



**Universidade do Algarve**

**Instituto Superior de Engenharia**

# **Controlo e análise do processo de produção de Aguardente de medronho da Serra do Caldeirão**

**David Miguel Cabrita do Espírito Santo**

---

**Mestrado em Tecnologia de Alimentos**

---

**Faro**

**2010**



**Universidade do Algarve**

**Instituto Superior de Engenharia**

# **Controlo e análise do processo de produção de Aguardente de medronho da Serra do Caldeirão**

**David Miguel Cabrita do Espírito Santo**

**Relatório de projecto orientado por:**

**Professora Doutora Célia Quintas e Professora Ludovina Galego**

---

**Mestrado em Tecnologia de Alimentos**

---

**Faro**

**2010**

## Agradecimentos

---

Os meus sinceros agradecimentos a todos os que me ajudaram, encorajaram e estiveram presentes ao longo deste trabalho de uma forma ou de outra.

À Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas pela motivação e apoio ao longo de todo o trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela dedicação, pela forma como me acompanhou na elaboração deste relatório e pela forma como me acompanhou na identificação das leveduras utilizando técnicas de biologia molecular.

À Professora Ludovina Rodrigues Galego por todo o apoio demonstrado ao longo do trabalho pelas condições colocadas à disposição na elaboração dos ensaios, por toda a ajuda prestada, pelo facto de me possibilitar adquirir e complementar conhecimentos ao longo da realização deste estudo. Agradeço ainda o entusiasmo transmitido nas várias pesquisas efectuadas nas diversas análises aos destilados, na quantificação e identificação de voláteis.

À Comissão Coordenadora do Mestrado de Tecnologia dos Alimentos, em especial ao Professor Doutor Eduardo Esteves, pela sua disponibilidade em esclarecer dúvidas relacionadas com o mesmo.

À Professora Doutora Maria Nelma Gaspar por toda a ajuda e ensinamentos transmitidos, pelo aconselhamento e por todo o apoio prestado ao longo do trabalho.

A todos os técnicos do Laboratório de Microbiologia, de Química e Enologia, pela disponibilidade prestada ao longo do trabalho (Sílvia Madeira, Neusa Rodrigues, Vera Gonçalves, Vera Francisco).

À Mestre Teresa Cavaco pela disponibilidade e ajuda na determinação e identificação de ácidos orgânicos e de açúcares ao longo do processo em estudo.

À destilaria Manuel de Sousa Martins e ao Sr. Manuel de Sousa Martins pela sua colaboração e disponibilidade e acima de tudo pelas condições oferecidas que me permitiram realizar este estudo.

À Associação IN LOCO pela sua motivação e colaboração nas fases iniciais do presente trabalho, nomeadamente pelo apoio financeiro.

Às minhas colegas de Mestrado e de Laboratório Neusa Rodrigues e Maria do Carmo Alves, pela boa disposição, entajuda e amizade ao longo de todo o trabalho.

A toda a família pelo apoio que me deram em especial à minha Mãe, à minha Irmã e aos meus Avós. Agradeço a compreensão nas alturas mais complicadas e a forma como toleraram a minha falta de tempo para lidar com variadas situações em prol de realizar e terminar este estudo.

Aos meus amigos que me vão encorajando todos os dias e que têm sido bastante compreensivos nas várias situações e pela forma como me apoiam, Ângela Viegas, Andreia Neto, Inês Agostinho, Nuno Van Dijk, Pedro Oliveira, Bruno Oliveira, Tomás Vieira. Agradeço-vos por tudo.

## Lista de Abreviaturas

---

%	Porcentagem
% vol	Porcentagem de volume
µm, nm, mm, cm, m, km	Micrómetro, nanómetro, milímetro, centímetro, metro, quilómetro
µl, ml, l	Microlitro, mililitro, litro,
g, kg	Gramma, quilograma
ANOVA	Análise de variância
Al	Alumínio
As	Arsénio
B	Boro
°C	Graus centígrados
°C/min	Graus centígrados por minuto
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
CfoI	Enzima de restrição de <i>Clostridium formicoaceticum</i>
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	Etanol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Cr	Crómio
Cu	Cobre
CW-DVB	Carbowax/Dvinilbenzeno
Dez	Dezembro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano
EDTA	Tetra-acetato de etileno diamina
F5	Fermentação 5
F5A	1 ° Destilado da Fermentação 5
F5B	2 ° Destilado da Fermentação 5
F7	Fermentação 7
F7A	1 ° Destilado da Fermentação 7
F7B	2 ° Destilado da Fermentação 7

<b>F10</b>	<b>Fermentação 10</b>
<b>F10A</b>	<b>1 ° Destilado da Fermentação 10</b>
<b>F10B</b>	<b>2 ° Destilado da Fermentação 10</b>
<b>Fev</b>	<b>Fevereiro</b>
<b>Fe</b>	<b>Ferro</b>
<b>FID</b>	<b>Detector de ionização de chama (Flame ionization detector)</b>
<b>Ga</b>	<b>Gálio</b>
<b>GC</b>	<b>Cromatografia gasosa (Gas chromatography)</b>
<b>GC-MS</b>	<b>Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (Gas chromatography mass spectrometry)</b>
<b>g / hl álcool puro</b>	<b>Gramas por hectolitro de álcool puro</b>
<b>HACCP</b>	<b>Análise de perigos e controlo de pontos críticos (Hazard Analysis Critical Control Point)</b>
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>Ácido fosfórico</b>
<b><i>HaeIII</i></b>	<b>Enzima de restrição de <i>Haemophilus aegyptius</i></b>
<b><i>HinfI</i></b>	<b>Enzima de restrição de <i>Haemophilus Influenzae</i></b>
<b>HPLC</b>	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatography)</b>
<b>HS-SPME-GC</b>	<b>Espaço de cabeça-microextração em fase sólida-Cromatografia gasosa (Headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography)</b>
<b>K</b>	<b>Potássio</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>di-Hidrogenofosfato de Potássio Monobásico</b>
<b>l</b>	<b>Litro</b>
<b>log</b>	<b>Logaritmo</b>
<b>Li</b>	<b>Lítio</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>m<sup>2</sup>, km<sup>2</sup></b>	<b>Metro quadrado, quilómetro quadrado,</b>
<b>Mar</b>	<b>Março</b>
<b>MEA</b>	<b>Meio de cultura de agar e extracto de malte (Malt Extract Agar)</b>
<b>mg/l</b>	<b>Miligramma por litro</b>
<b>mg/ml</b>	<b>Miligramma por mililitro</b>

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloreto de Magnésio</b>
<b>min</b>	<b>Minuto</b>
<b>ml/min</b>	<b>Mililitro por minuto</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>N</b>	<b>Normalidade</b>
<b>N.</b>	<b>Norte</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamida adenida dinucleótido (forma reduzida)</b>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<b>Nicotinamida adenida dinucleótido (forma oxidada)</b>
<b>NaOH</b>	<b>Hidróxido de sódio</b>
<b>ND</b>	<b>Não detectada</b>
<b>Nov</b>	<b>Novembro</b>
<b>NP</b>	<b>Norma Portuguesa</b>
<b>Li</b>	<b>Lítio</b>
<b>Mg</b>	<b>Magnésio</b>
<b>Mn</b>	<b>Manganês</b>
<b>Na</b>	<b>Sódio</b>
<b>Ni</b>	<b>Níquel</b>
<b>Out</b>	<b>Outubro</b>
<b>P</b>	<b>Fósforo</b>
<b>PA</b>	<b>Poliacrilato</b>
<b>PAMAF</b>	<b>Programa de Apoio à Modernização Agrícola e Florestal</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de Bases</b>
<b>Pb</b>	<b>Chumbo</b>
<b>PCA</b>	<b>Meio de cultura de contagem de microrganismos (Plate Count Agar)</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacção em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)</b>
<b>PDA</b>	<b>Meio de cultura de agar, batata e dextrose (Potato Dextrose Agar)</b>
<b>PDMS</b>	<b>Polidimetilsiloxano</b>
<b>PDMS-DVB</b>	<b>Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno</b>
<b>p/v</b>	<b>Peso/ volume</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>

<b>RFLP</b>	<b>Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphisms)</b>
<b>rpm</b>	<b>Rotações por minuto</b>
<b>rRNA</b>	<b>RNA ribossomal</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil sulfato de sódio</b>
<b>SPME</b>	<b>Microextracção em fase sólida (Solid-phase microextraction)</b>
<b>Sr</b>	<b>Estrôncio</b>
<b>TAE</b>	<b>Tris-acetato-EDTA</b>
<b>Ti</b>	<b>Titânio</b>
<b>Tris HCl</b>	<b>Cloridrato de <i>Tris</i>-(hidroximetil)-aminometano</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colónias</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra Violeta</b>
<b>UV-Vis</b>	<b>Radiação Ultra Violeta visível</b>
<b>V</b>	<b>Vanádio</b>
<b>V (unidade)</b>	<b>Volt</b>
<b>V/V</b>	<b>Volume /volume</b>
<b>W.</b>	<b>Este</b>
<b>YM</b>	<b>Meio de cultura de extracto de levedura e malte (Yeast Media)</b>
<b>Zn</b>	<b>Zinco</b>



## Resumo

---

A aguardente de medronho é uma bebida destilada produzida a partir de frutos fermentados da espécie *Arbutus unedo* L (medronheiro). Esta bebida é produzida, na Serra do Caldeirão - Algarve, em pequena escala e de uma forma artesanal, podendo o produto final possuir características variáveis em termos de qualidade. O processo fermentativo do fruto de *Arbutus unedo* L. foi estudado através de parâmetros microbiológicos e físico-químicos de três fermentações diferentes, de forma a comparar a sua evolução ao longo do tempo. Em relação aos parâmetros microbiológicos, estudou-se a evolução da microbiota total e da população de leveduras nas fermentações. Os parâmetros físico-químicos analisados foram o pH, a acidez total, os ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, málico, acético, láctico, gálico, cítrico, succínico), o °Brix e o teor de frutose, glucose e sacarose. A formação dos compostos voláteis, etanol, acetato de etilo e isopentanois foi acompanhada durante as fermentações. A quantificação dos compostos voláteis no fermentado foi realizada pelo método da adição de padrão utilizando a micro extracção em fase sólida, com fibra de poliacrilato e análise em cromatógrafo gasoso (HS-SPME-GC). Ao longo do estudo foram isoladas leveduras e identificadas por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciação da região D1/D2 do gene 26S rRNA. Os isolados principais pertenciam aos géneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Dioszegia*, *Dothichiza*, *Hanseniaspora*, *Lachancea*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Torulaspora*. Após as fermentações, os destilados obtidos foram analisados e as suas características foram estudadas de acordo com o Decreto de Lei 283/2000 de 26 de Setembro.

O objectivo do presente trabalho foi estudar o processo de produção da aguardente de medronho (*Arbutus unedo* L.) da Serra do Caldeirão e analisar as características dos destilados obtidos.

