

***Brettanomyces bruxellensis*: ocorrência, crescimento e efeito no aroma do vinho**

Torey Arvik¹, Thomas Henick-Kling²

¹ Doutorando do Departamento de Enologia, Cornell University, Geneva, NY

² Professor Associado do Departamento de Enologia, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY

A espécie *Brettanomyces bruxellensis* pode provocar o cheiro a suor de cavalo associado ao cheiro de embalagens metálicas do tipo *Band-Aids*®. Um ou uma combinação destes cheiros e aromas pode ser detectada em vinhos contaminados por estas leveduras. As espécies do género *Dekkera/Brettanomyces*¹ são conhecidas pela sua capacidade de colonizar ambientes específicos, nomeadamente seiva de árvores, salas de ordenha, indústria cervejeira e, muito particularmente, adegas de vinificação.

Normalmente é aceite a existência de cinco espécies de *Dekkera/Brettanomyces*: *D. (B.) bruxellensis*, *B. custersianus*, *D. anomalus*, *B. naardenensis*, e *B. nanus*³. Este género foi reclassificado com base em diferentes populações isoladas, as quais foram identificadas com diversos sinónimos ao longo da história da micologia. Recentemente, a análise de sequências conservadas de genes e os tradicionais testes bioquímicos foram utilizados na última reclassificação deste grupo⁴.

Qual é a diferença entre *Brettanomyces* e *Dekkera*? A resposta a esta pergunta exige alguns conhecimentos sobre o comportamento sexual das leveduras.

O género *Dekkera*, cujas espécies produzem esporos quando em condições ambientais difíceis, é, em termos micológicos, a forma sexual “perfeita” de *Brettanomyces*. Assim, neste trabalho, o género será por vezes indicado por “*Dekkera/Brettanomyces*” como forma de descrever esta dualidade.

Concentremo-nos agora na designação *Brettanomyces*, uma vez que apenas algumas pessoas tiveram a felicidade de identificar a forma *Dekkera* num vinho⁷. A espécie *Brettanomyces bruxellensis* foi isolada, supostamente, num vinho com 10 anos de envelhecimento! Para um microbiologista não seria uma surpresa mas foi-o para aqueles que o produziram.

Surpreendentemente, durante o período em que o vinho é conservado em barricas ou garrafas, as espécies do género *Brettanomyces* podem fermentar pequenas quantidades de açúcar quando existe algum oxigénio disponível, mesmo que em pequenas quantidades. Supostamente, as espécies do género *Brettanomyces* crescem activamente no vinho durante um período de tempo relativamente curto. No entanto, que seja do nosso conhecimento, nenhum trabalho de investigação permitiu suportar claramente esta hipótese: as leveduras do género *Brettanomyces* não podem apresentar um crescimento activo indefinidamente.

Apesar disso, uma outra hipótese se coloca: estas leveduras (como muitos outros microorganismos) podem permanecer num estado viável mas não-culturável (VNC) durante longos períodos de tempo. Neste estado, embora a presença das leveduras não possa ser observada por recurso a métodos normais de cultura, as células continuam a metabolizar os nutrientes existentes no meio onde estão presentes, sendo por isso consideradas vivas. Este estado é relativamente comum em microorganismos especializados os quais são considerados agentes patogénicos para o Homem, tendo sido recentemente identificados como fazendo parte das bactérias presentes no vinho⁸.

Tendo presente esta constatação, o que poderá ser dito sobre a presença de *B. bruxellensis* em vinhos com 10 anos de envelhecimento? Aparentemente, são esporos ou células VNC presentes num determinado tipo “estado” ambiental. Teoricamente, neste estado fisiológico, estas células permanecerão viáveis durante vários anos num bom vinho conservado em condições tão especiais. Elas fazem notar a sua presença, quando cultivadas em meios ricos em nutrientes, aparecendo sob a forma de colónias clássicas. Isto é, quando lhes são proporcionadas boas condições de nutrição e as condições ambientais desejáveis.

“O que é que faz esta *Brettanomyces* no meu vinho?”

Até recentemente, proferir a palavra “*Brettanomyces*” na presença de produtores de vinho sortia o mesmo efeito que tecer comentários desagradáveis sobre os seus familiares próximos. Actualmente, os produtores de vinho parecem mostrar abertura para discutir o assunto de uma forma menos defensiva. Apesar de tudo, existem alguns vinhos tintos particularmente visados, os quais são excelentes exemplos das virtudes que a presença de *Brettanomyces* introduz no seu aroma e gosto específicos. Os produtores de vinho aprenderam a reconhecer estes aromas complexos e compreenderam como são formados no vinho. Com a compreensão destes novos conhecimentos sobre a ecologia do género *Brettanomyces* e sobre a formação de aromas indesejáveis, espera-se que os produtores de vinho estejam melhor capacitados para controlar a formação destes aromas nos seus vinhos.

