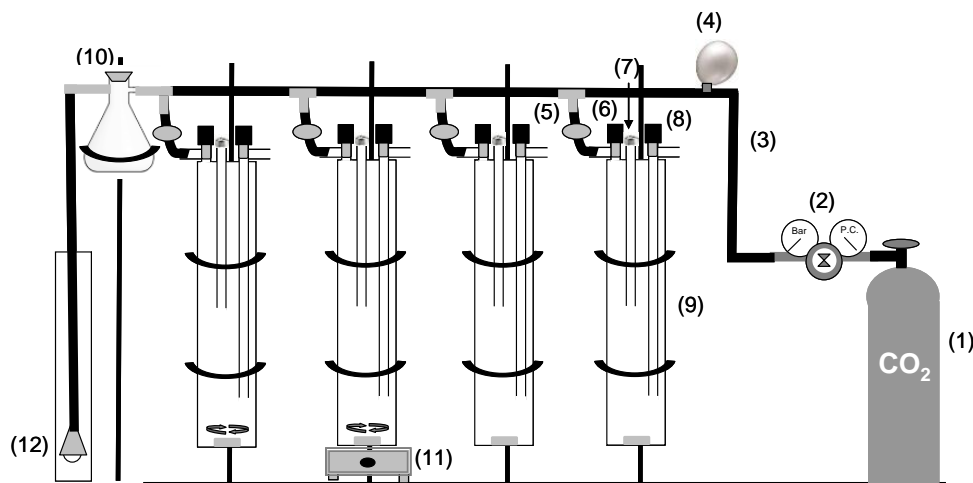


Figura 1 - Esquema dos fermentadores em anaerobiose

(1): Cilindro de gás carbônico para pressurizar sistema. (2): Manômetro/Registro. (3): Tubulação de passagem de gás carbônico pelo sistema. (4): Válvula de segurança contra vazamento de gás. (5): Filtro de 0,20 µm. (6): Tampa tipo rosca para entrada de saída de gás no fermentador. (7): Tampa de borracha para inoculação das leveduras no mosto. (8): Tampa tipo rosca para retirada de amostra. (9): Fermentador de 1450 mL. (10): Recipiente de segurança contra retorno de água no sistema de fermentação. (11): Agitador magnético (Quinis). (12): Batoque para manutenção da anaerobiose no sistema de fermentação.

No décimo dia, as fermentações foram interrompidas e o fermentado de maçã foi centrifugado a 10200 g à 5°C (Centrífuga Himac CR21GII) durante 20 minutos, em seguida trasfegado, engarrafado e armazenado sob baixa temperatura (-18 °C).

2.2.1 Análises Instrumentais

Coleta dos compostos voláteis - *Headspace*

As amostras do fermentado de maçã foram colocadas em frascos com capacidade de 20 mL, na quantidade de 6 mL, onde foram colocados 50 µL de padrão interno (Ácido heptanóico, Merck). Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção por comparação com padrões. Antes da coleta dos compostos voláteis, as amostras permaneceram a 60°C sob agitação no forno do injetor automático (cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument) durante 10 minutos.

Coleta dos compostos voláteis - SPME

As amostras do fermentado de maçã foram colocadas em frascos com capacidade de 20 mL, na quantidade de 6 mL, onde foram acrescentados 2,2 g de NaCl (conforme recomendação do fabricante - Supelco), para evitar inchaço e/ou danos na fibra utilizada e 40 µL do mesmo padrão interno (ácido heptanóico, 16,3 mg.mL⁻¹ - Merck). Para a microextração

em fase sólida os frascos com as amostras foram equilibrados a 60°C por 5 minutos, a seguir permaneceram à mesma temperatura sob agitação durante 10 minutos, período em que a microfibras permaneceu exposta no *headspace* do frasco para a adsorção dos compostos. Após a extração a microfibras foi exposta diretamente no pórtilo de injeção do cromatógrafo gasoso para a dessorção térmica dos compostos.

Análise cromatográfica de compostos voláteis

A análise dos compostos aromáticos foi realizada em cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument - YL 6100 GC, equipado com detector de ionização de chama - FID, coluna capilar (Phenomenex) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 25 µm e filme de ZB-WAX com 0,25µm de espessura. A temperatura do injetor foi de 220°C, do detector de 230°C, o gás de arraste foi o nitrogênio a um fluxo de 2,5 mL.min⁻¹ e a técnica de injeção foi split 1:1,2. As condições de análise foram com programação de temperatura inicial a 40°C por 5 minutos, elevação de 10°C.min⁻¹ até 150°C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. A seguir uma elevação de 10°C.min⁻¹ até 200°C, permanecendo por 5 minutos e nova elevação de 10°C.min⁻¹ até 220°C, onde permaneceu por 16 minutos.

Para o *headspace* foi utilizado o modo de injeção automática do CG, com volume de 1500µL e para SPME a injeção foi manual com exposição da fibra no interior do pórtilo do injetor para dessorção dos compostos voláteis.

A composição da solução estoque de referência utilizada para a identificação e quantificação dos compostos voláteis no fermentado de maçã está apresentada na Tabela 1. Para as análises do *headspace* foi utilizada a solução padrão estoque diluída 1:25 e para a extração com a utilização do SPME, 1:30. As diluições da solução estoque foram submetidas às mesmas condições de análise já descritas para as amostras do fermentado de maçã, incluindo o acréscimo do padrão interno.

Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os obtidos na solução de referência. Para a quantificação das concentrações dos compostos voláteis identificados, foi utilizada a seguinte relação:

$$C = A \cdot \frac{h_i}{H_i} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

C = concentração do componente (mg.L⁻¹)

A = concentração da substância na solução de referência (mg.L⁻¹)

h = área do pico da substância na amostra

H = área do pico da substância na referência

I = área do pico do padrão interno na referência

i = área do pico do padrão interno na amostra.

A quantificação dos compostos não identificados foi realizada utilizando a equação 1, no entanto foi utilizada a concentração do etanol na solução de referência (A) e a área do pico do etanol na solução de referência (H), assim o valor obtido de cada composto foi em mg de equivalente de etanol.L⁻¹.

Tabela 1 - Composição da solução estoque de referência para análise dos compostos voláteis de fermentado de maçã

Componentes		Concentração (mg.100mL ⁻¹)
Nomenclatura oficial	Nomenclatura usual	
Etanal	Acetaldeído	260*; 325**
Etanoato de etila	Acetato de etila	133,8
Etanol	Álcool etílico	15860
Propanoato de etila	Etil propionate	41,5
3-metil butanoato de etila	Etil-isobutirato	34,2
Etanoato de propila	Acetato de propila	45,6
Etanoato de isobutila	Acetato de isobutila	35,1
Butanoato de etila	Etil butirato	8,1
Etanoato de butila	Acetato de butila	5,3
Hexanona	Hexanona	30,5
Acetato de isopentila	Acetato de isoamila	31,8
2-heptanona	2-hepatnona	30,1
3-metil-1-butanol	Álcool isoamílico	241,6
2-metil-1-butanol	Álcool amílico	32,3
2-Hexanol	Álcool sec-hexílico	18,5
Etanoato de hexila	Acetato de hexila	9,0
2-octanona	2-octanona	30,6
3-hexanoato de etila	Etil-3-hexanoato	42,7
2-hidróxi propanoato de etila	Lactato de etila	130,9
1-Hexanol	Álcool hexílico	7,6
Octanoato de etila	Caprilato de etila	16,5
Decanoato de etila	Caprato de etila	8,7
Ácido butanóico	Ácido butírico	18,1
1,4-butanoato de etila	Succinato de dietila	10,2
2 fenil etanol	Álcool fenetílico	390,5
Dodecanoato de etila	Laurato de etila	8,1
Ácido octanóico	Ácido caprílico	75,2

(*) concentração utilizada no *headspace*; (**) concentração utilizada no SPME

Análises estatísticas

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para diferenciação de médias em software Excell 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PERFIL AROMÁTICO DOS FERMENTADOS DE MAÇÃ

A composição aromática obtida na fermentação do mosto de maçãs por cepas de *H. guilliermondii* e *H. uvarum* permitiu verificar a presença de ésteres, aldeídos, ácidos, cetonas e álcoois, tanto pelo método de análise por *headspace* quanto pela microextração em fase sólida, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração de compostos voláteis do *headspace* e extraídos por SPME, de fermentados de maçã elaborados com cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*

Compostos voláteis	<i>H. uvarum</i>		<i>H. guilliermondii</i>	
	<i>Headspace</i>	SPME	<i>Headspace</i>	SPME
Ésteres				
Etanoato de etila	146,99 ^a ± 0,75	7,63 ^A ± 0,70	9,90 ^b ± 0,60	0,98 ^B ± 0,09
Etanoato de isobutila	nd	nd	nd	0,31 ± 0,02
Butanoato de etila	nd	nd	0,05 ± 0,00	0,72 ± 0,07
Etanoato de butila	nd	0,11 ^A ± 0,02	nd	0,11 ^A ± 0,02
Acetato de isopentila	0,63 ± 0,03	0,09 ± 0,01	nd	nd
Etanoato de hexila	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00	nd	nd
2-hidróxi propan. de etila	47,99 ^a ± 3,96	4,30 ^A ± 0,24	45,17 ^b ± 3,73	3,79 ^B ± 0,21
Octanoato de etila	0,10 ^a ± 0,01	nd	0,02 ^b ± 0,00	nd
Decanoato de etila	0,29 ^a ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,09 ^a ± 0,00	nd
1,4-butanoato de etila	6,24 ^a ± 0,37	0,36 ^A ± 0,09	4,33 ^a ± 0,21	0,36 ^A ± 0,09
Dodecanoato de etila	4,26 ^a ± 0,36	0,16 ^B ± 0,00	2,94 ^a ± 0,22	0,33 ^A ± 0,00
Aldeídos				
Etanal	38,04 ^a ± 0,56	5,25 ^A ± 0,04	21,47 ^b ± 0,56	2,79 ^B ± 0,02
Ácidos				
Ácido butanóico	4,85 ^a ± 0,25	0,08 ^A ± 0,01	3,30 ^a ± 0,27	0,06 ^B ± 0,01
Ácido octanóico	nd	0,45 ^A ± 0,01	nd	0,27 ^B ± 0,00
Álcoois				
Etanol	17459,91 ^a ± 618,97	2001,91 ^A ± 211,89	8876,94 ^b ± 462,49	1336,19 ^B ± 142,81
3-metil-1-butanol	21,99 ^a ± 0,15	1,96 ^A ± 0,22	12,41 ^b ± 0,37	1,13 ^B ± 0,13
2-hexanol	0,28 ^a ± 0,02	nd	0,13 ^a ± 0,01	nd
2-fenil etanol	nd	0,20 ^A ± 0,01	nd	0,19 ^A ± 0,01
Cetonas				
2-heptanona	nd	nd	0,04 ± 0,00	nd
2-octanona	0,06 ± 0,00	nd	nd	0,01 ± 0,00

Nota: Concentração dos compostos voláteis identificados em mg.L⁻¹, nd = não detectado; dados mostram a média de três replicatas ± DP; a,b = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de *headspace* (p ≤ 0,05); A,B = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de SPME (p ≤ 0,05).

Nos resultados tanto do *headspace* quanto por microextração em fase sólida, foi perceptível que a cepa de levedura utilizada influencia no perfil de voláteis, pois foram encontrados resultados que diferenciaram significativamente uma cepa da outra. De maneira geral a quantidade de compostos produzidos por *H. uvarum* foi sempre maior que a de *H. guilliermondii*, salvo para butanoato de etila, 2-heptanona, que não foram detectados em *H. uvarum* pelo método *headspace*. E para etanoato de isobutila, butanoato de etila e 2-octanona que não foram detectados em *H. uvarum* por SPME e ainda, etanoato de butila e 1,4-butanoato de etila que tiveram a mesma concentração em ambas as cepas por este método. Rojas *et al* (2001) tendo trabalhado com as mesmas espécies de leveduras, encontraram resultado oposto, em que a cepa *H. guilliermondii* produziu maiores quantidades de compostos como acetato de isopentila, etanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila e etanoato de isobutila, em relação a *H. uvarum*. Entretanto, salienta-se que os autores trabalharam com fermentações em meio sintético, que apresenta composição quimicamente definida e supre todas as exigências nutricionais do microrganismo em estudo.

Neste trabalho pela técnica de *headspace* foi constatada a produção de quantidades consideráveis de etanoato de etila, 2-hidróxi propoanoato de etila, 1-4-butanoato de etila e de dodecanoato de etila, e em menores proporções acetato de isopentila, etanoato de hexila, octanoato de etila e decanoato de etila para ambas as cepas e butanoato de etila apenas para *H. guilliermondii*. Rojas *et al* (2001) encontrou resultado semelhante para o etanoato de etila, tanto para *H. guilliermondii* quanto para *H. uvarum*, embora a diferença de quantidade entre as cepas tenha sido grande, este composto foi o mais abundante dentre os compostos produzidos por ambas as cepas.

Xu *et al* (2006) verificaram que o etanoato de etila, 2-hidróxi propanoato de etila e 3-hexanoato de etila foram também os ésteres produzidos em maiores concentrações em sidras elaboradas por cepas de *Hanseniaspora valbyensis*, sugerindo ser uma característica deste gênero de leveduras. Entretanto, Mingorange-Cazorla *et al* (2003) utilizaram cepas de *H. uvarum* para fermentar mosto de uva e suco de laranja e obtiveram o etanoato de etila apenas na fermentação do suco de laranja.

Cortes e Blanco (2011) afirmam ser o octanoato de etila, hexanoato de etila e acetato de isopentila os compostos mais influentes e determinantes para os aromas secundários, com notas frutais em vinhos de Treixadura. Para Rojas *et al* (2001) a mistura do acetato de isopentila, octanoato e decanoato de etila, acetato de hexila e 2-feniletil acetato determina aroma frutal e floral em vinhos. As fermentações de vinho e sidra compartilham muitas similaridades do ponto de vista microbiológico, assim como os compostos voláteis formados nestas fermentações, terão um mesmo efeito no limiar de percepção do aroma, seja qual for a sua origem (FACUNDO, 2009; MORRISSEY *et al*, 2004; ROJAS *et al*, 2001, 2003; HEARD; FLEET, 1986).

Com relação à presença destes compostos no fermentado de maçã, percebe-se que somente o acetato de isopentila foi detectado, por ambos os métodos para a cepa de *H. uvarum*. O hexanoato de etila não foi produzido por nenhuma das cepas estudadas e o octanoato de etila foi produzido em pequena quantidade (0,10 e 0,02 mg.L⁻¹) por *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, no entanto, foi identificado apenas no *headspace*.

Peng *et al* (2009), constataram que são nove os componentes chave para o aroma da sidra (Shaanxi-China) obtida de maçãs Fuji: etanoato de etila, ácido isobutirato etanóico, etanoato de dimetil propanol ou acetato isopentílico, octanoato de etila, 4-etil hidroxibutanoato, 3-metil-1-butanol ou álcool isopentílico, 3,4,5-trimetil-4-heptanol, 1-nonanol e 3-metil-tio-1-propanol. Estes compostos poderiam ser responsáveis por 85,61% do total de variação nos componentes do aroma do produto. Destes compostos, quatro (etanoato de etila, acetato isopentílico, octanoato de etila e 3-metil-1-butanol) foram encontrados nos fermentados de maçã no presente estudo.

Foi quantificado um maior teor de etanol para a cepa de *H. uvarum* em comparação com a cepa *H. guilliermondii*, confirmando o resultado já encontrado por ebuliometria (dados aqui não apresentados). Porém, este resultado foi contrário ao trabalho desenvolvido por Moreira *et al* (2008) que encontraram maior teor para a cepa *H. guilliermondii*, em vinho.

Xu *et al* (2006) perceberam que *Saccharomyces* sp. apresenta uma conversão de açúcar para álcool de 11,5%, enquanto *Hanseniaspora valbyensis* produz álcool com uma conversão que não ultrapassa 6,0% (v/v). Neste estudo foi encontrado um teor de 17459,91 mg.L⁻¹ e 8876,94 mg.L⁻¹ (no *headspace*) e de 2001,91 mg.L⁻¹ e 1336,19 mg.L⁻¹ (por SPME), respectivamente, para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*. Oliveira *et al* (2005) tendo realizado fermentação de caldo de cana com diversas cepas diferentes de *Saccharomyces* sp. e também com cepas não-*Saccharomyces*, considerou o perfil na formação de voláteis da espécie

Hanseniaspora occidentalis muito semelhante ao das *Saccharomyces* sp., tendo encontrado valores que vão de 2,1 a 8,3% (v/v) de etanol para esta cepa.

Segundo Garden-Cerdan e Ancin-Azpilicueta (2006), as cepas selvagens ou não-*Saccharomyces* pouco contribuem para a formação de álcool isoamílico (3-metil-a-butanol - composto que contribui para o aroma frutal). No entanto, Xu *et al* (2006) verificaram que a cepa de *H. valbyensis* foi capaz de produzir 45,35 mg.L⁻¹ de álcool isoamílico em fermentações de culturas puras e quando combinada com *Saccharomyces* sp, esta produção chegou a atingir 232,05 mg.L⁻¹, dependendo do tempo de inóculo. Embora sejam de espécies diferentes, as cepas *H. uvarum* e *H guilliermondii*, na fermentação do mosto de maçã, demonstraram que são capazes de produzir, respectivamente, uma concentração de 21,99 mg.L⁻¹ e 12,41 mg.L⁻¹ deste composto identificados no *headspace*.

Romano *et al* (2003) relatam que a cepa *Hanseniaspora* sp. produziu uma menor quantidade de álcool isoamílico (40 mg.L⁻¹) e uma maior concentração de etanoato de etila (100 mg.L⁻¹) do que a cepa *Saccharomyces* (250 mg.L⁻¹, <10 mg.L⁻¹, respectivamente), evidenciando que *S. cerevisiae* produziu uma concentração muito maior de álcoois superiores. No presente trabalho obteve-se uma concentração abaixo de 40 mg.L⁻¹ de álcool isoamílico para ambas as cepas, porém em relação ao etanoato de etila, *H. uvarum*, produziu quase 50% a mais (*headspace*) que nos dados relatados por estes autores.

O etanal foi quantificado nas duas cepas de leveduras encontradas, tanto por *headspace* quanto por SPME, e este segundo Gil *et al* (2006) consiste no aldeído mais importante na produção de vinhos, normalmente conhecido como um subproduto da fermentação alcoólica e sua produção pode ser influenciada pela cepa de levedura. Em concentrações menores, o etanal contribui com notas frutais, entretanto em altas concentrações (>200 mg.L⁻¹) este composto influencia negativamente o aroma do vinho (GIL *et al*, 2006). Assim, nas condições em que foi quantificado neste trabalho (38,04 e 21,47 mg.L⁻¹, para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente) contribuirá para um aroma frutal no fermentado obtido.

3.2 COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE HEADSPACE E SPME

Em 30 artigos sobre compostos voláteis de frutas, vinhos e fermentados de frutas, publicados nos últimos 5 anos, foi verificado que em 21 deles os autores utilizaram formas como *headspace* dinâmico, injeção direta, extração líquido/líquido e evaporação de solvente

assistida para o estudo dos voláteis. Entretanto, somente dois artigos (GONZÁLEZ-MAS *et al*, 2009; SAERENS *et al*, 2008) realizaram a captura dos compostos por *headspace* estático e treze deles (RODRIGUEZ *et al*, 2010; AZHU VALAPPIL *et al*, 2009; GONZÁLEZ-MAS *et al*, 2009; MOLINA *et al*, 2009; PENG *et al*, 2008, 2009; VIANA *et al*, 2008, 2009; RÓTH *et al*, 2007; OSÓRIO-CADAVID *et al*, 2008; XU *et al*, 2006, 2007; PAPATHANASIOU *et al*, 2006) utilizaram a extração dos voláteis por SPME. Estes dois métodos, se comparados com os tradicionais, são considerados mais simples, rápidos e evitam a manipulação e perda dos voláteis.