Palavras Chave: Medronho ( <i>Arbutus unedo</i> ), Aguardente de Medronho, Leveduras, Fermentação, Compostos voláteis, PCR-RFLP
---

## Abstract

---

“Aguardente de Medronho” is a traditional spirit produced in the South of Portugal, much appreciated due to its sensory characteristics. It is manufactured by fermenting the berries of the Mediterranean shrub *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). Historically this product has been a complement to farmers’ income, and on account of that fact, over the last years efforts have been made to improve the quality of the production process and of the final product. The present study investigated the fermentation process and its influence in the quality of the distillate. The evolution of the total viable counts and of the yeast populations during the fermentation process was followed. The changes of pH, °Brix, reducing sugars, acids, ethanol, ethyl acetate and isopentanol were also monitored. Fruits were harvested during the month of November, mixed with water in 450 l stainless steel vessels that were immediately closed and then allowed to ferment over a specific period of time. This process, took place at room temperature, during Autumn and Winter, relying on the natural microbiota initially present on the fruits and on the surrounding environment. Total viable counts were determined using acidified Plate Count Agar and yeasts were counted on acidified Malt Extract Agar. Yeasts were also isolated during the fermentative process. The isolated yeasts were identified by the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique. Some of the isolated that shown a doubtful pattern, were later confirmed using the 26S rRNA gene sequencing. The identified isolates belong to the genus *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Dioszegia*, *Dothichiza*, *Hanseniaspora*, *Lachancea*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Torulaspora*. Sugars and acids were measured by High-performance liquid chromatography (HPLC) and the volatile compounds (ethanol, ethyl acetate and isopentanol) in the musts were studied by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC) with a polyacrylate fiber. During the fermentation period, yeasts grew exponentially reached stationary phase and remained on this phase for the rest of the study. The levels of sugars and acids increased during the first days and decreased thereafter. The quality parameters of one of the distillates obtained after the fermentation period were in accordance with both the European Directive (Regulation (EC) N° 110/2008 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2008) and the specific Portuguese “medronho” distillate legislation (Decreto-Lei n° 238/2000 of 26 September 2000).

Keywords: Medronho ( <i>Arbutus unedo</i> ), Medronho Spirit, Yeasts, Fermentation, Volatile compounds, PCR-RFLP
--

## Índice de Figuras

---

Figura 1 - Frutos e folhas do medronheiro ( <i>A. unedo</i> L.).	2
Figura 2 - Flores de medronheiro ( <i>A. unedo</i> L.).	3
Figura 3 - Medronhos maduros depois de colhidos.	3
Figura 4 - Representação esquemática do locus rDNA nas leveduras, localização da região ITS1 e ITS2 (Sugita <i>et al.</i> , 2002).	13
Figura 5 - Representação esquemática do locus rDNA nas leveduras, localização da região D4/D2 (Sugita <i>et al.</i> , 2002).	14
Figura 6 - Vista frontal da destilaria.	20
Figura 7 - Alambique e zona de destilação de Manuel Sousa Martins.	21
Figura 8 - Fermentadores de inox da destilaria de Manuel Sousa Martins.	22
Figura 9 - Diagrama de produção de aguardente de medronho.	23
Figura 10 - Aguardente de medronho envelhecida.	24
Figura 11 - Fotografia de satélite do Azinhalinho (Google Earth 2009).	26
Figura 12 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Azinhalino (Google Earth 2009).	26
Figura 13 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Zebro de Cima (Google Earth 2009).	27
Figura 14 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Zebro de Cima, zona Este (Google Earth 2009).	28
Figura 15 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Zebro de Cima, zona Oeste (Google Earth 2009).	28
Figura 16 - Dinâmica da população de leveduras (◆) e da microbiota aeróbia total (■) na Fermentação 5 (A), na Fermentação 7 (B) e na Fermentação 10 (C) (os pontos representados são as médias dos resultados observados em duplicado com o desvio padrão correspondente).	41

Figura 17 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 43  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Aureobasidium pullulans* (A) e *Candida apicola* (B). As bandas m  
correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 18 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 44  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Candida zemplinina* (C) e *Cryptococcus tephrensensis* (D). As bandas  
m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 19 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 44  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Cryptococcus* sp. (E) e *Dothichiza pithyophila* (F). As bandas m  
correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 20 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 45  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Dioszegia zsoltii* (G) e *Hanseniaspora uvarum* (H). As bandas m  
correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 21 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 45  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Issatchenkia orientalis* (I) e *Lachancea thermotolerans* (J). As  
bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 22 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 46  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Metschnikowia* sp. (K) e *Metschnikowia* aff. *fructicola* (L). As  
bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 23 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 46  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Pichia membranaefaciens* (M) e *Rhodotorula nothofagi* (N). As  
bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 24 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 47  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Rhodotorula mucilaginosa* (O) e *Saccharomyces cerevisiae* (P). As  
bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 25 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por 47  
PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e  
*HinfI* (4) das espécies *Sporidiobolus* sp.(Q) e *Torulaspora delbrueckii* ( R). As bandas m  
correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Figura 26 - Cronograma da sucessão das espécies de leveduras ao longo das 48  
Fermentações.

Figura 27 - Evolução do ° Brix na Fermentação 5(◆), Fermentação 7(▲) e Fermentação 49  
10 (●).

Figura 28 - Evolução dos valores de pH(■) e da % de acidez expressa em ácido 52  
lático(◆) na Fermentação 5 (A), na Fermentação 7 (B) e na Fermentação 10 (C).

Figura 29 - Evolução da formação de acetato de etilo nas Fermentações: F 5 (×), F 7 (■) 54  
e F 10 (▲).

Figura 30 - Evolução da formação de etanol nas Fermentações: F 5 (×), F 7 (■) e F 10 55  
(▲).

Figura 31 - Evolução dos isopentanóis nas Fermentações: F 5 (×), F 7 (■) e F 10 (▲). 56

Figura 32 - Variação das temperaturas máximas (.....) e mínimas (- - - -) da sala de 57  
fermentação no período em que decorreram as fermentações: Fermentação 5 (■),  
Fermentação 7 (■) e Fermentação 10 (■).

## Índice de Tabelas

---

Tabela I - Propriedades químicas do fruto do medronheiro ( <i>A. unedo</i> L.) (Özcan e Haciseferoğullari, 2007).	4
Tabela II - Características do fruto do medronheiro ( <i>A. unedo</i> L.) em dois estados de maturação (Alarcão-E-Silva <i>et al.</i> , 2000).	5
Tabela III - Propriedades dimensionais do fruto de medronheiro (Özcan e Haciseferoğullari, 2007).	5
Tabela IV - Especificações dos parâmetros físico-químicos e organolépticos para a comercialização da aguardente de medronho (Anexo do artigo 3º do Decreto Lei 238/2000 de 26 de Setembro de 2000).	7
Tabela V - Leveduras isoladas de diversas fermentações de cachaça artesanal (Oliveira <i>et al.</i> , 2005; Nova <i>et al.</i> , 2009; Gomes <i>et al.</i> , 2009).	11
Tabela VI - Propriedades e aplicações de diferentes tipos de fibras e das suas fases estacionárias disponíveis comercialmente (Valente e Augusto, 2000; Alpendurada, 2000).	17
Tabela VII - Recolha de amostras nas Fermentações 5, 7 e 10.	30
Tabela VIII - Reagentes utilizados na mistura para PCR (Mix).	33
Tabela IX - Condições da amplificação através de PCR.	33
Tabela X - Reagentes utilizados na preparação das soluções para as reacções de restrição com endonucleases.	34
Tabela XI - Reagentes utilizados na mistura para PCR (Mix).	35
Tabela XII - Tamanho em bp (pares de bases) dos produtos de PCR, dos fragmentos resultantes da actividade de três endonucleases de restrição e percentagem de isolados das diferentes espécie das três Fermentações.	43
Tabela XIII - Percentagem de identificação por sequenciação da região D1/D2 das espécies isoladas nas três Fermentações.	49
Tabela XIV - Evolução dos ácidos orgânicos na Fermentação 5.	50
Tabela XV - Evolução dos ácidos orgânicos na Fermentação 7.	51
Tabela XVI - Evolução dos ácidos orgânicos na Fermentação 10.	51
Tabela XVII - Evolução dos açúcares (frutose, glucose, sacarose) na Fermentação 5.	53
Tabela XVIII - Evolução dos açúcares (frutose, glucose, sacarose) na Fermentação 7.	53

Tabela IXX - Evolução dos açúcares (frutose, glucose, sacarose) na Fermentação 10.	54
Tabela XX - Características da aguardente resultante da Fermentação 5 (F5A e F5B), da Fermentação 7 (F7A e F7B) e da Fermentação 10 (F10A e F10B).	58

## ÍNDICE GERAL

---

Agradecimentos	ii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	viii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvi
I- Introdução	1
1. O medronheiro ( <i>Arbutus unedo</i> L.)	1
1.1. Composição nutricional do fruto do medronheiro ( <i>A. unedo</i> L.)	3
1.2. Subprodutos do medronheiro	5
1.2.1. Aguardente de medronho	6
2. Fermentação alcoólica	8
3. Leveduras	9
3.1. Identificação de leveduras	12
3.1.1. Identificação por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)	13
3.1.2. Sequenciação parcial do gene 26S rRNA	14
4. Compostos voláteis	14
4.1. Análise de compostos voláteis por microextração em fase sólida	16
II- Materiais e Métodos	20
1. A destilaria	20
1.1. Processo de produção de aguardente de medronho	21
1.2. Caracterização e localização da zona em estudo	25
1.2.1. Azinhalinho	25
1.2.2. Zebro de Cima	27
2. Preparação do processo fermentativo	29
2.1. Recolha de amostras	29
3. Metodologias de análise dos fermentados	31
3.1. Parâmetros microbiológicos dos processos fermentativos	31



3.1.1. Contagem da microbiota aeróbia total	31
3.1.2. Contagem de leveduras	31
3.1.3. Isolamento de leveduras	32
3.1.4. Manutenção das culturas de leveduras	32
3.2. Identificação de leveduras	32
3.2.1. Extração de DNA	32
3.2.2. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)	33
3.2.3. Identificação por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)	34
3.2.4. Sequenciação parcial do gene 26S rRNA	34
3.3. Parâmetros físico-químicos dos fermentados	35
3.3.1. Doseamento do resíduo seco solúvel (°Brix)	35
3.3.2. Doseamento da acidez total	36
3.3.3. Determinação do pH	36
3.3.4. Monitorização das temperaturas ao longo do processo fermentativo	36
3.3.5. Identificação e quantificação de ácidos orgânicos	36
3.3.6. Identificação e quantificação de açúcares	37
3.3.7. Doseamento dos compostos voláteis ao longo da fermentação: acetato de etilo, etanol e isopentanóis	37
3.3.7.1. Extração e análise de compostos voláteis dos fermentados por microextração em fase sólida	38
4. Metodologias de análise dos destilados	39
4.1. Processo de destilação	39
4.2. Doseamento dos compostos voláteis	39
4.3. Doseamento do grau alcoólico	39
4.4. Doseamento da acidez	39
4.5. Doseamento do teor de cobre	40
5. Análise estatística de resultados	40
III- Resultados	41
1. Parâmetros microbiológicos	41
2. Identificação de leveduras por análise de polimorfismos de fragmento de restrição (RFLP)	42

3. Sequenciação parcial do gene 26S rRNA	48
4. Parâmetros físico-químicos do processo fermentativo	49
4.1. Doseamento resíduo seco solúvel (°Brix)	49
4.2. Identificação e quantificação de ácidos orgânicos	50
4.3. Determinação do pH e doseamento da acidez total	52
4.4. Identificação e quantificação dos açúcares	53
4.5. Doseamento dos compostos voláteis ao longo da fermentação: acetato de etilo, etanol e isopentanóis	54
4.6. Monitorização das temperaturas do processo fermentativo	56
5. Análises físico-químicas no destilado	57
6. Discussão	60
7. Considerações finais	67
8. Referências Bibliográficas	69
ANEXOS	

## **I- Introdução**

A optimização da qualidade da aguardente de medronho está dependente dos conhecimentos obtidos relativamente à evolução dos parâmetros físico-químicos e biológicos ao longo de todo o processo de produção e aos seus efeitos no produto final. A fase da fermentação do medronho é, certamente muito importante na qualidade do produto final. Assim, a monitorização de um processo fermentativo desde o seu início, controlando os parâmetros químicos, físicos e microbiológicos será útil para os vários produtores de aguardente de medronho.