Muitos produtores de vinho já passaram pela experiência de tentar controlar leveduras do género *Brettanomyces* nas suas adegas. Em muitas das adegas onde trabalhamos pediram-nos a máxima descrição relativamente ao seu “problema de contaminação”. Alguns afirmaram terem “trabalhado com *Brettanomyces*” como forma de produzirem vinhos mais complexos, e que, posteriormente, esta situação tornou-se um problema irresolúvel em alguns dos seus vinhos tintos. Num dos projectos em particular, foram identificadas duas estirpes de *Brettanomyces bruxellensis*, indígenas numa adega que produzia alternadamente três tipos de vinho^{1,10}.

Recentemente, a abordagem da questão “*Brettanomyces*” sofreu uma alteração. Os críticos de vinhos apontam as adegas californianas como sendo exageradamente “higiénicas”. Alguns afirmaram mesmo que os odores e sabores de *Brettanomyces* num vinho são mais desejáveis do que a sua ausência, conforme foi evidenciado pelas exorbitantes quantias pagas por garrafas ostentando no rótulo “carácter clássico de um Bordeaux *standard*”. O debate foi iniciado e os enólogos com quem temos trabalhado não parecem entusiasmados com a potencial perda de frutado e aromas varietais.

Qual é a história do género *Brettanomyces*?

As espécies do género *Brettanomyces* têm uma longa história “anedótica” que as relaciona com diversos alimentos. Por esse motivo, a indústria, nos últimos 110 anos, ofereceu diversos nomes (e descobridores) para o mesmo organismo¹. Existem muitíssimos artigos publicados descrevendo infecções de diversas bebidas, cerveja e vinho especificamente, contendo diversas leveduras, em garrafas ou nas cubas de segunda fermentação, com características de maus odores (especialmente em vinhos tintos)¹¹.

Um autor descreveu a utilização patenteada da *Brettanomyces* para a segunda fermentação de cervejas especiais. O nome *Brettanomyces* foi oficialmente atribuído às leveduras “tipo *Torula*” caracterizadas por N. Hiltje Clausen, em 1904, como sendo responsáveis pela produção de “cervejas autêntico tipo inglês”².

A história de Clausen é a seguinte: em Inglaterra, as aplicações de um sistema de cultura de arranque à base de uma levedura pura do género *Saccharomyces* arruinou completamente o aroma das cervejas “stock Ales” inglesas. Em todo o mundo, os químicos ligados à produção de cerveja questionaram-se sobre o facto de os ingleses não conseguirem conjugar esforços e produzir cervejas tipicamente inglesas de boa qualidade com o novo sistema de levedura única.

Clausen provou experimentalmente que as leveduras do género *Brettanomyces* produzem uma segunda fermentação em casco sendo assim responsáveis pela produção de cervejas “stock ales” com carácter tipicamente inglês. Ironicamente, a cerveja é descrita como parecendo vinho. Interessantemente, os produtores britânicos de cerveja artesanal conseguiram comprar estirpes de leveduras da espécie *Brettanomyces bruxellensis* (anteriormente designada *B. lambicus*), a fornecedores de leveduras de arranque comerciais, as quais produzem a mesma característica “vínica” das verdadeiras cervejas tipicamente inglesas e das “lambics” belgas.

Nos vinhos tintos, é reduzido o número de descritores positivos conhecidos para cada um dos compostos resultantes da actividade das leveduras *Brettanomyces bruxellensis*. Algumas das qualidades “tipo-vinho” de cervejas especiais são habitualmente descritas em vinhos tintos como odores “medicinal”, “animal”, “meia transpirada”, “celeiro”, “fumo”, “metálico”, “penso” e “especiarias”^{1,12}.

No entanto, alguns descritores como “cravo-da-índia”, “fumo” e “especiarias” são extremamente desejados para realçar a intensidade ou complexidade de aromas “florais” ou “frutados”, típicos de castas como Cabernet Sauvignon, Merlot ou Cabernet franc. Em vinhos de menor intensidade (com menos estrutura e extracção) a ocorrência dos efeitos da actividade de leveduras do género *Brettanomyces* poderá ser excessivamente notada e, por isso, poderá arruinar o valor comercial final do produto^{12,17}.

Esta é outra questão sem uma resposta concreta. Apenas um reduzido número de pessoas têm capacidade para detectar, nos vinhos tintos, os odores típicos indicativos dos defeitos provocados pela actividade de leveduras do género *Brettanomyces*. Alguns detectam o odor “medicinal” puro indicativo do composto 4-etilfenol outros detectam os odores a “maçãs verdes” e “cabra molhada” dos ácidos valérico e isovalérico, cada um produzido em diferentes graus^{1,13,17}. Outros, ainda, conseguem detectar o odor “animal” e “celeiro”^{1,13}.

Apenas um reduzido número de pessoas conseguiu detectar os aromas tipo “rato” e “côdea de pão”, os quais são produzidos pela oxidação das acetil-tetrahidropiridinas na boca^{14,24}. É importante notar que o odor a rato num vinho será devido, provavelmente, à actividade de outros microorganismos presentes, estando menos relacionado com a actividade de leveduras do género *Brettanomyces*, embora exista essa possibilidade¹⁴.

Paul Henschke do *Australian Wine Research Institute* acrescenta: “ao longo de todos os nossos anos de trabalho com vinhos com odor a “rato”, apenas conseguimos detectar o sabor [a “rato”] num caso catastrófico: o vinho tinto era incrivelmente volátil, apresentando teores elevadíssimos de fenóis voláteis e também de outros compostos “decapantes” para o palato, presentes no vinho como resultado da actividade microbiológica.”

