

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
Graduação em Biotecnologia Molecular

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO
DE UMA LEVEDURA FERMENTADORA DE ABACAXI (*Ananas
comosus L.*)**

Trabalho de Conclusão de Curso

CAROLINE FLORES DE OLIVEIRA

Porto Alegre, Novembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
Graduação em Biotecnologia Molecular

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE UMA LEVEDURA
FERMENTADORA DE ABACAXI (*Ananas comosus* L.)**

CAROLINE FLORES DE OLIVEIRA

Trabalho apresentado como um dos requisitos
para obtenção do Grau de Bacharel em
Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia
Molecular.

Orientadora: Dra. Patrícia Valente da Silva

Co-orientadora: Sandra Denise Camargo Mendes

Porto Alegre, Novembro de 2015

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela formação e ensino de excelência;

Em especial à minha orientadora Patrícia Valente pelos ensinamentos, paciência, incentivo, oportunidade e, principalmente, pela amizade. À minha co-orientadora Sandra Mendes, que mesmo de longe esteve sempre presente, com muita paciência, me ajudando na realização deste trabalho;

À minha família pela base, exemplo, paciência e força em todos os momentos que eu precisei;

A todos os meus amigos do laboratório, em especial à professora Maria Lúcia, Daiane, Ângela e Maurício;

À professora Karina Monteiro que acreditou no meu projeto e me incentivou a desenvolvê-lo, encaminhando-me à orientação da professora Patrícia;

Às agências de fomento CAPES e CNPq.

Resumo

A fermentação para a obtenção de bebidas alcoólicas pode ser feita a partir do mosto de qualquer fruta sã, fresca e madura que contenha açúcares fermentescíveis. O abacaxi é uma fruta que apresenta características sensoriais muito agradáveis, elevadas concentrações de açúcares, acidez e forte aroma. Este estudo visa isolar e caracterizar uma cepa de levedura com uso potencial como *starter* na produção de fermentado de abacaxi. Leveduras foram isoladas a partir de suco de abacaxi submetido à fermentação espontânea. Os isolados foram caracterizados morfológica e bioquimicamente e aqueles que obtiveram os melhores resultados foram identificados molecularmente. A fermentação do mosto de abacaxi foi conduzida com os isolados selecionados LIA12, LIA20, LIA26, LIA34, LIA35 e LIA36 e o produto final foi avaliado em relação às características químicas. O sequenciamento genético identificou os isolados da seguinte forma: LIA12: *Pichia caribbica*; LIA20: *Hanseniaspora lachancei*; LIA 26: *Torulaspota delbrueckii*; LIA34: *Candida tropicalis*; LIA35: *Pichia membranifaciens*; LIA36: *Torulaspota delbrueckii*. As cepas testadas produziram uma grande variedade de compostos voláteis. As leveduras que apresentaram os melhores perfis foram a LIA26 e LIA36, ambas *Torulaspota delbrueckii*. Outras análises ainda precisam ser feitas, como teor alcoólico, açúcares redutores, acidez total, acidez volátil, sulfatos totais, anidrido sulfuroso total, cloretos totais e cinzas, além de uma análise sensorial. A fermentação conduzida com mais de uma cepa, em especial o co-cultivo com *Saccharomyces cerevisiae*, também deve ser avaliada em futuros trabalhos.

Abstract

The fermentation for obtaining alcoholic beverages can be made from the wort of any healthy, fresh and ripe fruit containing fermentable sugars. Pineapple is a fruit that has very pleasant sensory characteristics, high concentrations of sugars, acidity and strong aroma. This study aims to isolate and characterize a yeast strain with potential use as *starter* in the production of fermented pineapple. Yeasts were isolated from pineapple juice subjected to spontaneous fermentation. The isolates were characterized morphologically and biochemically and those who obtained the best results were identified molecularly. The fermentation of pineapple wine was conducted with the selected isolates LIA12, LIA20, LIA26, LIA34, LIA35 and LIA36, and the final product was assessed in relation to the chemical characteristics. The genetic sequences identified the isolates as follows: LIA 12: *Pichia caribbica*; LIA20: *Hanseniaspora lachancei*; LIA 26: *Torulaspota delbrueckii*; LIA34: *Candida tropicalis*; LIA35: *Pichia membranifaciens*; LIA36: *Torulaspota delbrueckii*. The tested strains produced a wide variety of volatile compounds. The yeasts LIA26 and LIA36 presented the best profiles, both identified as *Torulaspota delbrueckii*. Other analysis have yet to be made, such as alcohol content, reducing sugars, total acidity, volatile acidity, total sulfates, total sulfur dioxide, total chlorides and ash, in addition to a sensory analysis. Fermentation carried out with more than one strain, in particular co-culture with *Saccharomyces cerevisiae*, has also to be evaluated in future works.

Lista de Figuras

FIGURA 1 - Esquema simplificado da fermentação alcoólica.....	15
FIGURA 2 - Curva de fermentação espontânea do suco de abacaxi.....	29
FIGURA 3 - Imagens representativas dos resultados do teste de fermentação de glicose.....	31
FIGURA 4 - Esquema da inoculação das leveduras para a realização dos testes de exclusão em placa.....	33
FIGURA 5 - Resultado do teste de tolerância ao etanol.....	33
FIGURA 6 - Resultado do teste de tolerância a altas concentrações de glicose.....	34
FIGURA 7 - Resultado do teste de produção de H ₂ S.....	35

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Valores e parâmetros estabelecidos para a composição do vinho de acordo com a legislação brasileira.....	2
TABELA 2 - Valores e parâmetros para a composição do vinho de acordo com a legislação brasileira.....	3
TABELA 3 - Teor de açúcares totais permitido no vinho de acordo com a legislação brasileira.....	3
TABELA 4 - Compostos voláteis identificados por Pino e Queris (2010) no vinho de abacaxi.....	8
TABELA 5 - Características tecnológicas importantes na seleção de cepas fermentadoras.....	12
TABELA 6 - Características qualitativas importantes na seleção de cepas fermentadoras.....	13
TABELA 7 - Resultado dos testes de fermentação das leveduras isoladas do suco de abacaxi natural e fermentado espontaneamente.....	31
TABELA 8 - Morfologia colonial das leveduras selecionadas.....	36
TABELA 9 - Morfologia celular das leveduras selecionadas.....	36
TABELA 10 - Resultado da assimilação de fontes de carbono pelos isolados.....	37
TABELA 11 - Resultado da assimilação de fontes de nitrogênio pelos isolados.....	37
TABELA 12 - Crescimento das leveduras selecionadas em diferentes temperaturas.....	38
TABELA 13 - Resultados dos testes de fermentação de diversos açúcares.....	39
TABELA 14 - Resultado do teste de crescimento em meio NaCl 10%.....	40
TABELA 15: Identificação molecular dos representantes dos grupos fenotípicos das leveduras selecionadas.....	41
TABELA 16: Compostos voláteis produzidos nas fermentações de suco de abacaxi inoculadas com as leveduras selecionadas.....	42
TABELA 17: Valores de OAV para os compostos que apresentaram valor superior a 1 para pelo menos uma amostra e o limiar de percepção olfativa para cada composto.....	44
TABELA 11: Tempo de retenção no cromatógrafo a gás dos compostos encontrados no fermentado de abacaxi.....	57
TABELA 12: OAV dos compostos em cada amostra.....	60

Sumário

1.	INTRUDUÇÃO	1
1.1	História do vinho	1
1.2	Vinho no Brasil	1
1.3	Legislação brasileira.....	2
1.4	Vinho de frutas	5
1.5	Abacaxi.....	6
1.6	Benefícios do abacaxi e da fermentação	9
1.7	Leveduras e Processos de Fermentação	11
1.7.1	Leveduras	11
1.7.2	Leveduras e a fermentação alcoólica.....	11
1.7.3	Processo fermentativo	14
2.	JUSTIFICATIVA.....	18
3.	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivos Específicos:	19
4.	METODOLOGIA	20
4.1	Isolamento de leveduras.....	20
4.2	Preparo do inóculo	20
4.3	Teste de exclusão por estresse	21
4.3.1	Testes da capacidade fermentativa de glicose.....	21
4.3.2	Teste de tolerância a etanol	21
4.3.3	Teste de tolerância a altas concentrações de glicose	22
4.3.4	Detecção de produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	22
4.4	Caracterização fenotípica das leveduras	22
4.4.1	Testes morfológicos	22
4.4.2	Testes bioquímicos	23
4.5	Agrupamento dos isolados por fenótipo	25
4.6	Identificação molecular	25
4.6.1	Extração do DNA genômico das leveduras.....	25
4.6.2	Quantificação e diluição do DNA genômico	26
4.6.3	Amplificação do DNA genômico pela reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	26
4.6.4	Sequenciamento e identificação molecular	26

4.7	Fermentação	27
4.8	Análises de compostos voláteis.....	27
4.8.1	Preparo de amostra	27
4.8.2	Análises qualitativas.....	27
4.8.3	Análises quantitativas	28
4.8.4	Cálculo do valor de atividade olfativa	28
5.	RESULTADOS.....	29
5.1	Isolamento de leveduras do suco de abacaxi.....	29
5.2	Caracterização das fases da fermentação espontânea	29
5.3	Isolamento de leveduras durante a fermentação espontânea	30
5.4	Testes de exclusão.....	30
5.4.1	Fermentação de glicose	30
5.4.2	Teste de tolerância a etanol	32
5.4.3	Teste de tolerância a altas concentrações de glicose	33
5.4.4	Deteção de produção de H ₂ S	34
5.5	Identificação fenotípica das leveduras	35
5.5.1	Morfologia.....	35
5.5.2	Testes de assimilação de fontes de carbono.....	36
5.5.3	Testes de assimilação de fontes de nitrogênio.....	37
5.5.4	Crescimento em diferentes temperaturas.....	37
5.5.5	Fermentação de vários açúcares	39
5.5.6	Crescimento em meio NaCl 10%.....	40
5.5.7	Agrupamento dos isolados por fenótipo.....	40
5.5.8	Identificação molecular.....	41
5.5.9	Fermentação e análise dos fermentados.....	41
6.	DISCUSSÃO.....	45
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	47
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
9.	ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 História do vinho

O vinho é uma das bebidas alcoólicas mais populares no mundo, hoje consumido principalmente para celebrar alguma ocasião especial ou para aliviar o stress do dia a dia. Sua origem ainda não é certa, mas há evidências de seu consumo datadas entre 5400 e 5000 a.C, em Hajji Firutz Tepe, província de Azerbaijão Ocidental no noroeste do Irã (McGoven et al, 1996). Entre os anos de 1958 e 1968, arqueólogos do Museu de Arqueologia e Antropologia da Universidade da Pensilvânia, durante uma escavação em uma aldeia neolítica nas montanhas Zagros, na porção norte do Irã, encontraram uma jarra de cerâmica que continha sal de cálcio do ácido tartárico e resquícios de oleoresina de carvalho (*Pistacia terebinthus*), utilizado na época como bactericida (Phillips, R. 2001). A presença de ácido tartárico é naturalmente elevada apenas em uvas (*Vitis vinifera*), uma fruta muito abundante em Hajji Firutz Tepe (McGoven et al, 1996), sugerindo que esta província foi cenário das primeiras produções de vinho, datando de mais de 7.000 anos atrás. Além da uva, a região também é grande produtora de carvalho. O suco de uva é naturalmente fermentado a vinho se deixado à temperatura ambiente.

Do sul do Cáucaso, o cultivo da uva e a produção do vinho provavelmente expandiram-se para o sul para a Palestina, Síria, Egito e Mesopotâmia, onde houve a domesticação da uva (Zohary et al, 1988) e, a partir do terceiro milênio a.C., o vinho foi utilizado para fins sacramentais no Egito (Soleas et al, 1997). Foi apenas a partir no século XVII que o vinho começou a assumir suas expressões modernas, sendo utilizado enxofre no tratamento do barril a fim de melhorar a qualidade do vinho e estender sua vida.

1.2 Vinho no Brasil

As primeiras videiras foram trazidas ao Brasil apenas em 1522, por Martim Afonso de Souza. As mudas de *Vitis vinifera* foram plantadas na capitania de São Vicente, SP, mas o clima desfavorável impediu que a prática seguisse adiante. O jovem Brás Cubas, no entanto, insistiu no cultivo de videiras, transferindo as plantações do litoral para o planalto atlântico e, em 1551, consegue elaborar o primeiro vinho brasileiro. O vinho chegou ao sul do Brasil em 1626, com a chegada dos jesuítas à região das Missões. É creditada ao Padre Rosque Gonzales de Santa Cruz a introdução das primeiras videiras, que contou com a ajuda de índios na elaboração do vinho, elemento das celebrações religiosas. A partir dessa data, a fabricação do vinho ganhou força até 1789, quando, percebendo o

avanço da prática local, a corte portuguesa proibiu o cultivo da uva no país como forma de proteger sua própria produção, até que em 1808, com a transferência da coroa portuguesa para o Brasil a prática voltou a ser liberada. O grande salto na produção nacional de vinhos ocorreu com a chegada dos imigrantes italianos, em 1875, que trouxeram de sua terra natal o conhecimento técnico de elaboração e a cultura do consumo, elevando a qualidade da bebida e conferindo importância econômica à atividade. Em 1881 surgiu o mais antigo registro de elaboração no Vale dos Vinhedos, RS (em < <http://www.ibravin.org.br/historia-do-vinho-no-brasil.php> acessado em 19 de outubro de 2015.).

1.3 Legislação brasileira

A legislação brasileira estabelece padrões de identidade para garantir a qualidade do vinho. O artigo 4º da portaria nº 259, de 31 de maio de 2010 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece os limites máximos de contaminantes inorgânicos que vinhos e derivados da uva devem respeitar, estando esses citados a seguir:

I - arsênio, máximo de vinte centésimos de miligrama por litro;

II - chumbo, máximo de trinta centésimos de miligrama por litro;

III - cobre, máximo de um miligrama por litro;

IV - estanho, máximo de duzentos e cinquenta miligramas por litro;

V - ferro, máximo de quinze miligramas por litro;

VI - zinco, máximo de cinco miligramas por litro; e

V - no caso de vinho, conteúdo total de metais, expresso em ferro, máximo de vinte miligramas por litro.

As tabelas a seguir apresentam os valores e parâmetros para a composição química do vinho de acordo com as portarias nº 229, de 25 de outubro de 1988 e 259, de 31 de maio de 2010 (tabelas 1, 2 e 3):

Tabela 3: Valores e parâmetros estabelecidos para a composição do vinho de acordo com a legislação brasileira

	Vinhos de Mesa e Fino		ESPUMANTE		Licoroso		Composto	
	Máx	Mín	Máx	Min	Máx	Min	Máx	Min
Acidez total (meq /L)	130,0	55,0	130,0	55,0	120,0	50,0	45,0	-
Acidez volátil (corrigida) (meq /L)	20,0	-	20,0	-	20,0	-	20,0	-
Sulfatos totais (g/L)	1,2	-	1,0	-	1,0	-	1,0	-
Anidrido sulfuroso total, em (g/L)	0,25	-	0,25	-	0,35	-	0,35	-
Cloretos totais. em cloreto de sódio (g/L)	0.20	-	0.20	-	0.20	-	0.20	-

Tabela 4: Valores e parâmetros para a composição do vinho de acordo com a legislação brasileira

	Álcool etílico, em graus GL, a 20°C		Pressão a 20 °C, em atm para		Cinzas, em g/l, para	
	Máx	Min	Máx	Min	Máx	Min
Vinho de Mesa						
Tinto	14,0	8,6	1,0	-	1,5	-
Rosado	14,0	8,6	1,0	-	1,0	-
Branco	14,0	8,6	1,0	-	1,0	-
Espumante						
Champanha	13,0	10,0	-	3,5	-	1,0
Espumante Moscatel	10,0	7,0	-	4,0	-	1,0
Espumante Gaseificado	12,5	10,0	3,0	1,6	-	1,0
Frisante	14,0	7,0	2,0	1,1	-	1,0
Gaseificado	14,0	7,0	3,9	2,1	-	1,0
Leve	8,5	7,0	*	*	-	1,0
Licoroso	18,0	14,0	*	*	*	*
Composto	20,0	14,0	*	*	*	*

Tabela 5: Teor de açúcares totais permitido no vinho de acordo com a legislação brasileira

	Teor de açúcares totais, em g/l de glicose:	
	Máximo	Mínimo
Vinho de Mesa		
Seco	4,0	-
Demi-Sec	25,0	4,1
Suave	-	25,1
Espumante		
Nature	3,0	-
Extra-Brut	8,0	3,1
Brut	15,0	8,1
Seco	20,0	15,1
Demi-Sec	60,0	20,1
Doce	-	60,1
Licoroso		
Seco	20,0	-
Doce	-	20,1
Composto		
Seco	40,0	-
Demi-Sec	80,0	40,1
Doce	-	80,1

A legislação brasileira estabelece definições de classes para o vinho de acordo com suas características, como mostrado a seguir:

- Vinho de mesa: É o vinho com graduação alcoólica de 8,6 a 14% em volume, podendo conter 1 (uma) atmosfera de pressão a 20 °C.
- Vinho Frisante- É o vinho com graduação alcoólica de 7 a 14% em volume, com um conteúdo de anidrido carbônico de 1,1 até 2 atmosferas de pressão a 20 °C., natural ou gaseificado.
- Vinho Gaseificado: É o vinho resultante da introdução de anidrido carbônico puro por qualquer processo, devendo apresentar uma graduação alcoólica de 7 a 14% em volume e uma pressão compreendida entre 2,1 e 3,9 atmosferas a 20 °C.

- Vinhos Espumantes Naturais: São os vinhos nos quais o anidrido carbônico é resultante da fermentação em recipientes fechados e com pressão mínima de 4 (quatro) atmosferas a 20 °C.
- Espumante ou Espumoso Natural (Champanha): É o vinho espumante no qual o anidrido carbônico é resultante de uma segunda fermentação alcoólica do vinho na garrafa (método champenoise/tradicional) ou em grandes recipientes (método charmat) com uma pressão mínima de 4 (quatro) atmosferas a 20 °C. e uma graduação alcoólica de 10 a 13% em volume a 20 °C.
- Moscato Espumante ou Moscatel Espumante: É o vinho espumante no qual o anidrido carbônico é resultante da fermentação em recipiente fechado do mosto ou mosto conservado de uva Moscatel ou Moscato, com uma pressão mínima de 4 (quatro) atmosferas a 20 °C. com graduação alcoólica de 7 a 10% em volume e um remanescente mínimo de açúcar natural de 20 gramas por litro.
- Vinho Licoroso: É o vinho com graduação alcoólica natural ou adquirida de 14 a 18% em volume sendo permitido uso de álcool etílico, mosto concentrado, caramelo, mistela simples, açúcar e caramelo de uva.
- Vinho Composto: É o vinho de graduação alcoólica de 14 a 20% em volume, obtido pela adição ao vinho de macerados ou concentrados de plantas amargas ou aromáticas, substâncias de origem animal ou mineral, álcool etílico, açúcar, caramelo e mistelas simples. Deverá conter no mínimo 70% de vinho.
- Vinhos Finos: São os vinhos com graduação alcoólica de 8,6 a 14% em volume, proveniente exclusivamente de variedades "Vitis Vinífera", pertencentes ao grupo I (Viníferas Nobres) da tabela de preços mínimos da CONAB, elaborados mediante processos tecnológicos adequados que assegurem a qualidade de suas características sensoriais dos grupos.
- Vinhos Leves: São os vinhos com graduação alcoólica de 7 a 8,5% em volume, obtido exclusivamente pela fermentação dos açúcares naturais da uva, produzido durante a vindima, na região produtora, podendo ser de Viníferas ou de Americanas ou híbridas, desde que identificadas na rotulagem.