A fermentação do medronho, actualmente, é levada a cabo pela sua microbiota epifítica. Se se conhecer as espécies responsáveis pelo processo fermentativo torna-se possível providenciar as melhores condições para que a fermentação progrida, de forma a optimizar o processo de produção. Durante a fermentação natural do medronho, para além das leveduras responsáveis pela produção de etanol, estão presentes no fruto, outros microrganismos que podem originar subprodutos indesejados. Estes microrganismos incluem bactérias e várias estirpes de leveduras que podem dominar durante a primeira fase da fermentação e ter efeitos negativos na aguardente que se reflectirão nas suas características químicas e organolépticas. Para além disto, estas espécies causam um consumo desnecessário de açúcares.

O presente trabalho teve como principal objectivo o estudo da fermentação do medronho (fruto de *Arbutus unedo* L.), através da monitorização de parâmetros microbiológicos e físico-químicos de três fermentações independentes ao longo do tempo. Foi ainda objectivo deste trabalho identificar as leveduras isoladas ao longo do processo de fermentação e a analisar os destilados obtidos de acordo com os parâmetros referenciados no Decreto-lei 238/2000 de 26 de Setembro.

### **1. O medronheiro (*Arbutus unedo* L.)**

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é um arbusto abundante na região mediterrânica que pertence ao género *Arbutus* e à família *Ericaceae*. Atinge normalmente entre os três e seis metros, podendo, no entanto, crescer até aos 10 metros de altura. Possui ramos sinuosos e folhas persistentes, serradas simples e verdes, sendo uma boa opção como árvore ornamental (Figura 1).

Os troncos são verdes quando jovens e tornam-se avermelhados quando a planta envelhece (Gilman e Watson, 1993; Mereti *et al.*, 2002; Soufleros *et al.*, 2005).



Figura 1 - Frutos e folhas do medronheiro (*A. unedo* L.).

Este arbusto adapta-se a numerosos tipos de solos, ácidos, básicos, arenosos, rochosos e argilosos. Resiste a secas moderadas e cresce bem com exposição total ou parcial à luz solar (Gilman e Watson, 1993).

Possuí flores brancas ou verdes e por vezes rosadas, em forma de guizo (Figura 2), que se encontram nas árvores em cachos. As árvores em floração possuem em simultâneo os frutos da floração anterior (Gilman e Watson, 1993; Özcan e Haciseferoğullari, 2007).



Figura 2 - Flores de medronheiro (*A. unedo* L.).

Os frutos são esféricos de dimensões variáveis e podem ir de um centímetro a quatro centímetros de diâmetro. A cor vermelha/laranja (Figura 3), característica do estado final de maturação, ocorre um ano após a fecundação. Os frutos são carnudos com saliências piramidais e contêm sementes (de 20 a 25 sementes) (Gilman e Watson, 1993; Soufleros *et al.*, 2005).



Figura 3 - Medronhos maduros depois de colhidos.

### 1.1. Composição nutricional do fruto do medronheiro (*A. unedo* L.)

O fruto do medronheiro (*A. unedo* L.) é composto na sua maior parte por água, açúcares, ácidos, proteínas e minerais como indicado na Tabela I (Özcan e Haciseferoğullari, 2007). O

estado de maturação dos frutos interfere na composição dos mesmos como se pode observar na Tabela II (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001).

**Tabela I - Propriedades químicas do fruto do medronheiro (*A. unedo* L.)** (Özcan e Haciseferoğullari, 2007).

Propriedades	Valores
Humidade (%)	53,72 ± 2,10
Proteínas (%)	3,36 ± 0,12
Gorduras (%)	2,1 ± 0,10
Fibras (%)	6,4 ± 1,10
Valor energético (kcal/g)	327 ± 13,00
Cinzas (%)	2,824 ± 0,12
pH	4,6 ± 0,10
Acidez (%)	0,4 ± 0,10
Extracto solúvel em água (%)	35,6 ± 2,30
Extracto solúvel em álcool (%)	19,16 ± 3,20
Extracto solúvel em éter (%)	3,0 ± 0,40
Sulfito de diemetilo (g/kg)	5,3 ± 0,60
Óleos essenciais (%)	0,02 ± 0,00
Compostos minerais (mg/kg)	
Al	20,11 ± 2,69
As	10,58 ± 6,47
B	16,03 ± 2,12
Ca	4959,02 ± 150
Cd	0,19 ± 0,05
Cr	2,41 ± 0,96
Cu	1,65 ± 0,41
Fe	12,15 ± 1,11
Ga	0,47 ± 0,43
K	14909,08 ± 1687
Li	0,94 ± 0,15
Mg	1315,57 ± 129,19
Mn	4,44 ± 0,55
Na	701,26 ± 80
Ni	0,13 ± 0,14
P	3668,56 ± 339,69
Pb	0,51 ± 0,04
Sr	5,10 ± 0,80
Ti	0,16 ± 0,26
V	16,63 ± 4,27
Zn	8,09 ± 0,96

**Tabela II - Características do fruto do medronheiro (*A. unedo* L.) em dois estados de maturação** (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001).

Nutriente	Composto	Fruto verde	Fruto maduro
Açúcares (%/peso)	Sacarose	8,77 ± 0,06	8,68 ± 0,03
	Glucose	3,95 ± 0,23	12,5 ± 0,30
	Frutose	2,33 ± 0,04	20,8 ± 0,20
Ácidos orgânicos (g/100 g)	Málico	1,95 ± 0,16	2,63 ± 0,23
	Quínico	7,35 ± 0,16	5,99 ± 0,05
	Fumárico	Não detectado	Vestígios
Vitaminas (mg/100 g)	Niacina	4,9 ± 1,70	9,1 ± 0,60
	Acido Ascórbico	542 ± 11	346 ± 7
	B-caroteno	38,1 ± 0,37	70,9 ± 5,20
Proteínas (%)		4,6 ± 0,40	3 ± 0,10
Fenóis (mg/g)	Taninos	3,13 ± 0,06	1,75 ± 0,02
	Antocianinas	0,25 ± 0,02	1,01 ± 0,01
Fenóis Totais (mg/g)		15,5 ± 0,60	14,6 ± 0,90
Cor	L*	81,75	59,82
	a*	-4,40	18,75
	b*	36,49	38,11
	C*	36,49	42,47
	h°	96,87	63,80

Os frutos possuem dimensões que se encontram resumidas na Tabela III (Özcan e Haciseferoğullari, 2007).

**Tabela III - Propriedades dimensionais do fruto de medronheiro** (Özcan e Haciseferoğullari, 2007).

Propriedades	Valores
Peso (g)	0,70 ± 0,027
Diâmetro (mm)	10,70 ± 0,111
Comprimento (mm)	8,51 ± 0,134
Diâmetro geométrico médio (mm)	9,91 ± 0,027
Esfericidade	1,17 ± 0,006

## 1.2. Subprodutos do medronheiro

Os frutos do medronheiro podem ser utilizados para a produção de produtos alimentares tradicionais como compotas, geleias, vinagre, produtos fermentados, aguardente e licores ou apenas consumidos frescos (Galego, 1995; Soufleros *et al.*, 2005).



### 1.2.1. Aguardente de medronho

A aguardente de medronho é um destilado produzido a partir dos frutos fermentados do medronheiro (*Arbutus unedo* L.). Esta bebida é produzida em Portugal em algumas zonas da Serra Algarvia, Baixo Alentejo, Buçaco e na Serra da Estrela. É um destilado reconhecido pela comunidade Europeia desde 1989 (Regulamento (CEE) nº 1576/89). Conhece-se ainda a existência do seu fabrico noutros países como na Grécia, onde é apelidado de *Koumaro* (termo grego para designar medronho), no sul de Itália (apelidado de *Corbezzolo*) e na Turquia (Soufleros *et al.*, 2005; Alberti *et al.*, 2007).

O início da produção deste destilado no Algarve, não é conhecido, mas estima-se que seja uma prática deixada pelos Árabes que chegaram ao Baixo Alentejo e Algarve entre 712/713 e governaram a província por 5 séculos (Catarino, 1999).

As referências escritas relativas à produção de aguardente de medronho praticamente só surgem com as primeiras monografias de várias localidades Algarvias, escritas nos princípios do século XX, dando uma indicação da importância que esta actividade tinha na região. No vasto concelho de Loulé, segundo F. X. d'Athaide Oliveira (1905), existiam 61 fábricas de aguardente (Oliveira, 1998), em São Brás de Alportel 5 (Louro, 1996) e em Monchique, em 1938, estavam registadas 55 indústrias de produção de aguardentes (Gascon, 1993), para citar algumas das zonas onde ainda continua a existir produção de destilados.

Esta actividade continuou a ter grande importância económica para os habitantes da serra até aos anos 60 do último século, depois com o desenvolvimento do turismo e a emigração a produção foi decrescendo. Segundos os relatórios internos da Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Santa Catarina da Fonte do Bispo em 1965, só aquela organização, produziu 20 342 l de aguardente de medronho. Em 1970 já se verificava uma queda de quase 50 % (11 742 l) e no século XXI esta organização já tinha deixado de produzir aguardente de medronho (Galego & Almeida, 2007). A redução de produção, o encarecimento da mão-de-obra e a procura por alguns turistas levaram a que o preço deste destilado tivesse aumentado consideravelmente de cerca de 5\$00/l (0,025 €) nos anos 60 para 25 €/l no presente.

No início dos anos 90, quando começaram a ser planeados trabalhos com vista à não desertificação das zonas de serra foram feitos estudos que indicaram ser a aguardente de



medronho, a par do queijo de cabra e do mel as três actividades mais importantes para a economia dos habitantes da serra do Caldeirão, (INDE, 1993). Na sequência deste estudo iniciaram-se vários projectos com vista à valorização destes produtos. No caso da aguardente de medronho o final dos projectos subsidiados coincidiu com a criação do Decreto-lei 238/2000 onde se define a aguardente de medronho no Artº 2 *"entende-se por aguardente de medronho a aguardente de frutos obtida exclusivamente por fermentação alcoólica e destilação do fruto carnudo do Arbutus unedo L. ou do seu respectivo mosto"* e quais as suas características no Artº 3 nº 2 –*"Na aguardente de medronho o teor máximo admissível de cobre é de 15 mg/l"*. No anexo que se refere ao artigo 2 encontram-se as restantes características (Tabela IV).