Nenhuma das características anteriormente indicadas pode ser, ela própria, considerada como favorável. No entanto, como anteriormente afirmado, num perfil de vinho complexo e com uma boa estrutura podem ser notadas pequenas quantidades de qualquer um dos odores normalmente tidos como defeitos, caso o contexto seja o correcto.

Tal facto leva-nos a acreditar em relatos de produtores de vinho que descrevem os seus numerosos encontros com *Brettanomyces*: “Parecia que a estirpe que tinha estava a fazer boas transformações no meu vinho; de repente, no ano passado, deve ter aparecido outra, ou outra coisa qualquer, e então todo o lote começou a tresandar.” Existem boas e más estirpes de *B. bruxellensis*?

Após contactar diversos produtores de vinho num seminário sobre *Brettanomyces*, patrocinado pela Viquiry em Santa Rosa, CA, em 2001, pareceu que a indústria vitivinícola tinha decidido explorar a questão “boas *Brettanomyces* vs más *Brettanomyces*”.

O nosso laboratório e outros tentam correntemente caracterizar estirpes oriundas de todo o mundo, por recurso a diversas tecnologias, para avaliar se existem estirpes com capacidade para produzir num vinho os aromas a “*Brettanomyces*” desejados (“fumo” e “especiarias”) ou apenas os maus aromas.

Como é que a *Brettanomyces* desenvolve a sua actividade?

Como qualquer bom sobrevivente, as leveduras do género *Brettanomyces* alimentam-se de tudo o que encontram. Como seria de esperar, quanto mais selectivo for o ambiente, mais fácil é para um organismo tolerante competir com sucesso, com os seus rivais, por recursos limitados.

No caso da espécie *Brettanomyces bruxellensis*, pequenas quantidades de açúcares fermentescíveis (0,1 g/L) e elevadas concentrações de etanol (superiores a 14%), podem actuar como combustível^{1,4}. Uma pequena quantidade de oxigénio é também um bom auxílio para o crescimento de leveduras do género *Brettanomyces* no vinho^{1,4,14}. Estas leveduras podem produzir 2,0 g/L de ácido acético antes do seu crescimento ser severamente afectado¹⁶. Por este motivo é extremamente difícil prever o que poderá acontecer a um vinho não filtrado quando em garrafa, o qual poderá apresentar uma certa complexidade na altura do engarrafamento e ser horrendo um ano mais tarde!

Um dos odores mais desagradáveis, associados às leveduras do género *Brettanomyces* é o resultante da presença do composto 4-etilfenol. Existem pelo menos 10 novos compostos odoríferos que podem originar aromas “plásticos” similares, incluindo o 4-etilguaicol, responsável por um odor a “fumo” e “especiarias” em alguns vinhos.¹

A produção de 4-etilfenol a partir do ácido p-cumárico é completada numa curta sequência de reacções. O p-cumarato é degradado em 4-vinilfenol, um composto com um forte odor a caixote do lixo. Mesmo para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, não é invulgar a produção de 4-vinilfenol durante a fermentação activa, numa quantidade apenas ligeiramente inferior quando comparada com a produção de leveduras do género *Brettanomyces*^{13,17}. A última fase, a transformação da forma 4-vinilfenol em 4-etilfenol é exclusiva do género *Brettanomyces* (pelo menos tanto quanto é do conhecimento da ciência). Esta conversão é tida como de ocorrência contínua durante vários meses, embora não seja ainda conhecido todo o processo fisiológico (para mais informação consultar Boulton *et al.*, 1996)

Observações em adegas e em laboratório demonstraram que as condições de crescimento, as concentrações de diversos cofactores, o número de leveduras e a temperatura da vasilha contaminada têm grande importância na produção dos odores^{1,9,10,17}.

Duas hipóteses são particularmente consideradas para explicar o facto de a espécie *B. bruxellensis* descarboxilar a forma 4-vinilfenol em 4-etilfenol. Uma teoria propõe que esta espécie de *Brettanomyces* obtém parte da energia de que necessita a partir desta transformação, sob a forma de um pequeno gradiente de electrões, o qual permite a produção de uma pequena quantidade de moléculas essenciais de ATP. Acreditamos particularmente neste teoria, uma vez que a espécie *Oenococcus oeni* actua de forma idêntica quando transforma o ácido málico em ácido láctico, conseguindo obter o mesmo benefício¹⁸. Poderá ainda ser teorizado que um gradiente de iões H⁺ pode ser desenvolvido, sendo qualquer excesso utilizado para “ganhar” moléculas de ATP.

A segunda teoria afirma que a espécie de *Brettanomyces* anula o efeito tóxico do p-cumarato através da descarboxilação e redução em 4-vinilfenol: se a espécie *S. cerevisiae* actua desta forma porque não o fará também a espécie *B. bruxellensis*? Os trabalhos consultados não permitem suportar nenhuma das hipóteses. Assim, a questão “porquê” é algo que necessita de uma análise mais aprofundada. Este objectivo indica que deverão ser desenvolvidos novos trabalhos ao nível da fisiologia com tantas estirpes quantas possam ser obtidas.