Vale ressaltar a diferença significativa nos teores dos compostos adquiridos no *headspace* e por SPME. Assim, a somatória dos ésteres no *headspace* para *H. uvarum* foi de 206,67 mg.L⁻¹ e para *H. guilliermondii* 62,50 mg.L⁻¹ e por SPME, os mesmos compostos somaram para as mesmas cepas, respectivamente, um valor de 12,67 mg.L⁻¹ e 6,59 mg.L⁻¹. Os álcoois no *headspace* totalizaram 17459,91 mg.L⁻¹ e 8876,94 mg.L⁻¹ e por SPME 2004,07 mg.L⁻¹ e 1337,51 mg.L⁻¹, respectivamente para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*. Esta variação foi repetida para todos os demais compostos, provavelmente, devido a diversos fatores discutidos na sequência.

Considera-se que na análise de compostos voláteis orgânicos, na maioria dos casos os analitos são primeiramente transferidos para uma fase gasosa para depois serem analisados, geralmente por cromatografia gasosa (SLACK *et al apud* MITRA, 2003). No método do *headspace* os compostos foram coletados diretamente desta fase, enquanto que no SPME, os mesmos precisaram contar com a etapa de adsorção e posteriormente de dessorção, para poderem ser identificados e quantificados, fato que poderia justificar a menor quantidade encontrada neste método. Destaca-se que o tempo de extração utilizado neste trabalho foi de 10 minutos à temperatura de 60°C, enquanto Xu *et al* (2007) utilizou 30 minutos à 50°C; Boylston *et al* (2003) 30 minutos à 40°C; Peng *et al* (2008, 2009) 30 minutos à 30°C e 45°C e Azhu-Valappil *et al* (2009) 45 minutos à 36°C, todos realizando extração dos voláteis da sidra.

Para Dean (1998) a fase mais importante do método SPME é a adsorção de analitos na fibra, portanto a escolha do adsorvente é essencial, pois deve ter uma forte afinidade para os compostos orgânicos avaliados, de modo que a pré-concentração pode ocorrer a partir de qualquer amostra aquosa ou da sua fase gasosa. Assim, foi verificado que para análise em maçãs, suco de maçã, sidra e meios sintéticos Azhu Valappil *et al* (2009), Xu *et al* (2007), Zierler *et al* (2004) e Buzzini *et al* (2003) empregaram como revestimento da fibra o

DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano). O revestimento de PDMS (polidimetilsiloxano) foi utilizado nos estudos de Peng *et al* (2008, 2009), Xiabo e Jiewen (2008); Reid *et al* (2004), Boylston *et al* (2003) enquanto Young *et al* (2004) e Zierler *et al* (2004) usaram CAR/PDMS (Carboxen/Polidimetilsiloxano).

A opção pelo revestimento Carbowax/Divinilbenzeno na fibra teve o objetivo de avaliar o seu desempenho em fermentados de maçã, considerando ter este adsorvente dois componentes: carbowax (adsorvente moderadamente polar) e o divinilbenzeno (fase suspensa na Carbowax, que tem uma elevada afinidade para pequenas aminas); o que confere a este SPME sua adequação para a extração de álcoois e compostos polares (SUPELCO, 1999; SHIREY, 1999) voláteis alvo do presente estudo.

A escolha entre imersão direta do SPME na amostra ou no *headspace* da amostra, também consiste em fator importante para uso do SPME. Assim, o SPME do *headspace* deve ser considerado para a extração de compostos voláteis de amostras sólidas ou líquidas, em que o ponto de ebulição normal dos analitos de interesse seja menor que 200°C, caso contrário, a imersão direta do SPME provavelmente será necessária (SLACK *et al apud* MITRA, 2003). Assim justifica-se a escolha de expor a fibra no *headspace*, pois a maioria dos compostos buscados (ésteres e álcoois superiores) apresenta ponto de ebulição abaixo desta temperatura. Embora, tenha sido constatada a captura de seis compostos que apresentam ponto de ebulição acima de 200°C (ácido octanóico, 2-fenil-etanol, octanoato de etila, decanoato de etila, 1,4-butanoato de etila e dodecanoato de etila).

Pelos resultados discutidos, percebeu-se uma maior quantidade dos compostos captados pelo método do *headspace* quando comparado ao SPME, no entanto, ao observar a Tabela 3, a qual apresenta os compostos não identificados, quantificados por equivalente em etanol, verificou-se que por SPME foram capturados 57 compostos, 5 vezes mais que por *headspace* com apenas 11 compostos.

Como a forma de identificação utilizada neste estudo foi o comparativo do tempo de retenção dos padrões, constatou-se que o SPME foi menos eficaz que o *headspace*, pois apesar de ter captado um número muito maior de compostos, a concentração dos mesmos foi muito menor. Assim, mesmo tendo capturado 46 compostos não identificados a mais que no *headspace*, os mesmos não puderam ser identificados, pois não se contava com a espectrometria de massa acoplada ao cromatógrafo gasoso, como dispunham os autores Azhu Valappil *et al* (2009); Swiegers *et al* (2009); Peng *et al* (2008, 2009); Xiaobo e Jiewen

(2008); Xu *et al* (2007); Defilippi *et al* (2005); Reid *et al* (2004); Boylston *et al* (2003); Buzzini *et al* (2003).

Tabela 3 - Concentração de compostos voláteis não identificados, do *headspace* e extraídos por SPME, de fermentados de maçã elaborados com *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*.

(Continua)

Compostos Voláteis	Tempo de retenção (minutos)	<i>H. uvarum</i>		<i>H. guilliermondii</i>	
		<i>Headspace</i>	SPME	<i>Headspace</i>	SPME
1	1,7	5,16 ± 0,18	0,13 ± 0,01	nd	nd
2	3,5	11,41 ± 0,40	nd	nd	4,89 ± 0,52
3	4,6	70,17 ± 2,49	nd	nd	0,59 ± 0,06
4	5,4	nd	nd	nd	2,91 ± 0,31
5	5,6	24,12 ^a ± 0,86	4,50 ^A ± 0,48	22,21 ^a ± 1,16	3,05 ^B ± 0,33
6	6,4	nd	nd	nd	0,08 ± 0,01
7	6,6	nd	0,17 ± 0,02	nd	nd
8	6,8	93,64 ^a ± 3,32	25,29 ^A ± 0,68	81,42 ^a ± 4,24	24,21 ^B ± 2,59
9	7,8	nd	nd	nd	0,51 ± 0,05
10	9,0	nd	0,29 ^A ± 0,03	nd	0,31 ^A ± 0,03
11	9,6	nd	2,23 ± 0,24	nd	nd
12	10,1	nd	0,33 ± 0,03	nd	nd
13	10,3	1,27 ± 0,04	0,25 ^A ± 0,03	nd	0,22 ^A ± 0,02
14	11,3	nd	nd	nd	0,07 ± 0,01
15	11,5	nd	0,38 ^A ± 0,04	nd	0,24 ^B ± 0,03
16	11,8	nd	nd	nd	0,04 ± 0,00
17	12,0	nd	0,10 ^A ± 0,01	nd	0,09 ^A ± 0,01
18	12,2	10,63 ^a ± 0,38	14,50 ^B ± 1,53	11,01 ^a ± 0,57	23,57 ^A ± 2,52
19	12,5	nd	0,39 ± 0,04	1,10 ± 0,06	nd
20	13,0	nd	0,24 ^B ± 0,03	nd	0,31 ^A ± 0,03
21	13,3	nd	nd	nd	0,07 ± 0,01
22	13,4	nd	0,78 ^B ± 0,08	nd	0,84 ^A ± 0,09
23	13,5	nd	0,33 ^B ± 0,04	nd	0,41 ^A ± 0,04
24	13,7	nd	0,68 ^A ± 0,07	nd	0,71 ^A ± 0,08
25	13,9	nd	0,19 ^A ± 0,02	nd	0,17 ^A ± 0,02
26	14,1	nd	0,23 ^A ± 0,02	nd	0,21 ^A ± 0,02
27	14,4	nd	3,44 ^A ± 0,36	0,83 ± 0,04	3,47 ^A ± 0,37
28	14,8	nd	0,67 ^A ± 0,07	nd	0,13 ^B ± 0, 01
29	15,4	nd	0,36 ^A ± 0,04	nd	0,41 ^A ± 0,04
30	15,6	nd	0,31 ^A ± 0,03	nd	0,37 ^A ± 0,04
31	15,8	nd	0,25 ^B ± 0,03	nd	0,43 ^A ± 0,05
32	15,9	nd	0,43 ^A ± 0,05	nd	0,55 ^A ± 0,06
33	16,3	nd	0,18 ^B ± 0,02	nd	0,23 ^A ± 0,03
34	16,5	20,56 ^a ± 0,73	3,30 ^A ± 0,35	5,53 ^a ± 0,29	2,99 ^B ± 0,32
35	16,7	nd	0,72 ^A ± 0,08	nd	0,25 ^B ± 0,03
36	16,9	nd	nd	nd	0,57 ± 0,06
37	17,0	nd	3,93 ^A ± 0,42	nd	3,16 ^B ± 0,34
38	17,6	nd	nd	nd	0,07 ± 0,01
39	17,8	nd	nd	nd	0,65 ± 0,07
40	19,8	nd	1,00 ^B ± 0,11	nd	1,42 ^A ± 0,15
41	22,0	nd	0,64 ± 0,07	nd	nd

Tabela 3 - Concentração de compostos voláteis não identificados, do *headspace* e extraídos por SPME, de fermentados de maçã elaborados com *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*.

(Conclusão)

Compostos Voláteis	Tempo de retenção (minutos)	<i>H. uvarum</i>		<i>H. guilliermondii</i>	
		<i>Headspace</i>	SPME	<i>Headspace</i>	SPME
42	24,5	nd	0,46 ± 0,05	nd	nd
43	24,9	nd	0,35 ± 0,04	nd	nd
44	28,4	nd	16,12 ^A ± 1,71	nd	5,23 ^B ± 0,56
45	29,3	nd	nd	1,14 ± 0,06	0,42 ± 0,04
46	29,7	nd	0,99 ^A ± 0,10	nd	0,78 ^B ± 0,08
47	29,8	nd	nd	nd	0,54 ± 0,06
48	30,9	nd	0,13 ^B ± 0,01	nd	0,32 ^A ± 0,03
49	31,3	nd	0,25 ^B ± 0,03	nd	0,32 ^A ± 0,03
50	31,7	nd	0,07 ± 0,01	nd	nd
51	31,9	nd	4,11 ^A ± 0,43	nd	0,81 ^B ± 0,09
52	32,6	nd	2,72 ^B ± 0,29	nd	6,28 ^A ± 0,67
53	34,7	nd	0,16 ^A ± 0,02	nd	0,22 ^A ± 0,02
54	35,8	nd	nd	nd	0,36 ± 0,04
55	36,2	nd	nd	nd	0,59 ± 0,06
56	38,1	nd	0,17 ^A ± 0,02	nd	0,17 ^A ± 0,02
57	40,1	nd	0,29 ^B ± 0,03	nd	0,41 ^A ± 0,04

Nota: Concentração dos compostos em mg de equivalente de etanol.L⁻¹; nd = não detectado; dados mostram a média de três replicatas ± DP (*headspace*) e duas replicatas ± DP (SPME); a,b = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de *headspace* (p ≤ 0,05); A,B = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de SPME (p ≤ 0,05).

Assim, nas condições em que as análises foram realizadas, ou seja, na ausência da espectrometria de massa, o custo do uso do SPME não foi justificado.

Slack *et al* (*apud* MITRA, 2003) considera que a análise por SPME tem várias vantagens na análise de compostos orgânicos voláteis, dentre as quais cita o custo baixo das fibras comparado com o custo de outros métodos de extração de analitos voláteis; fato não observado neste trabalho nas condições estudadas, onde o *headspace* foi mais eficiente mantendo o baixo custo.

Existem três passos básicos a serem considerados no desenvolvimento de um método de extração de compostos voláteis por SPME, a extração dos analitos; a injeção no GC e as condições cromatográficas. As principais questões envolvidas na fase de extração incluem, o modo de extração (direta ou *headspace*), a escolha do revestimento da fibra, agitação, tempo e temperatura de extração, e a possibilidade de modificação da matriz da amostra (SLACK *et al* *apud* MITRA, 2003).

McLaren *et al* (1995), comentam que são muitas as variáveis que devem ser consideradas no processo de extração por SPME como: espessura do revestimento de fibra,

condições físicas do revestimento de fibra (rachaduras, contaminação); umidade na agulha; temperatura de extração; componentes da matriz da amostra; tipo de agitação; tempo de amostragem (especialmente importante se o equilíbrio não é atingido); volume de amostra e volume do *headspace* no frasco, e, ainda, tempo decorrido entre a extração e análise propriamente dita.

Salienta-se que não se teve como objetivo a otimização das condições de adsorção dos compostos no SPME, o que certamente melhoraria a aquisição dos compostos tanto em termos de quantidade como de qualidade. O objetivo foi comparar os resultados empregando a mesma forma de aquisição dos compostos, para o SPME e *headspace*, utilizando tempo de 10 minutos no condicionamento da amostra, temperatura de 60°C e condições de agitação equivalentes para ambas metodologias.

Para realizar a dessorção dos compostos da fibra foi utilizada a mesma temperatura do injetor do *headspace*, ou seja, 220°C, que se encontra dentro do limite de 200 a 240°C recomendado no manual do SPME (SUPELCO, 1999).

Neste sentido McLaren *et al* (1995) relatam a importância da geometria da entrada do GC, na etapa de dessorção da fibra, bem como do tipo de revestimento do pórtilo de injeção, do volume, da temperatura de dessorção, da temperatura inicial da coluna e também de suas dimensões, da posição da fibra na entrada do GC, das possíveis contaminações na entrada do GC, da estabilidade do detector e por fim, do fluxo do gás de arraste utilizado. Destaca-se que neste trabalho todas as considerações citadas por McLaren *et al* (1995) foram únicas para os dois métodos empregados.

Mesmo com a existência de avançados métodos de identificação e quantificação de compostos voláteis, as técnicas de extração continuam sendo a etapa mais complexa da análise. Segundo Queiroz *et al* (2001) a técnica de extração a ser escolhida deve levar em consideração as seguintes características: [1] simplicidade, [2] tempo de extração, [3] custo, [4] fornecer extratos livres de possíveis interferentes e [5] altas recuperações com boa exatidão e precisão. Neste trabalho foi possível analisar os resultados em cada aspecto citado, nos dois métodos estudados, e assim eleger a técnica de *headspace* como a mais viável considerando as mesmas condições de análise.

4 CONCLUSÕES

As cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* apresentaram a capacidade de produzir de ésteres, aldeídos, ácidos, cetonas e alcoóis. Foi verificado entre estes compostos a presença de etanoato de etila, octanoato de etila, acetato de isopentila (apenas em *H. uvarum*), 3-metil-1-butanol e etanal, que segundo a literatura, contribuem para o aroma frutal em fermentados de maçãs e vinhos. Assim, ambas as leveduras apresentam potencial em produção de compostos aromáticos, podendo ser aplicadas na elaboração de fermentados de maçãs, melhorando a qualidade aromática do produto final.

A captura dos compostos voláteis de fermentados de maçã utilizando *headspace* estático apresentou resultados satisfatórios, evidenciando a quantificação dos compostos de interesse e com baixo custo nas condições aplicadas. No entanto, a SPME, necessita da otimização das condições de extração, bem como de acoplar ao cromatógrafo gasoso a espectrometria de massa, para obtenção de resultados que justifiquem a relação custo/benefício.

REFERÊNCIAS

ANDORRA, I.; BERRADRE, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVEZARZOSO, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. **European Food and Residual Technology**, v.231. p.215–224. 2010.

AZHU VALAPPIL, Z.; FAN, X.; ZHANG, H.Q.; ROUSEFF, R.L. Impact of thermal and nonthermal processing technologies on unfermented apple cider aroma volatiles. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.3, p.924-929, 2009.

BELTRAN, G.; NOVO, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A.; ROZÈS, N. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.2, p.169-177, 2008.

BERLARDI, R.; PAWLISZYN, J. The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and their Rapid Transfer to Capillary Columns. **Water Quality Research Journal of Canada**, v.24, p.179-181, 1989.

BOYLSTON, T. D.; WANG, H.; REITMEIER, C. A.; GLATZ, B. A. Effects of processing treatment and sorbate addition on the flavor characteristics of apple cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.7, p.1924-1931, 2003.

BUZZINI, P.; MARTINI, A.; CAPELLI, F.; PAGONI, U.M.; DAVOLI, P. A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, n.4, p.301-311, 2003.

CARVALHO, J.R.F.; SILVA, K.M.; SIMÕES, D.R.S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado frisante de maçã com características semelhantes à sidra francesa. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.28, n.1, p.97-114, 2010.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**. Itália, v.108, p.239-245, 2006.

CLETO, F. V. G.; CONSOLINI, F. Legislação Brasileira de Bebidas. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, Legislação e Mercado**. São Paulo: Edgard Blucher. 1-20, 2005.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n 4, p.925-932, 2011.

DEAN, J.R. **Extraction methods for environmental analysis**. New York : John Wiley & Sons Ltda, 1998.

DEFILIPPI, B. G., *et al* Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. **Plant Science**, v.168, n.5, p.1199-1210, 2005.

FACUNDO, H.V.V. **Mudanças no perfil sensorial e de voláteis do suco de abacaxi concentrado durante o processamento**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Ceará, 2009.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. p.17-28.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research Technology**, v.222, p.15-25, 2006.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analytical Chemical Acta**, v.563, p.145-153, 2006.

GONZÁLEZ-MAS, M.C.; GARCÍA-RIÑÓN, L.M.; ALFARO, C.; RAMBLA, J.L.; PADILLA, A.I.; GUTIERREZ, A. Headspace-based techniques to identify the principal volatile compounds in red grape cultivars. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.510–518, 2009.

HEARD, G.M. ; FLEET, G.H. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. **Food Technology in Australia**, v.38, p.22-25, 1986.

HUBERT, C.; BRUNERIE, P.; LE QUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F. Lês composés volatiles du cidre: extraction rapide et dosage. **Sciences des Aliments**, v.10, n.3, p.603-618, 1990.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.23, n.3, p.523 – 528, 2003.

LE QUÉRÉ, J.M.; DRILLEAU, J.F. Microbiologie et technologie du cidre. **Revue des Oenologues**, n.88, p.17-20, 1998.

MADRERA, R.R.; ALONSO, J.J.M. Typification of cider brandy on the basis of cider used in its manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.8, p.3071-3075, 2005.

MADRERA, R. R.; HAVIA, A. G.; GARCÍA, N. P.; VALLES, B. S. Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.2064-2069, 2008.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Study of methods for the Extraction of volatile compounds from fermented grape must. **Food Chemistry**, v.96, p.586-590, 2006.

MANGAS, J.; RODRÍGUEZ, R.; MORENO, J.; BLANCO, D. Volatiles in distillates of cider aged in American oak wood. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.268-273, 1996.

MCLAREN, J.W.; METHVEN, B.A.J.; LAM, W.H.; BERMAM, S.S. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry in the production of environmental certified reference materials. **Mikrochimica Acta**, v.119, p.287-295, 1995.

MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J.M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F.J. LAS; RODRÍGUEZ-VICO, F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.297–304, 2003.

MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. Hoboken (N.J.): John Wiley & Sons, 2003. (Chemical analysis, v.162)

MOLINA, A.M.; GUADALUPE, V.; VARELA, C.; SWIEGERS, J.H.; PRETORIUS, I.S.; AGOSIN, E. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. **Food Chemistry**, v.117, p.189–195, 2009.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.285- 294, 2005.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.231-238, 2008.