Sendo o vinho dividido também nos tipos tinto, rosado ou rose e vinho branco, de acordo com seu modo de produção e uvas utilizadas.

Muitos são os benefícios proporcionados pelo vinho; entretanto essa bebida é pouco difundida no Brasil em razão do clima predominantemente tropical, com exceção do sul do Brasil, onde o consumo é maior. O vinho de abacaxi, entretanto, possui um aroma muito pronunciado, o

que torna a bebida indicada para o consumo no verão, a temperatura relativamente baixa, de 12 °C a 14 °C, o que pode atrair consumidores do Brasil todo.

1.4 Vinho de frutas

Por ter sido feito há milênios utilizando a uva, hoje em dia poucos sabem que é possível fermentar o suco de diversas frutas diferentes. Essa prática é um pouco mais disseminada na Europa e Austrália e, além de trazer benefícios à saúde de quem consome moderadamente, é capaz de impulsionar a economia, uma vez que pode utilizar as frutas que foram machucadas durante a pós-colheita e que seriam jogadas fora, gerando desperdícios, e, assim, diminuir perdas econômicas. O fermentado de frutas também garante a utilização das sobras de eventuais superproduções, evitando o apodrecimento, uma vez que um vinho devidamente armazenado pode manter-se próprio para o consumo por anos.

Segundo a Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988, vinho é exclusivamente a bebida resultante da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% e máximo 14% (V/V a 20 °C). Sendo a palavra vinho derivada de *vitis* (videira em latim), esta é usada para designar apenas o fermentado de uva. Os fermentados das outras frutas devem, portanto, vir denominadas pelo nome da matéria prima utilizada, como vinho de laranja, vinho de jabuticaba, vinho de abacaxi, etc. Algumas bebidas fermentadas inclusive têm nome próprio, como o fermentado de maçã, que se chama Cidre ou Sidra, e o fermentado de arroz, que se chama Saquê.

Assim como a uva, outras frutas também possuem açúcar e podem passar pelo processo de fermentação, dando origem a bebidas alcoólicas denominadas de fermentados de frutas. O fermentado de fruta, segundo o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), no documento “Nem tudo que fermenta vira Vinho”, publicado no site oficial do IBRAVIN em 2012, é a bebida com graduação alcoólica de 4% a 14% em volume, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura de uma única espécie, do respectivo suco integral ou concentrado, ou polpa, que poderá nestes casos, ser adicionado de água.

Segundo Corazza e colaboradores (2001), com qualquer fruta que contenha níveis razoáveis de açúcar é possível de se produzir um bom vinho, com sabores característicos de cada fruta. A literatura cita a produção de vinho a partir de frutas como amora (AMERINE; BERG; CRUESS, 1972), abacaxi (Alian e Mussenge, 1976; Maldonado et al, 1975, Ayogu, 1999; Chanprasartsuk et al., 2010;

Pino and Queris, 2010), manga (Onkarayya et al, 1984), kiwi (WITH; LODGE, 1982; Towantakavanit et al., 2011), melão (BENK, 1987), maracujá (Benk, 1987), maçã (Fan et al., 2006; Wang et al., 2004), mirtilo (Stull et al., 2010; Basu et al., 2010; Johnson et al., 2011; Johnson et al., 2012; Li et al., 2011), cereja (Sun et al., 2011), pêssego (Davidovic et al., 2013), framboesa (Hager et al., 2008; Lim et al., 2012) coco, cupuaçu, jabuticaba, gabioba (Duarte et al., 2010a), banana (Akubor et al., 2003), goiaba (Sevda, 2011), jaca (Jagtap et al, 2011), laranja (Selli, 2007), mamão (Lee et al., 2011a; Lee et al., 2011b) e cactos (Steinkraus, 1996). Muitas dessas bebidas são produzidas em pequena escala usando métodos básicos e tradicionais (Rainieri et al, 2000).

1.5 Abacaxi

O abacaxi (*Ananas comosus L.*) é uma das frutas subtropicais mais apreciadas e consumidas em todo o mundo. Desenvolve-se a partir de uma infrutescência produzida pela planta de mesmo nome, caracterizada como uma planta monocotiledônea da família das bromeliáceas, subfamília Bromelioideae. O Brasil é um dos principais produtores, e seu consumo é feito principalmente *in natura*, sendo seu aproveitamento industrial muito fraco. É uma fruta cujas características sensoriais são muito características e agradáveis. Possui elevadas concentrações de açúcares, a maioria fermentescíveis, acidez e forte aroma (Paull et al, 2003), além de nutrientes suficientes (incluindo nitrogênio) para o crescimento de leveduras e fermentação, dando características agradáveis ao fermentado (Ruengrongpanya, 1996; Ayogu, 1999). A assimilação de nitrogênio contribui para a produção dos principais metabólitos resultantes da fermentação, que influencia o aroma e sabor do vinho (Thepkaew et al, 2013). Além disso, o suco pode ser facilmente extraído, rendendo mais de 55% de suco por peso de fruta (Salvi e Rajput, 1995), que pode ser facilmente filtrado e descontaminado. O abacaxi é uma fruta cujo aroma atrativo e seu refrescante balanço entre doçura e acidez o fazem ter um grande potencial para produção de vinho de frutas, fornecendo uma alternativa com grandes valores nutricionais ao seu consumo. O vinho de abacaxi já tem produção comercial no Havaí, Japão e Tailândia (Chanprasartsuk et al, 2010).

Silva e colegas, em 2010, utilizaram abacaxi para elaboração de vinhos e avaliaram a composição físico-química do produto final. Obtiveram um rendimento de 60% de fermentado em relação ao suco inicial e uma acidez com valores em torno de 87,09 mEq/L, estando dentro do que estabelece a legislação brasileira para vinho branco seco que é de no mínimo 55,0 mEq/L e máximo de 130,0 mEq/L. Valores dentro deste mesmo padrão também foram encontrados por Muniz et al (2002), Santos et al (2005) e Caldas (2006). O teor alcoólico ficou em torno de 13% e o valor de

açúcares totais obtidos foi de 3,0 g/L, o que, de acordo com a legislação brasileira, enquadra-se como vinho branco de mesa seco. A análise sensorial revelou uma aceitabilidade em torno de 68,5% (homens) e 64,5% (mulheres), o que é considerada uma boa aceitabilidade.

Araújo e colegas (2009) analisaram diversas características químicas do fermentado de abacaxi e apontaram semelhanças na composição em relação aos vinhos de uvas, principalmente com as dos vinhos brancos. Neste estudo, os teores médios de alcoóis superiores foram de $76,4 \pm 2,4$ mg.L⁻¹ para o n-propanol; $98,5 \pm 2,0$ mg.L⁻¹ para o isobutanol e $229,1 \pm 2,4$ mg.L⁻¹ para os alcoóis amílicos, estando os dois últimos dentro da média encontrada nos vinhos de uva (respectivamente 12-174 mg.L⁻¹ e 55-384 mg.L⁻¹) e o álcool n-propílico acima do valor estabelecido (6-63 mg.L⁻¹) (LEE; COOLEY, 1981; RIZZON, 1987; SHINOHARA; WATANABE, 1976; SIMPSON, 1979). As concentrações dos alcoóis superiores totais ($404,0 \pm 9,6$ mg.L⁻¹) incluíram-se na faixa em que estes alcoóis favorecem o aroma de vinhos de uvas.

Os valores médios encontrados para acetato de etila, acetaldeído, metanol e fenóis (respectivamente 71,2; 48,1; 20,1; e 432,4 mg.L⁻¹) estão de acordo com os valores médios apresentados na literatura para vinhos brancos (respectivamente 26,9-173,2 mg.L⁻¹, 13-108 mg.L⁻¹, 18,9-40,5 mg.L⁻¹, 151-455 mg.L⁻¹ E.A.G.) (Rizzon, 1987; Nykanen, 1986; Gnekow e Ough, 1976; Kramling e Singleton, 1969; Ohkubo, 1984). O acetato de etila também se encontrava na faixa estabelecida para vinhos tintos (49,7-208,1 mg.L⁻¹). Segundo a literatura (AMERINE; BERG; CRUESS, 1972; RIZZON, 1987), valores acima de 200 mg.L⁻¹ para acetato de etila são capazes de deteriorar o aroma dos vinhos. Alian et al, 1976 estabeleceu o valor 100 mg.L⁻¹ como limite inferior para acetaldeído capaz de ser percebido olfativamente, e o vinho de abacaxi apresentou um valor abaixo desse limite. Os teores de metanol foram inferiores aos estabelecidos para vinhos tintos (61,3-155,6 mg.L⁻¹). Os valores de pH, acidez total (g ác cítrico.L⁻¹), acidez volátil (g ác cítrico.L⁻¹), ácidos cítrico, málico, oxálico e succínico (mg.L⁻¹), açúcares redutores (g glicose.L⁻¹), etanol (°GL) e glicerol (g.L⁻¹) foram de, respectivamente, 3,68; 4,77; 0,42; 4125; 1982; 676; 1322; 0,31; 11,2; e 6,9. O Índice de Aceitabilidade (I.A.) foi de 73,3%, indicando a aceitação desses vinhos, já que atingiram I.A. maiores que 70% (TEIXEIRA; MEINERT; BARBETTA, 1987).

No vinho de abacaxi produzido por Pino e Queris em 2010, foi encontrado um total de 18 compostos voláteis, nos quais a maioria ésteres (13 compostos), quatro álcoois e um ácido (Tabela 4):

Tabela 6: Compostos voláteis identificados por Pino e Queris (2010) no vinho de abacaxi

Composto	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Limiar de detecção ($\mu\text{g/L}$)
Ácido acético	1,4 \pm 0,09	2000
Acetato de etila	38,3 \pm 1,7	5
Isobutanol	6,3 \pm 0,3	400
3-Metil-1-butanol	21,5 \pm 1,4	280
2-Metil-1-butanol	7,8 \pm 0,4	300
Etil 2-metilpropanoato	0,6 \pm 0,03	0,1
3-Metil-1-butil acetato	0,6 \pm 0,04	30
Exanoato de etila	6,9 \pm 0,4	14
Benzoato de metila	0,9 \pm 0,05	10
2-feniletanol	0,6 \pm 0,04	140
Metil 2-metilheptanoato	10,9 \pm 0,4	nd
Benzoato de etila	0,9 \pm 0,06	60
Succinato de dietilo	0,7 \pm 0,04	70
Octanoato de etila	97,4 \pm 5,1	5
Fenilacetato de etila	0,5 \pm 0,03	650
Acetato de 2-feniletila	0,4 \pm 0,02	480
Etil 9-decenoato	7,6 \pm 0,5	nd
Decanoato de etila	17,9 \pm 0,09	200

Este estudo mostrou que três dos 18 compostos identificados estavam acima da concentração limiar de detecção aromática (OAV). Dois dos ésteres predominantes apresentam um aroma frutado, doce e refrescante (octanoato de etila e acetato de etila) (Burdock, 2009). Embora os alcoóis e o ácido acético estivessem presentes em altas concentrações, não foi atribuída a eles nenhuma contribuição no aroma. Muitos dos compostos detectados contribuem para o caráter frutado do vinho abacaxi, como por exemplo o hexanoato de etila, que tem um poderoso odor frutado de banana (Burdock, 2009). Os valores de pH, extratos residuais (g.L^{-1}), acidez total (g ácido cítrico/L), acidez volátil (g ácido acético/L), etanol ($^{\circ}\text{GL}$), compostos fenólicos (mg ácido gálico /L) e cinzas estiveram em torno de 3,52; 12,9; 4,12; 0,82; 10,8; 108,0; e 0,90, respectivamente.

Todos os estudos utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação. Outras leveduras melhor adaptadas ao ambiente proporcionado pelo abacaxi poderiam fornecer resultados melhores. Di Cagno, em 2009, em um estudo que visava descobrir quais leveduras eram encontradas no abacaxi, encontrou apenas *Pichia guilliermondii* enquanto que Chanprasartsuk e colegas em 2010 encontraram *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia guilliermondii* no suco de abacaxi fermentado e constataram que *P. guilliermondii* é a levedura que inicia a fermentação. Nenhuma espécie de *Saccharomyces* foi encontrada.

1.6 Benefícios do abacaxi e da fermentação

Em relação à saúde, o consumo de vinho também pode trazer benefícios. Em 1974, Klatsky e colaboradores constataram que consumidores moderados de álcool sofrem o primeiro infarto do miocárdio (IM), e doença arterial coronariana (DAC) mais tardiamente e em menos quantidade em relação aos abstêmios. Essa pesquisa foi corroborada através de vários outros estudos durante os anos 1990, em que uma coletânea notavelmente consistente de dados epidemiológicos apontou uma redução da incidência de mortalidade e morbidade por DAC entre aqueles que consomem álcool com moderação em comparação com os abstêmios (Goldberg et al, 1995; Kannel et al, 1996; Criqui et al, 1996; Rimm et al, 1991; Klatsky et al, 1992; Gronbaek et al, 1994; Doll et al, 1994; Fuchs et al, 1995). Esta redução foi demonstrada para morte, infarto do miocárdio e hospitalização por DAC, em todas as populações estudadas, de ambos os sexos, e em todas as idades. Esta proteção parece ser devida em grande medida, se não exclusivamente, ao etanol presente nessas bebidas. Uma das razões é a capacidade do álcool de aumentar a concentração de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), um fator de risco negativo bem conhecido para DAC (Suh et al, 1992; Gaziano et al, 1993). Outro mecanismo que pode desempenhar um papel benéfico importante é a capacidade do álcool de inibir ou reduzir a agregação de plaquetas e a coagulação do sangue (Renaud et al, 1992; Ridker et al, 1994; Rubin et al, 1994), além de alterar o metabolismo de eicosanóides levando a uma redução da síntese de tromboxano, juntamente com o aumento da síntese da prostaciclina vasodilatadora (Dunn et al, 1981; Fenn et al, 1982; Mikhailidis et al, 1983; Galli et al, 1983; Landolfi et al, 1984; Rand et al, 1988; Veenstra et al, 1990).

Evidências de que o vinho confere benefícios adicionais, devido ao seu conteúdo de polifenóis, especialmente flavonóides que, em experimentos *in vitro* e em cultura de células, mostraram-se potentes inibidores de agregação de plaquetas, além de atuarem na síntese dos eicosanóides e na proteção contra o câncer e outras doenças crônicas e inflamatórias, bem como na DAC (Steinmetz et al, 1991; Hertog et al, 1993; Hubbard et al, 1994; Willet, 1994) e nas reações de oxidação biológicas, eliminando os radicais livres e extinguindo espécies reativas de oxigênio, atuando como antioxidantes (Soleas et al, 1997; Torel et al, 1986; Bors et al, 1987; Slater et al, 1986; Afanas'ev et al, 1989; De Whalley et al, 1990; Mangiapane et al, 1992). Os flavonóides são compostos fenólicos que atuam como potentes antioxidantes e quelantes de metal. Eles têm a capacidade de sequestrar e, assim, reduzir a atividade de indução de metais oxidantes, tais como ferro e cobre. Os flavonóides interferem nas infecções virais, bacterianas, fúngicas, e alimentação de animais, reprodução, crescimento, e desenvolvimento (Denno, 2012).

Um desses compostos, a catequina, também presente no abacaxi (Li et al, 2014), promove a produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular, inibe a síntese de tromboxano em plaquetas e de leucotrienos em neutrófilos, modula a síntese e secreção de lipoproteínas e para o crescimento do tumor, assim como inibe a carcinogênese em diferentes modelos experimentais (Soleas et al, 1997).

O abacaxi em si também possui propriedades benéficas para a saúde. É usada como planta medicinal em várias culturas nativas (Mondal et al, 2011). Os polissacarídeos presentes nas paredes celulares atuam como imunomoduladores, estimulam o crescimento da flora microbiana gastrointestinal e atuam na prevenção de doenças cardiovasculares (Mudgil et al, 2013). Wang e colegas, em 2015, comprovaram a atividade antiproliferativa de polissacarídeos de abacaxi (pineapple polysaccharides ou PAPs) em linhagens celulares de carcinoma de mama. Essa inibição no desenvolvimento tumoral pode ser devido a vários mecanismos de ação, como a indução de apoptose de células tumorais, a regulação do sistema imunológico contra o tumor e inibição de metástases (Wang et al, 2015). Determinados polissacarídeos, tais como as pectinas, têm sido descritos como sendo capazes de ligar-se a receptores específicos nas células cancerosas e inibir a progressão de células tumorais ou metástases (Maxwell et al, 2012). É possível que os PAPs inibam a proliferação de células cancerosas através de tal mecanismo. Nesse mesmo estudo, Wang também constatou a ação antioxidante dos PAPs de maneira dose-dependente.

Outros compostos do abacaxi também contribuem para sua importância na saúde humana. Bromelaína é o nome dado ao extrato de plantas da família Bromeliaceae contendo enzimas proteolíticas, fostase, glicosidase, peroxidase e celulase. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a bromelaína apresenta vários fibrinolíticos, antiedematosos, antitrombóticos e atividades antiinflamatórias. É usada no tratamento de angina, bronquite, sinusite, trauma cirúrgico, tromboflebite, desbridamento de feridas (Livio et al, 1978; Neubauer, 1961) e para aumentar a absorção de drogas, em particular antibióticos (Renzini et al, 1972; Maurer, 2001). Também alivia a osteoartrite, diarreia, várias desordens cardiovasculares, artrite reumatóide, colite ulcerosa, inflamação do cólon, dor e asma crônica (Secor et al, 2005; Onken et al, 2008). A bromelaína também possui algumas atividades anticancerígenas e promove a morte celular por apoptose. É considerada como um complemento alimentar e está disponível gratuitamente para o público em geral em lojas de produtos naturais e farmácias nos EUA e na Europa [Ley et al, 2011]. Existem evidências de que a bromelaína pode ser uma candidata promissora para o desenvolvimento de futuras terapias de enzimas orais para pacientes oncológicos [Chobotova et al, 2010]. A Bromelaína é absorvida nos intestinos humanos, sem degradação e sem perder a sua atividade biológica [Chobotova et al, 2010; Castell et al, 1997].