Onde podem ser encontradas as *Dekkera/Brettanomyces*?

As espécies de *Brettanomyces* são omnipresentes. Isto é, podem ser encontradas em qualquer ponto onde sejam procuradas com atenção. Nas vinhas, na água, no solo, no mosto, nas câmaras de frio, nas cubas de fermentação, no pavimento de cimento de uma adega e nas barricas.

A espécie *Brettanomyces bruxellensis* instala-se numa adega quando as condições de higiene não são suficientemente controladas, o SO₂ não é utilizado correctamente, ou as barricas ou cubas contaminadas são negligenciadas e é possibilitada a absorção do oxigénio do ar. As espécies de *Brettanomyces* são únicas no modo como utilizam o “efeito Custer” como meio de completar a fermentação alcoólica na presença de uma pequena quantidade de oxigénio^{1,4,15}.

Não deverá ser esquecido o efeito fungistático do SO₂ sobre as espécies de *Brettanomyces*. A manutenção do nível de SO₂ total a 80ppm (\leq pH 3,5) impedirá o crescimento das leveduras do género *Brettanomyces*. Também a temperatura é um factor crítico. O crescimento destas leveduras é muito mais rápido com temperaturas superiores a 20°C e, de um modo geral, pára abaixo dos 8°C. A filtração pode eliminar fisicamente as leveduras do género *Brettanomyces*. Parte do problema global constituído pela presença destas leveduras no vinho deriva do facto de alguns produtores seguirem a “moda” e engarrafarem vinhos não filtrados.

As leveduras do género *Brettanomyces* podem ser monitorizadas, mas não controladas. As barricas que não são monitorizadas e completamente atestadas estão frequentemente sujeitas a contaminações maciças de *Brettanomyces*. No que diz respeito a esta questão, os produtores de vinho deverão ter em consideração o processo percorrido pela indústria europeia de transformação de carne.

Em visitas a algumas destas indústrias de transformação poderá ser solicitada a passagem por um banho de desinfecção de calçado, como forma de evitar a introdução de viroses e outros organismos potencialmente contaminantes. O mesmo deverá ser solicitado nas adegas, particularmente nas áreas de transformação. Basta imaginar por onde possa ter andado o calçado para justificar o pedido de o “embalar”.

Quando é utilizada uma mangueira para limpar o pavimento com mosto ou vinho derramados, microorganismos aeróbios encontram-se dispersos no ar sendo projectados para as paredes e cubas, ou simplesmente passam da mangueira para esses locais.

Não estamos a sugerir que as adegas se transformem em locais assépticos. No entanto, uma reflexão mais exigente e algumas precauções poderão ajudar a diminuir a incidência de eventuais contaminações. Não deverá ser permitida a entrada de uma pessoa na adega que tenham manuseado qualquer outro equipamento ou visitado qualquer outra adega ou contactado com uvas, sem que seja quebrado o ciclo de uma possível penetração de organismos nas áreas de produção de vinho. As leveduras do género *Brettanomyces* aparecem nas uvas mas podem ser eliminadas pelas boas práticas de vinificação e de sanidade. Não há necessidade de introduzir leveduras indesejáveis com origem noutras adegas.

Existem algumas indicações que apontam para a introdução de leveduras do género *Brettanomyces* através das uvas. O facto de se apresentarem em número reduzido torna difícil o seu isolamento; no entanto, após algum tempo, esse pequeno número crescerá o suficiente para causar problemas. Aparentemente mais comum é a sua entrada com o vinho ou barricas provenientes de outras adegas.

A questão mais importante é o facto de as leveduras do género *Brettanomyces* parecerem esperar pelo momento certo para se manifestarem. Uma pequena população de uma espécie de *Brettanomyces* pode esperar numa barrica ou algures no ambiente da adega, pelas condições necessárias ao seu crescimento.

Quando em presença de uma ou duas barricas contaminadas com leveduras do género *Brettanomyces*, estas deverão ser isoladas, devendo ser utilizado equipamento diferente e especializado (se possível) no seu manuseamento. O vinho deverá ser filtrado nas barricas as quais deverão ser limpas antes da adição de sulfuroso. O vinho filtrado deverá ser armazenado noutra local durante algum tempo e ser utilizado para lotes depois de nos termos assegurado da sua estabilidade.

O trabalho de Mark Sefton *et al.* (2000) demonstrou que as barricas de carvalho, anteriormente infectadas com *B. bruxellensis* não podem ser completamente esterilizadas²³. Uma lavagem cuidadosa e enchimento com água sulfitada, ou a raspagem e queima, ou ainda o tratamento por ozono, não poderão esterilizar a barrica. Dado o elevado volume interior e a natureza porosa do carvalho, nem todas as leveduras do género *Brettanomyces* podem ser removidas ou eliminadas.