MORRISSEY, W.F.; DAVENPORT, B.; DOBSON, A.D.W.; QUEROL, A. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations, **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.3, p.647-655, 2004.

NOGUEIRA, A.; SWIECH, B. P.; WOSIACKI, G. Características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado. **Publicatio UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa (PR), v.12, n.3, p.15-23, 2006.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2010. v.1, p.113-142.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1569-1576, 2005.

OSORIO-CADAVID, E.; CHAVES-LÓPEZ, C.; TOFALO, R.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. **Food Microbiology**, v.25, p.771– 777, 2008.

PAGE, B.D.; LACROIX, G. Application of solid-phase micro extraction to the *headspace* gas chromatographic analysis of halogenated volatiles in selected foods. **Journal of Chromatography**, v.648, p.199-211, 1993.

PAPATHANASIOU, I.; SELVAGINI, R.; SERVILI, M.; VAUGHAN-MARTINI, A.; ROUSSIS, I.G. Winemaking ability of wild yeast strains and comparative volatile profiles of wines fermented at 12° or 20°C. **Food Science and Technology Research**, v.12, n.3, p.194-198, 2006.

PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. A fuzzy comprehensive evaluation for selecting yeast for cider making. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.140-144, 2008.

PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) Fuji apple. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.610-615, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, Campinas (SP), v.24, n.1, p.68-76, 2001.

REID, L.M.; O'DONNELL, C. P.; KELLY, J. D.; DOWNEY, G. Preliminary studies for the differentiation of apple juice samples by chemometric analysis of solid-phase microextraction-gas chromatographic data. **Journal Agricultural and Foes Chemistry**, v.52, p.6891-6896, 2004.

RODRÍGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BARBAGELATA, R. J.; BARDA, N. B.; CABALLERO, A. C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.19–25, 2010.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINÁGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v.86, p.181-188, 2003.

ROJAS, V.; GIL, J.V.; PINÁGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.3, p.283-289, 2001.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.169-180, 2003.

RÓTH, E.; BERNA, A.; BEULLENS, K.; YARRAMRAJU, S.; LAMMERTYN, J.; SCHENK, A.; NICOLAI, B. Postharvest quality of integrated and organically produced apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.45, p.11–19, 2007.

ROZA, C.; LACA, A.; GARCÍA, L.A.; DÍAZ, M. Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. **Process Biochemistry**, v.38, p.1451-1456, 2003.

SAERENS, S.M.G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K.J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.454–461, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2.

SHIREY, R.E. SPME fibers and selection for specific applications. In: WERCINSKI, S.A.S. (Ed.). **Solid phase microextraction: a practical guide**. New York: Marcel Dekker, 1999. p.59-110.

SIMÕES, D. R. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Aromas em maçãs, sucos e sidras: uma revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.27, n.1, p.153-172, 2009.

SLACK, G.; SNOW, N.H.; KOU, D. Extraction of volatile organic compounds from solids and liquids. In: MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003, p.183-223. (Chemical analysis, v.162)

SOUZA, F.K.F.; DA LUZ, R.O.; DOS SANTOS, C.M.E.; PIETROWSKI, G.A.M.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Development of fermentator in series for the study of kinetic apple fermented. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, p.379-386, 2011.

SUPELCO, Bellefonte, PA, Sigma-Aldrich Co., 1999.

SWIEGERS, J.H.; KIEVIT, R.L.; SIEBERT, T.; LATTEY, K.A.; BRAMLEY, B.R.; FRANCIS, I.L.; KING, E.S.; PRETORIUS, I.S. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. **Food Microbiology**, v. 26, p.204–211, 2009.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.34, n.1, p.52-59, 2000.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas. **Química nova**, v.23, n.4, 2000.

VERSINI, G.; FRANCO, M.A.; MOSER, S.; BARCHETTI, P.; MANCA, G. Characterisation of apple distillates from native varieties of Sardinia island and comparison with other Italian products. **Food Chemistry**, v.113, p.1176-1183, 2009.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v.25, p.778-785, 2008.

VIANA, F.; GILA, J. V.; VALLÉSA, S.; MANZANARES, A. P. Increasing the levels of 2 phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. v.135, p.68–74, 2009.

VILANOVA, M.; SIEIRO, C. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.929–933, 2006.

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.32, n.4, p.775-786, 1989.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v.37, n.1, p.9-22, 2008.

XIAOBO, Z.; JIEWEN, Z. Comparative analyses of apple aroma by a tin-oxide gas sensor array device and GC/MS. **Food Chemistry**, v.107, p.120-128, 2008.

XU, Y.; FAN, W.; QIAN, M. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and *headspace* solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oregon, v.55, p.3051-3057, 2007.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, China, v.33, p.192-196, 2006.

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.376–384, 2006.

YOUNG, J.C.; CHU, C. L.G.; LU, X.; ZHU, H. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.8086-8093, 2004.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v.65, p.1843-1852, 1993.

ZIERLER, B.; SIEGMUND, B.; PFANNHAUSER, W. Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using *headspace* solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.520, n.1-2, p.3-11, 2004.

ZOHRE, D.E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, p.319 – 324, 2002.

CAPÍTULO VI - AVALIAÇÃO DE *H. guilliermondii* E *H. uvarum* NA ELABORAÇÃO DE FERMENTADOS DE MAÇÃS POR FERMENTAÇÕES MISTAS E SEQUENCIAIS

RESUMO

A fermentação sequencial sob ação de leveduras oxidativas e fermentativas tem sido proposta como uma maneira de melhorar a qualidade de bebidas fermentadas. Neste trabalho foram avaliadas fermentações mistas de *Saccharomyces cerevisiae* com *Hanseniaspora uvarum*, e de *Saccharomyces cerevisiae* com *Hanseniaspora guilliermondii*, utilizando-se de inoculações sequenciais diferenciadas. Foi utilizado mosto despectinizado e pasteurizado de maçã da cv. Gala e monitorado o crescimento das leveduras, parâmetros físico-químicos e cinéticos ao longo de 10 dias de fermentação. A técnica de *headspace* foi utilizada para a captura dos compostos voláteis dos fermentados obtidos em de cada ensaio realizado, e a análise dos mesmos ocorreu em cromatógrafo gasoso com identificação comparando o tempo de retenção com os obtidos na solução de referência contendo padrão interno. Os resultados evidenciaram que houve uma boa interação entre as leveduras fermentativas e oxidativas, pois os fermentados obtidos além de apresentarem grau alcoólico adequado durante o período de avaliação, mantiveram a presença de açúcares residuais, característica desejável ao produto. A análise cromatográfica dos compostos voláteis permitiu identificar etanoato de etila, butanoato de etila acetato de isopentila, etanoato de hexila, 2-hidróxi propanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, 1,4-butanoato de etila, dodecanoato de etila, etanal, ácido butanóico e octanóico, etanol, 3-metil-1-butanol, 2-hexanol, 1-hexanol, 2-fenil etanol e 2-heptanona, nos fermentados elaborados por fermentação mista e sequencial. Na análise olfativa, foram percebidas diferenças nos fermentados obtidos em tempos diferentes de inoculação de *S. cerevisiae* sobre a *Hanseniaspora* sp., e a fermentação mista com *H. guilliermondii* foi considerada aromaticamente mais agradável. Desta forma, considerando a presença do grupo dos ésteres, e principalmente dos álcoois superiores, responsáveis por aromas frutais e florais, os ensaios de culturas mistas e sequenciais, revelaram a possibilidade de contribuir para a qualidade aromática do fermentado de maçã.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. *Hanseniaspora uvarum*. *Hanseniaspora guilliermondii*. Voláteis. Fermentação.

ABSTRACT

The sequential fermentation under oxidative and fermentative yeasts action has been proposed as a way to improve the quality of the fermented beverages. In this paper it was evaluated mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* with *Hanseniaspora uvarum*, and *Saccharomyces cerevisiae* with *Hanseniaspora guilliermondii* using sequential inoculations differentiated. It was used the Gala apple must and monitored the strains growing, physical and chemical parameters and kinetics for 10 days of fermentation. The headspace technique was used for the volatiles compounds capture of the fermented obtained in each test made, and their analysis was by gas chromatography with identification by comparing the retention time with those obtained in the reference solution containing internal standard. The results

showed that there was a good interaction between the fermentative and oxidative yeasts, because the fermented obtained besides showing appropriate alcohol degree, it kept the presence of residual sugars, desirable characteristic of the product. The chromatograph analysis of the volatiles compounds extracted by the headspace method allowed identified ethanoate, ethyl butanoate, ethyl acetate isopenthyl, hexylethanoate, 2-hydroxy ethyl propanoate, ethyl octanoate, ethyldecanoate, ethyl 1,4-butanoate, ethyl dodecanoate, ethanol, butanoic and octanoic acid, ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-hexanol, 1-hexanol, 2-phenyl ethanol and 2-heptanone, in the fermented made by mixed and sequential fermentation. In the olfactory analysis, differences were noted in the fermented obtained at different times of inoculation of *S. cerevisiae* over a *Hanseniaspora* and the mixed fermentation with *H. guilliermondii* were considered the most pleasant aromatically. Thus, considering the presence of the esters group, and, especially the superiors alcohols, responsible for fruity and floral aromas, the tests of mixed and sequential cultures revealed the possibility to contribute to obtain an apple wine with aromatic quality.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. *Hanseniaspora uvarum*. *Hanseniaspora guilliermondii*. Volatiles. Fermentation.

1 INTRODUÇÃO

A fermentação de sidra francesa, considerada uma das melhores do mundo, ocorre em duas fases, a primeira chamada de oxidativa e posteriormente a fase fermentativa. A atividade inicial das leveduras oxidativas é considerada importante para o perfil aromático dos vinhos, devido ao fato destas leveduras serem responsáveis por diferentes reações enzimáticas desenvolvendo uma ampla quantidade de produtos voláteis e não voláteis (DOMÍZIO *et al*, 2007; CIANI; BECO e COMITINI, 2006; NOGUEIRA, 2003; ROMANO *et al*, 2003).

A fermentação mista de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* (oxidativas) tem recebido muita atenção devido à possibilidade de prover características de *flavour* ao produto final. O efeito da interação de levedura oxidativa e convencional na fermentação da sidra parece ser eficiente na produção de aromas se for ajustado o tempo de inóculo das duas leveduras. A interação levedura-levedura influencia o crescimento das cepas, impactando na eficiência do processo e qualidade do produto final. A fermentação mista com tempos de inoculação corretamente ajustados resulta em uma melhor eficiência de conversão alcoólica (3,47 %), com teores de açúcares residuais (3,88 %) agradáveis para o produto final e um tempo de fermentação viável para o processo (XU *et al*, 2006).

Com relação aos compostos voláteis do produto fermentado, os ésteres são descritos como os melhores contribuintes para características de odor frutado no *bouquet* do vinho. Ésteres de acetato como acetato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila e acetato de 2-

fenil-etila são importantes compostos do *flavour* dos vinhos e outras bebidas alcoólicas, e podem ser formados em concentrações relativamente altas por leveduras oxidativas (ROJAS *et al*, 2003; RAPP; MANDERY, 1986).

As leveduras do gênero *Hanseniaspora* são as melhores produtoras de ésteres de acetato, principalmente acetato de 2-fenil-etila, quando comparada com os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces* (VIANA *et al*, 2008). Em fermentações mistas, Xu *et al* (2006) encontraram que as cepas de *Hanseniaspora valbyensis* produzem altos teores de etil-ésteres e as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* produzem altas quantidades de álcoois, e o resultado final destes teores é uma contribuição positiva no produto final. Os maiores ésteres formados são etil-acetato e fenil-etil-acetato (considerados os maiores impactantes no aroma); e os álcoois são álcool isoamílico e álcool isobutílico.

A maior parte dos trabalhos sobre o processamento e a qualidade da sidra no Brasil, tem sido desenvolvida por enólogos contratados pelas indústrias interessadas na comercialização das frutas, visando o processamento das maçãs de descarte (NOGUEIRA *et al*, 2007). Assim, encontra-se uma lacuna na elaboração de fermentado de maçã nas condições brasileiras de processamento, com a utilização de fermentações com cepas oxidativas e fermentativas, em inoculações sequenciais.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a ação de leveduras oxidativas e fermentativas em fermentações mistas e sequenciais nos compostos voláteis e parâmetros físico-químicos, assim como a análise sensorial dos produtos obtidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram utilizadas amostras de maçãs da cultivar Gala (90 Kg) obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

A levedura fermentativa utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (Fabricante AEB Group). As leveduras oxidativas: *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram identificadas em capítulo anterior deste trabalho e conservadas em tubos inclinados contendo *yeast malt agar* (YMA) à temperatura de 7-10°C.

Os meios de cultura e reativos utilizados nas análises foram de qualidade P.A., e os padrões foram de grau cromatográfico ($\geq 99,7\%$ - Fluka; $\geq 98,5\%$ - Merck; $\geq 97-99\%$ - Aldrich; grau analítico - Interchim).

Os padrões de aromas foram os seguintes: etanal (Interchim), etanoato de etila (Fluka), etanol (Merck), propanoato de etila (Interchim), 3-metil butanoato de etila (Interchim), etanoato de propila (Interchim), etanoato de isobutila (Interchim), butanoato de etila (Interchim), etanoato de butila (Fluka), hexanona (Interchim), acetato de isopentila (Aldrich), 2-heptanona (Interchim), 3-metil-1-butanol (Merck), 2-metil-1-butanol (Interchim), 2-hexanol (Interchim), etanoato de hexila (Fluka), 2-octanona (Interchim), 3-hexanoato de etila (Interchim), 2-hidróxi propanoato de etila (Aldrich), 1-hexanol (Fluka), octanoato de etila (Aldrich), decanoato de etila (Aldrich), ácido butanóico (Fluka), 1,4-butanoato de etila (Fluka), 2-fenil-etanol (Aldrich), dodecanoato de etila (Aldrich) e ácido octanóico (Fluka).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Processos

Processamento do mosto de maçã. As maçãs foram selecionadas, lavadas e trituradas em microprocessador (Processador Metvisa, Tipo MPA). A massa triturada foi acondicionada em pacotes de tela plástica porosa que, superpostos, foram submetidos a uma pressão de $3,0 \text{ kgf.cm}^{-2}$ em prensa hidráulica (Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado com pectinase (Pectinex Ultra SP, atividade $9.500 \text{ PGU.mL}^{-1}$, Novozymes do Brasil), a uma proporção de $3,0 \text{ mL.hL}^{-1}$ (120 minutos a $20-25^\circ\text{C}$) e, após sedimentação, o sobrenadante foi trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo, envasado em garrafas de vidro de 600 mL, lacradas com tampa metálica e pasteurizado a $80-85^\circ\text{C}$ por 20 minutos (WOSIACKI *et al*, 1989).

Processamento do fermentado de maçã. O mosto clarificado foi acondicionado em fermentadores de vidro de 1450 mL com volume útil de 1200 mL, conforme apresentado na Figura 1, esterilizados em autoclave ($121^\circ\text{C} / 15 \text{ min}$) e mantidos em sala climatizada à temperatura de 20°C (SOUZA, *et al*, 2011). No mosto foi adicionado antibiótico cloranfenicol a 0,01% (99%, Henrifarma - São Paulo) para controle do crescimento bacteriano. As

leveduras foram inoculadas com uma população inicial de aproximadamente $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ para cepas oxidativas e $2,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ para cepas fermentativas, nos seguintes ensaios:

- **Ensaio 1:** inóculo de leveduras oxidativas e fermentativas simultaneamente (processo misto), considerado inóculo de leveduras fermentativas no tempo de 0 dia;

- **Ensaio 2:** inóculo de leveduras oxidativas no tempo 0 e de leveduras fermentativas no tempo de 1 dia;

- **Ensaio 3:** inóculo de leveduras oxidativas no tempo 0 e de leveduras fermentativas no tempo de 2 dias;

- **Ensaio 4:** inóculo de leveduras oxidativas no tempo 0 e de leveduras fermentativas no tempo de 3 dias.

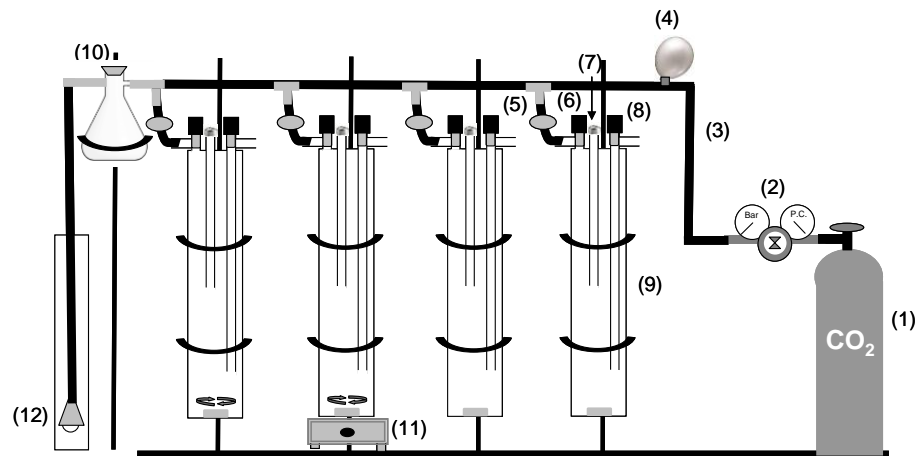


Figura 1 - Esquema dos fermentadores em anaerobiose

(1): Cilindro de gás carbônico para pressurizar sistema. (2): Manômetro/Registro. (3): Tubulação de passagem de gás carbônico pelo sistema. (4): Válvula de segurança contra vazamento de gás. (5): Filtro de 0,20 μm. (6): Tampa tipo rosca para entrada de saída de gás no fermentador. (7): Tampa de borracha para inoculação das leveduras no mosto. (8): Válvula tipo rosca para retirada de amostra. (9): Fermentador de 1450 mL. (10): Recipiente de segurança contra retorno de água no sistema de fermentação. (11): Agitador magnético (Quimis). (12): Batoque para manutenção da anaerobiose no sistema de fermentação.

Para atingir a população das leveduras oxidativas, foi inoculada uma colônia de cada cepa de *Hanseniaspora* sp., isolada em YMA (Merck), em 5 mL de Caldo glucose peptona e extrato de levedura (GPBY) e depois de 24h de incubação a 25 °C, esta cultura foi transferida para 100 mL do mesmo caldo, tempo e temperatura atingindo a população de aproximadamente 10^{12} ufc.mL⁻¹ (SCHMIDELL *et al.*, 2001). A partir desta população foi coletado um volume suficiente para obter a população desejada nos fermentadores (em torno de $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹). Para a levedura fermentativa foram seguidas as recomendações do fabricante (AEB Group).

No décimo dia, as fermentações foram interrompidas e o fermentado de maçã foi centrifugado a 10200 g à 5°C (Centrífuga Himac CR21GII) durante 20 minutos, em seguida trasfegado, engarrafado e armazenado sob baixa temperatura (-18 °C).

Pontos de amostragem. Nos tempos de fermentação com 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias foram retirados 10 mL de amostras do fermentado para contagem de células; e nos dias 3, 5, 7 e 10 foram retirados 40 mL para análises físico-químicas.

As amostragens foram realizadas conforme Souza *et al* (2011).