1.7 Leveduras e Processos de Fermentação

1.7.1 Leveduras

As leveduras são microrganismos unicelulares eucariotos, que podem ser ovais, redondas, cilíndricas, triangulares, apiculares e ogivas. Algumas são capazes de desenvolver características multicelulares através da formação de pseudohifas. Geralmente possuem entre 2 a 10 µm (esféricas) e de 20 a 30 µm (cilíndricas) (McGraw-Hill, 1997) Pertencentes ao reino Fungi, hoje são conhecidas em torno de 1500 espécies (Kurtzman et al, 2006), distribuídas entre ascomicetos e basidiomicetos. Reproduzem-se assexuadamente por brotamento ou fissão ou sexuadamente através da formação de esporos. Podem ser encontradas em qualquer ambiente que oferecer alguma fonte de carboidrato, e atualmente possuem diversas funções na indústria: usados na fabricação de vinho e cerveja, pão e bolos, na biorremediação, na produção de etanol industrial e biodiesel, atuam como probióticos, aditivos e flavorizantes de comida, possuem importante papel na pesquisa científica e aplicações médicas, produzindo diversas enzimas e outras moléculas importantes através de engenharia genética.

1.7.2 Leveduras e a fermentação alcoólica

O sabor, aroma, textura e turbidez finais do processo de vinificação são resultado de uma complexa interação de diversos fatores (Soleas et al, 1997). A fruta utilizada e seu estado de conservação proporcionam a base do sabor do vinho, mas o microrganismo empregado possui a capacidade de modificar certas propriedades químicas, fornecendo sutilezas e individualidades aos vinhos. Esses microrganismos são naturalmente encontrados nas frutas e a fermentação pode ocorrer de maneira espontânea. Este método, entretanto, não é o recomendado, pois há muitas leveduras e bactérias que produzem compostos secundários indesejáveis, como sulfeto de hidrogênio e outros compostos voláteis de enxofre, vários ésteres e fenóis voláteis, tornando o vinho pouco ou nada atrativo (Esteve-Zarzozo et. al., 2000). Uma alternativa é selecionar cepas de leveduras *starter* capazes de fermentar o mosto a vinho sem a produção de compostos indesejáveis. A utilização de culturas *starter* também possibilita a reprodutibilidade e a previsibilidade da qualidade dos vinhos.

As leveduras do gênero *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) geralmente começam a fermentação natural do suco de uva (Rainieri et al, 2000). No entanto, essas leveduras não são tolerantes à etanol, e morrem quando a concentração alcoólica atinge de 3 a 4%, quando a espécie *Saccharomyces*

cerevisiae começa a predominar (Fleet, 1993; Mortimer et al, 1994). Existem, no entanto, várias outras leveduras que podem estar presentes durante a fermentação, como *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* e algumas *Schizosaccharomyces* spp. *Saccharomyces ludwigii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Brettanomyces* spp. (Fleet, 1993; Henschke, 1997).

Durante a fermentação, as condições criadas contribuem para a pressão seletiva, e os microrganismos que não se adaptarem são inibidos. Já ao final da fermentação, quando os nutrientes se esgotam e a concentração de etanol está elevada, as espécies que haviam resistido acabam morrendo também (Henschke, 1997).

S. cerevisiae desempenha o papel principal na fermentação espontânea de suco de uva. No entanto, essas leveduras não estão necessariamente presentes em grandes quantidades nas uvas. A predominância de *S. cerevisiae* no vinho é uma consequência das condições, especialmente a alta concentração de etanol, que inibem outras espécies microbianas mais severamente (Rainieri et al, 2000).

Por ser a espécie mais tolerante a etanol, *Saccharomyces cerevisiae* geralmente é utilizada como *starter*. Zambonelli (1998) dividiu as características enológicas de *S. cerevisiae* em dois grupos: tecnológicas e qualitativas, descritas nas tabelas 5 e 6:

Tabela 7: Características tecnológicas importantes na seleção de cepas fermentadoras:

Tolerância a etanol

Vigor fermentativo

Resistência a SO₂

Tipos de crescimento em meio líquido:

- Células dispersas
- Células agregadas
- Floculação
- Formação de espuma
- Formação de película
- Velocidade de sedimentação

Crescimento em altas e baixas temperaturas

Presença de fatores *killer*

Fonte: S. RAINIERI, I.S. PRETORIUS (2000), **Selection and improvement of wine yeasts**

Tabela 8: Características qualitativas importantes na seleção de cepas fermentadoras:

Subprodutos da fermentação:

- Glicerol
- Ácido succínico
- Ácido acético
- Acetaldeído
- n-Propanol
- Isobutanol
- Álcool isoamílico
- β -feniletanol

Produção de compostos sulfúricos:

- H₂S
- SO₂

Ação no ácido málico:

- Atividade enzimática
 - β -glucosidase
 - Esterase
 - Enzimas proteolíticas
 - Autólise
-

Fonte: S. RAINIERI, I.S. PRETORIUS (2000), **Selection and improvement of wine yeasts**

Uma disponibilidade natural de *S. cerevisiae* que possua uma combinação ideal de características tecnológicas e qualitativas é altamente improvável. Além disso, cepas de *S. cerevisiae* geralmente produzem vinhos com um perfil aromático simples. Leveduras de outras espécies têm sido utilizadas como *starter*, para atribuir certas características organolépticas que não seriam possíveis utilizando apenas *S. cerevisiae*, sendo esta introduzida após a morte da cultura primária para finalizar a fermentação. Vários estudos têm demonstrado que algumas espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Kloeckera* ou *Hanseniaspora* podem influenciar positivamente o caráter global do vinho, principalmente através das propriedades aromáticas produzidas, fornecendo perfis complexos e novos sabores aos vinhos (Fleet, 1993; Romano, 1997).

São os metabólitos secundários produzidos pelas leveduras durante o processo de fermentação que fornecem as individualidades de cada vinho, pois estes contribuem para as características organolépticas que diferem um vinho do outro. Leveduras não-*Saccharomyces* geralmente produzem altas concentrações de ésteres, álcoois superiores, aldeídos e glicerol; compostos que desempenham um papel importante na determinação do perfil sensorial do vinho

(Rainieri et al, 2000). Por exemplo, cepas pertencentes às espécies *Candida stellata* e *Kloeckera apiculata* foram apontadas como boas produtoras de glicerol; cepas pertencentes à espécie *Candida colliculosa* produzem altas concentrações de acetaldeído e de n-propanol (Heard, 1988). Soden et al. (2000) observaram um aumento da concentração de glicerol, ácido acético e acetato de etila em vinhos obtidos por fermentação com *C. stellata*. O produto de *C. stellata* mostrou um aroma mais intenso de mel, damasco, chucrute e acetato de etila, e uma diminuição de aroma de limão, banana e de flores em comparação ao produto atribuído à cepa *S. cerevisiae*.

As contribuições individuais e conjuntas dos compostos presentes nos vinhos determinam as características organolépticas do produto final. Os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, por exemplo, são responsáveis pela amargura e adstringência dos vinhos, (ARNOLD; NOBLE, SINGLETON, 1980), enquanto que os compostos voláteis secundários contribuem na qualidade do aroma (NYKANEN, 1986) e o glicerol para a viscosidade, doçura e corpo dos vinhos (LAGE et al., 1989; NOBLE; BURSICK, 1984).

O uso de leveduras não-*Saccharomyces* juntamente com as *Saccharomyces* pode melhorar a qualidade do vinho e diversificar o sabor e aroma. (Garavaglia et al, 2015) Esse processo já é feito no mundo todo, e diversas leveduras consideradas “ideais” já foram isoladas e são hoje comercializadas para a fermentação do mosto de uva, sendo pouco ou nada avaliadas para outras frutas.

Devido às diferenças na composição das frutas, as leveduras utilizadas devem ser adaptadas a diferentes condições, como, por exemplo, diferentes composições e concentrações de açúcares e pH. Assim sendo, é importante que para a fermentação do mosto das diferentes frutas a levedura seja a mais adaptada às condições a que elas serão submetidas, sendo necessário o isolamento de uma cepa considerada ideal para cada fruta.

1.7.3 Processo fermentativo

A fermentação alcoólica é o processo biológico na qual leveduras convertem açúcares em energia para a célula, com a produção de metabólitos como etanol e dióxido de carbono. Utiliza o produto da glicólise, o piruvato, na produção do etanol em situações anaerobióticas. Na presença de oxigênio, a levedura tem preferência pelo ciclo respiratório, entretanto na ausência de O₂ ou em altas concentrações de glicose, mesmo em ambientes aeróbicos, as leveduras optam pela via fermentativa (efeito Crabtree). Esta via tem como objetivo a regeneração do NAD⁺ e, para isso, direciona o piruvato à descarboxilação pela piruvato descarboxilase com a participação de tiamina formando acetaldeído e liberando CO₂. Em seguida o acetaldeído é reduzido pela desidrogenase

alcoólica gerando etanol e regenerando NAD^+ . Dessa forma, leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de produzir dois moles de etanol, dois moles de gás carbônico e 2 ATP para cada mol de glicose (Figura 1)

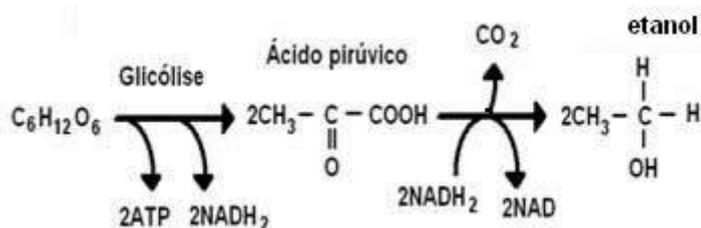


Figura 1: Esquema simplificado da fermentação alcoólica

Um vinho pode ser produzido através de fermentação espontânea ou inoculação de fermento selecionado. As fermentações espontâneas são aquelas realizadas de maneira natural, através das leveduras presentes na casca da fruta. Nesse tipo de fermentação, não há inoculação externa, assim sendo, ela será realizada por diversas espécies de leveduras diferentes, e não apenas por uma única espécie, como o que acontece quando há inoculação de leveduras fermentadoras selecionadas. A vantagem desse tipo de fermentação é, ao final do processo, possuir um vinho de caráter único, embora também haja desvantagens como a possível presença de organismos deteriorantes, prejudicando a qualidade do vinho.

Em vinhos de uva, geralmente o primeiro estágio da fermentação espontânea é realizada predominantemente pela levedura apiculada *Hanseniaspora uvarum* e sua forma anamórfica, *Kloeckera apiculata*, juntamente com *Candida*, até o nível de etanol chegar a 3-4%. A partir desse momento, outras leveduras, como *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* e *Pichia* passam a prevalecer no processo (JIMENEZ-CLEMENTE, et. al., 2004; ROSINI, G., FEDERICI e MARTINI, 1982; PARISH, CARROL, 1985). O estágio final da fermentação espontânea é sempre dominado pelo grupo de leveduras álcool-tolerantes *Saccharomyces sensu stricto*. Este grupo consiste de quatro espécies: *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus* e *Saccharomyces pastorianus*. Às vezes, outras leveduras não-*Saccharomyces* também estão presentes no final da fermentação, como *Bretanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces* (REDZEPOVÍC et. al., 2002).

A combinação de leveduras que atuarem no processo fermentativo determinará a qualidade do vinho, pois cada uma pode produzir metabólitos favoráveis ou desfavoráveis, em altas ou pequenas concentrações. Por exemplo, algumas leveduras são capazes de realizar fermentação

gliceropirúvica antes da alcoólica, quando as quantidades de piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase ainda são limitadas. Nessa via, o NADH é reoxidado a NAD^+ através da conversão de di-hidroxiacetona fosfato em glicerol-3-fosfato, o qual é desfosforilado gerando glicerol, enquanto que parte do piruvato reage com o acetaldeído ativo ligado ao pirofosfato de tiamina gerando ácido α -acetolático, que pode ser transformado em diacetil, acetoina e 2,3-butanediol, compostos que atribuem aroma amanteigado ao vinho (Spadari, 2014). O glicerol é o sub-produto mais abundante da fermentação do vinho depois do etanol e do dióxido de Carbono. Esse poliálcool não contribui diretamente no aroma do vinho, pois não é volátil, mas contribui na doçura, corpulência e suavidade (Swiegers, et al, 2005). Tipicamente, os níveis de glicerol variam de 1 a 15 g.L^{-1} (Taherzadeh et al, 2002). Noble e Bursik (1984) verificaram que o sabor do glicerol é percebido em vinhos quando a sua concentração é superior a 5,2 g.L^{-1} .

As leveduras podem também produzir ácido acético a partir de acetil-CoA (VERDHUYN et al., 1990) ou a partir da oxidação do acetaldeído (Spadari, 2014.). O ácido acético é o principal componente da acidez volátil. Altas concentrações de ácido acético fornecem um sabor pronunciado de vinagre (Siebert et al, 2005). As concentrações de ácido acético nos vinhos geralmente giram em torno de 0,5 g.L^{-1} e devem estar abaixo de 0,8 g.L^{-1} (Ribeiro et al, 2014). O acetaldeído é um dos compostos carbonílicos mais comuns nos vinhos, com concentrações que variam de 13 a 30 mg.L^{-1} (Reddy et al, 2005). Alguns aldeídos contribuem para aromas descritos como “maçã machucada” e “noz”, mas também podem indicar oxidação do vinho (Swiegers et al, 2005). Depois do etanol, os ácidos orgânicos são as substâncias que mais contribuem para o sabor dos vinhos. A acidez destas bebidas procede tanto do mosto quanto da fermentação alcoólica, de modo que o pH final situa-se normalmente entre 2,0 e 4,0. Valores de pH acima de 4,0 tornam os vinhos sujeitos a alterações microbiológicas e de cor.

Já os álcoois superiores e seus ésteres são subprodutos derivados do catabolismo de aminoácidos e anabolismo de carboidratos realizados pelas leveduras a fim de produzir aminoácidos, bases nitrogenadas e outras moléculas que contenham nitrogênio (COPPOLA, 1982). Nas concentrações entre 140 a 420 mg.L^{-1} , os álcoois superiores contribuem favoravelmente à qualidade sensorial, entretanto valores acima desse limite podem tornar o aroma “asfixiante” (Bertrand, 1981; Zoecklein et al., 1989). De maneira geral, os álcoois superiores apresentam aromas desagradáveis definidos como solvente (álcool isoamílico) ou repolho cozido (metionol). A exceção é o feniletanol, que contribui com aroma de rosas. No entanto, quando acetilados, são capazes de fornecer aromas agradáveis como o acetato de isoamila (banana) ou acetato de feniletila

(rosas) (Spadari, 2014). Os ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média fornecem aromas de flores e frutas. Os ésteres são em geral hidrolizados durante o envelhecimento em garrafa, sendo característicos de vinhos jovens (Spadari, 2014).

Outros subprodutos que algumas leveduras podem produzir durante a fermentação alcoólica são o gás sulfídrico (H_2S), produto do metabolismo de compostos inorgânicos e cisteína que fornece um aroma desagradável ao vinho (Pretorius, 2000; Mendes-Ferreira et al., 2010); β -glicosidasas que aumentam a intensidade de aromas varietais (Hernández, 1995; Fia et al., 2005); monoterpenos, como geraniol, linalol, citronelol e α -terpineol capazes de alterar características organolépticas dos vinhos; fenóis voláteis a partir da degradação de ácidos hidroxicinâmico, cumárico e ferúlico presentes nos mostos, que, dependendo da concentração, podem imprimir características desejáveis ou indesejáveis nos vinhos, entre outros inúmeros compostos secundários capazes de contribuir na qualidade do produto final. O teor médio de metanol pode estar relacionado ao conteúdo de pectina presente no mosto (San Miguel, 1982 e Nykanen, 1986). O ácido succínico geralmente fornece um sabor salgado e amargo.

2. JUSTIFICATIVA

Este estudo visa o desenvolvimento de um novo produto biotecnológico utilizando substratos e matérias primas 100% nacionais, impulsionando os conhecimentos em relação à prática vinícola e incentivando a pesquisa brasileira nessa área, tornando possível a obtenção de *know-how* suficiente para que futuramente o Brasil possa competir com os vinhos produzidos nos países europeus.

O abacaxi é uma fruta consumida quase que exclusivamente *in natura*, tendo seu aproveitamento industrial muito limitado. A elaboração de um vinho de abacaxi seria capaz de impulsionar a economia, uma vez que pode utilizar as frutas que foram machucadas durante a pós-colheita e que seriam jogadas fora, gerando desperdícios, e, assim, diminuir perdas econômicas. O fermentado de frutas também garante a utilização das sobras de eventuais superproduções, evitando o apodrecimento, uma vez que um vinho devidamente armazenado pode manter-se próprio para o consumo por anos.

Além disso, os produtos secundários da fermentação alcoólica trazem inúmeros benefícios à saúde humana. O vinho de uva pode apresentar certa adstringência e amargura, contribuindo para que muitas pessoas não gostem dessa bebida. O clima no Brasil também não favorece o consumo de vinho tinto, pois é um país de clima predominantemente tropical, com exceção do sul do Brasil, onde o consumo é maior. O vinho de abacaxi, entretanto, possui um aroma muito pronunciado, o que torna a bebida indicada para o consumo no verão, em temperatura relativamente baixa, de 12 °C a 14 °C, o que pode atrair consumidores do Brasil todo.

A elaboração do fermentado de abacaxi é quase que exclusivamente caseira. Assim sendo, não há uma padronização quanto às melhores técnicas de produção, sendo feito de maneira semelhante à produção do vinho da uva. Um estudo que leve em consideração as propriedades do abacaxi poderia valorizar muito mais essa bebida, melhorando suas características organolépticas e tornando o produto final com uma aceitabilidade de proporções consideráveis e talvez constituir um mercado consumidor suficiente para produção em escala de comercialização.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar uma cepa de levedura com uso potencial como *starter* na produção de fermentado de abacaxi.

3.2 Objetivos Específicos:

- Isolar leveduras a partir de diferentes fases da fermentação espontânea do mosto de abacaxi.
- Caracterizar os isolados fenotipicamente e confirmar a sua identificação através de seqüenciamento do domínio D1/D2 da subunidade grande ribossomal 26S.
- Avaliar a tolerância dos isolados a altas concentrações de glicose, etanol, fermentação de glicose e produção de H₂S e selecionar isolados com potencial uso como *starter* na fermentação do suco de abacaxi
- Submeter o mosto de abacaxi à fermentação utilizando os isolados selecionados
- Avaliar o produto final em relação a características químicas e sensoriais.