A NASA partilha um problema idêntico ao colocado aos produtores de vinho: quando existe um incidente no decurso de uma missão (ou colheita), a situação poderá ser desastrosa ou irrecoverável. Por este motivo, os técnicos da NASA desenvolveram o programa *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP – “análise de situações de risco e controlo de pontos críticos”). Este procedimento é, de facto, uma verdadeira filosofia de verificação e reverificação de pontos importantes de um sistema que visa assegurar a existência de uma solução de recuperação no caso de algo falhar. Assim, quando é detectada uma barrica infectada, deverá ser considerada como contaminada ao longo de toda a sua vida na adega. O vinho contido nessa barrica deverá ser filtrado, sulfitado e sujeito a testes de detecção de *Brettanomyces*, antes do seu loteamento ou engarrafamento. Correr o risco de lotear maus aromas não é uma solução a considerar.

Uma vez que os produtores de vinho lutam com diversos padrões de contaminação, mesmo quando são promovidas boas práticas de higiene, localizar as fontes de contaminação será um processo demasiado tardio porque, nessa altura, na maioria dos casos, não terá já qualquer utilidade. A utilização de pipetas de plástico estéreis em vez de um colector de amostras é um auxílio importante para reduzir fortemente as possibilidades de inoculação de *Brettanomyces*.

O equipamento de colheita da amostra pode ser esterilizado com uma fervura durante 15 minutos. Pode ainda ser esterilizado por imersão numa solução de etanol a 70%. Sobre este assunto, Paul Henschke acrescenta: "... microorganismos não-“esporolados” como *Brettanomyces* podem ser mortos por exposição a água quente durante 10 minutos ou ao etanol a 70% durante 5 minutos (ajustar o meio de combate ao organismo invasor é de uma eficácia extrema para o controlo de contaminações por organismos do género *Dekkera* [sic])”.

A utilização de vinho não contaminado por leveduras do género *Brettanomyces* (vinho filtrado, pasteurizado ou tratado com Velcorin®) para o atesto de barricas será uma ajuda para alcançar o mesmo objectivo. Manter as barricas cheias sem qualquer derrame permitirá atrasar o crescimento das populações de leveduras indígenas do género *Brettanomyces* restringindo o acesso ao oxigénio que lhes é necessário. A melhor forma de excluir o O₂ é fechar bem a barrica e não lhe mexer deixá-la em paz!!

Esta constatação coloca uma outra questão: efectuar ou não a micro-oxigenação? Ralph Kunkee (UC Davis) e outros microbiologistas, com conhecimento profundo das espécies do género *Brettanomyces*, desaconselham a sua realização, excepto quando existe um programa adequado de monitorização da presença de compostos como o 4-etilfenol, o 4-etilguiacol e a possibilidade de cultivar as “Brett” em meio específico. De um modo geral, este serviço poderá ser prestado pelos laboratórios de análise de vinhos a um custo moderado.

Infelizmente, nem todos os aromas e aromas indesejáveis produzidos pelas diferentes espécies do género *Brettanomyces* podem ser detectados ou monitorizados da mesma forma que o 4-etilfenol e o plaqueamento é, geralmente, muito lento. Assim, os novos métodos necessitam de ser melhor desenvolvidos para evitar o crescimento de *Brettanomyces* ou para possibilitar a sua detecção atempada nos vinhos armazenados, quando presentes num estado viável²³.

Pela nossa experiência, consideramos não existir qualquer correlação directa entre o 4-etilfenol e o número de células viáveis de *B. bruxellensis*. Para a amostra de vinhos locais com que trabalhamos, tão pouco consideramos a não detecção de 4-etilfenol como um indicador da ausência *Brettanomyces bruxellensis*. No entanto, este método de medição pode ser empregue como medida preventiva para monitorizar as alterações que uma população de *Brettanomyces* activa pode provocar numa barrica ao longo do tempo.

Efeito das leveduras do género *Brettanomyces* nos aromas e gostos do vinho

Os primeiros efeitos observados em vinhos contaminados por *Brettanomyces* incluem, a curto prazo, a perda de frutado e uma diminuição da complexidade global do vinho. A longo prazo, aumentam os aromas indesejáveis tais como *Band-Aid*®, creosote^a, borracha queimada, parecendo haver, em geral, perda de aromas frutados e florais.

^a Substância caustica, extraída do alcatrão, utilizada para a conservação de substâncias orgânicas

Num estudo realizado numa das mais importantes adegas da Califórnia, foram acompanhadas três colheitas com vista à detecção de leveduras do género *Brettanomyces* e de outras alterações no vinho. Muito significativo é o facto de os compostos associados aos aromas e gostos dependentes da casta terem sofrido uma grande conversão em compostos indesejáveis.

Os ácidos cianamínicos (tal como o p-cumárico) podem surgir associados aos aromas florais e a mel do vinho. Uma vez que as espécies do género *Brettanomyces* convertem estes compostos de forma a assegurarem a sua viabilidade na garrafa durante um longo período, faz sentido pensar que estes aromas delicados desapareçam à medida que se prolonga a actividade das leveduras do género *Brettanomyces*. A cromatografia de gás-olfactometria GCO - *Gas chromatography-olfactometry*) demonstrou exactamente este efeito relativamente a vinhos provenientes da adega anteriormente mencionada. Aromas a medicamentos e metálicos e os seus precursores substituíram os aromas florais¹.