A cinética de fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa do fermentado (200mL) através da liberação de gás carbônico (CO₂) pelo batoque, durante o período de 10 dias de fermentação a temperatura de 20°C. Para as pesagens a agulha conectada na rolha de borracha foi retirada e o erlenmeyer fechado contendo o fermentado foi pesado a cada 2 horas, em balança analítica (0,001 g de sensibilidade, Bell Engineering- Mark 1300) até peso constante (ROGER *et al*, 2002; BELY *et al*, 1990). A velocidade de fermentação foi calculada pela variação da perda de gás carbônico em função do tempo (Equação 1).

$$V = \Delta\text{CO}_2 / \Delta t \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

$$V = \text{Velocidade de fermentação (gCO}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta\text{CO}_2 = \text{Variação de produção de CO}_2 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta t = \text{Variação de tempo (dias)}$$

2.2.2 Experimentos

Avaliação do efeito da fermentação mista e sequencial de leveduras fermentativas e oxidativas no perfil volátil de fermentados de maçãs. Para realizar a fermentação mista foi colocado um inóculo inicial de $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ da levedura oxidativa em quatro fermentadores. A cepa fermentativa *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (Fabricante AEB Group) foi sendo inoculada sequencialmente nos fermentadores no tempo 0 da fermentação e nos dias 1, 2 e 3 com população inicial de $2,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹. O experimento foi realizado com *Hanseniaspora uvarum* e com *Hanseniaspora guilliermondii*. Para avaliar o perfil volátil dos fermentados de maçãs elaborados nas fermentações mistas e sequenciais, os compostos voláteis foram analisados por *headspace* estático, identificados e quantificados por

cromatografia gasosa. Foram avaliados os compostos voláteis do fermentado final (10° dia de fermentação).

2.2.3 Análises Instrumentais

Coleta dos compostos voláteis - *Headspace*

As amostras do fermentado de maçã foram colocadas em frascos com capacidade de 20 mL, na quantidade de 6 mL, onde foram colocados 50 µL de padrão interno (Ácido heptanóico, Merck). Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção por comparação com padrões. Antes da coleta dos compostos voláteis, as amostras permaneceram a 60°C sob agitação no forno do injetor automático (cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument) durante 10 minutos.

Análise cromatográfica de compostos voláteis

A análise dos compostos aromáticos foi realizada em cromatógrafo gasoso Young Lin Instrument - YL 6100 GC, equipado com detector de ionização de chama - FID, coluna capilar (Phenomenex) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 25 µm e filme de ZB-WAX com 0,25µm de espessura. A temperatura do injetor foi de 220°C, do detector de 230°C e o gás de arraste foi o nitrogênio a um fluxo de 2,5 mL.min⁻¹. A técnica de injeção foi split 1:1,2 e foi utilizado o modo de injeção automática do CG, com volume de 1500µL. As condições de análise foram com programação de temperatura inicial a 40°C por 5 minutos, elevação de 10°C.min⁻¹ até 150°C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. A seguir uma elevação de 10°C.min⁻¹ até 200°C, permanecendo por 5 minutos e nova elevação de 10°C.min⁻¹ até 220°C, onde permaneceu por 16 minutos.

Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os obtidos na solução de referência. Para a quantificação das concentrações dos compostos voláteis identificados, foi utilizada a seguinte relação:

$$C = A \cdot \frac{h_i}{H_i} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

C = concentração do componente (mg.L⁻¹)

A = concentração da substância na solução de referência (mg.L⁻¹)

h = área do pico da substância na amostra

H = área do pico da substância na referência

I = área do pico do padrão interno na referência

i = área do pico do padrão interno na amostra.

A quantificação dos compostos não identificados foi realizada utilizando a equação 2, no entanto foi utilizada a concentração do etanol na solução de referência (A) e a área do pico do etanol na solução de referência (H), assim o valor obtido de cada composto foi em mg de equivalente de etanol.L⁻¹.

2.2.4 Análises Físico-Químicas

Nos pontos 0, 3, 5, 7 e 10 dias foram realizadas análises de **açúcares redutores** quantificados pelo método químico clássico de Somogyi-Nelson assim como os açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise da sacarose com HCl 1 N (50 °C / 5 min) e **álcool** através do uso do ebuliômetro. A **acidez titulável** total foi determinada por neutralização com NaOH 0,1 N até pH 8,33 com fenolftaleína e calculada como ácido málico, sendo expresso em g.100 mL⁻¹, e a **acidez volátil** foi calculada como ácido acético e expressa em g.100 mL⁻¹. O **nitrogênio total** foi determinado pelo método de Kjeldhal (IAL, 2008; BARON *et al*, 1977). Todas as análises físico-químicas foram realizadas nas amostras dos fermentados previamente centrifugadas para a separação da biomassa.

2.2.5 Análises Microbiológicas

As amostras dos fermentados de maçã foram coletadas e preparadas para contagem microbiológica conforme recomendado por Silva *et al* (2010). Foram preparadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1%, e semeadas em superfície, com alça de Drigalski, no meio ágar malte que permite a diferenciação das colônias de leveduras fermentativas e oxidativas (XU *et al*, 2006). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas. Para a contagem foram consideradas as placas que apresentaram de 25 a 250 colônias típicas da levedura considerada, respeitando a diluição correspondente. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL⁻¹). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Ponta Grossa.

2.2.6 Análise Sensorial

Teste 1. Nos 4 produtos obtidos a partir de diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae Bouquet* sobre a levedura oxidativa *Hanseniaspora uvarum* em fermentações mista e sequenciais foram realizadas análise olfativa de ordenação por preferência, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), e teste de aceitação com escala hedônica de 7 pontos segundo metodologia descrita por Faria e Yotsuyanagi (2002).

Teste 2. Nos 4 produtos obtidos a partir de diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae Bouquet* sobre a levedura oxidativa *Hanseniaspora guilliermondii* em fermentações mista e sequenciais foram realizadas análise olfativa de ordenação por preferência, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), e teste de aceitação com escala hedônica de 7 pontos segundo metodologia descrita por Faria e Yotsuyanagi (2002).

Teste 3. Foi realizada análise olfativa de preferência pareada, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), entre os dois produtos preferidos dos testes 1 e 2.

2.2.7 Análises Estatísticas

Foram feitas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para diferenciação de médias em software Excell 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados físico-químicos do mosto de maçã da cultivar Gala (Tabela 1), pode-se dizer que, pelo teor de nitrogênio, que na maçã está na forma de aminoácidos, o mosto é classificado com elevado teor ($>150 \text{ mg.L}^{-1}$) (NOGUEIRA *et al*, 2007). As leveduras *Saccharomyces* sp. e não-*Saccharomyces* utilizam no seu crescimento teores entre 50-70 e 30-40 mg.L^{-1} de nitrogênio, respectivamente (NOGUEIRA, 2003). Desta forma, a concentração de nitrogênio total não caracteriza este nutriente como fator limitante de crescimento, existindo teor suficiente para inoculação das duas leveduras neste mosto. Entretanto, o seu residual pode afetar a estabilidade microbiológica durante o armazenamento de bebidas que não receberam tratamento térmico, podendo ocorrer, alterações na qualidade do produto final (LEA; DRILLEAU, 2003).

Pode ser observado que o mosto de maçã da cultivar Gala, utilizado como meio de fermentação por leveduras apiculadas, apresentou baixo teor de açúcares ($9,78 \text{ g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) (Tabela 1), quando comparado com os resultados de Wosiacki *et al* (2008) que encontrou um valor médio para a mesma cultivar de $11,78 \pm 2,24 \text{ g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$. Isto atesta que o grau de maturidade da fruta utilizada para o processamento do suco não estava no seu estágio completo de maturação, podendo afetar o rendimento de etanol.

A acidez total expressa em ácido málico do mosto da cultivar Gala ($0,34 \text{ g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) classifica-o como baixa acidez ou doce (PAGANINI *et al*, 2004). Este fator pode ser prejudicial para o produto final, uma vez que valores maiores de acidez resultam em um fermentado com maior frescor (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010).

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas do mosto de maçã da cultivar Gala

Análises	Resultados
Nitrogênio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	153,47±0,02
Acidez Total ($\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ ác. málico)	0,34±0,004
Acidez Volátil ($\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ ác. acético)	0,02±0,008
Açúcares redutores ($\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$)	9,23±0,09
Açúcares redutores totais ($\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$)	9,78±0,05

A Figura 2 apresenta o resultado das contagens de colônias de *H. uvarum* e *S. cerevisiae* nos ensaios de fermentação mista e sequencial. No ensaio 1 ocorreu a maior contagem de *S. cerevisiae* em $\text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$, evidenciando que a presença da *H. uvarum*, no início do processo fermentativo, favoreceu o seu crescimento. No entanto, para a cepa oxidativa a presença da *S. cerevisiae*, não permitiu que a mesma obtivesse sua maior população ($1,2 \times 10^{10} \text{ ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$), o que foi obtido apenas no ensaio 3, quando a cepa fermentativa foi inoculada após 2 dias de fermentação. Estes resultados demonstram que as duas cepas apresentam uma boa interação em ensaios multi-culturas, existindo pouca influência de uma sobre a outra. E também percebe-se que a cepa *H. uvarum* foi tolerante aos teores de etanol no final dos dez dias de processo.

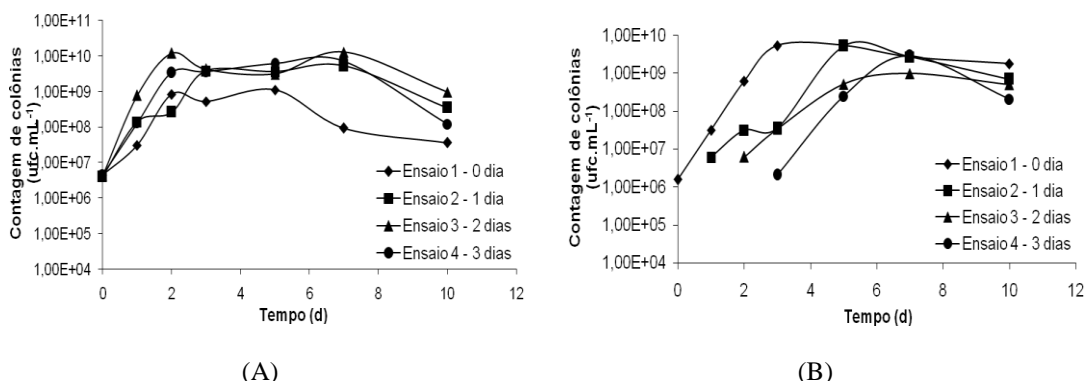


Figura 2 - Contagem de colônias nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. uvarum*. A) Contagem de colônias de *H. uvarum*. B) Contagem de colônias de *S. cerevisiae*.

Percebe-se que as leveduras *Hanseniaspora uvarum* não são suplantadas pelas *Saccharomyces* até o 10º dia de fermentação, exatamente como ocorre em processo natural, onde as *S. cerevisiae* estão sob a influência de várias cepas oxidativas (Figura 2). As cepas alcançaram populações máximas ao redor de 10^9 ufc.mL⁻¹ para as oxidativas e fermentativas.

Os dados obtidos neste trabalho estão em discordância com Ciani; Beco e Comitini (2006), ao verificarem em fermentações mistas e sequenciais de *H. uvarum*/*S. cerevisiae* que a fermentação sequencial exibe uma persistência e uma quantidade maior de leveduras em relação à fermentação mista. Andorrá *et al* (2010) também verificaram um efeito antagônico das cepas de *S. cerevisiae* sobre as cepas não-*Saccharomyces* (*C. zemplinina* e *H. uvarum*), onde a presença de *S. cerevisiae* reduziu fortemente as outras espécies em culturas mistas.

A cepa *H. guilliermondii* demonstrou um comportamento diferente de *H. uvarum*, pois as cepas fermentativas alcançaram população mais alta (aproximadamente 10^{10} ufc.mL⁻¹) (Figura 3). Também não ocorreu suplantação de células até o décimo dia de processo. O diferencial foi uma diminuição da população final de *S. cerevisiae* no ensaio 1 - fermentação mista. Estes resultados demonstram um alto crescimento de leveduras fermentativas, pois em ensaios de fermentação puras estas cepas não chegam a atingir esta população, atingindo aproximadamente 10^7 ufc.mL⁻¹ (NOGUEIRA *et al* 2007). É possível verificar que estas duas cepas também apresentaram uma boa interação em fermentações mistas.

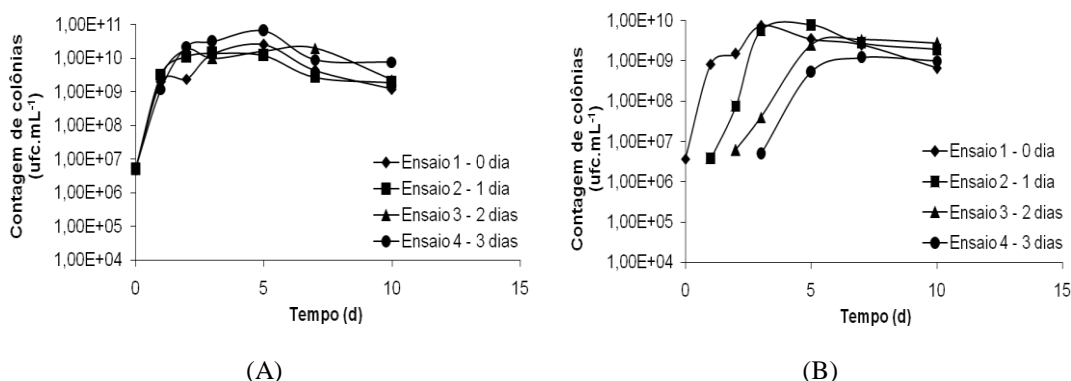


Figura 3 - Contagem de colônias nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. guilliermondii*. A) Contagem de colônias de *H. guilliermondii*. B) Contagem de colônias de *S. cerevisiae*

Observou-se ainda nas Figuras 2 e 3 que tanto a levedura *H. guilliermondii*, quanto *H. uvarum*, toleraram os níveis de etanol do final do processo de 6,5 e 6,7 °GL, respectivamente, não sendo suplantadas pelas cepas de *S. cerevisiae*, conforme descrevem Nogueira (2003) e LeQuére e Drilleau (1993).

Assim, os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com Bedriñana *et al* (2010), que isolaram e identificaram uma grande variedade de espécies de leveduras, incluindo *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces*, e verificaram que o gênero *Hanseniaspora* coexistiu com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante o início e fases avançadas de fermentação. E também com os resultados de Bely *et al* (2008) que mostram que as espécies não-*Saccharomyces* podem sobreviver em níveis significativos durante a fermentação do açúcar, independentemente se o mosto é ou não pasteurizado. Verificaram que as populações de não-*Saccharomyces* e de *S. cerevisiae* atingiram níveis semelhantes ao final da fermentação, constatando que a cultura pura de *S. cerevisiae* não suprimiu o crescimento de leveduras indígenas não-*Saccharomyces*.

Pérez-Nevado *et al* (2006) estudaram o mecanismo envolvido na morte celular de *H. guilliermondii* e *H. uvarum*, durante fermentações mistas com *S. cerevisiae* sob condições de crescimento enológicas, e verificaram que quando *S. cerevisiae* alcançam densidades celulares de cerca de 10^7 UFC.mL⁻¹, uma forte redução da população de *Hanseniaspora* passa a ser observada independentemente da concentração de etanol. Fato não observado neste trabalho.

Analisando a evolução de etanol na fermentação sequencial de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* (Figura 4B), percebe-se que o único ensaio que estabilizou o teor antes do 10º dia foi o ensaio 1 - fermentação mista. Os outros ensaios continuaram produzindo etanol a partir

de açúcar até a finalização do processo. Assim, mesmo com os teores de etanol atingidos (de até 6,7° GL), todos os ensaios mantiveram açúcares residuais no produto final, sendo que o ensaio que teve maior teor residual (4,04 g.100mL⁻¹) foi o ensaio 3 (*H. uvarum* + *S. cerevisiae* 2d).

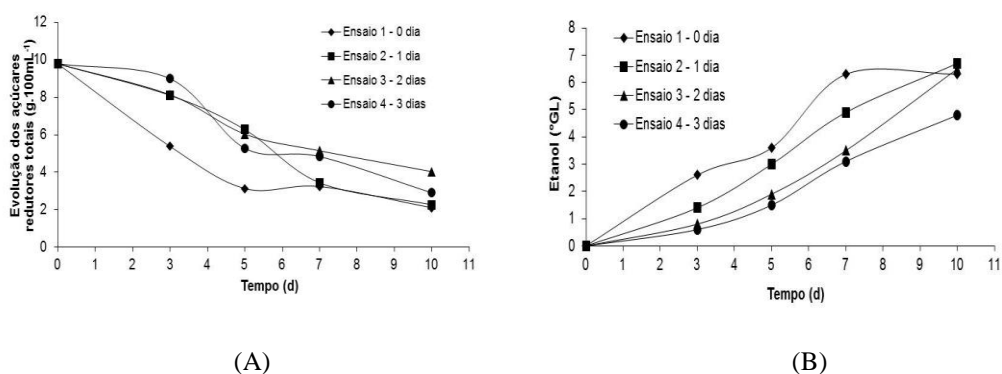


Figura 4 - Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. uvarum*. A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução da concentração de etanol (°GL)

Observa-se que para a evolução de etanol em *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* (Figura 5) todos os ensaios atingiram o teor maior que o processo permitiu no 10° dia sem perceptível estabilização, e ainda permaneceram açúcares residuais no produto. O ensaio 4 foi o que manteve maior teor de açúcares residuais (3,15 g.100mL⁻¹) (*H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 3 dias).

Resultados semelhantes foram encontrados por Xu *et al* (2006) que em fermentações mistas de *H. valbyensis* e *S. cerevisiae*, obteve um teor de 11,5% (v/v) de etanol e 3,88 g.L⁻¹ de açúcares residuais e em fermentações puras de *H. valbyensis* obteve um teor de etanol de 6% (v/v) com 30,21 g.L⁻¹ de açúcares residuais.

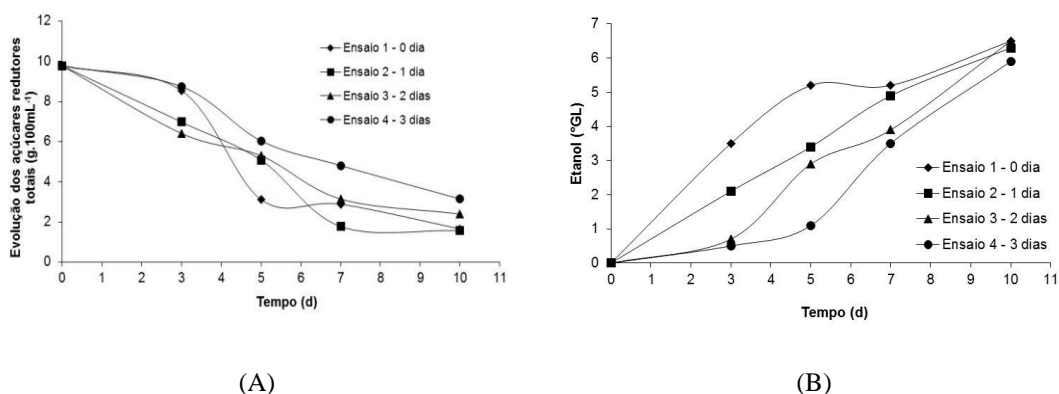


Figura 5 - Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. guilliermondii*. A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol

Percebe-se que a maior velocidade de fermentação foi obtida no ensaio 1 de *H. uvarum* - fermentação mista (Tabela 2), provavelmente a ação das duas leveduras juntas no mosto favorece o andamento do processo fermentativo. Percebe-se também que à medida que aumentou o tempo de inoculação de *S. cerevisiae* no mosto, a velocidade de fermentação foi reduzida. Resultado não perceptível na relação entre o consumo de açúcares e produção de etanol, o que pode ser devido à produção de metabólitos secundários do processo fermentativo.

Tabela 2 - Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae* Bouquet.

Ensaio	Tempo de Inóculo (dias)	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo V máx (dias)
1	0	11,91	2,75
2	1	9,32	3,5
3	2	8,05	4,25
4	3	7,46	7

Os resultados para velocidade da fermentação realizada sob ação de *H. guilliermondii* e *S. cerevisiae* foram semelhantes ao encontrado para fermentação sequencial com *H. uvarum*, sendo a maior velocidade máxima encontrada no ensaio 1 - 0 dia, e esta é decrescente à medida que aumenta o tempo de inoculação de *S. cerevisiae*. Neste ensaio é possível perceber uma consonância entre estes dados e a relação entre o consumo de açúcares e produção de etanol, que também decresce com o aumento do tempo de inóculo de *S. cerevisiae*.