4. METODOLOGIA

4.1 Isolamento de leveduras

Um abacaxi da variedade Pérola foi obtido de um mercado local, lavado com água e sabão, descascado com faca previamente esterilizada, macerado utilizando cadinho e pistilo autoclavados e o suco foi filtrado com gaze também estéril. Uma parte (35 mL) foi colocada em um tubo falcon de 50 mL com um pequeno furo na tampa, fechado e incubado a 28 °C para permitir fermentação espontânea. Como durante a fermentação os açúcares são consumidos pelas leveduras e convertidos em etanol, dióxido de outros metabólitos, e há liberação do CO₂, o mosto perde massa e assim é possível monitorar o avanço da fermentação. O tubo falcon foi pesado diariamente e cada estabilização no peso foi considerada uma fase.

Outra parte do suco (10 mL) foi adicionada a um tubo de ensaio e, a partir deste, foram feitas cinco diluições em série com água destilada estéril. Adicionou-se 1 mL do suco em um tubo contendo 9 mL de água e, desta solução, foi retirada 1 mL e adicionada a outro tubo também com 9 mL de água, e assim sucessivamente, até resultar nas concentrações finais de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi colocada no centro de uma placa de Petri contendo Agar YPG (1% de Extrato de Levedura, 1% de Peptona, 2% de glicose e 2% de Ágar) suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski. Para cada concentração, este procedimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C para crescimento das colônias.

As colônias isoladas com características macroscópicas e microscópicas de levedura foram semeadas, através de esgotamento, em outra placa com Agar YPG suplementado com cloranfenicol e incubadas a 28 °C durante 48 horas. Finalizada a fermentação espontânea e determinada a quantidade de fases que possui a fermentação de abacaxi, um tubo para cada fase, cada um contendo 35 mL de suco de abacaxi, foram submetidos à fermentação espontânea a 28 °C e, a cada fase, o mesmo procedimento de isolamento descrito acima foi realizado.

4.2 Preparo do inóculo

Para cada experimento, os isolados foram plaqueados com auxílio de uma alça microbiológica estéril, por esgotamento, em placas de Petri contendo YPG 2% e incubadas a 28 °C por 48 horas.

4.3 Teste de exclusão por estresse

Foram realizados testes de exclusão para selecionar os isolados que apresentam características enológicas de interesse e rejeitar os demais. As leveduras foram primeiramente submetidas a testes de fermentação de glicose e, aquelas consideradas fermentadoras, foram submetidas a testes de estresse em meios contendo altas concentrações de etanol, glicose e através da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S).

4.3.1 Testes da capacidade fermentativa de glicose

Para verificar a capacidade fermentativa de cada levedura, elas foram cultivadas conforme descrito em 4.2 e, com auxílio de uma alça estéril, uma pequena quantidade de uma colônia isolada foi inoculada em um tubo de ensaio fechado com bucha contendo 5 mL de meio líquido MBF (0,75% peptona, 0,45% extrato de levedura e 2% glicose) e um tudo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 28 °C e lidos nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 21 após o inóculo. Foram consideradas leituras negativas quando não houvesse acúmulo de gás no tubo de Durham, +1 quando somente 1/3 do tudo de Durham estiver preenchido por gás, +2 quando o gás estiver presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham estiver completamente cheio de gás. O teste foi realizado em duplicata.

4.3.2 Teste de tolerância a etanol

Para verificar tolerância a etanol daqueles isolados que obtiveram um resultado positivo para fermentação de glicose, estes foram primeiramente cultivados em meio YPG líquido a 28 °C durante 48 horas. Foram adicionados 600 µL de cada inóculo em um poço de um carimbo replicador e, utilizando a técnica de *replica-plate*, os isolados foram plaquados em placas de Petri contendo meio Agar YPG suplementado com etanol nas concentrações de 6% (v/v), 12% (v/v) e 18% (v/v). As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas e lidas. As colônias que tiveram um crescimento próximo, igual ou superior ao controle (meio YPG 0% de etanol) nos meios 6% e 12% de etanol foram consideradas tolerantes. O teste foi realizado em duplicata.

4.3.3 Teste de tolerância a altas concentrações de glicose

Para verificar tolerância a altas concentrações de glicose dos isolados que cresceram em etanol, estes foram primeiramente cultivados em meio YPG líquido a 28 °C durante 48 horas. Foram adicionados 600 µL de cada inóculo em um poço de um carimbo replicador e, utilizando a técnica de *replica-plate*, os isolados foram plaquados em placas de Petri contendo meio Agar YPG suplementado com glicose nas concentrações de 30%, 40% e 50%. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas e lidas. As colônias que tiveram um crescimento próximo, igual ou superior ao controle (meio YPG 2% de glicose) foram consideradas tolerantes.

4.3.4 Detecção de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Para detectar a produção de Sulfeto de Hidrogênio pelos isolados, estes foram cultivados em meio YPG líquido a 28 °C durante 48 horas e 600 µL de cada inoculo foram colocados em um poço de um carimbo replicador e, utilizando a técnica de *replica-plate*, os isolados foram plaquados em placas de Petri contendo meio LA (4% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 0,3% de peptona, 0,02% de sulfato de amônio, 0,1% de acetato de chumbo neutro e 2% de Agar) e incubados a 28 °C durante 10 dias. As colônias que apresentaram uma coloração de preto a marrom foram consideradas produtoras de H₂S e as que apresentaram uma coloração de branco a bege foram consideradas não ou pouco produtoras. O teste foi realizado em duplicata.

4.4 Caracterização fenotípica das leveduras

Os isolados que toleraram altas concentrações de glicose e etanol e produziram pouco ou nada de H₂S foram submetidos a testes de identificação fenotípica, como morfologia colonial e celular, assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, fermentação de diversos açúcares e crescimento em meio líquido contendo 10% de NaCl.

4.4.1 Testes morfológicos

As leveduras isoladas foram caracterizadas quanto suas características coloniais e celulares. Para caracterização colonial, foram levados em conta os seguintes aspectos: cor, forma, margem,

elevação e superfície. Para caracterização celular, foi feita observação em microscópio utilizando a técnica de lâmina a fresco e considerados as seguintes características: forma, tamanho e reprodução.

4.4.2 Testes bioquímicos

As leveduras isoladas foram submetidas a testes de crescimento em diferentes fontes de carbono e de assimilação de fontes de nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, fermentação de vários açúcares e crescimento em meio líquido contendo 10% de NaCl.

4.4.2.1 Testes de assimilação de fontes de carbono

As leveduras selecionadas foram primeiramente cultivadas como descrito em 4.2 e, com auxílio de uma alça microbiológica, cada isolado foi inoculado em água destilada por 24 horas de modo que suas reservas de carbono se esgotassem. Em seguida foram inoculadas em placas de Petri contendo 0,67% de meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) acrescido de 2% de Agar Difco e 0,5 % da fonte de carbono a ser testada (glicose, galactose, D- xilose, L-arabinose, D-arabinose, L-ramnose, sacarose, maltose, trealose, inulina, amido solúvel, eritritol, D-glucitol, D-manitol, celobiose, melibiose, lactose, M-inositol, DL-lactato, succinato, citrato, metanol, acetona, isopropanol, N-acetil glicosamina, tween 80), exceto a rafinose, que continha 1% do açúcar. Os isolados foram inoculados utilizando-se um carimbo replicador (técnica de *replica-plate*). As placas foram deixadas em estufa a 28°C e lidas a cada 7 dias durante três semanas. Os isolados foram classificados como positivo (+) aqueles que cresceram, ou seja, são capazes de assimilar a fonte de carbono e como negativos os que não conseguiram crescer. Foi usado como controle negativo o meio YNB sem nenhuma fonte de carbono e como controle positivo o meio YNB acrescido de 0,5% de glicose. O teste foi feito em duplicata.

4.4.2.2 Testes de assimilação de fontes de nitrogênio

As leveduras foram cultivadas como descrito em 4.2 e, com auxílio de uma alça microbiológica, cada isolado foi inoculado em água destilada por 24 horas de modo que suas reservas de nitrogênio se esgotassem. Em seguida foram inoculadas em placas de Petri contendo 1,17% de meio *Yeast Carbon Base* (YCB) acrescido de 2% de Agar Difco e da fonte de nitrogênio a

ser testada (0,078% de nitrato, 0,064% de etilamina, 0,056% de lisina e 0,078% de creatina). Os isolados foram inoculados utilizando-se um carimbo replicador. As placas foram deixadas em estufa a 28°C e lidas a cada 7 dias durante três semanas. Os isolados foram classificados como positivo (+) aqueles que cresceram, ou seja, são capazes de assimilar a fonte de nitrogênio e como negativos os que não conseguiram crescer. Foi usado como controle negativo o meio YCB sem nenhuma fonte de nitrogênio e como controle positivo o meio YCB acrescido de 0,5% de peptona. O teste foi feito em duplicata.

4.4.2.3 Crescimento em diferentes temperaturas

Os isolados foram crescidos em meio líquido YPG por 48 horas, 600 µL de amostra foram colocados em dois poços do carimbo replicador cada, carimbados em placas contendo Agar YPG e incubados em estufas a diferentes temperaturas durante 72 horas. Para verificar o efeito da temperatura no crescimento foram empregados 25 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C. O aspecto das colônias a cada temperatura foi anotado e comparado. O teste foi feito em duplicata.

4.4.2.4 Fermentação de vários açúcares

Os isolados foram cultivados conforme descrito em 4.2 e, utilizando uma alça microbiológica, uma pequena alíquota foi inoculada em tubos de ensaio de vidro fechados com bucha, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos e 5 mL de meio líquido MBF (0,75% peptona, 0,45% extrato de levedura e 2% da fonte de carbono a ser testada). Os tubos foram colocados em estufa a 28 °C e foram observados o crescimento das leveduras pela turvação dos meios e a fermentação pela formação de gás no tubo de Durham. Foi atribuído um valor de 0 a 3 para a capacidade fermentativa de cada levedura para cada fonte de carbono. O valor zero foi atribuído às amostras cujos tubos de Durham não continham nenhum gás. O valor um foi atribuído àqueles cujos tubos de Durham continham 1/3 de seu volume em gás, o valor 2 àqueles cujos tubos continham 2/3 de gás e finalmente o valor três foi atribuído às amostras cujos tubos de Durham estavam completamente cheios de gás. As leituras foram realizadas nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21 após o inóculo e as fontes de carbono utilizadas foram galactose, maltose, rafinose, sacarose e lactose. O teste foi realizado em duplicata.

4.4.2.5 Crescimento em meio NaCl 10%

Os isolados foram incubados em meio NaCl 10% (YNB 0,67%, Glicose 5%, NaCl 10%, ágar 2%) durante três dias. O crescimento foi verificado através da turvação do meio. Foi atribuído valores de 0,5 a 3 de acordo com o nível de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Barnett et al, 2000). O teste foi realizado em duplicata.

4.5 Agrupamento dos isolados por fenótipo

Os resultados dos testes anteriores foram utilizados para classificar os isolados em grupos, de acordo com suas características fenotípicas, e apenas um representante de cada grupo foi identificado molecularmente.

4.6 Identificação molecular

4.6.1 Extração do DNA genômico das leveduras

Os isolados foram cultivados como descrito em 4.2, uma colônia inteira foi suspensa em 400 µL de tampão de lise (0,15 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 2% de SDS, pH 8,0) em tubos *ependorf*, que foram vortexados até a solução ficar homogênea. Incubou-se em banho-maria a 65 °C por 60 minutos e adicionou-se 200 µL de Acetato de Potássio a 5 M e pH 4,8. Os tubos foram vortexados durante 30 segundos e incubados em gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi passado a outro tubo *ependorf*, que foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido a um novo tubo. Foi adicionado a estes 1,0 mL de isopropanol a -20 °C e os tubos foram manualmente agitados de maneira suave durante 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% a -20 °C, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram deixados abertos dentro do fluxo laminar para que o *pellet* secasse. Estando seco, o *pellet* foi suspenso em 50 µL de TRIS-EDTA a pH 7,4, adicionou-se 2,5 µL de RNase e os tubos foram incubados em banho-maria a 60 °C por 30 minutos. Foi realizado eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação de extração.

4.6.2 Quantificação e diluição do DNA genômico

Foi realizada uma quantificação indireta do DNA genômico extraído através da intensidade da banda em gel de agarose 1%. As amostras cujas bandas estavam muito fortes foram diluídas 100x em água ultra pura e de bandas médias, 10x.

4.6.3 Amplificação do DNA genômico pela reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 μL , contendo 13,9 μL de água ultra pura, 2,5 μL de tampão, 0,3 μL de dNTPs, 0,8 μL de *primer* senso, 0,8 μL de *primer* anti-senso, 1,5 μL de MgCl_2 , 0,2 μL de Taq DNA Polimerase e 5 μL do DNA diluído.

Foi amplificado o domínio D1/D2 da subunidade grande do gene ribossomal 26S. Os *primers* utilizados foram:

NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e

NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

As reações de amplificação (PCR) foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, hibridização a 55 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. A eficácia da amplificação foi visualizada em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT®.

4.6.4 Sequenciamento e identificação molecular

Os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados pela Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os sequenciamentos foram comparados com sequências relatadas no GenBank usando o algoritmo "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)" e as leveduras isoladas foram identificadas.

4.7 Fermentação

O suco de abacaxi foi primeiramente filtrado com membrana Millipore de 22 µm. Em seguida, foram transferidos assepticamente 5 mL do mosto (suco de abacaxi) para vials de 10 mL. O inóculo de cada isolado foi previamente cultivado a 25 °C durante 24 horas em caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 2,0% de peptona, 2,0 de d-glicose). As células de leveduras em crescimento exponencial foram utilizadas para ajustar o número de células final em $2,0 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, foram inoculados 100 µL de cada isolado para o mosto e incubados a 25 °C durante 48 horas.

4.8 Análises de compostos voláteis

4.8.1 Preparo de amostra

Uma fibra de SPME composta por divinilbenzeno/ carboxeno/ polidimetilsiloxano 50/30 mm (DVB/CAR/PDMS), obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA) foi inicialmente condicionada de acordo com as recomendações do fabricante. Em um vial de 20 mL foram adicionados 5mL de amostra e 1,5 g de NaCl. O procedimento de extração de compostos voláteis foi realizado utilizando o amostrador automático Triplus-RSH (Thermo Fischer Scientific, USA) e o software ChromQuest (Thermo Fischer Scientific, USA). As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura de 56 °C e, posteriormente a fibra foi exposta no headspace (HS) por 55 minutos. A adsorção no injetor do cromatógrafo a gás foi realizada por 2 minutos a temperatura de 265 °C no modo splitless.

4.8.2 Análises qualitativas

Um cromatógrafo gasoso Varian CP-3900 (USA) equipado com um espectrômetro de massas íon trap Varian Saturn 4000 e o software Workstation Saturn GC-IT/MS versão 5.51 foram utilizados para identificação dos compostos voláteis no extrato de abacaxi. A separação cromatográfica foi realizada empregando uma coluna ZB-WAXplus (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) da Zebron (USA) e gás hélio como carreador a um fluxo constante de 1,0 mL/ min. A temperatura inicial do forno era de 40 °C por 5 minutos, aumentado 2 °C por minuto até atingir 220 °C. O detector íon trap foi operado a temperatura de 200 °C no transferline, 50 °C no manifold e 180 °C no trap. Todos os espectros de

massa foram obtidos por impacto de elétrons (EI), no modo fullscan (25 – 350 m/z). A corrente de emissão era de 50 μ A, com um tempo máximo de ionização de 25000 μ s.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção obtido para a amostra em relação aos padrões dos compostos voláteis injetados sob as mesmas condições e, baseada nos espectros de massa confrontados àqueles presentes na base de dados espectrais do National Institute of Standards and Technology (NIST) MS 05, considerando similaridades acima de 70%.

4.8.3 Análises quantitativas

As análises quantitativas foram executadas em um cromatógrafo a gás ThermoScientific Trace 1310 (USA) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e o software ChromQuest. A separação cromatográfica foi realizada empregando uma coluna ZB-WAXplus (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) da Zebron (USA) e gás nitrogênio como carreador a um fluxo de 1,0 mL/ min. A temperatura inicial do forno era de 40 °C por 5 minutos, aumentado 2 °C por minuto até atingir 220 °C. A identificação foi efetuada através do tempo de retenção, comparando-se com os padrões dos compostos voláteis e, a quantificação foi por padronização interna, com 4-metil 2-pentanol como padrão interno.

4.8.4 Cálculo do valor de atividade olfativa

O valor de atividade olfativa (Odour activity value - OAV) foi calculado para cada composto dividindo-se a média das concentrações encontradas pelo limiar de percepção olfativa descritos na literatura. Os compostos cujos valores de OAV estavam abaixo de 1 foram considerados como sendo irrelevantes na contribuição para o aroma (não perceptíveis pelo olfato humano), enquanto que compostos cujos valores de OAV > 1 foram considerados como participantes para o aroma do vinho de abacaxi.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento de leveduras do suco de abacaxi

O suco de um abacaxi da variedade Pérola foi inicialmente utilizado para isolamento de leveduras e para caracterização das fases da fermentação espontânea. Nesse primeiro isolamento, foram obtidas 12 colônias com morfologia de levedura, sendo denominadas CFO1, CFO5, CFO6, CFO8, CFO9, CFO10, CFO11.2, CFO 12, CFO 13, CFO 14, CFO 14.2 e CFO15. Essas leveduras são representantes da micobiota leveduriforme do abacaxi não fermentado.

5.2 Caracterização das fases da fermentação espontânea

O tubo falcon que continha 35 mL de suco de abacaxi, incubado a 28 °C para permitir a fermentação espontânea, foi pesado todos os dias até a estabilização do peso, indicando o término da fermentação. A curva de fermentação encontrada foi a seguinte:

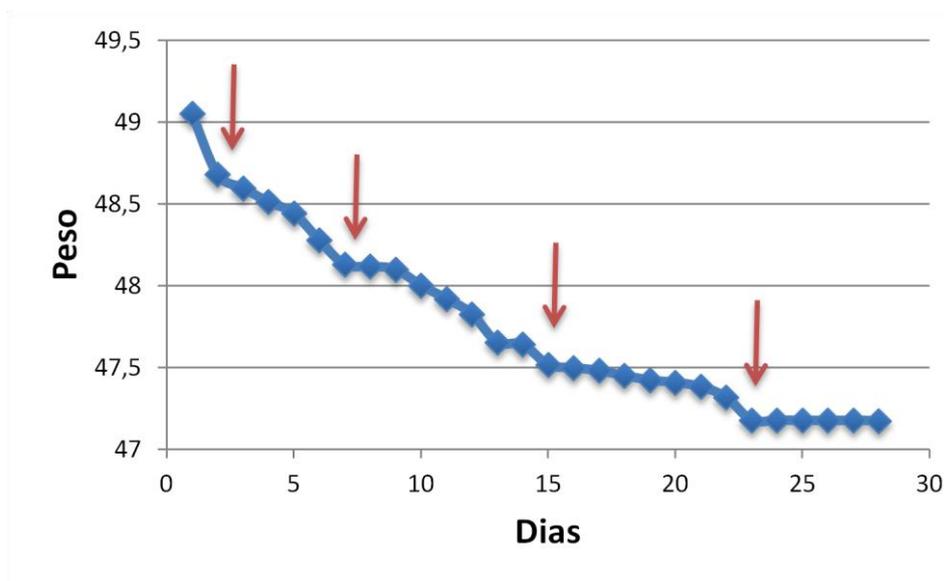


Figura 2: Curva de fermentação espontânea do suco de abacaxi. As setas indicam cada fase da fermentação, definida como sendo uma breve estabilização no peso do tubo falcon.