Existem diferentes níveis de presença de leveduras do género *Brettanomyces* no vinho, sendo também variados os tipos de efeitos resultantes da sua actividade. Nem todos os defeitos associados a *Brettanomyces* são notados pela generalidade das pessoas. Alguns sofrem de anosmia (incapacidade para cheirar) relativamente aos odores “animal” e a “celeiro”, os quais estão comumente associados a vinhos contaminados, outros são mais sensíveis aos aromas “plástico” (tais como o 4-etilfenol). Ambos os grupos de compostos químicos têm precursores de odores muito diferentes e muitas pessoas não possuem os receptores para os detectar a todos^{1,21}.

É igualmente importante lembrar que foi demonstrado que muitos compostos indicados como estando presentes em vinhos contaminados por *Brettanomyces* tinham aromas plásticos similares, embora os seus precursores tivessem tido uma detecção muito diferente ao nível de um painel de provadores¹. O nível de percepção do odor de 4-etilfenol em água é de aproximadamente 50 ng/L. O de 4-etilguaiacol é de 500 ng/L. Em consonância com outros odores com níveis de percepção idênticos, existe um efeito de adição para o provador relativamente a um vinho. As leveduras do género *Brettanomyces* podem ser um fenómeno muito complexo em vinhos ricos.

O “cheiro a rato” é um outro defeito atribuído à espécie *Brettanomyces bruxellensis* e a algumas bactérias do género *Lactobacillus*. O “cheiro a rato” num vinho é detectado como um retrogosto e não como um odor. O “cheiro a rato” tem origem em isómeros de 2-acetil-tetrahidropiridina e 2-acetil-1-pirrolina, os quais são oxidados na boca dos provadores e percebidos a nível retro-nasal^{14,24}. Estes compostos estão normalmente associados ao odor a “côdea”, a “pipocas velhas” e a “urina de rato”

O nível de percepção do odor de 2-acetil-tetrahidropiridinas é de aproximadamente 1,6 ng/L! Mais: Paul Henschke e colaboradores demonstraram que todas as espécies de *Brettanomyces* e *Dekkera* testadas podem produzir odores indesejáveis a “rato” bem como os resultantes da acetiltetrahidropiridina²⁴.

Qual o futuro das *Brettanomyces*?

Durante os próximos cinco anos, será desenvolvido um método de detecção molecular o qual permitirá a obtenção de resultados quantitativos num dia. O nosso laboratório tem vindo a desenvolver métodos com este fim. Actualmente, o trabalho tem vindo a ser desenvolvido com

base em sondas específicas para a sequência genética de *Brettanomyces bruxellensis*, com uma especificidade indicada de 100% ²².

A detecção de um organismo pela utilização de metodologias baseadas no DNA coloca alguns problemas. Um dos problemas está relacionado com a relativa estabilidade do DNA (tal como alguns tipos de RNA). Se estas moléculas são detectadas e nenhuma célula viável de *Brettanomyces bruxellensis* está de facto a alterar o vinho, então estamos na presença de um falso resultado positivo. Isto significa que, aparentemente, as leveduras do género *Brettanomyces* estão presentes, alterando o frutado, o que, na realidade, não acontece.

As tecnologias baseadas no DNA são extremamente sensíveis pelo que resultados positivos falsos (“falsos positivos”) são uma questão importante para aqueles que desenvolvem métodos de detecção molecular. No entanto, os métodos de cotagem tradicionais podem esconder “falsos negativos” (por exemplo: não parece plausível que leveduras do género *Brettanomyces* que não crescem possam metabolizar ácido cianamínico).

Outra questão importante é saber quem pagará os custos destes testes. Quando consideramos que uma barrica poderá ter um valor superior a €4.000 ou mais, um teste bi-mensal com um custo de €50 para detectar e enumerar as espécies de *Brettanomyces* presentes, antes de ser detectado qualquer odor ou gosto indesejado, poderá compensar o seu custo. O custo inicial do equipamento para efectuar este trabalho será elevado, mas a detecção de *Brettanomyces* ainda na barrica, antes de serem atingidos os níveis de percepção, pela utilização de métodos químicos ou moleculares, poderá pagar esse investimento em apenas alguns anos! Estes serviços estarão em breve disponíveis nos laboratórios comerciais de análise de vinhos.

A indústria de vinho tem sido lenta a adoptar os métodos de tipificação molecular e de detecção. Esta situação poderá ter como causa o facto de os microorganismos presentes no vinho não serem patogénicos. Por outro lado, tem vindo a aumentar o receio de um excesso de despesas, no seio da indústria alimentar, relacionadas com o desenvolvimento de protocolos e equipamentos. Esta parece ser, por isso, uma oportunidade de ouro para a utilização destes métodos, caso seja possível ultrapassar os obstáculos culturais e os limites impostos pelos custos da sua utilização na indústria do vinho, possibilitando assim a sua utilização diária.

Finalmente, pensamos ser necessário estudar, em laboratório, com a ajuda de um simples tubo de ensaio, a capacidade das enzimas responsáveis pela conversão de percursores em odores indesejáveis. O que é que realmente acontece quando são rompidas as paredes celulares das leveduras da espécie *Brettanomyces bruxellensis* e é libertado todo o seu conteúdo no vinho? Poderão as enzimas, anteriormente contidas pelas células, continuar a alteração do vinho da mesma forma indesejada? E durante quanto tempo? Esta ideia é suficiente para criar algumas preocupações aos produtores de vinho.