Tabela 3 - Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae* Bouquet

Ensaio	Tempo de Inóculo (dias)	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo v máx (dias)
1	0	14,54	1,75
2	1	10,14	3
3	2	8,49	5
4	3	6,47	5

É possível verificar a evolução dos compostos do mosto dos fermentados sequenciais sob a ação de leveduras *H. uvarum* e *H. guilliermondii* (Tabelas 4 e 5). Verificando primeiramente o teor de nitrogênio percebe-se que houve um consumo de aproximadamente 88 mg.L⁻¹ para a cepa *H. uvarum* e 84 mg.L⁻¹ para *H. guilliermondii*, estando em concordância com a literatura em todos os ensaios estudados (NOGUEIRA, 2003).

Todos os ensaios permaneceram com açúcares residuais, sendo o ensaio de 2 dias o que menos consumiu açúcares durante o processo, mas contrariamente produziu um teor alto de álcool quando comparado com os outros ensaios. Resultados semelhantes foram encontrados por Xu *et al* (2006) que em fermentações mistas de *H. valbyensis* e *S. cerevisiae*, obteve um teor de 11,5% (v/v) de etanol e 3,88 g.L⁻¹ de açúcares residuais.

Tabela 4 - Resultados das análises físico-químicas (10º dia) dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae* Bouquet

Análises	Mosto de maçã	Tempo de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>			
		0 dia	1 dia	2 dias	3 dias
Nitrogênio (mg.L ⁻¹)	153,47±0,02	69,34±5,99 ^a	69,34±5,99 ^a	66,57±4,53 ^a	63,79±4,53 ^a
Acidez Total (g.100mL ⁻¹ ác. málico)	0,34±0,004	0,36±0,00 ^a	0,38±0,02 ^a	0,39±0,01 ^a	0,32±0,00 ^b
Acidez Volátil (g.100mL ⁻¹ ác. acético)	0,02±0,008	0,03±0,01 ^b	0,05±0,00 ^a	0,05±0,00 ^a	0,05±0,01 ^a
Açúcares redutores (g.100mL ⁻¹)	9,23±0,09	0,78±0,03 ^c	0,79±0,01 ^c	1,23±0,06 ^b	1,51±0,01 ^a
Açúcares redutores totais (g.100mL ⁻¹)	9,78±0,05	2,11±0,08 ^c	2,27±0,02 ^c	4,04±0,02 ^a	2,90±0,02 ^b
Etanol (°GL)	-	6,3	6,7	6,5	4,8

Nota: ^{a, b, c, d} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de fermentados (p < 0,05).

Houve um aumento no conteúdo de acidez expressa em ácido málico nos ensaios exceto no tempo de 3 dias na ação de *H. uvarum* e um aumento da acidez volátil devido à síntese de ácido acético e acetato de etila nos produtos fermentados. O composto acetato de etila foi identificado em todos os produtos resultantes de fermentações sequenciais. As leveduras do gênero *Hanseniaspora* são conhecidas por serem altamente produtoras de ácido

acético e acetato de etila (CSOMA; SIPICZKI, 2008). Andorrá *et al* (2010), tendo trabalhado com culturas mistas de *S. cerevisiae* com *C. zemplinina* e *H. uvarum* em vinhos, verificaram uma produção de ácido acético acima dos níveis aceitáveis, capaz de neutralizar os benefícios da alta produção de ésteres. Estes valores elevados (1,48 g.L⁻¹) não foram encontrados neste trabalho.

Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas (10º dia) do fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae* Bouquet

Análises	Mosto de maçã	Tempo de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>			
		0 dia	1 dia	2 dias	3 dias
Nitrogênio (mg.L ⁻¹)	153,47±0,02	64,72 ± 2,62 ^a	73,96 ± 2,62 ^a	68,42 ± 3,46 ^a	72,11± 2,26 ^a
Acidez Total (g.100mL ⁻¹ ác. málico)	0,34±0,004	0,36 ± 0,00 ^a	0,38 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,00 ^a
Acidez Volátil (g.100mL ⁻¹ ác. acético)	0,02±0,008	0,07 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
Açúcares redutores (g.100mL ⁻¹)	9,23±0,09	0,18±0,007 ^d	0,40±0,004 ^c	0,59±0,009 ^b	1,12±0,01 ^a
Açúcares redutores totais (g.100mL ⁻¹)	9,78±0,05	1,66±0,009 ^c	1,57±0,04 ^c	2,40±0,03 ^b	3,15±0,07 ^a
Etanol (°GL)	-	6,5	6,3	6,5	5,9

Nota: a,b,c,d = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de fermentados (p < 0,05).

A variação do teor de etanol nas fermentações mistas e sequenciais de *H. uvarum* (de 4,8 a 6,7° GL) e *H. guilliermondii* (de 5,9 a 6,5° GL) evidenciaram que o teor de etanol encontrado neste trabalho foi muito semelhante ao encontrado por Suárez Valles *et al* (2007), que encontrou variação de 6,3 a 6,6% (v/v) em fermentação natural de sidra na Espanha, e também por Nogueira *et al* (2003) que verificou variação de 4,1 a 7,3° GL em sidras brasileiras. Entretanto, os valores foram considerados baixos em relação a outros autores como Xu *et al* (2006) que encontraram um teor de 11,5% (v/v) de etanol em fermentação mista de sidra; Ciani; Beco e Comitini (2006) que constataram teores de 16,0 % (v/v) em fermentação sequencial de vinhos, e Moreira *et al* (2008), que chegaram a obter 10,0 % (v/v) em fermentação mista com *H. uvarum* e 9,2% (v/v) com *H. guilliermondii*. Porém, não pode-se deixar de considerar o menor teor de açúcares que o mosto de maçã apresenta em relação ao mosto de uva.

Nas Tabelas 6, 7 e 8 estão apresentados os resultados da análise cromatográfica do *headspace* do mosto de maçã e também dos fermentados obtidos em fermentações mistas e sequenciais. Foi possível constatar a contribuição das leveduras do gênero *Saccharomyces*,

associadas com *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, na produção dos compostos aromáticos. Salvo o 2-hidróxi propanoato de etila, todos os demais compostos voláteis quantificados no mosto, evidenciaram um aumento variando de 1,4 para até 564,9 vezes a concentração obtida nos fermentados elaborados por culturas mistas, além da detecção de compostos não encontrados no mosto.

Tabela 6 - Compostos voláteis analisados por *headspace* em mosto de maçã

Compostos voláteis	Concentração (mg.L⁻¹)
Ésteres	
Etanoato de etila	1,14 ± 0,11
Butanoato de etila	0,05 ± 0,00
Acetato de isopentila	0,06 ± 0,01
Etanoato de hexila	0,07 ± 0,01
2-hidróxi propanoato de etila	16,07 ± 0,64
1,4-butanoato de etila	2,90 ± 0,03
Dodecanoato de etila	1,34 ± 0,00
Aldeídos	
Etanal	3,50 ± 0,30
Álcoois	
Etanol	84,32 ± 6,82
3-metil-1-butanol	0,88 ± 0,08
1-hexanol	0,61 ± 0,01
Não identificados	
1	47,38 ± 3,83
2	52,23 ± 4,22
3	0,79 ± 0,06
4	0,82 ± 0,07

Nota: Concentração dos compostos voláteis identificados em mg.L⁻¹; não identificados em mg de equivalente de etanol. L⁻¹; dados mostram a média de três replicatas ± DP.

Diversos estudos têm demonstrado que o processo de pasteurização pode causar perdas de compostos voláteis tanto no suco de maçã quanto na sidra. Nesse sentido Janzanti *et al* (2003), registraram perda total de octanoato de isoamila e de mais de 15 compostos não identificados em seus experimentos em suco clarificado de maçã Fuji. Boylston *et al* (2003) realizaram estudos em sidra e concluíram que a pasteurização realmente afeta os atributos sensoriais da bebida.

Neste trabalho não foi possível avaliar perda de compostos voláteis no mosto de maçã, em virtude da análise cromatográfica ter sido realizada apenas no mosto já pasteurizado. Entretanto, a comparação dos resultados com um quadro sobre os principais

compostos voláteis encontrados por diversos autores na maçã, suco e sidra, apresentado por Simões (2008), revelou que muitos voláteis listados no quadro, não foram detectados no mosto analisado, sugerindo esta perda.

A análise cromatográfica dos compostos voláteis pelo método de *headspace*, permitiu identificar a presença de ésteres, aldeídos, ácidos, álcoois e cetonas tanto em fermentações mistas de *H. uvarum* com *S. cerevisiae*, quanto de *H. guilliermondii* com *S. cerevisiae* (Tabelas 7 e 8, respectivamente).

Contudo, observaram-se comportamentos diferentes das cepas não-*Saccharomyces* frente às fermentações mistas, quando a maioria dos compostos quantificados de forma mais abundante na fermentação pura da cepa *H. uvarum* (etanoato de etila, 2-hidróxi propanoato de etila, 1,4-butanoato de etila e dodecanoato de etila e etanal) apareceu em menor quantidade (concentrações de 1,2 a 12,5 vezes menores) nas fermentações mistas. Isto só não foi verificado para o 3-metil-1-butanol e etanol. Com relação à cepa *H. guilliermondii*, com exceção de três compostos (2-hidróxi propanoato de etila, 1,4-butanoato de etila e etanal) todos os demais identificados na sua fermentação pura, apresentaram suas concentrações aumentadas (concentrações de 0,99 a 135,8 vezes maiores) nas fermentações mistas, conforme dados da literatura, que revelam que fermentações mistas e sequenciais favorecem a formação de compostos aromáticos em bebidas devido à ação conjunta das cepas (MOREIRA *et al*, 2008; XU *et al*, 2006; ROJAS *et al*, 2003).

Foi também perceptível que o tempo de inóculo da levedura *S. cerevisiae* sobre a levedura oxidativa influencia no perfil de compostos, pois foram determinadas diferenças significativas entre os compostos de cada ensaio, para ambas as cepas estudadas. Estes resultados estão em concordância com o trabalho de Xu *et al* (2006) que analisaram a ação de fermentações sequenciais com cepas de *H. valbyensis* e *S. cerevisiae* sobre os compostos aromáticos.

Tabela 7 - Compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*

(Continua)

Compostos voláteis	<i>H. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>			
	(pura)*	(pura)*	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Ésteres						
Etanoato de etila	146,99 ± 0,75	26,91 ± 0,14	18,56 ^c ± 1,76	78,44 ^b ± 7,44	90,95 ^b ± 8,62	132,82 ^a ± 12,60
Butanoato de etila	nd	0,50 ± 0,01	0,18 ^c ± 0,01	0,37 ^b ± 0,03	0,17 ^c ± 0,01	1,10 ^a ± 0,08
Acetato de isopentila	0,63 ± 0,03	2,88 ± 0,15	1,76 ^b ± 0,17	2,06 ^a ± 0,20	1,63 ^c ± 0,16	1,66 ^{bc} ± 0,16
Etanoato de hexila	0,18 ± 0,01	1,11 ± 0,09	0,13 ^c ± 0,01	0,25 ^b ± 0,02	0,35 ^a ± 0,03	0,26 ^b ± 0,03
2-hidróxi propan. de etila	47,99 ± 3,96	25,62 ± 2,12	3,84 ^d ± 0,15	10,46 ^b ± 0,42	7,52 ^c ± 0,30	14,55 ^a ± 0,58
Octanoato de etila	0,10 ± 0,01	2,07 ± 0,20	0,51 ^a ± 0,03	0,54 ^a ± 0,04	0,54 ^a ± 0,04	0,28 ^b ± 0,02
Decanoato de etila	0,29 ± 0,03	0,85 ± 0,08	0,09 ^b ± 0,00	0,10 ^b ± 0,00	0,17 ^a ± 0,01	0,05 ^c ± 0,00
1,4-butanoato de etila	6,24 ± 0,37	8,01 ± 0,47	1,72 ^d ± 0,02	4,51 ^a ± 0,05	2,12 ^c ± 0,02	3,45 ^b ± 0,04
Dodecanoato de etila	4,26 ± 0,36	4,65 ± 0,39	1,79 ^d ± 0,00	3,01 ^b ± 0,01	2,10 ^c ± 0,01	3,50 ^a ± 0,01
Aldeídos						
Etanal	38,04 ± 0,56	28,15 ± 0,41	9,87 ^c ± 0,86	18,80 ^b ± 1,63	12,38 ^c ± 1,07	26,91 ^a ± 2,33
Ácidos						
Ácido butanóico	4,85 ± 0,25	10,69 ± 0,55	nd	nd	2,86 ± 0,04	nd
Ácido octanóico	nd	5,01 ± 0,12	1,62 ^c ± 0,03	1,75 ^b ± 0,03	1,96 ^a ± 0,03	1,74 ^b ± 0,03
Álcoois						
Etanol	17459,91 ± 618,97	50091,61 ± 1776,65	26119,55 ^c ± 2112,89	43390,82 ^b ± 3508,15	28670,37 ^c ± 2317,51	48165,63 ^a ± 3894,52
3-metil-1-butanol	21,99 ± 0,15	116,09 ± 0,81	59,69 ^{ab} ± 5,24	64,42 ^a ± 5,65	38,56 ^c ± 3,38	58,68 ^b ± 5,15
2-hexanol	0,28 ± 0,02	10,11 ± 0,59	2,38 ^b ± 0,23	2,60 ^a ± 0,25	2,33 ^b ± 0,22	1,77 ^c ± 0,17
1-hexanol	nd	0,78 ± 0,00	0,38 ^c ± 0,01	1,39 ^a ± 0,03	0,85 ^b ± 0,02	1,40 ^a ± 0,03
2-fenil etanol	nd	39,51 ± 2,53	11,09 ^c ± 0,02	15,74 ^a ± 0,02	7,86 ^d ± 0,01	12,78 ^b ± 0,02
Cetonas						
2-octanona	0,06 ± 0,00	nd	0,02 ± 0,00	nd	nd	nd

Tabela 7 - Compostos voláteis do headspace de fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*

Compostos voláteis	<i>H. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>			
	(pura)*	(pura)*	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Não identificados						
1	5,16 ± 0,18	nd	nd	nd	4,10 ^b ± 0,33	12,67 ^a ± 1,02
2	11,41 ± 0,40	23,12 ± 0,82	13,84 ^d ± 1,12	46,83 ^b ± 3,79	38,42 ^c ± 3,11	65,38 ^a ± 5,29
3	24,12 ± 0,86	81,30 ± 2,88	57,77 ^c ± 4,67	134,70 ^a ± 10,89	88,11 ^b ± 7,12	142,90 ^a ± 11,55
4	93,64 ± 3,32	92,71 ± 3,29	nd	0,90 ^b ± 0,07	0,80 ^b ± 0,06	1,81 ^a ± 0,15
5	nd	83,34 ± 2,96	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	nd	nd	11,63 ^d ± 0,94	46,88 ^b ± 3,79	33,88 ^c ± 2,74	55,83 ^a ± 4,51
8	10,63 ± 0,38	3,86 ± 0,14	1,79 ^c ± 0,14	6,02 ^b ± 0,49	5,73 ^b ± 0,46	8,79 ^a ± 0,71
9	nd	nd	nd	1,27 ^b ± 0,10	1,60 ^a ± 0,13	
10	nd	nd	nd	1,99 ^b ± 0,16	1,37 ^c ± 0,11	2,59 ^a ± 0,21
11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	nd	3,55 ± 0,13	nd	1,29 ^a ± 0,10	1,11 ^b ± 0,09	nd
14	nd	nd	nd	1,71 ^a ± 0,14	1,11 ^c ± 0,09	1,42 ^b ± 0,11
15	20,56 ± 0,73	18,24 ± 0,65	nd	nd	2,55 ± 0,21	nd
16	nd	nd	nd	nd	nd	1,37 ± 0,11
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	nd	nd	nd	nd	nd	2,47 ± 0,20
19	nd	nd	3,30 ^b ± 0,27	4,18 ^a ± 0,34	2,35 ^c ± 0,19	3,91 ^a ± 0,32
20	nd	nd	nd	1,50 ± 0,12	nd	nd
21	nd	nd	2,82 ^a ± 0,23	nd	nd	1,49 ^b ± 0,12
22	nd	nd	nd	nd	nd	2,84 ± 0,23
23	nd	nd	7,32 ± 0,59	nd	nd	nd

(Conclusão)

Nota: Concentração dos compostos voláteis identificados em mg.L⁻¹; não identificados em mg de equivalente de etanol.L⁻¹; nd = não detectado; dados mostram a média de três replicatas ± DP; a,b,c,d = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de headspace (p <0,05); * dados de trabalho anterior.

Segundo Rodriguez *et al* (2010) as fermentações sequenciais de vinhos utilizando leveduras *S. cerevisiae* e *C. pulcherrima* (oxidativa) evidenciaram maior produção de álcoois superiores e de ésteres, do que em fermentações puras, evidenciando na análise sensorial aroma intensamente frutais e florais, e levemente com notas de solvente. Neste trabalho este aumento de produção foi percebido apenas para os álcoois superiores, que apresentaram maior concentração (somatória de 73,55; 84,16; 49,60 e 74,63 mg.L⁻¹, para os ensaios 1,2,3 e 4, respectivamente) em fermentações mistas do que em fermentações puras de *H. uvarum* (22,27 mg.L⁻¹) (Tabela 6). No entanto, para os ésteres, a concentração total, aumentou em relação ao tempo de inoculação da cepa de *S. cerevisiae*, (28,58; 99,74; 105,55 e 157,66 mg.L⁻¹, respectivamente ao tempo de 0, 1, 2 e 3 dias de inóculo) nas fermentações mistas, entretanto, a somatória dos ésteres produzidos em fermentação pura de *H. uvarum* (206,68 mg.L⁻¹), foi maior do que em todas as mistas.

A análise do resultado destes compostos nas fermentações mistas com *H. guilliermondii* (Tabela 7) evidencia maior concentração tanto de ésteres quanto de álcoois superiores nas fermentações mistas do que em fermentação pura com esta cepa, conforme as afirmações de Rodriguez *et al* (2010). Esta idéia fica reforçada quando se observa, a diminuição gradativa da concentração de álcoois superiores em relação ao tempo de inóculo de 0, 1, 2 e 3 dias com *S. cerevisiae* (153,28; 105,84; 114,09 e 95,70 mg.L⁻¹, respectivamente), evidenciando que quanto mais tempo a cepa de *H. guilliermondii* permaneceu agindo sozinha na fermentação, menor foi a concentração destes compostos. Entretanto, para os ésteres, apesar de estarem em concentrações maiores nas fermentações mistas (56,36; 62,98; 73,87 e 81,65 mg.L⁻¹, respectivamente) do que na pura (62,50 mg.L⁻¹), observou-se o oposto, ou seja, um aumento gradativo do teor destes compostos em relação ao tempo de inóculo, sugerindo serem as cepas oxidativas as maiores contribuintes na produção de ésteres em fermentações mistas.

Os resultados evidenciaram também que alguns ésteres que não foram produzidos em culturas puras de *H. guilliermondii* (acetato de isopentila e etanoato de hexila) e de *H. uvarum* (butanoato de etila), passaram a estar presentes nas fermentações mistas destas cepas com *S. cerevisiae*, configurando mais um ponto positivo das fermentações mistas, já que estes compostos contribuem positivamente com a qualidade aromática. O butanoato de etila confere um aroma de fruta, remanescente de abacaxi; o acetato de isopentila resulta em aroma doce, de banana e frutal (PINHEIRO; PASTORE, 2003; GARRUTI *et al*, 2001).