**Tabela IV - Especificações dos parâmetros físico-químicos e organolépticos para a comercialização da aguardente de medronho (Anexo do artigo 3º do Decreto Lei 238/2000 de 26 de Setembro de 2000).**

Parâmetros	Especificações
Características organolépticas	Aspecto - Límpido Cor - Incolor; Topázio (no caso de aguardente velha). Aroma - a medronho e etéreo. Sabor - a medronho e alcoólico.
Título alcoométrico a 20 % em volume	≥ 42 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Extracto seco	< 20 g/hl
Acidez total (em ácido acético)	≤ 200 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Substâncias voláteis (*)	≥ 200 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Etanal	≥ 5 ≤ 40 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Acetato de Etilo	≤ 300 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Metanol	≥ 500 ≤ 1000 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
2-butanol	≤ 2 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
1-propanol	≥ 10 ≤ 40 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Isobutanol	≥ 30 ≤ 70 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
1-butanol	≤ 3 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Isopentanois	≥ 80 ≤ 185 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Álcoois superiores totais	≥ 130 ≤ 300 (g/hl de álcool a 100 % vol.)
Isobutanol/propanol	≥ 1,5 ≤ 4 (g/hl de álcool a 100 % vol.)

(\*) Não incluem os álcoois etílico e metílico, de acordo com a definição constante da alínea k) do n.º 3 do artigo 1.º do Regulamento (CEE) n.º 1576/89, do Conselho, de 29 de Maio.

A comercialização dessas bebidas depende dos teores de determinados compostos indicados no Decreto Lei 238/2000 de 26 de Setembro de 2000 e Regulamento CE n.º 110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Janeiro de 2008 .

No presente são mais de 50 pequenos produtores que se têm legalizado na região em conformidade com a novas regras, todos com HACCP implementado ou em fase de implementação, mas com produções médias inferiores a 1000 l/ano. Alguns destes produtores aplicam esta aguardente na produção de licores. Já em 2010 foram legalizados dois produtores em Monchique para a preparação e engarrafamento da “Melosa”, o mais tradicional licor produzido naquela localidade. Esta é preparada adicionando mel, canela e limão à aguardente.

Em 2009 tinha surgido no mercado regional um licor de medronho e uma mistura de aguardente de medronho e mel, na qual os consumidores poderão ou não adicionar a canela e o limão a gosto se pretenderem obter a tradicional melosa.

A aguardente de medronho é utilizada ainda em temperos de carnes, na confecção de molhos, na preparação de algumas compotas e cocktails (Galego, 2006).

## **2. Fermentação alcoólica**

O fabrico de alimentos dependentes da actividade de leveduras tais como a produção de pão e bebidas fermentadas esteve sempre presente ao longo da história da humanidade, remontando à antiguidade (Ribéreau-Gayon, 2006).

A fermentação alcoólica é um processo de obtenção de energia por parte dos microrganismos, com produção de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), utilizando como fonte de energia os açúcares. Estes são os dadores iniciais de electrões sendo o receptor o acetaldeído, o qual origina os produtos finais, etanol e dióxido de carbono (Fleet, 1993; Ribéreau-Gayon, 2006).

A glicólise além de fornecer energia também fornece precursores metabólicos e poder redutor para as vias biossintéticas. Na fermentação alcoólica o piruvato é descarboxilado por acção da enzima piruvato descarboxilase e transformado em acetaldeído. Este vai ser reduzido a etanol, por uma reacção catalisada pela enzima álcool desidrogenase. Durante esta reacção, ocorre a reoxidação da coenzima NADH a  $\text{NAD}^+$ . Sem esta regeneração a manutenção do balanço redox das células das leveduras estaria comprometido e a glicólise cessaria (Walker, 2000; Ribéreau-Gayon, 2006).

A produção em pequenas quantidades de outros metabolitos durante a fermentação alcoólica (acetato de etilo, ácido cítrico e succínico, álcool isoamílico entre outros) varia de acordo com os microrganismos envolvidos na fermentação, mas estes compostos são de extrema importância e conferem características organolépticas específicas, às bebidas alcoólicas e outros produtos fermentados (Walker, 2000). Oliveira *et al.* (2005) detectaram a capacidade de produção de compostos voláteis por parte de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e de outros géneros (*Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Lachancea*, *Candida*, *Saccharomyces*), isoladas de fermentados de cana-de-açúcar destinadas à produção de cachaça (aguardente de cana-de-açúcar). Por outro lado, Nova *et al.* (2009) reforçam a importância das diferentes estirpes de levedura isoladas nas características do sabor e aroma de cachaça. Por exemplo diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* contribuem de forma diferente para a produção de alguns metabolitos, tais como o acetaldeído, álcool isoamílico, acetato de etilo, e álcool amílico. Culturas puras de *Pichia guilliermondi* e *Lachancea fermentati* conseguem produzir grandes quantidades de acetaldeído. A produção destes compostos indesejáveis na cachaça conduziu a que estas estirpes fossem consideradas contaminantes de uma fermentação. Algumas estirpes de *Pichia* sp. e a estirpe *Hanseniaspora occidentalis* produzem também grandes quantidades de álcool isoamílico e isobutanol, sendo que outras estirpes de *Pichia* sp. também conseguem produzir isopropanol em grandes quantidades. Estes metabolitos contribuem para síntese de aromas e sabores no produto final, alguns esterres como o etil-isobutirato (aroma a melão e maçã verde) e o acetato de isoamil (sabor a frutos vermelhos) (Nova *et al.*, 2009).

### 3. Leveduras

As leveduras são organismos eucariotas incluídos no domínio *Eucarya*, no Reino *Fungi*. Possuem uma organização somática unicelular, pelo menos numa fase do seu ciclo de vida, são destituídos de plastos e possuem uma parede celular formada essencialmente por manano, glucano e quitina. Não formam conídios aéreos nem órgãos de locomoção. Na maior parte dos casos são saprotróficos mas conhecem-se espécies associadas a parasitismo. A reprodução pode ser sexuada ou assexuada. A reprodução assexuada ocorre por gemulação na maior parte das leveduras, no entanto em algumas espécies ocorre a bipartição. A reprodução sexuada, quando conhecida leva à formação de ascos (Filo Ascomycota) ou à diferenciação dos basídios que originam os basidiósporos (Filo Basidiomycota). As espécies em que não está descrita a

reprodução sexuada estão agrupadas na categoria não filogenética Deuteromicetes (form phylum) (Deacon, 2006).

A presença de leveduras nos alimentos pode revelar-se extremamente importante e com elevado interesse económico como é o caso da panificação, produção de álcool a nível industrial, vinificação, produção de bebidas alcoólicas (destiladas e não destiladas). Contudo, a sua presença pode também estar associada a alterações indesejáveis (deteriorações) nos alimentos e bebidas, sendo responsáveis por avultadas perdas económicas (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003, Ribéreau-Gayon, 2006).

No caso das fermentações de frutos, as leveduras podem ter origem nos frutos, nas superfícies dos equipamentos utilizados para a fermentação e através de inoculação de culturas iniciadoras (starter) (Fleet, 1993). Dependendo das condições de disponibilidade de oxigénio, a utilização dos açúcares pode ser realizada de duas formas: através da fermentação ou através da respiração (Ribéreau-Gayon, 2006).

A fermentação de frutos destinada à produção de bebidas alcoólicas, realiza-se, em geral com base na microbiota existente nos frutos, existindo assim um risco da fermentação não se realizar da forma esperada, pois além das leveduras que produzem etanol, existem outras leveduras que podem deteriorar o fermentado. A deterioração de um fermentado pode ocorrer com a formação de flavours indesejados, formação de biofilmes ou turbidez dos fermentados. A presença de várias populações de leveduras resulta numa competição pela fonte de carbono, que se traduz numa redução do rendimento final em etanol e consequentemente levará à produção de excesso de compostos secundários (butanol, isobutanol, acetato de etilo, ácido acético, propanol, acetaldeído, entre outros) eventualmente responsáveis por alguns aromas indesejáveis (Fleet, 1993; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007). Estes aspectos podem resultar em enormes prejuízos para os produtores a nível económico.

Existem diversos géneros de leveduras associados a fermentações de matéria-prima utilizada na produção de destilados, sendo o mais estudado o género *Saccharomyces*, existem ainda outros como *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Torulaspora*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*,

*Kluyveromyces*, *Dekkera* entre outras (Lachance, 1995; Fährmann e Ganou-Parfait, 1998; Oliveira *et al.*, 2005; Nova *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2009).

Lachance (1995) identificou as seguintes leveduras durante o processo de fermentação de agave com o objectivo de produzir tequila:

-*Candida intermedia*, *Candida krusei*, *Brettanomyces anomalus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranaefaciens*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia sp.*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida milleri*, *Brettanomyces bruxellensis* e *Zygosaccharomyces rouxii*.

Durante a fermentação de cana-de-açúcar, com vista à obtenção de cachaça têm sido identificadas numerosas leveduras, resumidas na Tabela V.

**Tabela V - Leveduras isoladas de diversas fermentações de cachaça artesanal (Oliveira *et al.*, 2005; Nova *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2009).**

Autores	Nova <i>et al.</i> (2009)	Oliveira <i>et al.</i> (2005)	Gomes <i>et al.</i> (2009)	
Leveduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Rhodotorula lactosa</i>
	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	<i>Candida apicola</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Candida bentonensis</i>
	<i>Candida drosophilae</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>	<i>Candida akabanensis</i>
	<i>Candida milleri</i>	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Dekkera hansenii</i>
	<i>Candida ubatubensis</i>	<i>Pichia subpelliculosa</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
	<i>Pichia caribbica</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Pichia japonica</i>	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Pichia guilliermondii</i>		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>
	<i>Zygosaccharomyces sp.</i>		<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Candida xylophilus</i>
			<i>Candida sorboxylosa</i>	<i>Cryptococcus sp.</i>
			<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>
			<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	<i>Candida gropengiesseri</i>

Fährmann e Ganou-Parfait, (1998) identificaram as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces aceti*, *Saccharomyces*

*microellipsodes*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula minuta*, *Hansenula anomala*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis globosa*, *Torulopsis glabrata* e *Torulopsis stellata* durante a fermentação de cana-de-açúcar para obtenção de rum.

O papel de cada espécie de levedura na fermentação é de extrema importância. No caso da produção de bebidas alcoólicas destiladas, existem diversos parâmetros físico-químicos incluindo os compostos voláteis cujos limites estão legislados (Tabela IV).

Algumas leveduras podem contribuir para aumentar em valores significativos os níveis de determinados compostos voláteis (acetato de etilo, acetaldeídos, isobutanol, isopropanol, álcoois isoamílicos entre outros), tornando a bebida não conforme para ser comercializada (Galego, 1995; Oliveira *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Nova *et al.*, 2009).

### **3.1. Identificação de leveduras**

A identificação da microbiota presente na fermentação é de extrema importância, pois permite conhecer melhor e justificar as alterações ao longo do processo fermentativo.

A identificação através de testes bioquímicos torna-se muito complexa e morosa, visto que normalmente são necessários cerca de 60-90 testes. Apesar da existência de alguns kits rápidos, estes apresentam a desvantagem de estarem restritos na identificação de apenas algumas espécies (40-60). Existem outros métodos utilizando cromatografia gasosa, que consistem na análise dos lípidos totais das células e dos ácidos gordos de cadeia longa. Estes métodos apresentam problemas relacionados com reprodutibilidade e dependem do estado fisiológico das células (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Os progressos na biologia molecular possibilitaram o desenvolvimento de novas técnicas na identificação de leveduras. A amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos por reacções de polimerização em cadeia (PCR), veio contribuir para facilitar as análises efectuadas com pequenos fragmentos ou pequenas quantidades de DNA e permitir a tipagem rápida de muitos microrganismos. Mais recentemente a sequenciação de zonas específicas do DNA veio

contribuir para tornar mais rápida a identificação de espécies microbianas (Kurtzman e Robnett, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Boulton e Quain, 2001).