De acordo com a Figura 2, a fermentação do suco de abacaxi possui quatro fases: uma até o dia 2, outra até o dia 7, outra até o dia 15 e outra até o dia 23, quando o peso do tubo Falcon estabilizou. Uma fase foi considerada como sendo o ponto no qual ocorre um declínio significativo do

peso, seguido de uma breve estabilização e novo período de declínio. Essas fases foram utilizadas para o isolamento de leveduras durante o processo de fermentação espontânea do suco de abacaxi.

5.3 Isolamento de leveduras durante a fermentação espontânea

Quatro tubos falcons contendo 35 mL de suco de abacaxi cada foram incubados a 28°C para fermentação espontânea. Cada tubo falcon foi utilizado para obtenção de amostras de uma fase da fermentação. Os isolamentos foram realizados como descrito em 4.1. Durante a primeira fase, realizada no segundo dia da fermentação, foram isoladas 12 leveduras, que foram denominadas de seguinte forma: LIA1, LIA2, LIA3, LIA4, LIA5, LIA6, LIA7, LIA8, LIA9, LIA10, LIA11 e LIA12. Na fase 2, após 7 dias de fermentação, foram isoladas 11 leveduras: LIA13, LIA14, LIA15, LIA16, LIA17, LIA18, LIA19, LIA20, LIA21, LIA22 e LIA23. Após 15 dias, durante a fase 3, 10 leveduras foram isoladas: LIA24, LIA25, LIA26, LIA27, LIA28, LIA29, LIA30, LIA31, LIA32 e LIA33. Na última fase, apenas quatro leveduras puderam ser isoladas: LIA34, LIA35, LIA36 e LIA37.

5.4 Testes de exclusão

Esses testes foram realizados para excluir isolados de leveduras que não fossem interessantes para o posterior uso na fermentação do suco de abacaxi.

5.4.1 Fermentação de glicose

Todos os isolados foram submetidos a testes de fermentação de glicose. Após 48 horas de crescimento em meio Agar GYP para que as células estivessem metabolicamente ativas, as leveduras foram inoculadas em um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido MBF (0,75% peptona, 0,45% extrato de levedura e 2% glicose) e um tubo de Durham invertido, com auxílio de uma alça microbiológica. Os tubos foram incubados a 28 °C e lidos nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 21 após o inóculo. Foram consideradas leituras negativas quando não houvesse acúmulo de gás no tubo de Durham, +1 quando somente 1/3 do tubo de Durham estivesse preenchido por gás, +2 quando o gás estivesse presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham estivesse completamente cheio de gás,

como mostrado na Figura 3. As cepas com resultado +2 e +3 foram consideradas fermentadoras e os resultados encontram-se na Tabela 7.

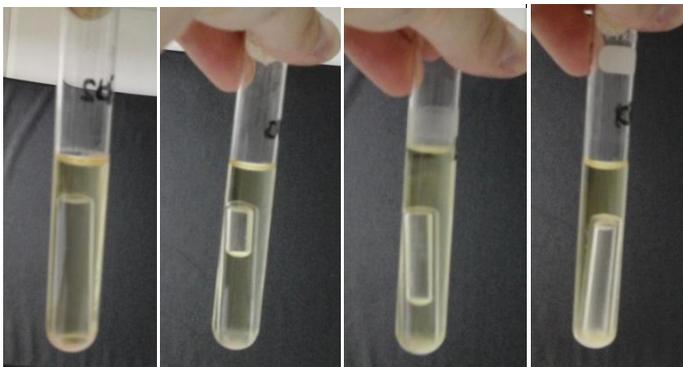


Figura 3: Imagens representativas dos resultados do teste de fermentação de glicose. Da esquerda para a direita: resultado negativo, resultado +1, resultado +2 e resultado +3.

Tabela 7: Resultado dos testes de fermentação das leveduras isoladas do suco de abacaxi natural e fermentado espontaneamente.

Isolado	Dia da Leitura							
	1	2	3	4	7	9	14	21
CFO1	0,5	3	-	-	-	-	-	-
CFO5	0	0	0	0	0	0	0	0
CFO6	3	-	-	-	-	-	-	-
CFO8	0	0	0	0	0	0	0	0
CFO9	0	0,5	3	-	-	-	-	-
CFO10	0	0	0	0	0	0	0	0
CFO11.2	0	0	0	0	0	0	0	0
CFO12	0	0	0	0	0	0	0	0
CFO13	3	-	-	-	-	-	-	-
CFO14	0	1	3	-	-	-	-	-
CFO14.2	0	0	0	0	0	0	0	0
CFO15	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA1	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA2	0	0,5	3	-	-	-	-	-
LIA3	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA4	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA5	0	0,5	3	-	-	-	-	-
LIA6	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA7	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA8	0	0	3	-	-	-	-	-
LIA9	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA11	0	0	0	3	-	-	-	-
LIA12	0	0	2,5	3	-	-	-	-
LIA13	3	-	-	-	-	-	-	-
LIA14	0	0	0,5	3	-	-	-	-
LIA15	2,5	3	-	-	-	-	-	-
LIA16	3	-	-	-	-	-	-	-

LIA17	0	0	1	3	-	-	-	-
LIA18	3	-	-	-	-	-	-	-
LIA19	1	3	-	-	-	-	-	-
LIA20	3	-	-	-	-	-	-	-
LIA21	0,5	3	-	-	-	-	-	-
LIA22	3	-	-	-	-	-	-	-
LIA23	0	1	3	-	-	-	-	-
LIA24	3	-	-	-	-	-	-	-
LIA25	0	1,5	3	-	-	-	-	-
LIA26	3	-	-	-	-	-	-	-
LIA27	0	3	-	-	-	-	-	-
LIA28	0,5	3	-	-	-	-	-	-
LIA29	0	3	-	-	-	-	-	-
LIA30	2,5	3	-	-	-	-	-	-
LIA31	0	3	-	-	-	-	-	-
LIA32	0	3	-	-	-	-	-	-
LIA33	3	-	-	-	-	-	-	-
LIA34	0	3	-	-	-	-	-	-
LIA35	0	0	0	0	0,5	3	-	-
LIA36	1	3	-	-	-	-	-	-
LIA37	0	2	3	-	-	-	-	-

De acordo com essa tabela, foi possível classificar os isolados em dois grupos: Fermentadoras e Não Fermentadoras como mostrado a seguir:

Fermentadoras: CFO1, CFO6, CFO9, CFO13, CFO14, LIA2, LIA5, LIA8, LIA11, LIA12, LIA13, LIA14, LIA15, LIA16, LIA17, LIA18, LIA19, LIA20, LIA21, LIA22, LIA23, LIA24, LIA25, LIA26, LIA27, LIA28, LIA29, LIA30, LIA31, LIA32, LIA33, LIA34, LIA35, LIA36 e LIA37.

Não Fermentadoras: CFO5, CFO8, CFO10, CFO11.2, CFO12, CFO14.2, CFO15, LIA1, LIA3, LIA4, LIA6, LIA7, LIA9 e LIA10.

Apenas as leveduras fermentadoras prosseguiram nos experimentos.

5.4.2 Teste de tolerância a etanol

As leveduras que foram consideradas positivas para fermentação de glicose foram incubadas em meio YPG suplementado com 6% (v/v), 12% (v/v) e 18% (v/v) de etanol e as colônias que tiveram um crescimento próximo, igual ou superior ao controle nos meios 6% e 12% de etanol foram consideradas tolerantes ao etanol. O isolado LIA11 não cresceu nos meios Agar GYP e não foi possível recuperá-lo de qualquer outra forma, não sendo possível submetê-lo a este teste. O teste foi realizado conforme o esquema mostrado na Figura 4. Todas as cepas testadas foram tolerantes a 6 e 12% de etanol (Figura 5).

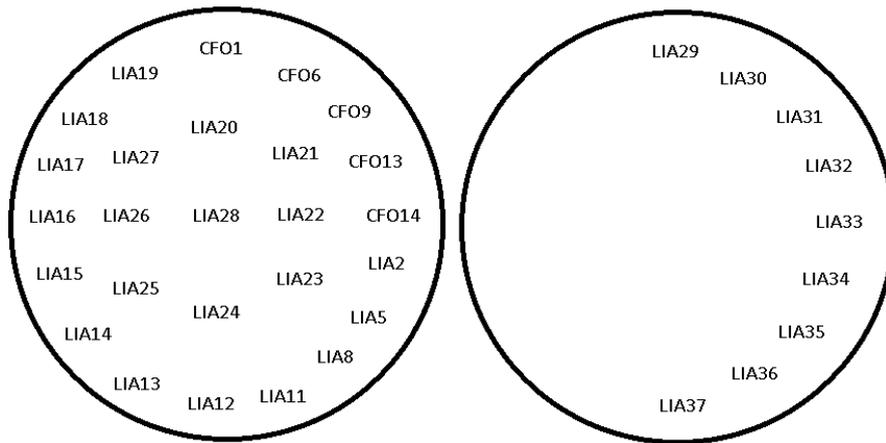


Figura 4: Esquema da inoculação das leveduras para a realização dos testes de exclusão em placa.

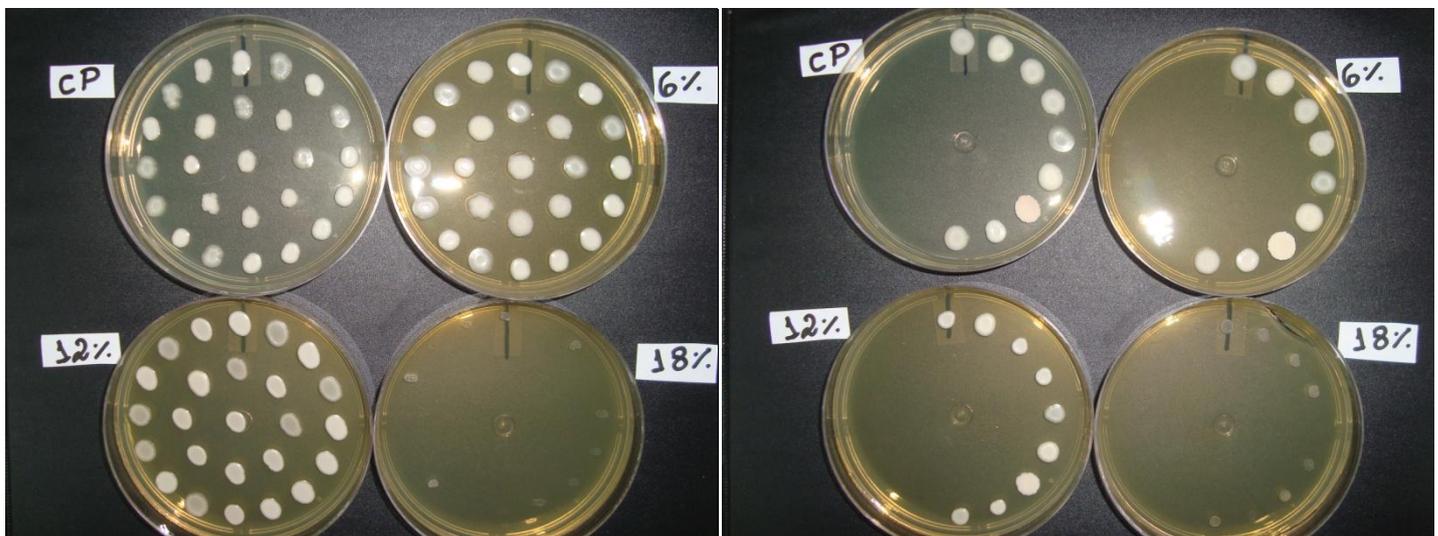


Figura 5: Resultado do teste de tolerância ao etanol.

5.4.3 Teste de tolerância a altas concentrações de glicose

Os isolados foram crescidos em meio YPG contendo 30%, 40% e 50% de glicose e um meio YPG acrescido de 2% de glicose como controle. O isolado LIA11 não cresceu nos meios nos meios Agar GYP, não sendo possível submetê-los a este teste. Os testes foram realizados em duplicata. Os inóculos foram feitos de acordo com o esquema da Figura 4 e, conforme mostrado na Figura 6, todos os isolados conseguiram tolerar bem altas concentrações de glicose.

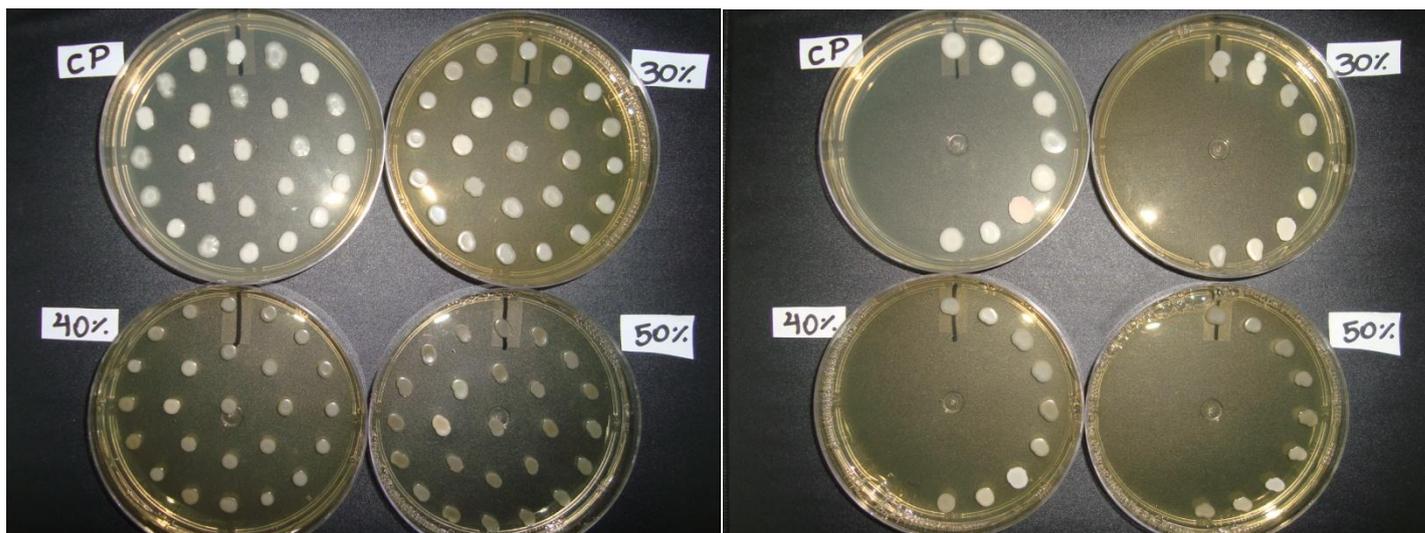
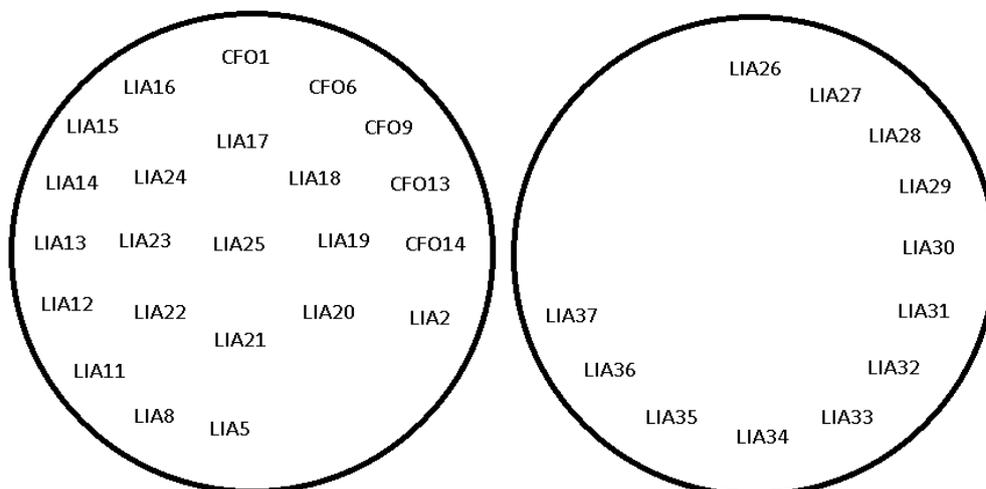


Figura 6: Resultado do teste de tolerância a altas concentrações de glicose.

5.4.4 Detecção de produção de H₂S

Para detectar produção de Sulfeto de Hidrogênio pelos isolados, estes foram cultivados em meio LA. As colônias que apresentaram uma coloração de preto a marrom foram consideradas produtoras e as que apresentarem uma coloração de branco a bege foram consideradas não ou pouco produtoras. Os testes foram realizados em duplicata. Conforme mostrado na Figura 7, os isolados CFO1, CFO6, CFO9, CFO14, LIA8, LIA11, LIA14, LIA17, LIA19, LIA21, LIA23, LIA24, LIA25, LIA27, LIA28, LIA29, LIA30, LIA31, LIA32 e LIA37 foram consideradas positivas para produção de H₂S e não seguiram adiante nos testes de identificação. Os isolados CFO13, LIA2, LIA5, LIA12, LIA13, LIA15, LIA16, LIA18, LIA20, LIA22, LIA26, LIA33, LIA34, LIA35 e LIA36 foram consideradas não produtoras de H₂S e seguiram para os testes de identificação.