Andorrá *et al* (2010) comentam que espécies de *Hanseniaspora* são consideradas grandes produtores de ésteres, cuja maioria contribui para o aroma floral e frutado de vinhos. No entanto, os autores advertem que o principal éster, o acetato de etila (etanoato de etila), em altas concentrações, acima de 200 mg.mL⁻¹, segundo Zohre e Erten (2002), produz aroma desagradável de cola e solvente. Este composto esteve presente em todas as fermentações puras e mistas realizadas com *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, embora tenha sido um dos ésteres mais abundantes em todos os ensaios, não atingiu valores que pudessem contribuir negativamente para o aroma dos fermentados, conforme citam os autores.

Tabela 8 - Compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*

(Continua)

Compostos voláteis	<i>H. guilliermondii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i>			
	(pura)*	(pura)*	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Ésteres						
Etanoato de etila	9,90 ± 0,60	26,91 ± 0,14	32,15 ^d ± 2,92	43,24 ^c ± 3,92	48,17 ^b ± 4,37	54,94 ^a ± 4,99
Butanoato de etila	0,05 ± 0,00	0,50 ± 0,01	0,25 ^b ± 0,01	0,26 ^b ± 0,01	0,31 ^a ± 0,01	0,32 ^a ± 0,01
Acetato de isopentila	nd	2,88 ± 0,15	3,87 ^a ± 0,29	3,08 ^b ± 0,23	3,12 ^b ± 0,23	2,44 ^c ± 0,18
Etanoato de hexila	nd	1,11 ± 0,09	0,43 ^c ± 0,00	0,56 ^b ± 0,00	0,61 ^a ± 0,00	0,61 ^a ± 0,00
2-hidróxi propan. de etila	45,17 ± 3,73	25,62 ± 2,12	8,91 ^c ± 0,03	8,41 ^d ± 0,03	13,12 ^b ± 0,05	15,30 ^a ± 0,05
Octanoato de etila	0,02 ± 0,00	2,07 ± 0,20	2,30 ^a ± 0,18	1,12 ^{bc} ± 0,09	1,30 ^b ± 0,10	0,96 ^c ± 0,08
Decanoato de etila	0,09 ± 0,00	0,85 ± 0,08	0,69 ^a ± 0,05	0,27 ^{bc} ± 0,02	0,34 ^b ± 0,03	0,21 ^c ± 0,02
1,4-butanoato de etila	4,33 ± 0,21	8,01 ± 0,47	4,12 ^a ± 0,01	3,14 ^c ± 0,01	3,33 ^b ± 0,01	2,20 ^d ± 0,00
Dodecanoato de etila	2,94 ± 0,22	4,65 ± 0,39	3,65 ^b ± 0,08	2,90 ^c ± 0,06	3,59 ^b ± 0,08	4,66 ^a ± 0,10
Aldeídos						
Etanal	21,47 ± 0,56	28,15 ± 0,41	11,23 ^d ± 0,79	12,48 ^c ± 0,87	14,38 ^b ± 1,01	17,76 ^a ± 1,24
Ácidos						
Ácido butanóico	3,30 ± 0,27	10,69 ± 0,55	11,03 ± 0,45	nd	nd	nd
Ácido octanóico	nd	5,01 ± 0,12	3,75 ^a ± 0,11	3,20 ^b ± 0,09	2,47 ^d ± 0,07	2,67 ^c ± 0,08
Álcoois						
Etanol	8876,94 ± 462,49	50091,61 ± 1776,65	47973,45 ^a ± 4742,87	41104,44 ^b ± 4063,55	46781,90 ^a ± 4624,53	47062,17 ^a ± 4654,02
3-metil-1-butanol	12,41 ± 0,37	116,09 ± 0,81	112,36 ^a ± 10,33	76,15 ^{bc} ± 7,00	83,48 ^b ± 7,68	70,35 ^c ± 6,47
2-hexanol	0,13 ± 0,01	10,11 ± 0,59	8,04 ^b ± 0,46	9,05 ^a ± 0,52	6,03 ^c ± 0,35	5,25 ^d ± 0,30
1-hexanol	nd	0,78 ± 0,00	1,88 ^a ± 0,06	1,10 ^c ± 0,04	1,56 ^b ± 0,05	1,58 ^b ± 0,05
2-fenil etanol	nd	39,51 ± 2,53	31,01 ^a ± 0,51	19,53 ^c ± 0,32	23,03 ^b ± 0,38	18,52 ^d ± 0,31
Cetonas						
2-heptanona	0,04 ± 0,00	nd	1,38 ^b ± 0,04	5,43 ^a ± 0,16	0,31 ^c ± 0,01	0,44 ^c ± 0,01

Tabela 8 - Compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*

(Conclusão)

Compostos voláteis	<i>H. guilliermondii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i>			
	(pura)*	(pura)*	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Não identificados						
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	nd	23,12 ± 0,82	23,50 ^d ± 2,32	29,67 ^c ± 2,93	36,72 ^b ± 3,63	45,26 ^a ± 4,48
3	22,21 ± 1,16	81,30 ± 2,88	117,69 ^b ± 11,64	153,18 ^a ± 15,14	158,34 ^a ± 15,65	156,13 ^a ± 15,44
4	81,42 ± 4,24	92,71 ± 3,29	2,12 ^b ± 0,21	4,55 ^a ± 0,45	1,31 ^c ± 0,13	1,53 ^{bc} ± 0,15
5	nd	83,34 ± 2,96	nd	2,62 ± 0,26	nd	nd
6	nd	nd	nd	19,53 ^a ± 1,93	1,42 ^b ± 0,14	0,95 ^b ± 0,09
7	nd	nd	82,44 ^c ± 8,15	108,92 ^a ± 10,77	86,33 ^c ± 8,53	92,04 ^b ± 9,10
8	11,01 ± 0,57	3,86 ± 0,14	3,78 ^d ± 0,37	5,77 ^c ± 0,57	7,47 ^b ± 0,74	9,60 ^a ± 0,95
9	nd	nd	4,35 ^a ± 0,43	3,78 ^b ± 0,37	2,73 ^c ± 0,27	2,40 ^c ± 0,24
10	nd	nd	2,34 ^b ± 0,23	2,67 ^a ± 0,26	2,20 ^c ± 0,22	2,04 ^d ± 0,20
11	nd	nd	1,76 ^a ± 0,17	1,71 ^a ± 0,17	1,58 ^b ± 0,16	1,23 ^c ± 0,12
12	nd	nd	nd	1,01 ^a ± 0,10	0,81 ^b ± 0,08	nd
13	0,83 ± 0,04	3,55 ± 0,13	nd	nd	nd	1,31 ± 0,13
14	nd	nd	1,95 ^a ± 0,19	1,73 ^b ± 0,17	1,63 ^c ± 0,16	1,51 ^d ± 0,15
15	5,53 ± 0,29	18,24 ± 0,65	8,99 ^a ± 0,89	4,69 ^c ± 0,46	6,33 ^b ± 0,63	5,01 ^c ± 0,50
16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17	nd	nd	3,12 ± 0,31	nd	nd	nd
18	5,53 ± 0,29	nd	2,00 ^a ± 0,20	nd	nd	2,24 ^a ± 0,22
19	nd	nd	3,05 ^b ± 0,30	2,10 ^d ± 0,21	2,57 ^c ± 0,25	3,54 ^a ± 0,35
20	nd	nd	2,06 ± 0,20	nd	nd	nd
21	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22	nd	nd	3,34 ± 0,33	nd	nd	nd
23	nd	nd	3,63 ± 0,36	nd	nd	nd

Nota: Concentração dos compostos voláteis identificados em mg.L⁻¹; não identificados em mg de equivalente de etanol.L⁻¹; nd = não detectado; dados mostram a média de três replicatas ± DP; a,b,c,d = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de *headspace* (p <0,05); * dados de trabalho anterior.

De acordo com Garden-Cerdán e Ancín-Azpilicueta (2006) as cepas selvagens ou não-*Saccharomyces* pouco contribuem para a formação de álcool isoamílico (composto que contribui para o aroma frutal). Este resultado foi também encontrado neste trabalho, onde o 3-metil-1-butanol apresentou concentrações maiores nas fermentações mistas do que nas fermentações puras tanto de *H. uvarum* quanto de *H. guilliermondii*.

Com relação ao 2-fenil etanol, Moreira *et al* (2008) comentam que vinhos produzidos por *S. cerevisiae*, em culturas puras ou mistas, tem apresentado concentrações de 2-feniletanol entre 43,1 e 58,1 mg.L⁻¹, e que um menor teor deste composto foi observado em vinhos produzidos por culturas puras de leveduras apiculadas (32,5-34,5 mg.L⁻¹). Rojas *et al* (2003), também verificaram em vinhos produzidos apenas por *H. guilliermondii* uma concentração menor (14,7 mg.L⁻¹) que a concentração obtida em culturas mistas de *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* (29,2 mg.L⁻¹). Neste trabalho, observou-se a presença deste composto nas fermentações mistas tanto de *H. uvarum* (7,86 - 15,74 mg.L⁻¹) quanto de *H. guilliermondii* (18,52 - 31,01 mg.L⁻¹), entretanto, não foi detectado 2-fenil etanol, nas fermentações puras destas cepas. O 2-fenil-etanol, bem como o acetato, desempenham um papel positivo no aroma do vinho, trazendo aromas frutados e florais (RAPP; MANDERY, 1986).

A variação da concentração de etanol nos fermentados obtidos de culturas puras e mistas para as duas cepas investigadas, revelou muita similaridade. Assim, a concentração deste composto foi maior em fermentações puras e nas fermentações mistas foi aumentando gradativamente em função dos tempos de inóculo da cepa de *S. cerevisiae*. Apenas o fermentado misto de *H. uvarum* de 2 dias fugiu do padrão observado. Vale ressaltar que este composto, em pequenas concentrações contribui com notas frutais, entretanto em altas concentrações (>200 mg.L⁻¹) influencia negativamente o aroma do vinho (GIL *et al*, 2006). Os mesmos autores ainda comentam que sua produção pode ser influenciada pela cepa de levedura, fato também verificado nos resultados. Assim, a cepa *H. uvarum*, produziu uma maior concentração de etanol (de 9,87 a 38,04 mg.L⁻¹) do que *H. guilliermondii* (de 11,23 a 21,47 mg.L⁻¹), tanto em fermentações puras quanto mistas. Salienta-se ainda que as quantidades produzidas contribuem com notas frutais para o fermentado de maçã.

Neste estudo encontramos um teor etanol de 17.459,91 mg.L⁻¹ para *H. uvarum* (2,2% v/v) em fermentação pura e uma variação de 26.119,55 a 48.165,63 mg.L⁻¹ em fermentações mistas. Para *H. guilliermondii* o valor encontrado em fermentação pura foi de 8.876,94 mg.L⁻¹ (1,1% v/v), enquanto nas fermentações mistas o teor de etanol variou de 41.104,44 a 47.973,45 mg.L⁻¹. Estes resultados estão de acordo com Moreira *et al* (2008), Ciani; Beco e

Comitini (2006) e Xu *et al* (2006) que encontraram em fermentações mistas sempre valores maiores do que em fermentações puras.

Nas fermentações mistas de *H. uvarum* o maior valor de etanol foi encontrado no *headspace* do ensaio em que se inoculou a cepa de *S. cerevisiae* após 3 dias de fermentação, no entanto, por ebuliômetro, este ensaio foi o que apresentou menor teor deste composto. No entanto, nas fermentações mistas de *H. guilliermondii* verificou-se o maior valor no ensaio em que as cepas foram inoculadas juntas (0 dias) tanto no *headspace* quanto por ebuliômetro.

A inclusão de leveduras oxidativas nas fermentações de bebidas tem sido proposta para a melhoria na complexidade aromática destes produtos (CIANI; BECO; COMITINI, 2006). Segundo Xu *et al* (2006) a fermentação mista com tempos de inoculação corretamente ajustados resulta em melhores características para o produto final.

Avaliando, neste trabalho, o tempo ideal de inoculação da cepa *Saccharomyces* sobre a cepa *Hanseniaspora uvarum* segundo o parâmetro sensorial (Tabela 9), foi observado que o tempo de 1 dia teve a maior somatória de notas, sendo o menos preferido dos julgadores. O tempo de 2 dias com a menor somatória de notas foi considerado o mais aromático, entretanto, não houve diferença significativa entre as amostras em termos estatísticos.

Tabela 9 - Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*

Fermentados de maçã	Inóculo de <i>S. cerevisiae</i> (dias)	Σ das ordens
A	0	132 ^a
B	1	142 ^a
C	2	128 ^a
D	3	133 ^a

Nota: a = não há diferença significativa entre as amostras com mesma letra (ANOVA, $p < 0,05$).

Na avaliação sensorial do fermentado produzido por *H. uvarum* + *S. cerevisiae* verificou-se que a porcentagem de homens e mulheres que participaram foi de 27,78 % e 72,22 %, respectivamente. Das pessoas que participaram da avaliação de aceitabilidade do fermentado de maçã sobre a ação destas leveduras, 50,00 % pertenciam à faixa etária menor que 25 anos. Do total de participantes, 72,22 % informaram idade inferior a 35 anos, caracterizando a predominância de público jovem, e 40,00 % afirmaram que raramente consomem vinhos.

Observa-se que não existe diferença significativa na preferência entre as amostras, mas devido ao fato da amostra produzida sob a ação de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* 3º dia ter

sido preferida um maior número de vezes, realizamos o teste de aceitabilidade com este produto. A média de aceitabilidade para a amostra foi de 4,98 (50 julgamentos), correspondendo a um percentual de 71,14%. Considerando como resultados positivos para o teste de aceitabilidade os níveis hedônicos gostei, gostei muito e gostei muitíssimo, a somatória de respostas nestas classificações foi de 62%, não atendendo assim o perfil dos julgadores (Figura 6).

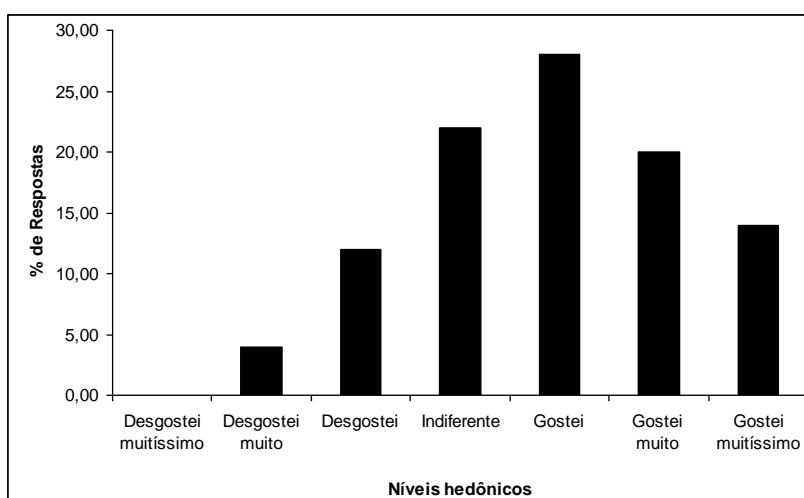


Figura 6 - Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação sequencial de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* 3º dia

Os resultados das análises cromatográficas deste fermentado revelaram ser esta a amostra que apresentou a maior somatória de ésteres ($157,66 \text{ mg.L}^{-1}$) e a segunda maior somatória de álcoois ($74,63 \text{ mg.L}^{-1}$), dentre os fermentados elaborados com *H. uvarum* e *S. cerevisiae*. Vale ressaltar que a quantidade dos ésteres foi duas vezes maior que a dos álcoois superiores, para a amostra considerada a mais preferida. O não atendimento ao perfil dos julgadores pode estar relacionado à baixa somatória de álcoois nesta amostra, sugerindo serem estes compostos os mais impactantes na análise olfativa de fermentados de maçã.

Entretanto, Andorrá *et al* (2010) tendo verificado o efeito de culturas puras e mistas em vinhos, comentam que espécies do gênero *Hanseniaspora* foram consideradas grandes produtoras de ésteres, a maioria deles contribuindo para o aroma frutado e floral de vinhos. No entanto, o principal éster, o etanoato de etila, em altas concentrações produz um aroma desagradável de cola, solvente, etc.

Salienta-se que este composto contribuiu com $132,82 \text{ mg.L}^{-1}$ do total de $157,66 \text{ mg.L}^{-1}$ de ésteres da amostra em discussão no presente trabalho. Ciani; Beco e Comitini

(2006) tendo avaliado culturas mistas verificaram em ensaios sequenciais com *H. uvarum*, um aumento exagerado de etanoato de etila, que excedeu o limiar de percepção (150 mg.L⁻¹) (JACKSON, 1994).

Avaliando tempo ideal de inoculação da cepa *Saccharomyces* sobre a cepa *H. guilliermondii*, sob o parâmetro sensorial (Tabela 10) percebemos que o tempo de 3 dias obteve maior somatória sendo o menos preferido pelos julgadores. Já o tempo de inoculação de 1 dia foi considerado ter o melhor aroma, mas segundo as análises estatísticas não houve diferença significativa entre as amostras.

Tabela 10 - Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*

Fermentados de maçã	<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> (dias)	Σ das ordens
A	0	131 ^a
B	1	124 ^a
C	2	126 ^a
D	3	139 ^a

Nota: a = não há diferença significativa entre as amostras com mesma letra (ANOVA, p < 0,05).

Entre os resultados da análise sensorial das cepas *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* a porcentagem de homens e mulheres que participaram da avaliação sensorial foi de 21,15 % e 78,85 %, respectivamente. Das pessoas que participaram da avaliação de aceitabilidade do fermentado de maçã, 56,25 % pertenciam à faixa etária menor que 25 anos. Do total de participantes, 83,33 % informaram idade inferior a 35 anos, caracterizando a predominância de público jovem, dos quais 44,68 % afirmaram que raramente consomem vinhos.

Observa-se que não existe diferença significativa na preferência entre as amostras, mas devido ao fato da amostra produzida sob a ação de *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* Od ter sido preferido um maior número de vezes, realizamos o teste de aceitabilidade com este produto. A média de aceitabilidade para a amostra foi de 4,90 (50 julgamentos), correspondendo a um percentual de 70,00%. A somatória das respostas nos níveis gostei, gostei muito e gostei muitíssimo alcançou o valor de 70%, e pode-se assim declarar que esta amostra é adequada ao perfil dos julgadores.

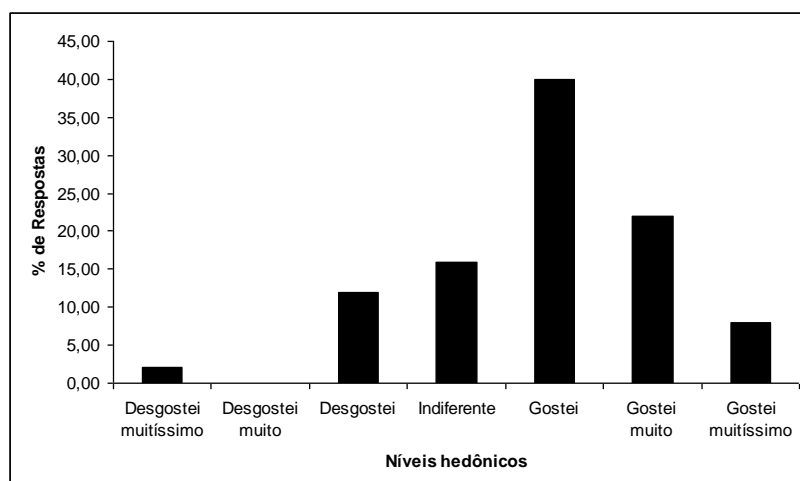


Figura 7 - Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação sequencial de *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 0d

Para confirmar o pressuposto anteriormente, foi realizada uma análise de preferência pareada entre as duas amostras preferidas nos ensaios anteriores. E, analisando a comparação entre as duas amostras (Tabela 11) foi possível observar que a fermentação sequencial com *H. guilliermondii* foi considerada a mais aromática pelos julgadores, pois obteve maior preferência na somatória de pontos.