Conclusão: a percepção é tudo

Muitos produtores de vinho propuseram algumas teorias para explicar as reacções que podem ocorrer num vinho contaminado por *Brettanomyces*. Outros propõem soluções que levariam um longo período a ser postas em prática, não só pelo estigma que lhes está associado, como também pela gestão feita das leveduras do género *Brettanomyces* presentes na adega. Entre estes tópicos controversos está a utilização proposta dos esterilizantes de bebidas e o *flash* pasteurizante.

A discussão promovida neste artigo visou aprofundar o conhecimento sobre o género *Brettanomyces*, devendo ser encarada como um resumo dos trabalhos actualmente existentes sobre os problemas associados a infecções provocadas por este género de leveduras nas adegas. “*Brettanomyces*” continua a ser um assunto que apaixona aqueles directamente envolvidos, quando comparado com outros problemas, talvez mais importantes, da viticultura e da gestão económica de adegas. Perante esta constatação, qual o fundamento para que continuem a ser desenvolvidos trabalhos de investigação?

Alguns agentes da indústria do vinho afastaram-se totalmente do assunto e proclamaram uma relação simbiótica natural entre o bom vinho e as leveduras do género *Brettanomyces*, a qual os produtores deveriam aceitar.

Outros agentes contactados com vista a avaliar a aceitação da ideia “boas *Brettanomyces*”, acreditam que esta mais não é que uma desculpa para a produção de um vinho com defeitos. Apesar de tudo, se um vinho foi produzido em condições que tenham possibilitado o desenvolvimento de uma estirpe específica de “boas *Brettanomyces bruxellensis*”, quaisquer outras “más estirpes” poderão entrar em competição com aquela; então, onde deveriam ser localizados os sensores de controlo de produção? Talvez na selecção de estirpes e na filtração selectiva.

Um comprador de vinho informou-nos estar desapontado com os produtores de vinho e críticos da especialidade que promoveram os efeitos relacionados com a actuação das leveduras do género *Brettanomyces* no vinho. Ele acreditava, até então, ter terminado a era da produção de “vinho a martelo”. Serão ainda necessários alguns anos de investigação de nível muito básico para que se possa assegurar a gestão total do impacto causado pelas leveduras do género *Brettanomyces*. A indústria do vinho parece ter seleccionado a *Brettanomyces* e alguns outros organismos específicos com base na sua capacidade para competir em nichos muito restritos.

No entanto, com esta afirmação poderemos ser apontados por transmitir o ponto de vista da ciência. Caso fosse possível disponibilizar esse tipo de controlo microbiológico, enquadrado por um sistema biológico dinâmico, penso que os produtores de vinho acolheriam de bom grado esta discussão. Até lá, pensamos que o género *Brettanomyces* continuará a consumir tempo e debates sobre o financiamento da investigação. Por este motivo as adegas vêm promovendo os seus próprios trabalhos, a um nível básico, no sentido de descobrir o comportamento da espécie *Brettanomyces bruxellensis*.

A este propósito deixamos um pedido: se alguém detiver estirpes que nos queira enviar, agradecemos que o façam! Estamos a construir uma base de dados com características e marcadores moleculares, para que quando alguém descobrir um subtipo específico de *Brettanomyces bruxellensis* que produza apenas características positivas num vinho tinto, possamos ter alguma informação sobre essa estirpe.

Há alguns anos, uma determinada garrafa de vinho tinto era procurada na Califórnia especificamente para que fosse levada para laboratório e fosse feita a cultura de *Brettanomyces bruxellensis*. O “cheiro” era forte com esta estirpe. Dificilmente alguém conseguiria levar este vinho à boca! Encontrámos vinhos idênticos em França, com cinco anos de envelhecimento, bem piores, mas estes foram os mais conceituados “carácter francês” (“*french character*”) que alguma vez encontrámos num vinho da Califórnia ou Nova York.

No máximo, apenas poderia pagar €25 por uma garrafa e esta despesa, com um vinho tão cheio de defeitos, não poderia ser justificada num curso sobre vinhos; hoje, gostaria de tê-lo

feito. A lição que este vinho pode proporcionar é importante. As notas de prova dos produtores de vinho afirmam que este vinho foi a representação mais fina de um rótulo Bordeaux. Enalteceram a sua chegada, a tempo das comemorações do *Milénium*. Recentemente, a adega que o produziu vendeu a última garrafa por bastante mais que €25. Algo a considerar quando não se consegue dormir à noite ao pensar nos estragos que a *Brettanomyces* está a provocar no nosso vinho.

Por outro lado, recebemos no nosso laboratório, para análise, alguns vinhos que apresentavam alguns aromas resultantes da actividade de *Brettanomyces*, e que estavam, claramente, em linha com características regionais específicas, os quais haviam sido rejeitados pelos compradores de vinho dado o seu “carácter *Brettanomyces*”. O custo desta rejeição para uma adega, em resultado de uma sobre-sensibilidade a *Brettanomyces*, não é apenas o da redução das suas margens de lucro, mas também os danos causados à sua imagem.