### 3.1.1. Identificação por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)

As regiões ITS1 e ITS2 (Internal transcribed spacer) são regiões não codificantes e variáveis e o gene 5.8S rRNA (Figura 4) é uma região codificante e conservada. Estas regiões, são em conjunto, muito úteis porque permitem distinguir espécies distintas. Os genes ribossomais apresentam um polimorfismo intraespecífico baixo mas uma variedade interespecífica alta (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

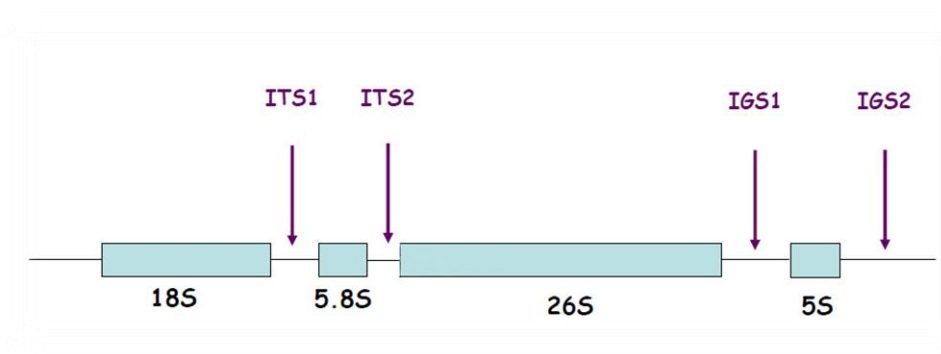


Figura 4 - Representação esquemática do locus rDNA nas leveduras, localização da região ITS1 e ITS2 (Sugita *et al.*, 2002).

No presente trabalho utilizou-se a amplificação da região 5.8S – ITS e posterior restrição para distinguir os isolados de leveduras obtidas a partir das fermentações de medronho. Através do uso de *primers*, para amplificação por PCR, é possível aceder a qualquer zona da unidade de rDNA, simplificando, deste modo, o estudo de um grande número de amostras (Fell *et al.*, 2000). A análise por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) de DNA consiste em cortar a amostra de DNA em fragmentos, pela acção de enzimas de restrição. Os fragmentos são então separados por uma electroforese em gel, de acordo com o seu tamanho, dando origem a padrões de restrição específicos, típicos de cada espécie (Boulton e Quain, 2001; Spencer e Spencer, 2001).

### 3.1.2. Sequenciação parcial do gene 26S rRNA

Os ribossomas são estruturas homólogas do ponto de vista funcional e evolutivo, que se encontram presentes em todos os organismos, apresentam uma origem evolutiva comum, apesar da sua conservação, apresentam diferentes níveis de evolução. Os genes do rRNA não apresentam variações entre indivíduos da mesma espécie e a totalidade de mais de 6.000 nucleótidos contidos nas sequências dos genes de rRNA (26S, 18S, 5,8S e 5S) é suficientemente elevada para distinguir filogenias. Assim, é possível verificar que a utilização de rRNA na identificação molecular apresenta várias vantagens (Kurtzman e Robnett, 1998; Fell *et al.*, 2000).

Um dos métodos moleculares utilizados em estudos de taxonomia para a identificação de leveduras baseia-se na comparação de sequências da região D1/D2 do gene rRNA 26S ou do gene do rRNA 18S. Outras regiões da unidade de rDNA também têm sido analisadas, como as regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*InterGenic Spacer*). Ao longo das últimas décadas diversas investigações têm sido desenvolvidas evidenciando que a região D1/D2 (Figura 5) exhibe diferenças suficientes entre leveduras de forma a efectuar-se avaliações entre as relações intra- e inter-específicas (Kurtzman e Robnett, 1998; Fell *et al.*, 2000).

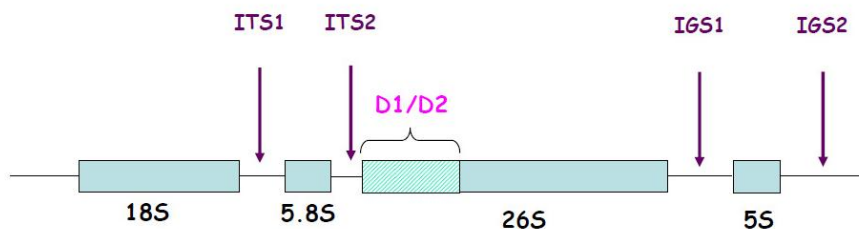


Figura 5 - Representação esquemática do locus rDNA nas Leveduras, localização da região D1/D2 (Sugita *et al.*, 2002).

## 4. Compostos voláteis

Durante os processos fermentativos, as leveduras presentes sintetizam diversos compostos voláteis, responsáveis pelo flavour. A actividade das leveduras durante a fermentação transforma o açúcar em etanol, mas também ocorre a formação de outros metabolitos como álcoois superiores, ácidos gordos e ésteres. A nível de características organolépticas é possível distinguir



uma bebida alcoólica, quanto ao seu flavour, pois a variação entre os metabolitos confere-lhe uma "identidade" própria. A presença de compostos orgânicos voláteis e não voláteis nas bebidas fermentadas e destiladas, permite avaliar qualitativamente as mesmas (Pereira *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; Querol e Fleet, 2006; Domizio *et al.*, 2007).

Durante a fermentação, o metabolismo das leveduras conduz à formação de determinados compostos, relacionados com os diferentes géneros e espécies de leveduras envolvidos nos processos e com as condições em que decorrem (temperatura, pH, presença de oxigénio assim como a natureza e concentração do substrato) (Querol e Fleet, 2006).

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) é um álcool, resultante normalmente do processo fermentativo de açúcares, por leveduras, sendo este o maior responsável pelo grau alcóolico de um fermentado e pela sua conservação (Fleet, 1993; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007). Nas bebidas fermentadas o teor alcóolico pode representar entre 8% a 17% do seu volume total (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Querol e Fleet, 2006; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007; Navarre, 2008). Nas bebidas destiladas de frutos e de acordo com o Regulamento (CE) n.º 110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho o teor alcóolico é pelo menos de 37,5 %.

Os ésteres representam um enorme grupo de compostos responsáveis pelo flavour de bebidas destiladas e a sua presença nos fermentados revela informações acerca da qualidade do produto final. Estes compostos voláteis conferem um odor característico e são de grande importância para o aroma das bebidas alcoólicas.

No caso dos fermentados e das aguardentes (destilados) existe um composto que é obtido por reacções de esterificação entre o etanol e o ácido acético, o acetato de etilo ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ) (Vera-Guzmán *et al.*, 2010), o qual quando em concentrações até 120 mg/100 ml de álcool puro contribui positivamente para o aroma do destilado (Versini *et al.*, 1995). Concentrações superiores induzem nos fermentados o aroma característico a colas ou verniz, contribuindo negativamente para as características aromáticas do produto final (Vera-Guzmán *et al.*, 2010). A presença deste composto pode ser um indicativo de contaminação (leveduras formadoras de véu, ou bactérias do género *Glucanobacter*) ou de uma fermentação que não foi bem realizada devido ao contacto com o oxigénio e a problemas de higienização do material utilizado (Fleet, 1993;

Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007). No caso dos fermentados de medronho, o excesso de acetato de etilo é potenciado principalmente, pelo contacto entre a massa em fermentação e o oxigénio (Versini *et al.*, 1995).

Os isopentanóis, são álcoois superiores encontrados nos fermentados, a sua importância deve-se ao seu odor característico, e também à sua acção solvente sobre outras substâncias aromáticas que interferem com o grau de volatilidade. São formados pelas leveduras quando os meios carecem de compostos nitrogenados assimiláveis (Fleet, 1993; Gómez, 1998; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Souza, 2006; Martorell *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007).

#### **4.1. Análise de compostos voláteis por microextracção em fase sólida**

A micro-extracção em fase sólida (SPME) é uma técnica que surge descrita primeiramente por Delardi e Pawliszyn em 1989 para a análise de um variado conjunto de voláteis e semi-voláteis em águas ou extractos aquosos tendo-se posteriormente generalizado a sua aplicação a amostras das mais diversas naturezas. Basicamente consiste na extracção de compostos directamente da amostra ou do espaço de cabeça dessa amostra num recipiente fechado por um septo, que permite a introdução de um tubo hipodérmico que protege uma fibra de sílica revestida com uma fase polimérica. Após a perfuração do septo a fibra é exposta durante um intervalo de tempo específico para cada caso em estudo. Terminada a exposição a fibra é retraída no tubo de protecção e transportada para o injector de um cromatógrafo gasoso (Pawliszyn, 1999).

Sem utilização de solventes, a extracção dos compostos é efectuada de forma não exaustiva. A utilização da fibra pode ser efectuada de duas formas, em contacto com a amostra (sistema de duas fases) ou introduzida no seu espaço de cabeça ("headspace" num sistema de três fases). Num sistema de duas fases a partição de analitos ocorre entre a amostra e a fase estacionária da fibra, num sistema de três fases ocorre entre a amostra, o espaço de cabeça e a fase estacionária. Com a utilização de um cromatógrafo de fase gasosa (GC), é possível separar os compostos sorvidos pela fase estacionária. As fases estacionárias da fibra utilizada no SPME podem ser de diferentes tipos (Tabela VI), a escolha da mais adequada é relacionada com a composição volátil da amostra sólida, líquida ou gasosa (Pawliszyn *et al.*, 1999; Valente e

Augusto, 2000; Rouessac e Rouessac, 2000; Bortoluzzi *et al.*, 2006; Queiroz e Lanças, 2005; Dórea *et al.*, 2008).

**Tabela VI - Propriedades e aplicações de diferentes tipos de fibras e das suas fases estacionárias disponíveis comercialmente (Valente e Augusto, 2000; Alpendurada, 2000).**

Tipo	Fase estacionária	Interacção	Espessura do filme (µm)	Temperatura máxima do injector (°C)	Aplicação
Não polares	Polidimetilasiloxano (PDMS)	Absorção	100	280	Compostos orgânicos apolares, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, benzeno/tolueno/xileno, pesticidas organoclorados. é possível usar com polares
			30	280	
			7	340	
Polares	Poliacrilato (PA)	Absorção	85	320	Compostos medianamente e altamente polares, fenóis, pesticidas organofosforados.
	Carbowax/divinilbenzeno (CW-DVB)	Mista	65	260	Compostos orgânicos polares tais como cetonas, álcoois, nitro aromáticos. Voláteis de média e alta polaridade
Bi-polares	Carboxen-PDMS	Mista	75	270	Voláteis, hidrocarbonetos
	PDMS-DVB	Mista	65	270	Voláteis e não voláteis de baixa polaridade a alta polaridade. Hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas.
			60	270	

O funcionamento das fases estacionárias é semelhante ao de uma esponja, os compostos da amostra são absorvidos/adsorvidos, para o seu interior. A capacidade de absorver/adsorver de determinado composto depende da espessura do filme, características e do tamanho do composto. A porosidade das fases estacionárias também é um factor que influencia a capacidade de absorver/adsorver de determinadas quantidades dos compostos analisados. Estes factores podem de certa forma provocar competição entre os analitos visto que os locais de absorção/adsorção são limitados (Valente e Augusto, 2000; Rouessac e Rouessac, 2000; Alpendurada, 2000).