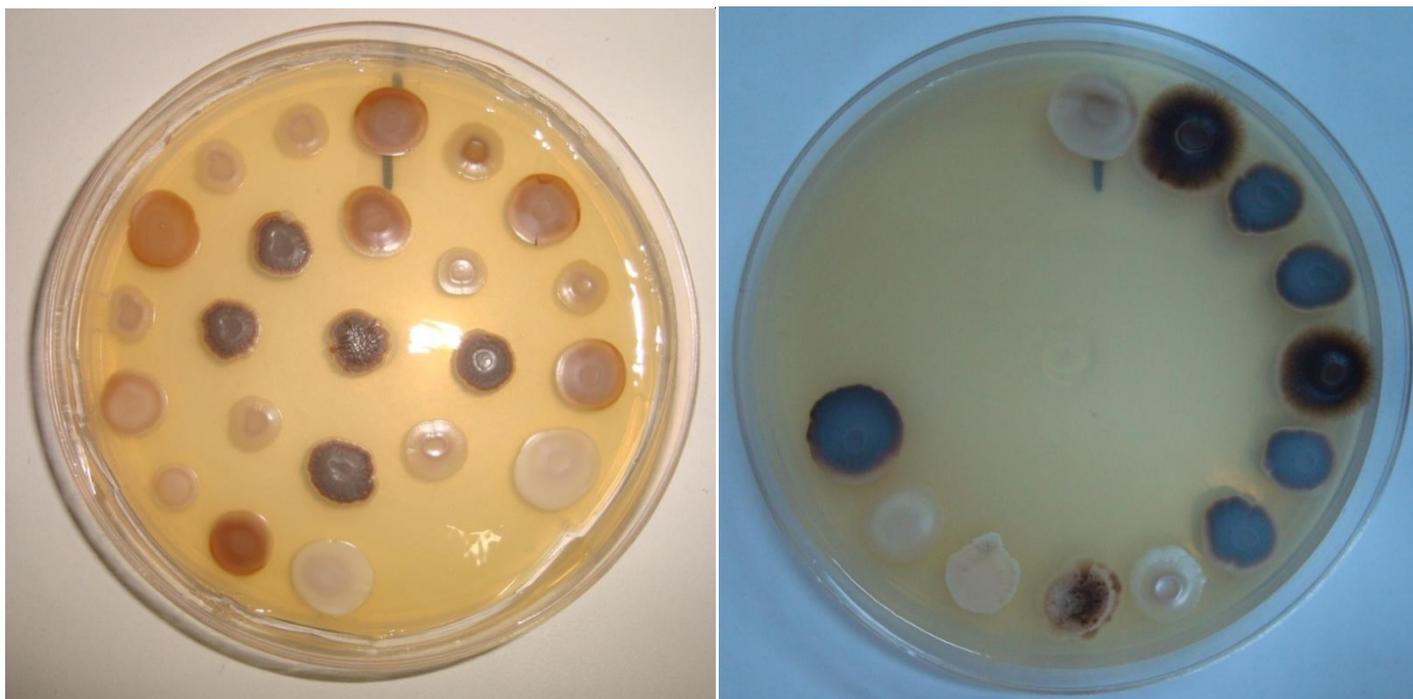


Figura 7: Resultado do teste de produção de H₂S.

Assim sendo, apenas os isolados CFO13, LIA2, LIA5, LIA12, LIA13, LIA15, LIA16, LIA18, LIA20, LIA22, LIA26, LIA33, LIA34, LIA35 e LIA36 seguiram para os próximos testes.

5.5 Identificação fenotípica das leveduras

5.5.1 Morfologia

5.5.1.1 *Morfologia colonial*

Os isolados foram classificados quanto à sua morfologia colonial cultivados sem estresse (Agar YPG a 28 °C). A Tabela 8 exhibe os resultados:

Tabela 8: Morfologia colonial das leveduras selecionadas.

Cor	CFO13	LIA2	LIA5	LIA12	LIA13	LIA15	LIA16	LIA18	LIA20	LIA22	LIA26	LIA33	LIA34	LIA35	LIA36
Branca	x		x						x	x					x
Creme		x		x	x	x	x	x			x	x	x		
Rosada														x	
Margem															
Inteira	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Lobulada														x	
Elevação															
Plana															
Convexa	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Forma															
Circular	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Irregular														x	
Superfície															
Lisa	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Rugosa														x	

5.5.1.2 Morfologia celular

Os isolados foram caracterizados quanto à sua morfologia celular em relação à forma, tamanho e reprodução (Tabela 9):

Tabela 9: Morfologia celular das leveduras selecionadas.

	CFO13	LIA2	LIA5	LIA12	LIA13	LIA15	LIA16	LIA18	LIA20	LIA22	LIA26	LIA33	LIA34	LIA35	LIA36
Morfologia Celular															
- apiculada	x	x			x	x	x	x							
- redonda			x	x							x		x		x
- elíptica									x	x		x		x	
Tamanho															
- pequena															
- média	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
- grande															
Reprodução															
Brotamento	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fissão															
Esporulação															
Tipo de Brotamento															
Unipolar															
Bipolar	x				x	x	x	x		x		x			
Multipolar		x	x	x					x		x		x	x	x

5.5.2 Testes de assimilação de fontes de carbono

Os isolados foram cultivados em meio YNB contendo diferentes fontes de carbono e classificados como positivo (+) aqueles que cresceram, ou seja, são capazes de assimilar a fonte de carbono e como negativos os que não cresceram.

Tabela10: Resultado da assimilação de fontes de carbono pelos isolados

	CFO13	LIA2	LIA5	LIA12	LIA13	LIA15	LIA16	LIA18	LIA20	LIA22	LIA26	LIA33	LIA34	LIA35	LIA36
CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
D-xilose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-arabinose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Trealose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Inulina	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Amido solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucitol	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
D-manitol	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
M-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopropanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil Glicosamina	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.5.3 Testes de assimilação de fontes de nitrogênio

Os isolados foram cultivados em meio YCB contendo diferentes fontes de carbono e classificados como positivo (+) aqueles que cresceram, ou seja, são capazes de assimilar a fonte de nitrogênio e como negativos os que não cresceram.

Tabela 11: Resultado da assimilação de fontes de nitrogênio pelos isolados

	CFO13	LIA2	LIA5	LIA12	LIA13	LIA15	LIA16	LIA18	LIA20	LIA22	LIA26	LIA33	LIA34	LIA35	LIA36
CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peptona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kreatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.5.4 Crescimento em diferentes temperaturas

Os isolados selecionados foram testados quanto à capacidade de crescimento a diferentes temperaturas (25, 30, 37, 40 e 42 °C). Os testes foram realizados em meio sólido para, além de

visualizar a capacidade de crescimento (tamanho da colônia) também ser possível visualizar a mudança na morfologia da colônia de acordo com a temperatura. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Crescimento das leveduras selecionadas em diferentes temperaturas.

	CFO13	LIA2	LIA5	LIA12	LIA13	LIA15	LIA16	LIA18	LIA20	LIA22	LIA26	LIA33	LIA34	LIA35	LIA36
Temperatura a 30°C															
Branca, margem lisa, brilhante		X	X	X											
Branca escura, margem irregular, opaca	X				X	X	X	X	X	X					
Branco intenso, liso											X				X
Branca escura												X			
Rosado feipudo														X	
Branca, rugosa no meio												X			
Temperatura 37 °C															
Meio transparente	X				X	X	X	X	X			X			
Branco mais escuro		X	X	X											
Rugosa no meio e transparente nas bordas										X					
Não cresceram											X			X	X
Muito rugosa, branca													X		
Temperatura 40°C															
Positivo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		
Negativo											X			X	X
Temperatura 42°C															
Positivo															X
Negativo	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X		X	X

5.5.5 Fermentação de vários açúcares

Os isolados foram submetidos a testes de fermentação de vários açúcares: galactose, maltose, rafinose e sacarose e foram atribuídos valores de zero a três de acordo com a quantidade de gás contido no tubo de Durham. O valor zero foi atribuído às amostras cujos tubos de Durham não continham nenhum gás. O valor um foi atribuído àqueles cujos tubos de Durham continham 1/3 de seu volume em gás, o valor 2 àqueles cujos tubos continham 2/3 de gás e, finalmente, o valor três foi atribuído às amostras cujos tubos de Durham estavam completamente cheios de gás. Os resultados podem ser vistos na Tabela 13:

Tabela 13: Resultados dos testes de fermentação de diversos açúcares.

	Lactose								Galactose								Maltose								
	1	2	3	4	7	9	14	21	1	2	3	4	7	9	14	21	1	2	3	4	7	9	14	21	
CFO13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	-	-	-	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-
LIA35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	Rafinose								Sacarose								
	1	2	3	4	7	9	14	21	1	2	3	4	7	9	14	21	
CFO13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA2	0	0	0	1	2	2	2	2	0	1	3	-	-	-	-	-	
LIA5	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	3	-	-	-	-	
LIA12	0	0	0	0	1	2	2	2	0	0	3	-	-	-	-	-	
LIA13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA26	0	1	2	2	2	2	2	2	3	-	-	-	-	-	-	-	
LIA33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA34	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	-	-	-	-	-	-	
LIA35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LIA36	0	1	1	1	2	2	2	2	3	-	-	-	-	-	-	-	

5.5.6 Crescimento em meio NaCl 10%

Os isolados foram incubados em meio NaCl 10% (YNB 0,67%, Glicose 5%, NaCl 10%, ágar 2%) durante três dias a 28 °C. O crescimento foi verificado através da turvação do meio. O resultado segue na tabela a seguir:

Tabela 14: Resultado do teste de crescimento em meio NaCl 10%.

	CFO13	LIA2	LIA5	LIA12	LIA13	LIA15	LIA16	LIA18	LIA20	LIA22	LIA26	LIA33	LIA34	LIA35	LIA36
Negativo			X	X		X	X			X				X	
0,5	X	X						X				X			X
1					X				X		X				
2															
3													X		

5.5.7 Agrupamento dos isolados por fenótipo

Utilizando os resultados dos testes acima descritos, as leveduras selecionadas foram agrupadas, de acordo com os fenótipos, em 6 grupos.

Grupo 1: CFO13, LIA13, LIA15, LIA16, LIA18, LIA20, LIA22 e LIA33

Grupo 2: LIA2 LIA5 e LIA12

Grupo 3: LIA 26

Grupo 4: LIA34

Grupo 5:LIA35

Grupo 6:LIA36

Um representante de cada grupo fenotípico foi selecionado aleatoriamente para identificação molecular. Os isolados selecionados foram:

Grupo 1: LIA12

Grupo 2: LIA20

Grupo 3: LIA26

Grupo 4: LIA34

Grupo 5: LIA35

Grupo 6: LIA36

5.5.8 Identificação molecular

Os isolados selecionados foram identificados conforme mostrado na tabela 15:

Tabela 15: Identificação molecular dos representantes dos grupos fenotípicos das leveduras selecionadas.

LIA12	<i>Pichia caribbica</i>
LIA20	<i>Hanseniaspora lachancei</i>
LIA26	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
LIA34	<i>Candida tropicalis</i>
LIA35	<i>Pichia membranifaciens</i>
LIA36	<i>Torulaspota delbrueckii</i>

5.5.9 Fermentação e análise dos fermentados

Foram realizados testes de fermentação do suco de abacaxi utilizando as leveduras selecionadas como fermentadoras. Os compostos foram analisados por cromatografia gasosa. As concentrações encontradas estão mostradas na Tabela 16. A Tabela 17 mostra os valores de OAV para os compostos que apresentaram OAV>1 para pelo menos uma amostra, o limiar de percepção olfativa e o aroma de cada composto. Os compostos que contribuem negativamente para o aroma do vinho estão marcados em vermelho e os valores de OAV abaixo de 1, que não são percebidos olfativamente, estão em azul. O tempo de retenção de cada composto no cromatógrafo está mostrado na Tabela 18 (Anexos).

Tabela 16: Compostos voláteis produzidos nas fermentações de suco de abacaxi inoculadas com as leveduras selecionadas. Como controles, foram utilizados o suco de abacaxi sem fermentar e a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* SC2048.

Composto	Suco	Suco	LIA 12	LIA 12	LIA 20	LIA 20	LIA 26	LIA 26	LIA 34	LIA 34	LIA 35	LIA 35	LIA36	LIA 36	SC2048	SC2048
Acetato de etila (µg/L)	5,51	6,91	6,74	7,47	3622,66	2216,33	612,84	572,09	43,5	55,33	7,9	7,48	314,05	232,2	180,72	277,38
Metanol (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isobutanoato de etila (µg/L)	42,63	47,8	39,04	37,16	35,86	33,25	-	-	-	-	24,42	21,04	59,39	68,34	-	-
α-pineno (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de isobutila (µg/L)	62,54	65,2	56,15	57,48	-	-	59,05	51,17	65,6	61,4	60,51	55,79	54,03	54,87	56,19	67,92
Sec-butanol (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	447,42	470,83	101,19	158,91	-	-	-	-
Butanoato de etila (µg/L)	1,82	2,27	-	-	43,32	40,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-metilbutanoato de etila (µg/L)	-	-	-	-	-	-	< 28,20	< 28,20	-	-	< 28,20	< 28,20	-	-	-	-
β-pineno (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isovalerato de etila (µg/L)	-	-	34,09	37,42	54,02	40,8	111,29	122,38	158,4	178,83	15,71	14,45	96,76	77,51	32,94	33,23
Acetato de isoamila (µg/L)	-	-	-	-	68,1	65,26	56,84	56,81	64,36	61,1	55,66	57,84	56,95	56,78	92,83	105,02
Pentanoato de etila (µg/L)	-	-	-	-	0,12	0,13	-	-	-	-	7,65	7,66	-	-	-	-
Limoneno (µg/L)	6,53	6,66	10,34	7,48	-	-	25,05	19,88	-	-	19,17	11,89	13,31	17,81	9,29	10,41
1-propanol (µg/L)	-	-	-	-	418,59	485,66	729,78	569,23	490,78	493,33	7,9	8,12	469,69	364,04	472,8	670,04
n-butanol (µg/L)	-	-	-	-	748,94	1000,77	6893,91	5555,78	1267,81	1721,56	136,66	117,39	3998,76	4041,05	1822,36	1734,45
Hexanoato de etila (µg/L)	-	-	70,2	61,1	39,19	39,18	90,93	69,14	67,11	51,39	4,43	6,23	13,83	17,22	185,09	236,75
Acetato de hexila (µg/L)	25	24,93	-	-	25,07	25,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-metil 1-butanol (µg/L)	2,77	2,73	21,56	28,98	5,47	5,76	4,57	6,28	3,67	5,32	4,16	4,33	5,77	6,63	4,28	4,27
Heptanoato de etila (µg/L)	-	-	< 31,18	< 31,18	-	-	-	-	-	-	< 31,18	< 31,18	< 31,18	< 31,18	-	-
1-hexanol (µg/L)	3,62	3,59	-	-	-	-	-	-	-	-	4,51	5,13	-	-	-	-
Octanoato de etila (µg/L)	0,02	0,03	0,91	0,93	18,33	20,6	73,64	68,29	70,04	91,9	0,26	0,24	185,86	212,94	305,14	370,19
Citronelal (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanoato de etila (µg/L)	-	-	3,93	3,17	1,65	2,03	10,57	7,99	7,66	6,05	3,5	3,3	1,29	1,12	7,04	7,65
Cedreno (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-terpineol (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de furfurila (µg/L)	-	-	-	-	253,41	164,97	< 244,22	< 244,22	< 244,22	< 244,22	4,34	4,41	< 244,22	< 244,22	-	-
Álcool furfúrico (µg/L)	52,84	68,92	98,53	97,45	91,18	72,13	137,69	109,87	-	-	45,83	29,99	66,47	89,64	186,64	187,74
Ácido isovalérico (µg/L)	-	-	< 9,56	< 9,56	-	-	-	-	298,05	265,44	415,24	461,87	1287,48	1919,98	-	-

Antranilato de etila (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Decanoato de etila (µg/L)	-	-	< 31,24	< 31,24	44,06	55,58	696,14	619,48	79,13	83,13	6,02	7,54	273,15	330,41	165,49	181,35
Ácido propanoico (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,19	16,01	-	-	-	-
β-damascenona (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-terpineol (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato de dietila (µg/L)	352,2	408,11	815,65	678,02	800,85	726,09	495,97	389,26	588,5	420,16	666,32	923,44	441,48	669,84	803,69	737,41
Undecanoato de etila (µg/L)	0,94	1,05	3,12	2,63	3,92	3,64	2,12	1,49	2,42	1,9	2,55	3,5	1,94	2,32	0,8	0,94
Tioacetato de 5-furfurila (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido butanoico (µg/L)	1250,35	1520,34	27785,61	2716,71	87,99	87,51	1939,89	1495,46	1393,6	1070,38	-	-	29,26	37,31	-	-
Acetato de feniletila (µg/L)	-	-	40,33	49,03	8957,66	7666,32	356,52	338,55	85,3	80,42	63,42	85	195,85	273,06	603,04	653,74
Ácido valérico (µg/L)	1,22	1,14	12,55	12,75	32,85	26,16	8,78	7,04	6,68	7,07	-	-	59,86	57,64	-	-
Laurato de etila (µg/L)	6,43	6,42	6,46	6,5	6,72	7,13	10,91	10,53	12,99	15,43	6,45	6,94	7,29	10,25	14,27	19,41
α-ionona (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido caproico (µg/L)	0,91	0,9	-	-	33,48	41,12	58,21	52,19	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-feniletanol (µg/L)	231,95	214,78	615,05	529,46	4512,44	3933,03	22888,63	22608,17	6350,81	5428,01	1450,93	1590,07	15463,32	21743,09	9651,53	12065,98
Ácido isobutírico (µg/L)	119,34	164,24	3330,75	3198,93	664,44	1077,94	2107,62	2415,95	1386,28	921,26	753,11	579,56	1414,98	1965,2	1601,55	1665,65
β-ionona (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido heptanoico (µg/L)	<63,09	<63,09	<63,09	<63,09	-	-	-	-	-	-	< 63,09	< 63,09	-	-	-	-
Ácido octanoico (µg/L)	45,46	62,26	98,81	90,13	9594,41	9018,62	435,17	416,73	228,51	212,76	118,9	120,32	127,65	189,47	19947,66	24969,39
γ-nonalactona (µg/L)	<62,34	<62,34	178,29	114,21	161,25	162,53	242,81	264,3	165,47	148,54	52,26	45,83	140,59	197,01	154,55	179,11
Lactato de etila (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cinamato de etila (µg/L)	-	-	< 4,36	< 4,36	-	-	< 4,36	< 4,36	< 4,36	< 4,36	< 4,36	< 4,36	< 4,36	< 4,36	< 4,36	-
Ácido pelargônico (µg/L)	1,73	1,96	6,76	6,7	2,58	3,58	3,12	3,06	3,19	2,79	2,18	2,83	2,92	3,55	3,07	3,86
Ácido cáprico (µg/L)	0,25	0,21	5,13	5,36	27,74	23,86	5,66	4,34	29,34	31,24	1,77	2,18	2,37	3,59	9,54	9,81
Ácido n-undecanoico (µg/L)	-	-	0,49	0,48	0,04	0,03	0,74	0,53	< 36,57	< 36,57	< 36,57	< 36,57	< 36,57	< 36,57	< 36,57	< 36,57
Ácido 10-undecenoico (µg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 17: Valores de OAV para os compostos que apresentaram valor superior a 1 para pelo menos uma amostra e o limiar de percepção olfativa para cada composto. Em vermelho, os compostos que contribuem negativamente para o aroma. Em azul, valores de OAV<1, ou seja, não contribuem para o aroma do vinho.