Para conhecimento

Os autores desejam agradecer ao Dr. Ralph Kunkee e ao Dr. Paul A. Henschke as suas persistentes e atentas revisões deste trabalho. Agradecemos ainda ao Dr. Jonathan Licker a investigação aprofundada dos aspectos históricos das questões abordadas. Finalmente, agradecemos ao Dr. Carl Shively os seus comentários sobre este assunto importante.

Referências

1. Licker, J. L., “The sensory analysis and Gas Chromatography-Olfactometry (GCO) of wines with ‘Brett’ flavor.” Master’s Thesis. Cornell University Department of Food Science and Technology. May, 1998.
2. Clausen, N. H., “On a method for the application of Hansen’s pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers.” Journal of the Institute of Brewing. 1904, 10, 308-331.
3. Herderich, M.; Costello, P.J.; Grbin, P.R.; Henschke, P.A. “Occurrence of 2-acetyl-1-pyrroline in mousy wines.” Nat. Prod. Let. 7: 129–132; 1995.
4. Kurtzman, C. P. and J. W. Fell (Eds.), “The Yeasts: a taxonomic study” 4th Edition. 1998. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.
5. Dickinson-J-Richard. “‘Fusel’ alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeast.” Microbiology (Reading) 142 (6). 1996. 1391-1397.
6. Boekhout, T., C. P. Kurtzman, K. O’Donnell and M. T. Smith, “Phylogeny of the Yeast Genera *Hanseniaspora* (Anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (Anamorph *Brettanomyces*, and *Eeniella* as Inferred from Partial 26S Ribosomal DNA Nucleotide Sequences.” International Journal of Systematic Bacteriology. 1994, 44 (4) p. 781-786
7. Kunkee, R., Personal communication in review of this manuscript. 2001
8. Millet-V. Lonvaud-Funel-A., “The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage.” Letters in Applied Microbiology. 30 (2). Feb. 2000. 136-141.
9. Egli C.M., Henick-Kling, T. “Identification of *Brettanomyces*/*Dekkera* species based on polymorphism in the RNA internal transcribed spacer region.” Am. J. Enol. & Vitic. (accepted 5/2001)
10. Mitrakul C.M., Henick-Kling, T, Egli C.M. “Discrimination of *Brettanomyces*/*Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods.” Food Microbiol. 16:3-14; 1999.

11. Wright, J. M., and Parle, J. N. "Brettanomyces in the New Zealand wine industry." *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1974, 17, 273-278.
12. Arvik, T. "Brett 101: Overview of Brettanomyces, its Occurrence, Growth and Effect on Wine Flavors." Presentation: Vinqury's MegaBrett Symposium. Santa Rosa, CA. June 6, 2001.
13. Heresztyn, T. "Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by Brettanomyces yeast." *Archives of Microbiology* 1986, 146, p.96-98.
14. Heresztyn, T. "Formation of substituted tetrahydropyridines by species of Brettanomyces and Lactobacillus isolated from mousy wines." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 1986, 37, p. 127-132.
15. Custers, M. T. J. "Onderzoekingen over het Gistseglacht Brettanomyces." Thesis, Delft University, 1940.
16. Freer-S-N., Dien-B-S., Matsuda-S., and Bothast-R-J. "Acetic acid production by Brettanomyces yeast." Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology. 100. 2000. Abstract number 503.
17. Chatonnet, P., D. Dubourdieu and J. N. Boidron "The influence of Brettanomyces/Dekkera sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 1995, 46, p. 463-468.
18. Cox, D. J. "Studies on the energetics and growth benefit of malolactic fermentation in lactic acid bacteria." Ph.D. Dissertation, Cornell University, 1991.
19. Cavin, J. F., V. Andioc, P. X. Etiévant, and C. Divies "Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 1993, 44, p. 76-80.
20. Cox, Donald J., and Henick-Kling, Thomas. "Proton-motive force and ATP generation during malolactic fermentation." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 46 (3). 1995, p.319-323
21. Lawless, H. T. and Heymann, H. "Sensory Evaluation of Food;" Chapman & Hall: New York, 1998.
22. Stender, Henrik, Kurtzman, Cletus. Hyldig-Nielsen-Jens-J. Sorensen-Ditte. Broomer-Adam. Oliveira-Kenneth. Perry-O'Keefe-Heather. Sage-Andrew. Young-Barbara. Coull-James. "Identification of Dekkera bruxellensis (Brettanomyces) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes." *Applied and Environmental Microbiology.* 67 (2). February, 2001 p. 938-941
23. Pollnitz, A.P.; Pardon, K.H.; Sefton, M.A. "4-Ethylphenol, 4-ethylguaiacol and oak lactones in Australian red wines." *Aust. Grapegrower & Winemaker* (438): 45-52; 2000
24. Grbin, P.R.; and Henschke, P.A. "Mousy off-flavor production in grape juice and wine by Dekkera and Brettanomyces yeasts." *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 255-262; 2000.
25. Boulton, R. B., V. Singleton, L.F. Bisson and R. Kunkee. *Principles and Practices of Winemaking.* 1996. Chapman & Hall Publishers New York, NY.