Uma das desvantagens do método de adsorção é que em determinados casos, quando existem concentrações muito elevadas de alguns compostos a analisar, vão saturar as fases estacionárias e a sua resposta deixa de ser linear. Contudo a interacção por adsorção é mais sensível (Valente e Augusto, 2000; Alpendurada, 2000; Ribeiro *et al.*, 2007).

Quando a análise é realizada utilizando uma fase estacionária que funciona por absorção permite uma maior linearidade, pois não satura tão rapidamente, embora a sua sensibilidade seja mais reduzida (Valente e Augusto, 2000; Rouessac e Rouessac, 2000; Alpendurada, 2000).

Na utilização de fases mistas, como o caso da CW- DVB, existe um efeito sinérgico de adsorção e absorção, que potencia uma elevada capacidade de retenção de analitos pela fase estacionária (Valente e Augusto, 2000; Alpendurada, 2000).

A técnica de SPME apresenta alguma sensibilidade a alguns parâmetros experimentais como a temperatura de extracção, o tempo de extracção, a agitação da amostra, o volume e o modo de apresentação da amostra. A temperatura a que a extracção é realizada, em caso de aumento pode promover a libertação de compostos para o espaço de cabeça, aumentando assim a sua volatilidade, mas pode também desfavorecer e contribuir para o aumento da solubilidade nas amostras líquidas (Valente e Augusto, 2000; Rouessac e Rouessac, 2000).

O tempo de exposição deve ser escolhido de acordo com a forma como se pretende trabalhar, antes ou depois de se estabelecer o equilíbrio entre as fases do sistema. Este é atingido quando a concentração dos compostos é homogénea e constante em cada uma das fases do sistema. O tempo de equilíbrio que uma amostra demora a atingir está relacionado com a composição da amostra, bem como a volatilidade dos compostos. Compostos menos voláteis necessitam, normalmente, de tempos de exposição maiores (Valente e Augusto, 2000; Rouessac e Rouessac, 2000; Alpendurada, 2000).

Num típico sistema de três fases de forma a tornar o sistema dinâmico é necessária a presença de agitação, homogeneizando a fase aquosa e permitindo uma convecção no espaço de cabeça ("headspace"). A existência deste sistema dinâmico favorece a extracção de compostos semi-voláteis. Vários factores podem contribuir para melhorar o limite de detecção de um determinado composto tais como, a diminuição do volume do seu espaço de cabeça, a adição de água e/ou sal e os referidos aumentos de temperatura e agitação, porque permitem libertar mais facilmente os analitos de uma matriz (Valente e Augusto, 2000; Rouessac e Rouessac, 2000; Alpendurada, 2000).

A capacidade de separação e repetibilidade da cromatografia em fase gasosa permite, com a utilização de padrões, identificar alguns dos compostos presentes bem como quantificá-los.

Após a extracção da amostra com a fibra, esta é colocada num injector do cromatógrafo, onde sofre uma desorção térmica. Com o auxílio de um gás de arraste (hélio), a amostra atravessa uma coluna revestida na parte interior por uma fase estacionária, onde os componentes da mistura são separados. O modo de injeção pode ser "split" ou "splitless", o primeiro permite que apenas uma parte da amostra atravessa a coluna, o segundo permite que toda a amostra injectada atravessa a coluna do cromatógrafo. A separação dos componentes presentes numa amostra (mistura) é determinada pela distribuição de cada componente entre o gás de arraste (fase móvel) e a fase estacionária. Compostos de baixa afinidade com a fase estacionária eluem rapidamente. Através do tempo de retenção na coluna é possível identificar o composto, em estudo (Galego, 1995; Skoog *et al.*, 1992; Neves e Freitas, 1996; Bortoluzzi *et al.*, 2006; Ouyang e Pawliszyn, 2008).

## II- Materiais e Métodos

### 1. A destilaria

O trabalho descrito no presente relatório decorreu em colaboração com um produtor de aguardente de medronho, o Sr. Manuel de Sousa Martins, legalizado desde 2001 mas que desde muito cedo acompanhou a produção de aguardente de medronho com o seu pai e com o seu avô. No período de pré-legalização este produtor seguiu e colaborou nos projectos de estudo de aguardente de medronho que decorreram no Algarve (PAMAF nº 4057 – Investigação-Acção sobre aguardente de medronho e PAMAF nº 8005- Estudo do envelhecimento da aguardente de medronho (1ª fase)). A destilaria situa-se na Serra do Caldeirão, no Azinhalinho. É uma pequena destilaria (estatuto de produção até 1000 l de álcool a 100 % vol. por ano) que produz para além de aguardente de medronho, licores tradicionais da Serra do Caldeirão (Figura 6) com sistema HACCP implementado. O proprietário e produtor Sr. Manuel Sousa Martins tem procurado introduzir inovações na destilaria com vista a obter produtos finais com a melhor qualidade, preservando os métodos artesanais.



Figura 6 - Vista frontal da destilaria.

O alambique (Figura 7), os fermentadores e outros utensílios são todos em inox, apresentando as vantagens de permitir uma fácil higienização e uma difícil degradação.

O alambique é de aquecimento indirecto encontrando-se a caldeira imersa num banho de parafina líquida. Este tipo de caldeira apresenta algumas vantagens em relação às caldeiras de aquecimento directo, nomeadamente, o facto de o fermentado não se queimar tão facilmente durante a destilação como ocorreria numa caldeira de aquecimento directo. A destilação efectua-se utilizando fogo de lenha (pinho, cepas de urze, azinho, estevas, entre outras).



Figura 7 - Alambique e zona de destilação de Manuel Sousa Martins.

### **1.1. Processo de produção de aguardente de medronho**

A colheita dos frutos tem início em finais do mês de Setembro e, dependendo das condições climáticas, pode prolongar-se até Dezembro. O fruto é colhido manualmente, sendo seleccionados apenas os frutos maduros (vermelhos/alaranjados). A colheita é feita com o máximo de cuidado de forma a evitar a presença de folhas, ramos e pedúnculos junto aos frutos. Estes são colocados em baldes de plástico, próprios para alimentos, que possibilitam o transporte para a destilaria sem que ocorra a perda de fluidos dos frutos. Durante a pesagem são examinados para que não existam nenhuns contaminantes físicos (folhas, ramos e pedúnculos) e depois de determinada a massa, estes são colocados nos depósitos de inox e fechados de forma a evitar o contacto com o ar e a oxidação dos frutos. Nos fermentadores (capacidade – 450 l) os frutos são cobertos com cerca de 80 litros de água. Estes recipientes não devem ficar

completamente cheios, pois durante a fermentação, com a ocorrência da produção de gás, ocorre elevação da massa.

A fermentação do medronho é realizada em fermentadores de inox fechados (Figura 8) à temperatura ambiente, durante cerca de 130 a 150 dias. Ao longo do período de fermentação, regista-se a evolução dos açúcares no mosto.

Os factores que podem influenciar o tempo de fermentação são vários, tais como a temperatura ambiente, a humidade, a disponibilidade de oxigénio, o teor de açúcares e a microbiota dos frutos. A forma de fermentação varia de produtor para produtor, dependendo dos factores mencionados anteriormente incluindo a natureza dos recipientes utilizados (plástico, cerâmica, inox ou madeira). Por outro lado, a fermentação é levada a cabo pelas leveduras epifíticas do fruto e pela microbiota associada aos equipamentos, ao ambiente da destilaria e aos manipuladores. O resultado final é uma série de aguardentes de medronho com características específicas para cada produtor. Por vezes essas características traduzem-se em aromas desagradáveis e excesso de acidez, tendo como causa a forma como é efectuada a fermentação, tal como tem sido referido (Galego, 1995; Cavaco *et al.*, 2007).



Figura 8 - Fermentadores de inox da destilaria de Manuel Sousa Martins.

Em geral, o processo de produção de aguardente de medronho é realizado de acordo com o diagrama da Figura 9.



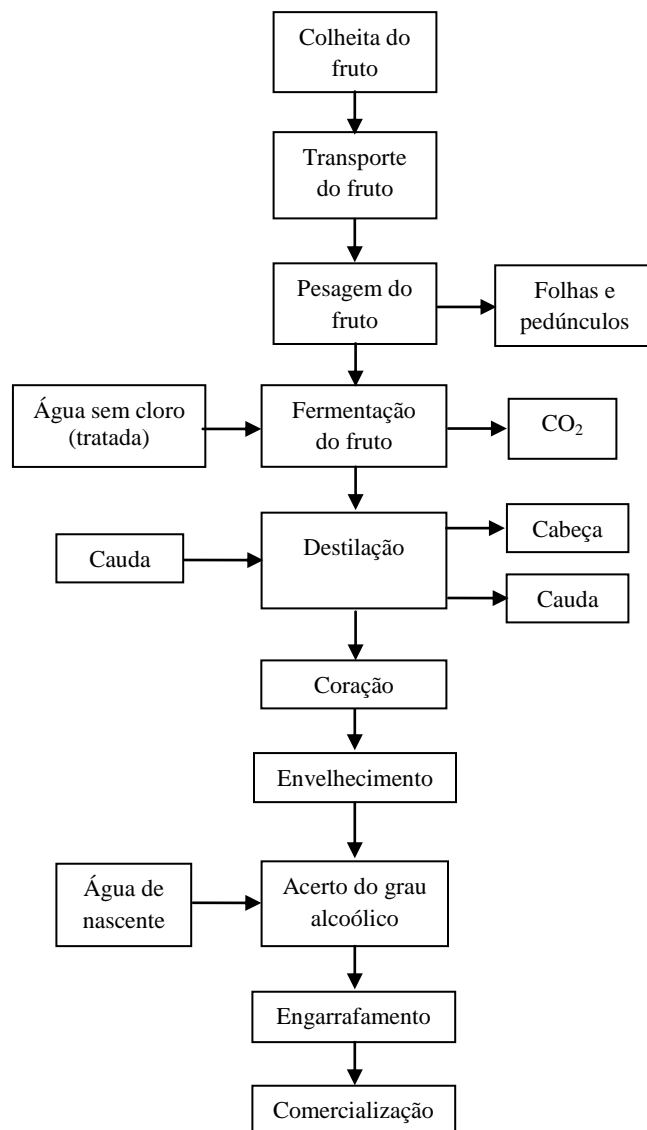


Figura 9 - Diagrama de produção de aguardente de medronho.

Quando a fermentação termina, procede-se à destilação do fermentado no alambique de inox (Figura 7). Em cada destilação é colocada uma placa de cobre dentro do alambique durante a destilação de forma a facilitar as reacções de precipitação dos compostos sulfurosos formados durante a fermentação, é facilmente higienizada, ao contrário do que acontece quando o alambique é em cobre (Labanca *et al.*, 2006). É ainda adicionado o frouxo ou cauda da destilação anterior de forma a aumentar o rendimento alcoólico da destilação. Durante a destilação são recolhidas três fracções do destilado (separadas por 2 cortes). A primeira fracção corresponde à

cabeça (é uma fracção de destilado rica em acetato de etilo), a segunda fracção corresponde ao coração (é a parte importante da destilação pois constitui a aguardente para consumo) e a terceira parte corresponde à cauda ou frouxo (um destilado com menor grau alcoólico) (Soufleros e Bertrand, 1990; Cantagrel *et al.*, 1990; Galego, 1995). O destilado obtido para consumo (coração) tem um grau que varia entre os 50 e os 60 % de volume alcoólico e pode ser, posteriormente, sujeito a um envelhecimento em madeira de carvalho.