Composto	Limiar	Suco	<i>Pichia caribbica</i>	<i>Hanseniapora lachancei</i>	<i>Torulasporea deldrueckii</i>	<i>Candida Tropicalis</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Torulasporea deldrueckii</i>	SC2048	Odor
Isobutanoato de etila (µg/L)	38	1,189868	1,002632	0,909342	0	0	0,598158	1,680658	0	frutado
Sec-butanol (µg/L)	130	0	0	0	0	3,531731	1,000385	0	0	frutado alcoólico
2-metilbutanoato de etila (µg/L)	18	0	0	0	1,566667	0	1,566667	0	0	maçã
Isovalerato de etila (µg/L)	3	0	11,91833	15,80333	38,945	56,21	5,026667	29,045	11,02833	frutado
n-butanol (µg/L)	590	0	0	1,482805	10,55058	2,533364	0,215297	6,813398	3,014246	alcoólico
Ácido isovalérico (µg/L)	33	0	0,289697	0	0	8,537727	13,28955	48,59788	0	rançoso doce
Decanoato de etila (µg/L)	200	0	0,1562	0,2491	3,28905	0,40565	0,0339	1,5089	0,8671	fruta
Undecanoato de etila (µg/L)	1	0,995	2,875	3,78	1,805	2,16	3,025	2,13	0,87	coco
Ácido butanoico (µg/L)	173	8,007775	88,15699	0,507225	9,928757	7,121329	0	0,192399	0	rançoso
Acetato de feniletila (µg/L)	250	0	0,17872	33,24796	1,39014	0,33144	0,29684	0,93782	2,51356	rosas
2-feniletanol (µg/L)	14000	0,015955	0,040875	0,301624	1,624886	0,420672	0,108607	1,3288	0,775625	rosas
Ácido octanoico (µg/L)	500	0,10772	0,18894	18,61303	0,8519	0,44127	0,23922	0,31712	44,91705	queijo
γ-nonalactona (µg/L)	91	0,685055	1,607143	1,779011	2,786319	1,72533	0,538956	1,854945	1,833297	coco, pera
Acetato de isoamila	30	0	0	2,22	1,89	2,091	1,89	1,895	3,297	banana
Hexanoato de etila (µg/L)	5	0	13,13	7,837	16	11,85	1,066	3,105	42,184	abacaxi
Octanoato de etila	2	0,0125	0,046	9,6	35	40,485	0,125	99,7	168,83	Fruta azeda

6. DISCUSSÃO

Os compostos metanol, α -pineno, β -pineno, citronelal, cedreno, β -terpineol, antranilato de etila, β -damascenona, α -terpineol, tioacetato de S-furfurila, α -ionona, geraniol, β -ionona, Lactato de etila e ácido 10-undecenoico não foram encontrados em nenhum fermentado e nem no suco de abacaxi.

O valor de atividade olfativa (Odour activity value - OAV) foi calculado para cada composto dividindo-se a média das concentrações encontradas pelo limiar de percepção olfativa. Os compostos acetato de etila, acetato de isobutila, butanoato de etila, pentanoato de etila, limoneno, 1-propanol, acetato de hexila, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, nanoato de etila, álcool furfurílico, ácido propanóico, succinato de dietila, ácido valérico, laurato de etila, ácido caprónico, ácido isobutírico, ácido heptanóico, ácido pelargônico, ácido cáprico e ácido n-undecanóico encontravam-se abaixo do limiar mínimo de percepção olfativa ($OAV < 1$) para todas as amostras e foram considerados irrelevantes na participação do aroma (ver tabela 19 nos anexos), enquanto que os compostos isobutanoato de etila, sec-butanol, 2-metilbutanoato de etila, isovalerato de etila, n-butanol, ácido isovalérico, decanoato de etila, undecanoato de etila, ácido butanóico, acetato de feniletila, 2-feniletanol, ácido octanoico, acetato de isoamila, hexanoato de etila, octanoato de etila e γ -nonalactona apresentaram OAV acima de 1 para pelo menos uma amostra. Os compostos heptanoato de etila, acetato de furfurila e cinamato de etila não possuem limiar mínimo de percepção olfativa descritos na literatura.

Segundo a Tabela 17, pode-se concluir que a levedura *Pichia caribbica* contribui pouco para a diversidade do aroma, produzindo apenas cinco compostos cujos aromas são favoráveis, sendo o de maior contribuição o hexanoato de etila, que atribui um aroma de abacaxi. Este composto, no entanto, é também produzido por todas as outras leveduras, assim sendo, esta levedura não mostrou peculiaridades em relação às outras. Além disso, *Pichia caribbica* produziu muita quantidade de ácido butanóico, um ácido que deteriora o vinho. A levedura *Hanseniapora lachancei* contribui com um pouco mais para a diversidade de aromas que *Pichia caribbica* e não produz muita quantidade de aromas deteriorantes. Destacou-se pela grande quantidade de acetato de feniletila produzido, proporcionando um aroma de rosas singular. A levedura *Torulaspota delbrueckii*, o isolado LIA26, foi a que produziu a maior variedade de aromas agradáveis, totalizando em dez, com um destaque especial para o isovalerato de etila, que contribui para um aroma frutado, e pouca quantidade de compostos deteriorantes. A levedura *Candida tropicalis* destacou-se em relação à *Torulaspota delbrueckii* (LIA26) apenas pela produção de sec-butanol, além de ser a única levedura

que produziu três compostos deteriorantes (ácido isovalérico, ácido butanóico e octanoato de etila). *Pichia membranifaciens* também não foi capaz de contribuir para a diversidade de aromas, produzindo seis compostos favoráveis e um desfavorável e a *Torulaspota deldrueckii* (LIA36) apresentou um perfil de aromas parecido com a outra linhagem de *Torulaspota deldrueckii* (LIA26) isolada, diferenciando-se pela produção de isobutanoato de etila (aroma frutado) e pela não produção de 2-metilbutanoato de etila (maçã) e acetato de feniletila (rosas). Em relação aos compostos desfavoráveis, *Torulaspota deldrueckii* (LIA36) não produziu ácido butanóico (rançoso, produzido pela LIA26 a OAV \approx 9,9), em compensação, produziu muitas quantidades de ácido isovalérico (rançoso, OAV \approx 48,6), além de produzir quase três vezes mais de octanoato de etila (fruta azeda) que a LIA26. Comparando-se com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* SC2048, os isolados mostraram contribuir para maior diversidade de aromas na fermentação do suco de abacaxi em relação a esse controle.

Araújo e colegas, em seu trabalho sobre vinho de abacaxi (2009), utilizaram a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* 79-B, para a fermentação e encontraram apenas dois compostos coincidentes com esta pesquisa: 1-propanol e acetato de etila, além do metanol, cujas concentrações permaneceram nulas no presente estudo. Enquanto que as concentrações de 1-propanol não ultrapassaram os 649 $\mu\text{g/L}$ no fermentado com LIA26, a fermentação conduzida pelo levedo *Saccharomyces cerevisiae* 79-B chegou a 76400 $\mu\text{g/L}$. Ambos os valores, no entanto, permaneceram abaixo do limiar mínimo de percepção olfativa (306000 $\mu\text{g/L}$). O álcool acetato de etila (limiar=7500 $\mu\text{g/L}$) também atingiu sua maior concentração no fermentado com o isolado LIA26 (592 $\mu\text{g/L}$) contra 71200 $\mu\text{g/L}$ encontrados por Araújo e colegas. Este álcool possui um agradável aroma de abacaxi, sendo percebido apenas no fermentado conduzido pela levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* 79-B.

Pino e Queris (2010) encontraram diversos compostos no vinho de abacaxi, entre eles o acetato de etila (38,3 $\mu\text{g/L}$), 3-metil-1-butanol (21,5 $\mu\text{g/L}$), acetato de isoamila (0,6 $\mu\text{g/L}$), 2-feniletanol (0,6 $\mu\text{g/L}$), succinato de dietila (0,7 $\mu\text{g/L}$), acetato de feniletila (0,4 $\mu\text{g/L}$) e decanoato de etila (17,9 $\mu\text{g/L}$), que permaneceram abaixo do limiar, embora para o acetato de isoamila, 2-feniletanol, acetato de feniletila e decanoato de etila as concentrações ficaram acima do nível perceptível para pelo menos um isolado deste estudo. No fermentado de abacaxi obtido por Pino e Queris, foi ainda encontrado hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila cujos OAV encontravam-se acima de 1. O hexanoato de etila possui um agradável odor de maçã, o octanoato de etila de abacaxi e o decanoato de etila de frutas. Todos esses compostos também apresentaram OAV>1 para pelo menos um isolado.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O abacaxi apresenta grande potencial para produção de vinho de frutas, pois contém um aroma muito acentuado, açúcar, nutrientes e acidez. A levedura utilizada, no entanto, é de essencial importância para a qualidade do produto, pois durante a fermentação alcoólica, muitos metabólitos secundários são produzidos, diferenciando-se de uma levedura para a outra. Como cada fruta apresenta características muito diferentes umas das outras, utilizar a mesma cepa para a fermentação de todas não exploraria o potencial de cada fruta e o fermentado poderia apresentar compostos desfavoráveis, tornando o vinho pouco atrativo.

Na fermentação do suco de abacaxi, cinco espécies de levedura foram isoladas: *Pichia caribbica*, *Hanseniapore lachancei*, *Candida Tropicalis*, *Pichia membranifaciens* e duas linhagens de *Torulaspore delbrueckii*. Cada uma apresentou vantagens e desvantagens, no entanto, as leveduras *Torulaspore delbrueckii* destacaram-se pela variedade de aromas produzidos, em especial o isolado LIA26.

Outras análises ainda devem ser feitas, como a quantificação de glicerol, etanol, açúcares redutores, acidez total, acidez volátil, sulfatos totais, anidrido sulfuroso total, cloretos totais, cinzas e análise sensorial. Possivelmente essas leveduras não são resistentes a altas concentrações de etanol. Assim sendo, elas seriam utilizadas como *starter* na fermentação para a produção de flavorizantes para posterior inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta uma boa produtora de etanol.

Estudos também podem ser feitos para o melhoramento genético das leveduras selecionadas, potencializando características favoráveis e/ou diminuindo a produção de compostos desfavoráveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANAS' EV, Igor B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1763-1769, 1989.
- AKUBOR, P. I. et al. Production and quality evaluation of banana wine. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 1-6, 2003.
- ALIAN, A.; MUSENGE, H. M. Utilization of pineapple waste for wine making. **Zambia journal of science and technology**, 1976.
- AMERINE, Maynard Andrew; CRUESS, William Vere; BERG, Harold W. The Technology of Wine Making: 3d Ed.
- ARAÚJO, Kátia Gomes Lima et al. Utilização de abacaxi (*Ananas comosus* L.) cv. Pérola e Smooth cayenne para a produção de vinhos-estudo da composição química e aceitabilidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 56-61, 2009.
- ARNOLD, R. M.; NOBLE, A. C.; SINGLETON, V. L. Bitterness and astringency of phenolics fraction of wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 675-678, 1980.
- AYOGU, T. E. Evaluation of the performance of a yeast isolate from Nigerian palm wine in wine production from pineapple fruits. **Bioresource technology**, v. 69, n. 2, p. 189-190, 1999. BARNETT, James Arthur et al. **Yeasts: Characteristics and identification**, 4th ed. Cambridge University Press, 2000.
- BARTHOLOMEW, Duane Phillip; PAULL, Robert E.; ROHRBACH, Kenneth G. (Ed.). **The pineapple: botany, production, and uses**. CABI, 2002.
- BASU, Arpita et al. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 9, p. 1582-1587, 2010. BENK, E. Uber tropische und subtropische weinahnliche Getranke. **Alkohol-industrie**, v. 6, p. 128-129, 1987.
- BERTRAND, A. Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité du vin. In: **Colloque Soc. Fr. Microbiol.** 1981. p. 251-267.
- BORS, Wolf; SARAN, Manfred. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. **Free Radical Research**, v. 2, n. 4-6, p. 289-294, 1987.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 19 de outubro de 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n. 259, de 31 de maio de 2010. Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 19 de outubro de 2015.

BRUCH, Kelly Lissandra. *Nem tudo que fermenta vira VINHO*. Bento Goncalves: IBRAVIN, 2012. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/downloads/1377636234.pdf>. Acesso em 15 de agosto de 2015.

BURDOCK, George A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. CRC press, 2009.

CALDAS, M. C. S.; MANFROI, L.; NETO, B. A. M.; SANTOS, J. S.; NASCIMENTO, L. A.; CARVALHO, E. A.; CARVAJAL, J. C. L.; MENDONÇA, F. H. O. **Elaboração de fermentado alcoólico de abacaxi**. I Jornada Nacional da Agroindústria, Bananeiras, 2006.

CASTELL, J. V. et al. Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 273, n. 1, p. G139-G146, 1997.

CHANPRASARTSUK, On-ong et al. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7500-7509, 2010.

CHANPRASARTSUK, O.; PHEANUDOMKITLERT, K.; TOONWAI, D. Pineapple wine fermentation with yeasts isolated from fruit as single and mixed starter cultures. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 5, n. 20, p. 104-111, 2012.

CHOBOTOVA, Katya; VERNALLIS, Ann B.; MAJID, Fadzilah Adibah Abdul. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: current evidence and perspectives. **Cancer letters**, v. 290, n. 2, p. 148-156, 2010.

COPPOLA, V. Precipitazione del ferro e del rame nei vini: cause e prevenzioni. **Vignevini**, v. 9, p. 19-21, 1982.

CORAZZA, Marcos L.; RODRIGUES, Dina G.; NOZAKI, Jorge. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

CRIQUI, Michael H. Alcohol and coronary heart disease: consistent relationship and public health implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 246, n. 1, p. 51-57, 1996.

DAVIDOVIC, Sonja M. et al. Physicochemical, antioxidant and sensory properties of peach wine made from redhaven cultivar. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 6, p. 1357-1363, 2013.

DE WHALLEY, Catherine V. et al. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. **Biochemical pharmacology**, v. 39, n. 11, p. 1743-1750, 1990.

DENNO, Robert (Ed.). **Variable plants and herbivores in natural and managed systems**. Elsevier, 2012.

DI CAGNO, Raffaella et al. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Food microbiology**, v. 27, n. 3, p. 381-389, 2010.

DOLL, Richard et al. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. **BMJ: British Medical Journal**, v. 309, n. 6959, p. 911, 1994.

DUARTE, Whasley F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, 2010.

DUNN, Ernest L. et al. Acute alcohol ingestion and platelet function. **Archives of Surgery**, v. 116, n. 8, p. 1082-1083, 1981.

ESTEVE-ZARZOSO, B. et al. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedes' area (Spain). **Food Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 553-562, 2000.

EZERONYE, O. U. Nutrient utilization profile of *Saccharomyces cerevisiae* from palm wine in tropical fruit fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 3, p. 235-239, 2004.

FAN, Wenlai; XU, Yan; YU, Aimei. Influence of oak chips geographical origin, toast level, dosage and aging time on volatile compounds of apple cider. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 3, p. 255-263, 2006.

FENN, C. G.; LITTLETON, J. M. Inhibition of platelet aggregation by ethanol in vitro shows specificity for aggregating agent used and is influenced by platelet lipid composition. **Thrombosis and haemostasis**, v. 48, n. 1, p. 49-53, 1982.

FIA, G.; GIOVANI, G.; ROSI, I. Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 3, p. 509-517, 2005.

FLEET, Graham H. **Wine microbiology and biotechnology**. CRC Press, 1993.

FUCHS, Charles S. et al. Alcohol consumption and mortality among women. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 19, p. 1245-1250, 1995.

GALLI, C. et al. Acute effects of ethanol, caffeine, or both on platelet aggregation, thromboxane formation, and plasma-free fatty acids in normal subjects. **Drug-nutrient interactions**, v. 3, n. 1, p. 61-67, 1983.

GARAVAGLIA, Juliano et al. Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production. **Microbiological research**, v. 173, p. 59-65, 2015.

GAZIANO, J. Michael et al. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 25, p. 1829-1834, 1993.

GNEKOW, B.; OUGH, C. S. Methanol in wines and most: sources and amounts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 1976.

GOLDBERG, David M.; HAHN, Susan E.; PARKES, Joel G. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. **Clinica Chimica Acta**, v. 237, n. 1, p. 155-187, 1995.

GRONBAEK, Morten et al. Influence of sex, age, body mass index, and smoking on alcohol intake and mortality. **Bmj**, v. 308, n. 6924, p. 302-306, 1994.

GUINARD, J. X.; PANGBORN, R. M.; LEWIS, M. J. Preliminary studies on acidity-astringency interactions in model solutions and wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, n. 8, p. 811-817, 1986.

HAGER, A. et al. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. H134-H140, 2008.

HEARD, Gillian Margaret. **Occurrence and growth of yeasts during the fermentation of Australian wines**. 1988. Tese de Doutorado. University of New South Wales.

HERNÁNDEZ, Manuel Ruiz. **La cata y el conocimiento de los vinos**. 1995.

HERTOG, Michael GL et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **The Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007-1011, 1993.

HUBBARD, R. W.; MEJIA, A.; HORNING, M. The potential of diet to alter disease processes. **Nutrition Research**, v. 14, n. 12, p. 1853-1896, 1994.

JAGTAP, Umesh B. et al. Preparation and evaluation of antioxidant capacity of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) wine and its protective role against radiation induced DNA damage. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1595-1601, 2011.

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

KANNEL, William B.; ELLISON, R. Curtis. Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect. **Clinica Chimica Acta**, v. 246, n. 1, p. 59-76, 1996.

KLATSKY, Arthur L.; FRIEDMAN, Gary D.; SIEGELAUB, Abraham B. Alcohol consumption before myocardial infarction: results from the Kaiser-Permanente epidemiologic study of myocardial infarction. **Annals of Internal Medicine**, v. 81, n. 3, p. 294-301, 1974.

KURTZMAN, Cletus P.; PIŠKUR, Jure. **Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts**. Springer Berlin Heidelberg, 2006.

JAGTAP, Umesh B.; BAPAT, Vishwas A. Wines from fruits other than grapes: Current status and future prospectus. **Food Bioscience**, v. 9, p. 80-96, 2015.

JOHNSON, Michelle H.; GONZALEZ DE MEJIA, Elvira. Comparison of chemical composition and antioxidant capacity of commercially available blueberry and blackberry wines in Illinois. **Journal of food science**, v. 77, n. 1, p. C141-C148, 2012.

JOHNSON, Michelle H. et al. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 16, p. 8923-8930, 2011.

KENGGHETKIT, Nanthaya; AMORNSAKCHAI, Taweechai. Utilisation of pineapple leaf waste for plastic reinforcement: 1. A novel extraction method for short pineapple leaf fiber. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 55-61, 2012.

KLATSKY, A. L.; FRIEDMAN, G. D.; SIEGELAUB, A. B. Alcohol use and cardiovascular disease: the Kaiser-Permanente experience. **Circulation**, v. 64, n. 3 Pt 2, p. III 32-41, 1981.