Tabela 11 - Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados pela ação de fermentações sequenciais com diferentes cepas oxidativas e tempos de inóculo de *S. cerevisiae*

Fermentados de maçã	Σ das ordens
<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 3d	18 ^a
<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 0d	32 ^b

Nota: ^{a,b} = há diferença significativa entre as amostras com letras diferentes (ANOVA, $p < 0,05$).

Ao verificar os dados das análises cromatográficas do fermentado mais preferido, constatou-se ser esta a amostra que apresentou a menor somatória de ésteres ($56,36 \text{ mg.L}^{-1}$) e a maior somatória de álcoois ($153,28 \text{ mg.L}^{-1}$), dentre os fermentados elaborados com *H. guilliermondii* e *S. cerevisiae*. Vale ressaltar que a quantidade dos ésteres foi quase três vezes menor que a dos álcoois superiores, para esta amostra. Considerando esta amostra adequada ao perfil dos julgadores, por apresentar uma maior concentração de álcoois, confirma-se o resultado sugerido na comparação da aceitabilidade dos fermentados elaborados com *H. uvarum* + *S. cerevisiae*, ao afirmar serem os álcoois superiores os compostos que mais contribuem positivamente na análise olfativa do fermentado de maçã.

Os resultados encontrados neste trabalho não estão de acordo com Ciani ; Beco e Comitini (2006), Rojas *et al* (2003) e Bilbao *et al* (1997) que destacam que os ésteres formados em fermentações são os maiores impactantes no aroma dos produtos. No entanto, de acordo com Cortes e Blanco (2011) que verificaram que os álcoois superiores quantitativamente, foram os compostos voláteis mais importantes, enquanto que os ésteres etílicos, acetatos e ácidos graxos, foram qualitativamente mais importantes sobre o aroma e propriedades sensoriais de vinho.

4 CONCLUSÕES

As fermentações sequenciais realizadas sob ação das cepas *H. uvarum* + *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* apresentaram uma boa interação entre leveduras fermentativas e oxidativas, com populações em níveis semelhantes. As cepas de *Hanseniaspora* sp. não foram suplantadas pelas leveduras convencionais até o 10º dia de fermentação, evidenciando resistência a teores de etanol de até 6,7º GL.

A análise cromatográfica dos compostos voláteis captados por *headspace*, permitiu identificar a presença de ésteres, aldeídos, ácidos, álcoois e cetonas tanto em fermentações mistas de *H. uvarum* com *S. cerevisiae*, quanto de *H. guilliermondii* com *S. cerevisiae*. Foi também perceptível que o tempo de inóculo da levedura *S. cerevisiae* sobre a levedura oxidativa influencia no perfil de compostos obtidos, pois foram determinadas diferenças significativas entre os compostos de cada ensaio, para ambas as cepas estudadas.

A fermentação mista realizada sob ação de *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* apresentou compostos voláteis com boa aceitação na análise sensorial olfativa, revelando que uma maior somatória de álcoois superiores (153,28 mg.L⁻¹) do que de ésteres (56,36 mg.L⁻¹) foi mais agradável na análise sensorial olfativa dos julgadores.

REFERÊNCIAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR 13.170**: teste de ordenação em análise sensorial. São Paulo: ABNT, 1994.

ANDORRÁ, I; BERRADRE, M.; ROZES, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M.; ESTEVEZARZOSO, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. **European Food Research and Technology**, v.231, p.215-224, 2010.

BARON, A.; BOHUON, G.; DRILLEAU, J. F. Remarques sur l'indice formol des concentrés de jus de pomme. **Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique**, v.70, n.749, p.19-26, 1977.

BEDRIÑANA R.P.; SIMÓN A. Q.; SUÁREZ VALLES, B. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. **Food Microbiology**, v.27, p.503-508, 2010.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J.-M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal of Enology and Viticulture**, n.41, p.319-324, 1990.

BELY, M.; STOECKLE, P.; MASNEUF-POMARÈDE, I.; DUBOURDIEU, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, p.312-320, 2008.

BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter of Applied Microbiology**, v.24, p.37-39, 1997.

BOYLSTON, T. D.; WANG, H.; REITMEIER, C. A.; GLATZ, B. A. Effects of processing treatment and sorbate addition on the flavor characteristics of apple cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.7, p.1924-1931, 2003.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.239-245, 2006.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n.4, p.925-932, 2011.

CSOMA, H.; SIPICZKI, M. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.328-336, 2008.

DOMIZIO, P.; LENCIONI, L.; CIANI, M.; DI BLASI, S.; PONTREMOLESI, C.; SABATELLI, M.P. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of vinsanto wine under different process conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.281-289, 2007.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial**. 1. ed. Campinas (SP): ITAL/Lafise, 2002. p.116.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research Technology**, v.222, p.15-25, 2006.

GARRUTI, D.; FRANCO, M.R.B.; SILVA, M.A.P.; JANZANTTI, N.S.; ALVES, G.L. Compostos voláteis do sabor de pseudofrutos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) CCP-76. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 4. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analytical Chemical Acta**, v.563, p.145-153, 2006.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: _____. **Normas analíticas**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008.

JACKSON, R. **Wine Science. Principles and Applications**. Academic Press, San Diego, USA, 1994. p. 178–219.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.523-528, 2003.

LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J.F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H. **Fermented beverage production**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 2003.

LE QUÉRE, J. M.; DRILLEAU, J. F. Fermentation of french cider, the process and yeast species. **Fermentation: food, drink and waste management, the future**. Britt’Atlantic Conference, England. 1993.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**. Portugal, v.124, p.231-238, 2008.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C. N.; SIMÕES, D. R.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v.51, n.5, 2007.

- NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n. 2, p.274-280, 2003.
- NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola. Efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 210 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais). Setor de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.
- NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2010, v.1, p.113-142.
- PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Aptidão industrial de seis cultivares de maçã (dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.6, p.1336-1343, 2004.
- PÉREZ-NEVADO, F.; ALBERGARIA, H.; HOGG, T.; GIRIO, F. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.336-345, 2006.
- PINHEIRO, D. M.; PASTORE, G. M. Produção biotecnológica de compostos de aromas. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela. 2003. p.195-206.
- RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v.42, p.873-884, 1986.
- RODRIGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BARBAGELATA, R. J.; BARDA, N. B.; CABALLERO, A. C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.19-25, 2010.
- ROGER, J. M.; SABLAYROLLES, J. M.; STEYER, J. P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.79, n.7, p.804-815, 2002.
- ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.181-188, 2003.
- ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.169-180, 2003.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, v.2, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R. GOMES, R. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**, 4. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SIMÕES, D. R. S.. **Abordagem tecnológica e sensorial nos produtos de maçã**: suco, fermentado e sidra. 174 f.. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

SOUZA, F.K.F.; LUZ, R.O.; SANTOS, C.M.E.; PIETROWSKI, G.A.M.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Development of fermentator in series for the study of kinetic apple fermented. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, p.379-386, 2011.

SUÁREZ VALLES, B.; BEDRIÑANA, R.P.; FERNÁNDEZ TASCÓN, N.; QUEROL SIMÓN, A.; RODRÍGUEZ MADRERA, R. Yeast species associated with the Spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiology**, v.24, p.25-31, 2007.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v.25, p.778- 785, 2008.

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.32, n.4, p.775-786, 1989.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v.37, n.1, p.9-22, 2008.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, China, v.33, p.192-196, 2006.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, 319-324, 2002.

CAPÍTULO VII - AVALIAÇÃO DA CONSERVAÇÃO POR LIOFILIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO NA VIABILIDADE DA LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum*

RESUMO

A preservação de leveduras é um importante recurso utilizado para manutenção e conservação de espécies em laboratórios e centros de pesquisa. Apesar de existirem estudos sobre diversos processos de preservação a longo prazo que garantem a estabilidade das culturas, não existe um método que seja aplicável a todo tipo de microrganismo respeitando todas as suas particularidades fisiológicas e metabólicas. A utilização de leveduras do gênero *Hanseniaspora*, reconhecidas como produtoras de compostos voláteis frutados, tem sido recomendada na literatura para melhorar a qualidade de bebidas fermentadas. O presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade de cepas de *Hanseniaspora uvarum* preservadas por dois métodos: liofilização e a -80°C . Deste modo foram aplicadas as metodologias de preservação a longo prazo em um isolado de *H. uvarum*, identificada em trabalho anterior. Esta cepa foi inicialmente avaliada em relação a sua morfologia macro e microscopicamente e na capacidade de fermentar o mosto de maçã, e após ser submetida à liofilização e a criopreservação, avaliou-se a viabilidade da mesma, em relação às mesmas características, no período de doze meses de armazenamento. A cepa revelou características coloniais estáveis, assim como seu aspecto microscópico permaneceu inalterado em todas as recuperações. Os resultados das contagens em placas mostraram uma constância em ambos os processos, com exceção de uma recuperação do liofilizado que não houve crescimento. No tocante a sua capacidade fermentativa, os resultados da cinética revelaram viabilidade de 80% das cepas submetidas a liofilização e 100% de viabilidade para as cepas preservadas a -80°C . Estes resultados demonstram que os métodos de conservação utilizados são compatíveis com a manutenção das características consideradas neste estudo. Vale ressaltar que o tempo de avaliação das cepas aqui estudadas foi curto, quando comparado a outros estudos publicados, entretanto em 12 meses foi possível confirmar informações encontradas na literatura.

Palavras-chaves: Criopreservação. Liofilização. *Hanseniaspora uvarum*.

ABSTRACT

The yeast preservation is an important resource used by maintaining and conserving the species in the laboratories and research centers. However, there are studies on several preservation processes that ensure long term stability of the strains, there is not a method that is applicable to all type of microorganism respecting the physiological and metabolic particularities. The use of *Hanseniaspora* yeast genera, recognized to produce fruity volatile compounds, has been recommended in the literature to improve the quality of fermented beverages. The present paper had as purpose to verify the feasibility of the *Hanseniaspora uvarum* strains preserved by two methods: freeze drying and frozen at -80°C . Thus we applied the methods of long-term preservation in a strain of *H. uvarum*, identified in previous work. This strain was initially evaluated in relation to its macro and microscopically morphology and in the ability of fermented the apple must, and, after been

submitted to freeze drying and the cryopreservation, it was evaluated its feasibility, in relation to the same characteristics, in the period of twelve months of storage. The strain revealed stable colonial characteristics, as its microscopic aspect remained unchanged in all the tests. The counts on the plate's results showed constancy in both processes, except for a recovery of freeze drying that there was no growing. In relation to their fermentative capacity, the kinetics results revealed that the feasibility of 80% of the strains submitted to freeze drying and 100% of feasibility for the strains preserved at -80°C. These results show that the conservation methods used are compatible with the characteristics maintenance considered in this study. It is important to note that the time of evaluation of the strains where studied was short, when comparing to other studies published. However, in twelve months it was possible to confirm informations found in the literature.

Keywords: Cryopreservation. Freeze drying. *Hanseniaspora uvarum*.

1 INTRODUÇÃO

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o ambiente (SILVA *et al*, 2008; GUIMARÃES, 2005).

As leveduras oxidativas ou não-*Saccharomyces* são conhecidas pela sua contribuição aos compostos voláteis aromáticos, principalmente ésteres, a maioria deles contribuintes para aromas frutais e florais em bebidas fermentadas. Diversos trabalhos têm sido realizados em vinho e sidra, utilizando cepas não-*Saccharomyces*, do gênero *Hanseniaspora*, obtendo resultados que evidenciam uma melhora na qualidade aromática do produto (VIANA *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2008, 2005; XU *et al*, 2006; XUFRE *et al*, 2006). Desta maneira torna-se interessante e necessária a conservação de cepas deste gênero para realização de estudos e pesquisas.

Para Girão *et al* (2004) a preservação adequada de culturas de leveduras é essencial para futuras investigações, sendo necessário manter as mesmas propriedades morfológicas e fisiológicas das cepas, independente do método de armazenamento escolhido. Mariano (2006) corrobora comentando que manter as propriedades morfológicas e fisiológicas das culturas, são atualmente as principais preocupações dos pesquisadores, ao empregar o armazenamento de cepas para quaisquer finalidades, seja para coleções de culturas, pesquisas, estudos taxonômicos, uso industrial ou comercial.

Segundo Baker e Jefries (2006) e Lastra *et al* (2001) a manutenção de cepas pelos processos de liofilização, criopreservação ou em água esterilizada, consistem nas formas mais adequadas de preservação, pois propiciam a redução do metabolismo celular a um nível basal, conservando as características fenotípicas e genotípicas dos microrganismos, além de contribuir para a diminuição dos riscos de contaminação. Cavalcanti (2010), tendo testado os métodos de liofilização e congelamento a -80°C em três gêneros de leveduras, constatou 100% de viabilidade dos isolados mantidos por 6 meses ou mais nestas condições.

O preparo de culturas para o congelamento é simples e fácil. Em geral a espécie a ser congelada, tanto em nitrogênio líquido quanto em ultra-freezer, deve ser submetida a crescimento em 3 mL de meio líquido por 24 horas, em seguida o frasco sofre agitação e acréscimo de 1 mL de solução de glicerol a 60%. Esta cultura é colocada em frascos apropriados ao congelamento, esterilizados e identificados, que serão totalmente selados. As culturas são então congeladas a aproximadamente -30°C por 30 a 60 minutos e a seguir podem ser colocadas em ultra-freezer a -80°C , ou em tanques de nitrogênio líquido (KURTZMAN *et al*, 2003; YARROW, 1998).

O processo de criopreservação, embora bastante utilizado para conservação de coleções de culturas, não é indicado para a comercialização de cepas de leveduras ou outros microrganismos (SUÁREZ LEPE, 1997). Robert *et al* (2006) endossam que embora para a distribuição a liofilização apresente vantagens sobre o congelamento, o método que tem sido escolhido para a preservação de leveduras é o congelamento em temperaturas ultrabaixas, por garantir estabilidade e confiabilidade.

A liofilização consiste em um processo de secagem do material por meio da sublimação da parte congelada a baixas temperaturas e sob vácuo, é, portanto, um processo de transferência de calor e de massa simultâneo, no qual o calor é fornecido para o produto congelado e o vapor d'água é removido continuamente (PITOMBO, 2005). Visa a secagem de organismos, de tal forma que a atividade metabólica seja fortemente reduzida (ROBERT *et al*, 2006).

Para o processo de liofilização a etapa inicial de congelamento deve ser realizada para que um mínimo de cristais de gelo seja formado. Na segunda etapa, a secagem primária, a água livre é retirada do produto e na terceira etapa, chamada de secagem secundária, a temperatura da água ligada é aumentada fortemente para que deixe o produto. O teor de umidade residual é expresso como uma porcentagem do peso seco absoluto. Para fungos a tolerância do teor de umidade residual é entre 1 e 2,5%. Secagem mais severa resultará em

danos irreversíveis às células, devido à desnaturação de proteínas e lipídios, enquanto que maiores teores de umidade poderá reduzir a vida útil do material (MELIN *et al*, 2011; ROBERT *et al*, 2006).

Entretanto, não existe um método universal que seja eficiente para todos os gêneros e espécies de fungos devido a diferenças existentes em suas características metabólicas e fisiológicas (PAOLI, 2005; DESHMUHK, 2003; FIGUEIREDO, 2001 *apud* CAVALCANTI, 2010; SILVA *et al*, 2008).

O comportamento de cada microrganismo perante diferentes processos de conservação evidencia respostas diversas. Assim, o propósito do presente estudo foi verificar a viabilidade de *Hanseniaspora uvarum* perante dois métodos de conservação, por liofilização e a -80°C.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

A cepa de *Hanseniaspora uvarum* utilizada foi identificada no capítulo III deste trabalho, fazendo parte do acervo de cepas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa. Os meios de cultura e reativos utilizados nas análises foram de pureza comprovada.

Para verificar as características de fermentação da cepa armazenada sob diferentes condições foi utilizado mosto de maçã da cultivar Gala (10 Kg), produzido com maçãs obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Conservação de *H. uvarum* por Liofilização

Para aumentar a biomassa a ser liofilizada, uma colônia fresca da cepa de *H. uvarum* isolada em YMA (*yeast malt agar*) foi inoculada em 5mL de caldo GPYB (*glucose peptone yeast extract broth*) esterilizado, que foi incubado à temperatura de 25°C, em estufa com agitação por 24 horas. Esta cultura foi transferida para um erlenmeyer contendo 100mL do

mesmo meio de cultura e incubado novamente nas mesmas condições, por 48 horas, atingindo a população de aproximadamente 10^{12} ufc.mL⁻¹ (SCHMIDELL *et al*, 2001).

A cultura obtida foi centrifugada (CELM - Modelo: Combate) a 3.000 rpm por 15 minutos e seguida de duas lavagens com água destilada esterilizada. Os pelets limpos foram colocados em um recipiente estéril e depois de homogeneizado o conteúdo foi distribuído em frascos tipo de penicilina, com rolha de borracha, previamente esterilizados. Os frascos foram congelados a -20°C por 24 horas e a seguir encaminhados ao liofilizador (Marca Terroni - Modelo LD 1500), onde foram vedados ainda a vácuo pelo próprio equipamento quando o processo de liofilização havia encerrado. A seguir foram acrescentados lacres de metal nos frascos para garantir a perfeita vedação. Os frascos liofilizados foram mantidos em armários fechados até a data de cada recuperação, em temperatura ambiente.

2.2.2 Conservação de *H. uvarum* a -80°C

Uma colônia fresca da cepa de *H. uvarum* foi inoculada em caldo GYMP (glucose peptone yeast and malt extract broth), esterilizado em tubos de vidro com tampão de algodão, que foram incubados a 25°C por 24h-48h, ou seja, até o crescimento da levedura no caldo, observado pela sua turvação.

Transferiu-se 1 mL desta cultura obtida para criotubos estéreis devidamente identificados e a seguir acrescentou-se 4 gotas de glicerol, previamente esterilizado por 2h no forno de Pasteur e devidamente resfriado, como crioprotetor. Depois de homogeneizar vigorosamente, os tubos foram colocados no freezer -20°C por 2 horas e a seguir foram transferidos para o freezer a -80°C (Marca Nuair - Modelo NU9668GC - Série 8050105), onde permaneceram armazenados até a data de cada recuperação (KURTZMAN *et al*, 2003).

2.2.3 Recuperação de *H. uvarum* Preservada por Liofilização e a -80°C

A recuperação de *H. uvarum* conservada tanto por liofilização quanto a -80°C, ocorreu logo após terem sido submetidas aos referidos processos, considerado tempo 0 de preservação, e também decorridos 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento.

Do liofilizado foi pesado assepticamente 7 mg do conteúdo dos frascos, colocados em tubos de ensaio com 9mL de água peptonada a 0,1% e 1 mL glicose, para reidratação. O

tubo foi agitado com auxílio do vortex (Vision Scientific - Modelo KMC1300v) e deixado em repouso por 20 minutos.

Para as amostras conservadas a -80°C coletou-se assepticamente 0,5 mL do criotubo, depois de descongelado e recuperou-se em tubos de ensaio com 8,5 mL de água peptonada a 0,1% e 1 mL glicose. O conteúdo obtido foi agitado com auxílio do vortex (Vision Scientific - Modelo KMC1300v) e deixado em repouso por 20 minutos.

A suspensão obtida nas duas formas de recuperação foi utilizada como inóculo para a verificação da capacidade fermentativa das cepas conservadas, para contagem em placas e também para a verificação das características morfológicas.

2.2.4 Avaliação da Viabilidade das Cepas

Contagem de leveduras em placas. Para realizar a contagem em placas de *H. uvarum* preservada por ambos os processos foi retirada uma alíquota de 1mL da suspensão obtida na recuperação e após concluídas as diluições seriadas, foi realizada semeadura em superfície com alça de Drigalski em YMA (*yeast malt agar*). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas (CROUS *et al*, 2009).