A aguardente da destilaria Manuel Sousa Martins é comercializada com um grau de 45 % de volume alcoólico. Assim, torna-se necessário proceder ao acerto do grau alcoólico, o qual é efectuado utilizando água de nascente engarrafada. Posteriormente, a aguardente é engarrafada em garrafas de vidro de 0,5 l (Figura 10) e comercializada.



Figura 10 - Aguardente de medronho envelhecida.

## **1.2. Caracterização e localização da zona em estudo**

Os frutos utilizados nas fermentações estudadas foram recolhidos na freguesia de S. Bartolomeu de Messines, Concelho de Silves, Distrito de Faro.

Esta freguesia com cerca de 8500 habitantes é a mais extensa do Algarve, estendendo-se numa área com cerca de 254 km<sup>2</sup>, com 18 km de norte para sul, abrangida por Serra e Barrocal, tendo a oeste a Serra do Caldeirão. É uma região fundamentalmente agrícola, onde ainda se pratica a agricultura em pequena escala ou de subsistência. As árvores com mais impacto neste tipo de subsistência são as oliveiras, alfarrobeiras, figueiras, amendoeiras, medronheiros, laranjeiras (Oliveira, 1987; Globalgarve, 2003).

Foram estudados três processos fermentativos independentes na destilaria Manuel de Sousa Martins (Azinhalinho). Para cada processo os frutos foram recolhidos em três zonas diferentes:

Fermentação 5 - Azinhalinho;

Fermentação 7 - Zebro Este;

Fermentação 10 - Zebro Oeste.

### **1.2.1. Azinhalinho**

O Azinhalinho (Figura 11) é uma pequena povoação situada a cerca de 5 km de S. Bartolomeu de Messines. O medronhal aqui existente possui uma extensão de 9800 m<sup>2</sup> (37°15'52.63" N. 8°14'00.70" W. elevação 232 m) (Figura 12). É também nesta região que se situa a destilaria (Oliveira, 1897; Google Earth, 2009).



Figura 11 - Fotografia de satélite do Azinhalinho (Google Earth, 2009).



Figura 12 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Azinhalinho (Google Earth, 2009).



### 1.2.2. Zebro de Cima

O Zebro de Cima (Figura 13) é uma povoação situada a cerca de 10 km de S. B. Messines, com cerca de 20 habitantes onde apenas vão permanecendo os mais idosos devido à desertificação. Os medronheiros da zona Oeste, estão plantados no sopé de uma parte montanhosa ( $37^{\circ}18'45.35''\text{N}$ .  $8^{\circ}11'54.66''\text{W}$  elevação 200 m) (Figura 14). O outro ponto de apanha, a zona Este ( $37^{\circ}18'49.92''\text{N}$   $8^{\circ}11'33.25''\text{W}$  elevação 345 m) (Figura 15) situa-se na parte superior (topo) da parte montanhosa. As duas zonas englobam uma área total com cerca de  $296800\text{ m}^2$ . Trata-se de uma zona acidentada e de difícil acesso (Oliveira,1987; Google Earth, 2009).



Figura 13 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Zebro de Cima (Google Earth, 2009).



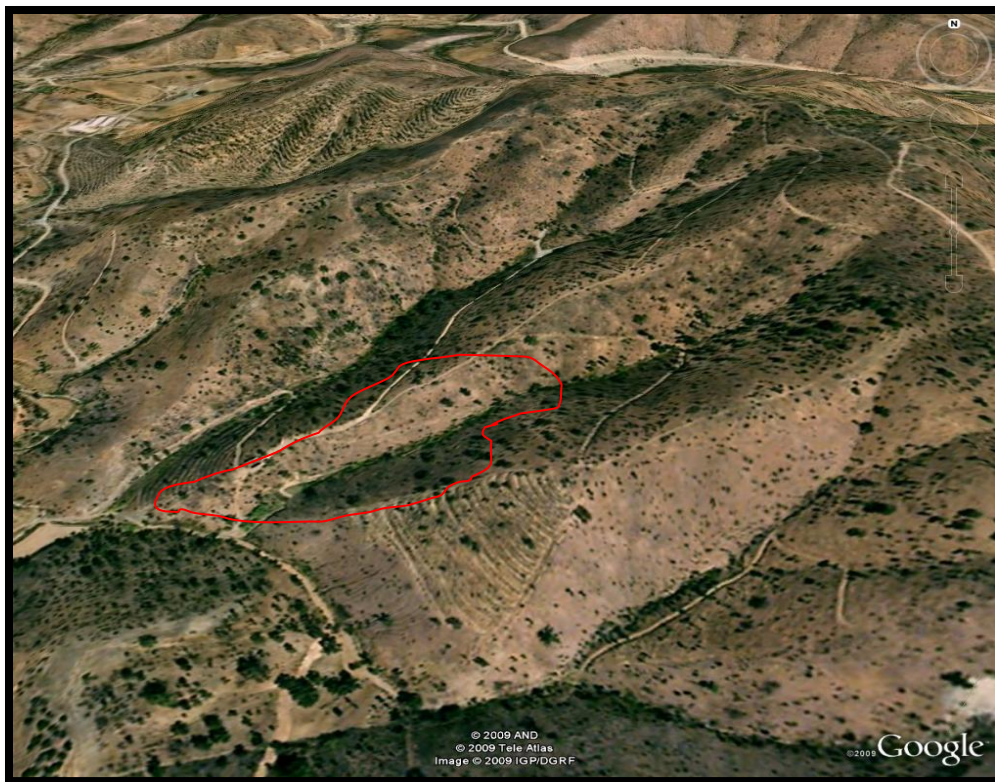


Figura 14 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Zebro de Cima, zona Este (Google Earth, 2009).



Figura 15 - Fotografia de satélite da zona de colheita do Zebro de Cima, zona Oeste (Google Earth, 2009).

## **2. Preparação do processo fermentativo**

A colheita realizou-se manualmente a partir do mês de Outubro, tendo-se seleccionado apenas os frutos maduros, ou seja aqueles que apresentavam uma coloração vermelha. No mesmo dia os frutos foram transportados para a destilaria, onde decorrem as fermentações.

Após colheita, na destilaria, os frutos foram pesados e inspeccionados visualmente de forma a retirar folhas ou pedúnculos, como descrito acima, tendo sido colocados 300 kg de fruto em cada fermentador de inox com uma capacidade de 450 l. Posteriormente, foram cobertos com cerca de 80 l de água proveniente de uma captação de superfície, tratada com radiação ultravioleta. O volume de água adicionado está relacionado com o teor de açúcares presente nos medronhos.

As fermentações decorreram à temperatura ambiente na sala de fermentação, por um processo natural dependendo da microbiota presente nos frutos, no ambiente e no equipamento da destilaria, não tendo sido adicionado nenhum tipo de *starter* microbiano. Estudaram-se três processos fermentativos independentes designados por Fermentação 5 (F5), Fermentação 7 (F7) e Fermentação 10 (F10).

### **2.1. Recolha de amostras**

Com o objectivo de estudar a evolução do processo de fermentação do medronho no que diz respeito a parâmetros microbiológicos e físico-químicos, acompanharam-se três fermentações independentes (F5, F7 e F10). As amostras de fermentado (120 ml) foram recolhidas dos fermentadores para dentro de frascos de vidro *Durham* estéreis. O procedimento de recolha de amostras de cada fermentador foi o seguinte:

- No topo do fermentador foi retirada uma amostra com uma espátula estéril contendo frutos e líquido de três pontos diferentes e equidistantes entre si de cerca de 15 cm;
- A 35 cm do topo foi retirada apenas uma amostra líquida, devido às dimensões das torneiras existentes nesse ponto;
- A 75 cm do topo, recolheram-se líquido e frutos, através de uma segunda torneira de dimensões superiores à anterior;

- No fundo dos fermentadores foi recolhido líquido e fruto através de uma torneira de decantação.

Antes e após a obtenção das amostras as torneiras foram desinfetadas com etanol e flamejadas. Após a recolha os fermentadores foram imediatamente fechados permanecendo assim até à recolha de amostras seguinte.

As amostras foram recolhidas em intervalos de tempo regulares (Tabela VII) de forma a acompanhar as alterações ao longo do processo de fermentação. O procedimento de recolha foi idêntico para todos os fermentadores. As amostras foram depois transportadas para o laboratório (Instituto Superior de Engenharia) em condições de refrigeração ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ).

**Tabela VII - Recolha de amostras nas Fermentações 5, 7 e 10.**

Fermentação 5		Fermentação 7		Fermentação 10	
Dia	Data	Dia	Data	Dia	Data
0	20-Out-08	0	27-Out-08	0	10-Nov-08
2	22-Out-08	2	29-Out-08	2	12-Nov-08
4	24-Out-08	4	31-Out-08	4	14-Nov-08
7	27-Out-08	7	3-Nov-08	7	17-Nov-08
9	29-Out-08	9	5-Nov-08	9	19-Nov-08
11	31-Out-08	11	7-Nov-08	11	21-Nov-08
14	3-Nov-08	14	10-Nov-08	14	24-Nov-08
18	7-Nov-08	18	14-Nov-08	18	28-Nov-08
23	12-Nov-08	23	19-Nov-08	23	3-Dez-08
28	17-Nov-08	28	24-Nov-08	30	10-Dez-08
32	21-Nov-08	32	28-Nov-08	39	19-Dez-08
34	28-Nov-08	39	5-Dez-08	42	22-Dez-08
51	10-Dez-08	44	10-Dez-08	51	31-Dez-08
58	17-Dez-08	51	17-Dez-08	74	23-Jan-09
63	22-Dez-08	56	22-Dez-08	94	12-Fev-09
72	21-Dez-08	65	31-Dez-08	107	25-Fev-09
95	23-Jan-09	88	23-Jan-09	142	1-Mar-09
115	12-Fev-09	108	12-Fev-09	-	-
128	25-Fev-09	121	25-Fev-09	-	-
135	4-Mar-09	150	26-Mar-09	-	-

No laboratório, cada amostra, depois de bem homogeneizada foi dividida em diferentes porções:

2 porções de 15 ml para dois tubos Falcon (estéreis);

1 porção de 50 ml para um tubo Falcon (estéril);



1 porção de 25 g para um saco de polietileno estéril.

As três primeiras foram congeladas a -20 °C para realização de análises físico-químicas posteriormente [pH, % acidez, °Brix, açúcares (frutose, glucose e sacarose), ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, acético, láctico, cítrico, succínico e gálico) e compostos voláteis (acetato de etilo, etanol, isopentanois)]. A amostra de 25 g foi utilizada para realizar análises microbiológicas (contagem de leveduras, contagem da microbiota aeróbia total e isolamento de leveduras para posterior identificação).

### **3. Metodologias de análise dos fermentados**

#### **3.1. Parâmetros microbiológicos dos processos fermentativos**

Para realizar as análises microbiológicas às amostras dos fermentados, misturaram-se 25 g de massa da amostra com 225 ml de solução de *Ringer* (Merck). Esta mistura foi posteriormente homogeneizada, durante 1 minuto em sacos de polietileno estéreis adequados a um homogeneizador (Blender, Stomacher 400). Após a homogeneização efectuou-se uma série de diluições sucessivas com solução de *Ringer* (Merck). Posteriormente, procedeu-se à inoculação nos meios de cultura adequados.