KLATSKY, Arthur L.; ARMSTRONG, Mary Anne; FRIEDMAN, Gary D. Alcohol and mortality. **Annals of Internal Medicine**, v. 117, n. 8, p. 646-654, 1992.

KRAMLING, T. E.; SINGLETON, V. L. An estimate of the nonflavonoid phenols in the wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, n. 2, p. 86-92, 1969.

LAGE, M. A. et al. Metodo gas-cromatografico rapido para la evaluation directa de etanol y glicerina en vinos. **Anales de Bromatologia**, v. 41, n. 2, p. 373-381, 1989.

LANDOLFI, Raffaele; STEINER, Manfred. Ethanol raises prostacyclin in vivo and in vitro. **Blood**, v. 64, n. 3, p. 679-682, 1984.

LEE, C. Y.; COOLEY, H. J. Higher- alcohol contents in New York wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 32, n. 3, p. 244-246, 1981.

LEE, Pin-Rou et al. Effect of fusel oil addition on volatile compounds in papaya wine fermented with *Williopsis saturnus* var. *mrakii* NCYC 2251. **Food research international**, v. 44, n. 5, p. 1292-1298, 2011a.

LEE, P. R. et al. Impact of amino acid addition on aroma compounds in papaya wine fermented with *Williopsis mrakii*. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 32, n. 2, p. 220, 2011b.

LEY, Chit Moy et al. A review of the use of bromelain in cardiovascular diseases. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 7, p. 702-710, 2011.

LI, Zi Cheng et al. Simultaneous determination of active ingredients in blueberry wine by CE-AD. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, n. 10, p. 1237-1240, 2011.

LI, Ti et al. Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 8, p. 1805-1817, 2014.

LIM, Jae W.; JEONG, Jong T.; SHIN, Chul S. Component analysis and sensory evaluation of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Mique) wines. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 5, p. 918-926, 2012.

LIVIO, M. et al. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in the rat. **Drugs Exp Clin Res**, v. 4, p. 49-53, 1978.

MALDONADO, OSCAR; ROLZ, CARLOS; CABRERA, SHERYL SCHNEIDER. Wine and vinegar production from tropical fruits. **Journal of food science**, v. 40, n. 2, p. 262-265, 1975.

MANGIAPANE, Heather et al. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. **Biochemical pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 445-450, 1992.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 9, p. 1234-1245, 2001.

MCGOVERN, Patrick E. et al. Neolithic resinated wine. **Nature** 381:480–481, 1996.

MENDES-FERREIRA, A.; BARBOSA, C.; JIMENEZ-MARTI, E.; DEL OLMO, M.L.; MENDES-FAIA, A. (2010) The wine yeast strain-dependent expression of genes implicated in sulfide production in response to nitrogen availability. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1314-1321.

MIKHAILIDIS, D. P. et al. Effect of ethanol on vascular prostacyclin synthesis, platelet aggregation, and platelet thromboxane release. **Br Med J** x9831287: 1495-8.

MONDAL, Sucheta et al. Evaluation of acute anti-inflammatory effect of Ananas comosus leaf extracts in rats. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 1312-1315, 2011.

MONTENEGRO, H. W. S.; CANTARELLI, P. R. **Abacaxi: produção pré-processamento e transformação agroindustrial**. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, [199-?], 1982.

MORALEDA, J. M. B. Aplicaciones en enología del análisis por cromatografía líquida y gaseosa de ácidos, azúcares e poliálcoholes. **Equipamentos e Tecnologia de Alimentos**, v. 7, p. 83-88, 1988.

MORTIMER, Robert K. et al. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. **Yeast**, v. 10, n. 12, p. 1543-1552, 1994.

MUDGIL, Deepak; BARAK, Sheweta. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 61, p. 1-6, 2013.

MUNIZ, C. R. et al. **Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais**. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 20, n. 2, p. 309-322, 2002.

NEUBAUER, R. A. A plant protease for potentiation of and possible replacement of antibiotics. **Experimental medicine and surgery**, v. 19, p. 143, 1961.

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, n. 2, p. 110-112, 1984.

NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, n. 1, p. 84-96, 1986.

OHKUBO, T.; NOBLE, A. C.; OUGH, C. S. Evaluation of California Chardonnay wines by sensory and chemical analysis. **Science des Aliments**, v. 7, p. 200-214, 1984.

ONKARAYYA, H.; SINGH, H. Screening of mango varieties for Dessert and Madeira-style wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 35, n. 2, p. 63-67, 1984.

ONKEN, Jane E. et al. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. **Clinical Immunology**, v. 126, n. 3, p. 345-352, 2008.

PARISH, M.E. Y CARROLL, D.E. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grape and musts. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 36, p. 165-170, 1985

PRETORIUS, Isak S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PHILLIPS, Roderick. **A short history of wine**. London: Penguin, 2001.

PINO, Jorge A.; QUERIS, Oscar. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1241-1246, 2010.

RAINIERI, S.; PRETORIUS, I. S. Selection and improvement of wine yeasts. **Annals of microbiology**, v. 50, n. 1, p. 15-32, 2000.

RAND, M. L. et al. Effects of ethanol on pathways of platelet aggregation in vitro. **Thrombosis and haemostasis**, v. 59, n. 3, p. 383-387, 1988.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1345-1350, 2005.

REDZEPOVIĆ, S.; ORLIC, S.; SIKORA, S.; MAJDAK, A.; PRETORIUS, I.S. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35, p. 305-310, 2002

RENAUD, Serge C. et al. Alcohol and platelet aggregation: the Caerphilly Prospective Heart Disease Study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 55, n. 5, p. 1012-1017, 1992.

RENZINI, G.; VAREGO, M. Die resorption von tetrazyklin in Gegenwart von Bromelain bei oraler application. **Arzneimittel-Forschung Drug Research**, v. 2, p. 410-412, 1972.

RIBEIRO, Luciana Silva et al. Fermented sugarcane and pineapple beverage produced using *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 262-272, 2015.

RIDKER, Paul M. et al. Association of moderate alcohol consumption and plasma concentration of endogenous tissue-type plasminogen activator. **Jama**, v. 272, n. 12, p. 929-933, 1994.

RIMM, Eric B. et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. **The Lancet**, v. 338, n. 8765, p. 464-468, 1991.

RIZZON, L. A. Composicao quimica dos vinhos da microrregiao homogenea vinicultora de Caxias do Sul (MRH 311)-compostos volateis. **Comunicado Tecnico-Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (Brazil)**. no. 5., 1987.

ROSINI, G., FEDERICI, F. Y MARTINI, A. Yeast flora of grapes during ripening. **Micr. Ecol.** v. 8, p. 83-89, 1982

RUBIN, Raphael; RAND, Margaret L. Alcohol and platelet function. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 18, n. 1, p. 105-110, 1994.

SAN MIGUEL, T. L. Contenido de metanol y alcoholes superiores en vinos de Rioja. **Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias**, v. 18, p. 145-152, 1982.

SANTOS, C. S.; ALMEIDA, S. S.; TOLEDO, A. L.; SANTANA, J. C. C.; DE SOUZA, R. R. **Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (Malpighia punicifolia L.)**. Brazilian Journal of Food Technology 10:47–50. 2005.

SECOR, Eric R. et al. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. **Cellular immunology**, v. 237, n. 1, p. 68-75, 2005.

SEVDA, Surajbhan et al. Fermentative Behavior of Saccharomyces Strains During Guava (Psidium Guajava L) Must Fermentation and Optimization of Guava Wine Production. **Journal of Food Processing & Technology**, 2011.

SELLI, Serkan. Volatile constituents of orange wine obtained from moro oranges (Citrus sinensis [L.] osbeck). **Journal of food quality**, v. 30, n. 3, p. 330-341, 2007.

SHINOHARA, T.; WATANABE, M. Gas chromatographic analysis of higher alcohols and ethyl acetate in table wines. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 2475-2477, 1976.

SIEBERT, Tracey E. et al. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 381, n. 4, p. 937-947, 2005.

DA SILVA, Jonas Luiz Almada et al. UTILIZAÇÃO DE ABACAXI PARA ELABORAÇÃO DE VINHOS: AVALIAÇÃO FÍSICO QUÍMICA E ACEITABILIDADE. **HOLOS**, v. 3, p. 108-118, 2010.

SIMPSON, R. F. Some important aroma components of white wine. **Food Technology in Australia**, v. 30, p. 512-522, 1979.

SLATER, T. F. et al. Free radical scavenging properties of modulators of eicosanoid metabolism. **Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research**, v. 17, p. 1098-1102, 1986.

SODEN, A. et al. Effects of co-fermentation with Candida stellata and Saccharomyces cerevisiae on the aroma and composition of Chardonnay wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 6, n. 1, p. 21-30, 2000.

SOLEAS, George J. et al. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 11, n. 5, p. 287-313, 1997.

STEINMETZ, Kristi A.; POTTER, John D. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. **Cancer Causes & Control**, v. 2, n. 5, p. 325-357, 1991.

STULL, April J. et al. Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 10, p. 1764-1768, 2010.

SPADARI, Laércio. Influência da cepa de levedura na composição de vinhos espumantes elaborados pelo método tradicional. 2014.

SUH, I. L. et al. Alcohol use and mortality from coronary heart disease: the role of high-density lipoprotein cholesterol. **Annals of Internal Medicine**, v. 116, n. 11, p. 881-887, 1992.

SUN, Shu Yang; JIANG, Wen Guang; ZHAO, Yu Ping. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the profile of volatile compounds and polyphenols in cherry wines. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 547-555, 2011.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of grape and wine research**, v. 11, n. 2, p. 139, 2005.

TAHERZADEH, Mohammad J.; ADLER, Lennart; LIDÉN, Gunnar. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol—a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1, p. 53-66, 2002.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1987. p. 180.

THEPKAEW, N., CHOMSRI, N. Fermentation of pineapple juice using wine yeasts: kinetics and characteristics. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, 2013 6(01), 1-10.

TOREL, Joseph; CILLARD, Josiane; CILLARD, Pierre. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 383-385, 1986.

TOWANTAKAVANIT, Korsak; PARK, Yong; GORINSTEIN, Shela. Bioactivity of wine prepared from ripened and over-ripened kiwifruit. **Open Life Sciences**, v. 6, n. 2, p. 205-215, 2011.

VEENSTRA, J. et al. Effects of moderate alcohol consumption on platelet function, tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. **Thrombosis and haemostasis**, v. 63, n. 3, p. 345-348, 1990.

VERDUYN, Cornelis et al. Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae* in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Cultures. **Journal of general microbiology**, v. 136, n. 3, p. 395-403, 1990.

WANG, Liping et al. Rapid Analysis of Flavor Volatiles in Apple Wine Using Headspace Solid-Phase Microextraction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, n. 1, p. 57-65, 2004.

WANG, Ling et al. Structural characteristics of pineapple pulp polysaccharides and their antitumor cell proliferation activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2015.

WILLETT, Walter C. Diet and health: what should we eat?. **Science**, v. 264, n. 5158, p. 532-537, 1994.

WITHY, L. M.; LODGE, Norman. Kiwifruit wine: production and evaluation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 33, n. 4, p. 191-193, 1982.

YOURAVONG, Wirote; LI, Zhenyu; LAORKO, Aporn. Influence of gas sparging on clarification of pineapple wine by microfiltration. **Journal of food engineering**, v. 96, n. 3, p. 427-432, 2010.

ZAMBONELLI, Carlo. **Microbiology and biotechnology of wine**. Edagricole, 1988.

ZOECKLEIN, B. W. et al. **Production Wine Analysis**. New York: A.V.I., 1989. p. 475.

Zohary D, Hopf M: *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford Univ. Press, Oxford, 1988.

9. ANEXOS

Tabela 19: tempo de retenção no cromatógrafo a gás dos compostos encontrados no fermentado de abacaxi

Tempo de Retenção (min)	Composto
6,298	Acetato de metila
7,719	Acetato de etila
10,481	Isobutanoato de etila
12,536	Acetato de isobutila
13,740	Butanoato de etila
18,148	Etilbenzeno
22,085	Hexanoato de etila
23,054	Limoneno
24,652	3-metil 1-butanol
24,958	2-etil 1-butanol
27,032	Hexenoato de 4-metila
27,383	Hexenoato de 3-metila
28,425	Acetato de hexila
29,001	2-propil 1-heptanol
29,547	2-metilbutanoato de 2-hidroximetila
32,931	2-metil 1-hepten-6-ona
34,063	1-hexanol
35,576	1,3,5-undecatrieno
35,883	2-nonen-1-ol
36,009	2-etil 1-dodecanol
39,040	Octanoato de etila
40,085	Ácido tioacético
40,583	Furfural
42,626	2-butil 1-octanol
43,641	Malonato de dimetila
44,122	Benzaldeído

44,448	Metil-tio-propanoato de metila
46,987	3-metil-tio-propanoato de etila
47,050	Ácido isobutírico
47,586	Furoato de metila
49,026	2,2-dimetil-propanoato de octila
50,633	Ácido butanoico
51,176	Decanoato de etila
51,322	Decanoato de metila
51,500	Mentol
51,809	3-hidroxi-hexanoato de metila
52,876	Álcool furfurílico
53,491	Succinato de dietila
54,743	5-etil-dihidroxi-2(3H)furanona
56,885	Ácido valérico
57,187	Undecanoato de etila
60,129	2-metil-tio-propenoato de metila
60,616	3,4-dimetil-benzaldeído
61,734	Cinamaldeído
62,447	5-acetoxioctanoato de metila
62,718	Laurato de etila
63,794	4-octenoato de metila
64,641	Diisobutirato de 2,2,4-trimetil-1,3-pentanediol
65,725	5-acetoxihexanoato de metila
66,164	2-feniletanol
66,360	2-acetoxioctanoato de metila

68,239	Ácido heptanoico
68,787	γ -decalactona
69,113	1-heptadecanol
71,758	γ -nonalactona
71,902	4-etilguaiacol
72,306	Furaneol
72,680	3-fenoxi 1-propanol
73,467	Ácido octanoico
78,500	Ácido nonanoico (pelargônico)
79,620	2-metoxi 4-vinilfenol
83,625	Ácido n-decanoico (cáprico)
83,605	Metil-dihidrojasmonato
84,867	5-hidroxi-pentanoato de 2,4-di-ter-butilfenila
87,251	Ftalato de etila
92,248	3,5-di-t-tert-butil 4- hidroxibenzaldeído
94,296	Ftalato de 1-butil 2- isobutila

Tabela 110: OAV dos compostos em cada amostra. Em vermelho, aqueles cujos OAV mantiveram-se abaixo de 1 para todas as amostras e não foram analisados.

Composto	LIA	LIA12	LIA20	LIA26	LIA34	LIA35	LIA36	SC2048
Acetato de etila (µg/L)	0,000828	0,000947	0,389266	0,078995	0,006589	0,001025	0,036417	0,03054
Isobutanoato de etila (µg/L)	1,189868	1,002632	0,909342	0	0	0,598158	1,680658	0
Acetato de isobutila (µg/L)	0,039919	0,035509	0	0,034444	0,039688	0,036344	0,034031	0,038784
Sec-butanol (µg/L)	0	0	0	0	3,531731	1,000385	0	0
Butanoato de etila (µg/L)	0,005113	0	0,105325	0	0	0	0	0
2-metilbutanoato de etila (µg/L)	0	0	0	1,566667	0	1,566667	0	0
Isovalerato de etila (µg/L)	0	11,91833	15,80333	38,945	56,21	5,026667	29,045	11,02833
Pentanoato de etila (µg/L)	0	0	0,0125	0	0	0,7655	0	0
Limoneno (µg/L)	0,032975	0,04455	0	0,112325	0	0,07765	0,0778	0,04925
1-propanol (µg/L)	0	0	0,001478	0,002123	0,001608	2,62E-05	0,001362	0,001867
n-butanol (µg/L)	0	0	1,482805	10,55058	2,533364	0,215297	6,813398	3,014246
Hexanoato de etila (µg/L)	0	13,13	7,837	16	11,85	1,066	3,105	42,184
Acetato de hexila (µg/L)	0,037261	0	0,037493	0	0	0	0	0
3-metil 1-butanol (µg/L)	9,17E-06	8,42E-05	1,87E-05	1,81E-05	1,5E-05	1,42E-05	2,07E-05	1,43E-05
Heptanoato de etila (µg/L)								
1-hexanol (µg/L)	0,000451	0	0	0	0	0,000603	0	0
Nonanoato de etila (µg/L)	0	0,004176	0,002165	0,010918	0,008065	0,004	0,001418	0,008641
Acetato de furfurila (µg/L)								
Álcool furfúrico (µg/L)	0,03044	0,048995	0,040828	0,06189	0	0,018955	0,039028	0,093595
Ácido isovalérico (µg/L)	0	0,289697	0	0	8,537727	13,28955	48,59788	0
Decanoato de etila (µg/L)	0	0,1562	0,2491	3,28905	0,40565	0,0339	1,5089	0,8671
Ácido propanoico (µg/L)	0	0	0	0	0	0,002111	0	0
Succinato de dietila (µg/L)	0,00076	0,001494	0,001527	0,000885	0,001009	0,00159	0,001111	0,001541
Undecanoato de etila (µg/L)	0,995	2,875	3,78	1,805	2,16	3,025	2,13	0,87
Ácido butanoico (µg/L)	8,007775	88,15699	0,507225	9,928757	7,121329	0	0,192399	0
Acetato de feniletila (µg/L)	0	0,17872	33,24796	1,39014	0,33144	0,29684	0,93782	2,51356
Ácido valérico (µg/L)	0,000393	0,004217	0,009835	0,002637	0,002292	0	0,019583	0
Laurato de etila (µg/L)	0,004283	0,00432	0,004617	0,007147	0,009473	0,004463	0,005847	0,011227

Ácido caproico (µg/L)	6,03E-05	0	0,002487	0,00368	0	0	0	0
2-feniletanol (µg/L)	0,015955	0,040875	0,301624	1,624886	0,420672	0,108607	1,3288	0,775625
Ácido isobutírico (µg/L)	0,000709	0,016324	0,004356	0,011309	0,005769	0,003332	0,00845	0,008168
Ácido heptanoico (µg/L)	0,02103	0,02103	0	0	0	0,02103	0	0
Ácido octanoico (µg/L)	0,10772	0,18894	18,61303	0,8519	0,44127	0,23922	0,31712	44,91705
γ-nonalactona (µg/L)	0,685055	1,607143	1,779011	2,786319	1,72533	0,538956	1,854945	1,833297
Cinamato de etila (µg/L)								
Ácido pelargônico (µg/L)	0,000308	0,001122	0,000513	0,000515	0,000498	0,000418	0,000539	0,000578
Ácido cáprico (µg/L)	1,53E-05	0,00035	0,00172	0,000333	0,002019	0,000132	0,000199	0,000645
Ácido n-undecanoico (µg/L)	0	4,85E-05	3,5E-06	6,35E-05	0,003657	0,003657	0,003657	0,003657