Verificação das características morfológicas. O aspecto macroscópico das colônias de *H. uvarum* obtidas foi observado antes da realização da contagem. Depois de anotados os resultados tanto da contagem quanto do aspecto macroscópico, as colônias foram utilizadas para preparações microscópicas coradas quando foram observadas as características microscópicas das cepas preservadas.

Verificação da capacidade fermentativa em mosto de maçã. O mosto clarificado, filtrado e pasteurizado foi acondicionado em erlenmeyers de 250 mL com volume útil de 200 mL, esterilizados (121°C por 15 min.) e munidos de batoque para avaliação da cinética de fermentação. No mosto foram adicionados 0,01% do antibiótico cloranfenicol (99%, Henrifarma - São Paulo) para controle do crescimento bacteriano. A levedura *H. uvarum*, conservada tanto por liofilização quanto a -80°C, foi inoculada nos erlenmeyers que foram identificados e incubados em estufa bacteriológica (Quimis - Modelo: 316 B24) a 25°C por 10 dias. A cinética de fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa do fermentado (200mL) através da liberação de gás carbônico (CO₂) pelo batoque, durante o período de 10 dias de fermentação a temperatura de 20°C. Para as pesagens a agulha

conectada na rolha de borracha foi retirada e o erlenmeyer fechado contendo o fermentado foi pesado a cada 2 horas, em balança analítica (0,001 g de sensibilidade, Bell Engineering- Mark 1300) até peso constante (ROGER *et al*, 2002; BELY *et al*, 1990). A velocidade de fermentação foi calculada pela variação da perda de gás carbônico em função do tempo (Equação 1).

$$V = \Delta\text{CO}_2 / \Delta t \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

$$V = \text{Velocidade de fermentação (gCO}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1})$$

$$\Delta\text{CO}_2 = \text{Variação de produção de CO}_2 \text{ corrigida por equação de gráfico (g.L}^{-1})$$

$$\Delta t = \text{Variação de tempo (dias)}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem de *H. uvarum* em placas apresentados na Figura 1 evidenciaram estabilidade populacional na preservação a -80°C, contudo, na recuperação de seis meses de preservação foi observado um pequeno aumento desta população, não detectado nas recuperações seguintes. Entretanto, na recuperação da cepa preservada por liofilização, apesar da população ter se mantido constante até 12 meses, não houve crescimento aos 9 meses de conservação.

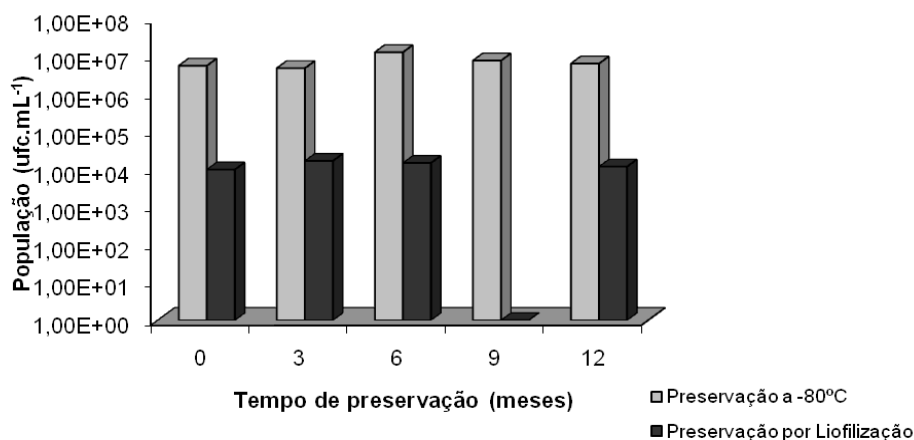


Figura 1 - População de *H. uvarum* expressa em ufc.mL⁻¹ (média de três replicatas C.V. < 5%)

Morgan *et al* (2006) comentam que existem poucas publicações que definem a concentração de células ideal inicial para a liofilização, mas que historicamente quantidades maiores que 10^8 células.mL⁻¹ garantem a recuperação de células viáveis de uma amostra liofilizada. Bozoglu *et al* (1987) recomendam para liofilização culturas com uma concentração maior que 10^7 células.mL⁻¹, para garantir células remanescentes suficientes após o processo de liofilização, armazenamento a longo prazo e para que a reconstituição da cepa seja bem sucedida. Desta maneira, considerando que a concentração inicial de leveduras neste trabalho foi de aproximadamente 10^{12} ufc.mL⁻¹, superior aos valores citados na literatura, o fator concentração inicial de leveduras não poderia justificar a ausência de crescimento na recuperação de 9 meses. Entretanto, justamente por ter esta concentração, não foram utilizadas substâncias crioprotetoras para a fase de crescimento de *H. uvarum*, e nem antes da liofilização.

Costa *et al* (2000) relacionaram a concentração celular ideal inicial com o crioprotetor utilizado na fase de crescimento do microrganismo, determinaram ser necessário maior concentração celular inicial (10^{10} ufc.mL⁻¹) ao se utilizar a sacarose e menor concentração (10^8 ufc.mL⁻¹) com leite desnatado como meio de proteção. Carvalho *et al* (2004) verificaram que *Lactobacillus bulgaricus* apresentou a menor diminuição da viabilidade após a liofilização, quando cultivadas em a presença de manose, em comparação com a frutose, a lactose ou glicose.

Bozoglu *et al* (1987) sugerem que a sobrevivência de 0,1% da população de células original é um "número suficiente" de sobreviventes de liofilização para permitir a continuação de uma linhagem. Os resultados das contagens deste trabalho apresentaram variação entre 10^4 a $1,7 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, salvo a amostra dos 9 meses de recuperação. Portanto, contagens inferiores a 0,1% de 10^{12} ufc.mL⁻¹ que foi a população inicial da liofilização, evidenciando que o crioprotetor na fase de cultivo das leveduras pode ter influenciado a sua viabilidade, entretanto, não comprometendo a preservação em 12 meses de preservação.

Morgan *et al* (2006) ressaltam que a razão para a preservação de células de altas concentrações, está baseada na premissa de que muitas células morrem durante o armazenamento a longo prazo, mas um número suficiente sobrevive para permitir a continuação da linhagem. Contudo, neste trabalho, a recuperação de leveduras recém liofilizadas e após 12 meses de recuperação evidenciaram resultados de contagens semelhantes, sugerindo que a morte das leveduras ocorreu durante a liofilização e não durante o armazenamento a longo prazo.

Para Suárez Lepe (1997) o processo de reidratação das leveduras liofilizadas é de grande importância para evitar choque osmótico forte com a consequente morte das células. O mesmo autor sugere para reidratação a solução de Ringer e o mosto de uva, sendo este último e o leite desnatado apontados como os meios mais adequados para suspender as células durante a liofilização. Outros autores afirmam que a criopreservação é aplicável à maioria dos microorganismos e que nestas técnicas, apesar do processo inicial ser agressivo para a célula, a utilização de crioprotetores e condições de crescimento são importantes para o sucesso da preservação, mantendo-se a estabilidade da amostra (NAGAI *et al*, 2005; DINIZ-MENDES *et al*, 1999; SPENCER; SPENCER, 1996).

Hubalek (2003) acrescenta que os agentes de proteção ou crioprotetores podem ser adicionados durante o crescimento do microrganismo, ou antes da liofilização. O tipo de protetor depende muito do microrganismo. No entanto, há alguns que parecem trabalhar bem com muitas espécies como leite desnatado, trealose, glicerol, adonitol, glicose, sacarose, lactose e polímeros (dextrano e polietilenoglicol) dentre outros.

Ao observar as considerações destes autores e os resultados encontrados aos nove meses de preservação por liofilização, foi aventada a possibilidade de perda da cepa pelo motivo de não se ter utilizado crioprotetor tanto para o crescimento da levedura quanto para a reidratação. No entanto, a recuperação da cepa aos 12 meses de conservação sob as mesmas condições utilizadas em todos os ensaios, evidenciou a viabilidade *H. uvarum*, descartando a possibilidade de atribuir uma menor vida útil do liofilizado sem a utilização de crioprotetores, sugerindo tratar-se de problema pontual com o frasco amostrado aos 9 meses.

Com relação às características macro e microscópicas das colônias de *H. uvarum* percebe-se (Quadro 1) que em todas as recuperações as amostras permaneceram inalteradas, tanto em relação ao aspecto macroscópico das colônias quanto às características celulares, confirmando os resultados descritos para esta levedura e relatados por Smith (1998). Isto evidencia que os métodos de preservação utilizados são compatíveis com estas características.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com o relato de outros autores como Mariano (2006), que tendo analisado cinco métodos de conservação de leveduras de interesse clínico e industrial (transferências seriadas em meio sólido, óleo mineral, água destilada, congelamento a -70°C e liofilização), verificou que todas as amostras permaneceram com suas características estáveis, tanto macro, como microscopicamente, evidenciando as características coloniais inalteradas em todos os ensaios. Cavalcanti (2010) que trabalhou com três gêneros de leveduras dentre outros microrganismos, concluiu que a liofilização e o

congelamento a -80°C foram adequados para a preservação das espécies de leveduras, pois a viabilidade dos isolados mantidos nestas condições durante seis meses foi de 100%.

Tempo de preservação (meses)	Método de Preservação			
	Liofilização		Criopreservação -80°C	
	Aspecto das Colônias	Aspecto Microscópico	Aspecto das Colônias	Aspecto Microscópico
0	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células apiculadas	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células apiculadas
3	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células alongadas	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células apiculadas
6	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células alongadas	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células alongadas
9	Ausentes	Ausentes	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células apiculadas
12	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células alongadas	Esbranquiçadas, bordos lisos e brilhantes	Células apiculadas

Quadro 1 - Resultados das características macro e microscópicas da cepa de *H. uvarum* preservada sob dois métodos diferentes

O processo de liofilização tem sido aplicado para leveduras e fungos filamentosos com bons resultados de recuperação, preservando as características fenotípicas e genotípicas dos microrganismos por períodos prolongados (CAVALCANTE *et al.*, 2007; MCGINNIS *et al.*, 1974). Porém, alguns autores relataram modificações morfológicas após a liofilização ou até mesmo inviabilidade do fungo no congelamento que antecede a liofilização (VOYRON *et al.*, 2009; PAOLI, 2005) fato não observado na cepa de *H. uvarum* em 12 meses de preservação.

Os resultados da capacidade de *H. uvarum* fermentar o mosto de maçã estão representados na Tabela 1, e evidenciam que a levedura manteve sua atividade fermentativa em ambos os processos de conservação.

Em experimentos de fermentação do mosto de maçã com a cepa de *H. uvarum* antes de ser submetida aos processos de preservação testados neste trabalho, determinou-se uma velocidade máxima de 3,85 gCO₂.L⁻¹.d⁻¹, num tempo de 4,25 dias (capítulo IV). Estes valores serão utilizados como padrão de comportamento da cepa estudada, visto que até então a mesma havia sido conservada em tubos inclinados contendo YMA (*yeast malt agar*) à

temperatura de 7-10°C, com repiques periódicos de 3 meses, processo que não submete o microrganismo às injúrias sofridas nas preservações investigadas.

Tabela 1 - Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzidos sob ação de *H. uvarum* preservada sob dois métodos diferentes

Tempo de preservação (mês)	Método de Preservação			
	Liofilização		Criopreservação -80°C	
	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo v máx (dias)	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo v máx (dias)
0	3,78	3,33	8,53	4,96
3	6,80	3,15	6,21	2,78
6	5,43	4,11	7,18	2,39
9	0,00	0,00	4,92	3,11
12	6,27	3,73	5,61	2,92

A partir deste resultado pode-se perceber que a velocidade máxima atingida em todos os ensaios, com exceção da cepa recém-lioofilizada, foram sempre superiores ao valor considerado como comportamento padrão deste microrganismo. Com relação ao tempo em todos os testes, exceto preservado a -80°C, a levedura demorou menos tempo para atingir a velocidade máxima. Evidenciando assim, que os processos de preservação a -80°C e por liofilização, foram adequados a levedura pesquisada, pois aumentaram sua velocidade máxima e diminuíram o tempo para que a mesma fosse atingida.

Mariano (2006) no sentido bioquímico observou que o perfil de assimilação e fermentação de carboidratos pelas leveduras avaliadas, se mostrou bastante estável, não se alterando após conservação das amostras pelos cinco diferentes métodos. Entretanto, em alguns ensaios, a assimilação de determinados carboidratos apresentou-se mais lenta, porém positivando com até 96 horas de incubação.

4 CONCLUSÕES

Para as condições experimentais do presente trabalho, a análise dos resultados obtidos permite concluir que os dois métodos de conservação estudados permitem a manutenção adequada da cepa de *H. uvarum*, garantindo estabilidade em suas características macro e microscópicas, bem como nas contagens e capacidade fermentativa. Desta forma,

atesta-se a viabilidade da levedura estudada após 12 meses de preservação por liofilização armazenada em temperatura ambiente e a -80°C em ultra-freezer.

Considerando a facilidade de preparação da amostra, o método de conservação a -80°C pode ser considerado mais viável na preservação das leveduras estudadas, entretanto o custo com energia elétrica para a manutenção das mesmas à esta temperatura deve ser considerado. Assim, o método de liofilização, apesar de um pouco mais trabalhoso no preparo das amostras, garante a preservação das mesmas em temperatura ambiente, dispensando o custo com energia elétrica.

Avaliações futuras poderão ser realizadas para melhor estimar o tempo de manutenção desta levedura por estes métodos de preservação, principalmente pela liofilização em que não se utilizou nenhum tipo de crioprotetor.

REFERÊNCIAS

BAKER, M.; JEFRIES, P. Use commercially available cryogenic vials for long-term preservation of dermatophyte fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.617-618, 2006.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J.-M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal of Enology and Viticulture**, n.41, p.319-324, 1990.

BOZOGLU, T.F.; OZILGEN, M.; BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. **Enzyme Microbiology Technology** v.9, p.531-537, 1987.

CARVALHO, A.S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F.X.; GIBBS, P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v.20, p.248-254, 2004.

CAVALCANTE, S.C.; FREITAS, R.S.; VIDAL, M.S.M.; DANTAS, K.C.; LEVI, J.E.; MARTINS, J.E.C. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102-1, p.41-47, 2007.

CAVALCANTI, S.D.B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Dermatologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; GARCIA, N.; VINAS, I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.793-800, 2000.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. **Fungal Biodiversity**. Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009.

DINIZ-MENDES, L.; BERNARDES, E.; ARAÚJO, P.S.; PANEK, A.D.; PASCHOALIN, V.M.F. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. **Biootechnology and Bioengineering**, v.65, n.5, p.572-578, 1999.

FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v.63, p.73-82, 2001.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.3, p.229-233, 2004.

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

HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology** v.46, p.205-229, 2003.

KURTZMAN, C.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.; FELL, J. W.; DEAK, T. Methods to identify yeast. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeast in food: beneficial and detrimental aspects**. Cambridge: CRC, 2003.

LASTRA, C.L.L.; HAJEK, A.E.; HUMBER, R.A. Effects of two cryopreservation techniques on viability and pathogenicity of entomophthoralean fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.79, p.861-864, 2001.

MARIANO, P.D.L.S.A. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade Fenotípica e Genotípica**. 118 f. Tese (Doutorado em Biologia Bucodental - Área de Microbiologia e Imunologia). Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, 2006.

MCGINNIS, M.R.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. **Applied Microbiology**, v.28, p.218-222, 1974.

MELIN, P.; SCHNÜRER, J.; HAKANSSON, S. 2011. Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.99, p.107-112, 2011.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, n.3, p.231-238, 2008.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.103. p.285-294, 2005.

MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P.A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p.183-193, 2006.

NAGAI, T.; TOMIOKA, K.; TAKEUCHI, K.; IIDA, M.; KAWADA, M.; SATO, T. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF genebank. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.39, n.1, p.19-27, 2005.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnostics and research. **FEMS Microbiology**, v.29, p.817-910, 2005.

PITOMBO, R.N.M. Liofilização. In: PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri (SP): Manole, 2005.

ROBERT, V.; STALPERS, J.; BOEKHOUT, T.; TAN, S. Yeast biodiversity and culture collections. In: ROSA, C.A.; PÉTER, G. (Eds.). **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.

ROGER, J.M.; SABLAYROLLES, J.M.; STEYER, J.P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.79, n.7, p.804-815, 2002.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2.

SILVA, J.O.; COSTA, P.P.; RECHE, S.H.C. Yeasts maintenance for freezing at - 20°C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.1, p.73-74, 2008.

SMITH, M.T. *Hanseniaspora zikes*. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998. p.214-220.

SPENCER, J.F.T; SPENCER, D.M. Maintenance and culture of yeasts. In: EVANS, I.H. **Yeast protocols: methods in cell and molecular biology**, Totowa (N.J), 1996. v.53, p.5-15.

SUÁREZ LEPE, J.A. **Levaduras vínicas: funcionalidad y uso en bodega**. Madrid: Mundi-Prensa, 1997.

VIANA, F.; GILA, J. V.; VALLÉSA, S.; MANZANARES, A. P. Increasing the levels of 2 phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.68-74, 2009.

VOYRON, S.; ROUSSEL, S.; MANAUT, F.; VARESE, G.C.; GINEPRO, M.; DECLERCK, S.; FILIPELLO MARCHISIO, V. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. **Mycology Research**, v.113, p.1027-1038, 2009.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.192-196, 2006.

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.376-384, 2006.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.W. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998, p.77-100.

CAPÍTULO VIII - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biodiversidade do mosto de maçãs apresentou dez espécies de leveduras não-*Saccharomyces*, sendo *Candida oleophila*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

Cinco espécies (*P. anomala*, *P. fermentans*, *H. guilliermondii*, *L. elongisporus* e *C. lusitaniae*) foram pela primeira vez relatadas em mosto de maçãs.

Os isolados de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* apresentaram [1] elevada sensibilidade ao sulfito, [2] temperatura ótima de fermentação entre 20-25°C, [3] manutenção de açúcar residual nos fermentados de maçã durante o período de avaliação, [4] atividade fermentativa, [5] capacidade de produzir compostos aromáticos que contribuem para o aroma frutal em fermentados de maçãs, como etanoato de etila, octanoato de etila, acetato de isopentila, 3-metil-1-butanol e etanal e [6] a cepa *H. guilliermondii* apresentou um perfil de voláteis bem aceito pela análise sensorial olfativa, entretanto, na análise cromatográfica foi a amostra que apresentou menores concentrações de ésteres e de alcoóis superiores, compostos considerados na literatura como maiores contribuintes de aroma em bebidas fermentadas.

Em fermentações mistas e sequenciais *H. uvarum* + *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* apresentaram [1] boa interação entre leveduras fermentativas e oxidativas sem apresentar competição no crescimento, [2] as leveduras oxidativas apresentaram resistência a teores de etanol de até 6,7° GL, [3] capacidade de produção de compostos voláteis como etanoato de etila, butanoato de etila acetato de isopentila, etanoato de hexila, 2-hidróxi propanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, 1,4-butanoato de etila, dodecanoato de etila, etanal, ácido butanóico e octanóico, etanol, 3-metil-1-butanol, 2-hexanol, 1-hexanol, 2-fenil etanol e 2-heptanona, [4] compostos voláteis com boa aceitação na análise sensorial olfativa na fermentação mista realizada sob ação de *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* e [5] um perfil sensorial mais agradável marcado pela maior somatória de álcoois superiores do que de ésteres.

A preservação de *H. uvarum* por liofilização e à temperatura de -80°C permitem a manutenção adequada da viabilidade da levedura, garantindo estabilidade em suas características macro e microscópicas, nas contagens e capacidade fermentativa.

As espécies apresentam potencial em produção de compostos aromáticos, pelas análises sensoriais olfativas particularmente *H. guilliermondii*, podendo ser aplicadas na elaboração de fermentados de maçãs, melhorando a qualidade aromática do produto final.