##### **3.1.1. Contagem da microbiota aeróbia total**

Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, na superfície do meio de cultura *Plate Count Agar*, pH 5 (PCA- Scharlau). As placas foram incubadas a 25 °C, durante 5 dias.

##### **3.1.2. Contagem de leveduras**

Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, na superfície do meio de cultura *Malt Extract Agar*, pH 5 (MEA - Scharlau). As placas foram incubadas a 25 °C, durante 5 dias.

### **3.1.3. Isolamento de leveduras**

Após contagem das leveduras nas placas de MEA, seleccionaram-se as colónias isoladas e repicaram-se para placas com *Potato Dextrose Agar* (PDA- Scharlau). Após 2 dias a 25 °C foram observadas ao microscópio para verificar se se tratavam de leveduras e se eram colónias puras. Sempre que necessário, repicou-se novamente para assegurar a pureza das culturas.

### **3.1.4. Manutenção das culturas de leveduras**

As culturas de leveduras foram crescidas em 2 ml de meio YM (0,5 % peptona, 0,3 % extracto de levedura, 0,3 % malte, 1% glucose) a 25 °C numa incubadora orbital (IKA KS 4000i). Após cerca de 16 h, as culturas (0,6 ml) foram colocadas em criotubos contendo 0,4 ml de glicerol (100 %) e congeladas a -80 °C.

## **3.2. Identificação de leveduras**

### **3.2.1. Extracção de DNA**

As leveduras cresceram em meio de cultura YM (0,5 % peptona, 0,3 % extracto de levedura, 0,3 % malte, 1% glucose), a 25 °C durante 16 h com agitação numa incubadora orbital (IKA KS 4000i). As culturas foram centrifugadas a 12 000 rpm a 4 °C durante 5 minutos numa centrífuga (Eppendorf 5415 R). Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 2 ml de água destilada ultra pura estéril. Procedeu-se novamente a uma centrifugação a 12 000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. Adicionou-se ao pellet 500 µl de uma solução de sorbitol 0,9 M, e 35 µl de uma solução de *Zymolyase* 1 mg/ml. Após agitação, incubou-se a 37 °C durante 60 minutos, posteriormente centrifugou-se novamente a 12 000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. Substituiu-se o sobrenadante por 500 µl de uma solução de 50 mM Tris HCl, 20 mM EDTA e adicionou-se ainda 13 µl de uma solução SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10 %. Posteriormente, agitou-se e incubou-se durante 5 minutos a 65 °C. Adicionou-se 200 µl de acetato de potássio 5 M e colocou-se no gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se 15 minutos a 13 000 rpm a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante para um novo microtubo contendo 700 µl de isopropanol (-20 °C) Incubou-se novamente à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) durante 10 minutos. Após uma centrifugação durante 15 minutos a 4 °C a 12 000 rpm, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com etanol

a 70 %. Efectuou-se uma nova centrifugação durante 3 minutos a 4 °C a 12 000 rpm e retirou-se cuidadosamente o etanol e o seu excesso com um papel absorvente. Deixou-se evaporar o etanol a 37 °C. Ressuspendeu-se o DNA em 50 µl de água destilada ultra pura estéril e armazenou-se a -20 °C. Esta solução foi diluída de 1:4 quando utilizada nas reacções de PCR.

### 3.2.2. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação da região 5.8S-ITS realizou-se de acordo com Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Para tal utilizaram-se os primers ITS1 (0,5 µM) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (0,5 µM) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC.3') (White *et al.*, 1990). Prepararam-se as reacções de PCR num volume de 100 µl de acordo com a Tabela VIII. Distribuiu-se 97 µl da Mix em cada tubo de PCR e adicionou-se 3 µl de solução de DNA de cada isolado a cada um.

**Tabela VIII - Reagentes utilizados na mistura para PCR (Mix).**

Reagentes	Volume (µl)	Concentração
Primer Forward ITS 1	2	1 µM
Primer Reverse ITS 4	2	1 µM
Desoxiribonucleótidos (Promega)	10	250 µM
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	10	1,5 mM
DNA Polimerase (Promega)	1	5 unidades
Tampão correspondente ao enzima	20	1 x
Água ultra pura estéril	52	-
DNA	3	-
Total	100	-

As condições em que decorreram as reacções de PCR estão referidas na Tabela IX.

**Tabela IX - Condições da amplificação através de PCR.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação Inicial	95	5
Desnaturação	95	1
Annealing	55	1
Extensão	72	2
Extensão final	72	10

A amplificação decorreu num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler) através de um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, *annealing* a 55,5 °C durante 1 minuto e extensão a 72 °C durante 2 minutos. No final, ocorreu um passo de extensão a 72 °C durante 10 minutos. Os

produtos de PCR foram separados num gel de agarose (1 %) preparado com TAE (1X) contendo uma concentração final de 0,5 µl/ml de brometo de etídio. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram estimados por comparação com um marcador de DNA (100 bp Ladder, Biorad). Após a electroforese (100 V), os géis foram visualizados no sistema G-Box Syngene- Genesys 10 UV Scanner.

### 3.2.3. Identificação por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)

Os produtos resultantes das reacções de PCR (uma alíquota constituída por 13 µl) foram digeridos com as endonucleases de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* (Bioron) (Tabela X). As misturas foram incubadas 12 h horas, a 37°C e os fragmentos de restrição foram separados em géis de agarose 3% em tampão TAE (1x). Após electroforese (130 V) os géis foram corados com brometo de etídio (1,5 mg/l) e visualizados no sistema G-Box Syngene- Genesys 10 UV Scanner. Os tamanhos dos fragmentos de DNA resultantes da restrição foram estimados por comparação com um marcador de DNA (100 bp Ladder, Biorad). Os perfis de restrição obtidos foram gravados e comparados com os publicados (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Sabate *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2002; Esteve Zarzoso *et al.*, 2003; de Llanos-Frutos *et al.*, 2004; Arroyo-López *et al.*, 2006).

Tabela X - Reagentes utilizados na preparação das soluções para as reacções de restrição com endonucleases.

Reagentes	Volume (µl)
Quantidade de enzima	0,8
DNA amplificado	13
Água ultra-pura estéril	2
Tampão do enzima	2
Total	17,8

### 3.2.4. Sequenciação parcial do gene 26S rRNA

Para os isolados em que se obteve padrões de restrição pouco conclusivos e para a confirmação de espécies cujos padrões não estavam descritos, procedeu-se à amplificação parcial

do gene 26S rRNA, nomeadamente os domínios D1 e D2, utilizando os primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') descritos por Kurtzman e Robnett (1998). A mistura para a reacção de PCR realizou-se de acordo com a Tabela XI.

**Tabela XI - Reagentes utilizados na mistura para PCR (Mix).**

Reagentes	Volume (µl)	Concentração
Primer Forward NL 1	2	1 µM
Primer Reverse NL 4	2	1 µM
Desoxiribonucleótidos (Promega)	10	250 µM
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	10	1,5 mM
DNA Polimerase (Promega)	1	5 unidades
Tampão correspondente ao enzima	20	1 x
Água ultra pura estéril	51	-
DNA	4	-
Total	100	-

A amplificação decorreu num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler) através de um passo de desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, *annealing* a 55.5 °C durante 2 minutos e extensão a 72 °C durante 2 minutos. No final, ocorreu um passo de extensão a 72 °C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados num gel de agarose (1 %) em TAE (1X) contendo 5 µl de brometo de etídio. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram estimados por comparação com um marcador de DNA (100 bp Ladder, Biorad). Os produtos resultantes da amplificação foram sequenciados. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas na base de dados <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### **3.3. Parâmetros físico-químicos dos fermentados**

#### **3.3.1. Doseamento do resíduo seco solúvel (°Brix)**

A determinação do resíduo seco solúvel foi efectuada de acordo com a Norma Portuguesa 785 (1985).

De cada amostra foi retirado 1 ml e distribuído por microtubos, os quais foram centrifugados a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C (Eppendorf 5415 R). Em seguida, com uma micropipeta foi retirada uma gota sem tocar na massa sólida da amostra, de forma a obter apenas

líquido que foi espalhado no centro do prisma principal do refractómetro Abbe (Atago type 1T, 4T), após o que foram feitas as leituras dos índices de refração a 20 ° C para cada amostra.

### **3.3.2. Doseamento da acidez total**

Pesaram-se 10 g de massa de fermentado adicionaram-se 50 ml de água destilada e procedeu-se à titulação com uma solução de NaOH 0,1 N, utilizando como indicador, uma solução de fenolftaleína a 1 % p/v.

### **3.3.3. Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada utilizando um potenciómetro Crison Micro pH 2000 equipado com um eléctrodo de pH. Antes da determinação do valor de pH de cada amostra o aparelho foi calibrado utilizando duas soluções padrão, uma com pH 4 e outra com pH 7.

### **3.3.4. Monitorização das temperaturas ao longo do processo fermentativo**

A medição da temperatura da sala de fermentação ao longo do tempo de fermentação, foi realizada utilizando um termómetro digital (P400) com uma sonda (Pt 400).

### **3.3.5. Identificação e quantificação de ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos das amostras de fermentado foram identificados e quantificados utilizando um sistema de cromatografia líquida (HPLC). Para quantificar os ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, acético, láctico, cítrico, succínico, málico, gálico) prepararam-se rectas de calibração utilizando padrões (Sigma Adrich, Portugal) para os diferentes ácidos, com as seguintes concentrações: 0,005; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6 e 1 g/100 ml.

Os ácidos orgânicos foram determinados após centrifugação das amostras a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C utilizando uma centrifuga Eppendorf 5415 R. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro Millipore de 0,45 µm e um diâmetro de 13 mm. A análise das amostras foi realizada num cromatógrafo líquido Jasco (HPLC) equipado com uma bomba Jasco PU-2080 e um detector Jasco de fotodíodo (PDA). Na análise das amostras utilizou-se uma coluna de fase reversa Lachrospher 100 RP-18 (Merck) com 25 cm x 4 mm x

5µm. Como eluente, utilizou-se tampão de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 M) a pH 2,4, com um fluxo de 0,8 ml/min (o pH foi ajustado com ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )). O volume de amostra injectado foi de 20 µl, tendo a detecção dos ácidos sido realizada a 214 nm. O tempo de corrida de cada amostra foi de 30 minutos.

Os resultados foram expressos em gramas de ácido orgânico por 100 ml de amostra de fermentado. Cada determinação foi realizada em triplicado.

### **3.3.6. Identificação e quantificação de açúcares**

Para a determinação do teor de açúcares foram seleccionados seis pontos de amostragem de cada fermentação com base na variação do crescimento microbiano. Cada amostra foi colocada em microtubos de 2 ml com ajuda de uma espátula e centrifugada a 12 000 rpm a 4 °C durante 15 minutos utilizando uma centrífuga Eppendorf 5415 R. Posteriormente as amostras foram filtradas utilizando um filtro Milipore com uma porosidade de 0,45 µm e um diâmetro de 13 mm.

Para a determinação do teor de sacarose, glucose e frutose nas amostras foi necessário preparar uma recta de calibração utilizando padrões adequados (0,1; 0,3 e 0,7 g/100 ml) (Sigma-Aldrich Portugal). A análise das amostras foi feita por HPLC num cromatógrafo (Jasco) equipado com um detector de índice de refração (Jasco – RI- 1530 Intelligent RI Detector) e com uma coluna *Polyspher OAHy* (Merck). A fase móvel utilizada foi uma mistura acetonitrilo e água (75:25 V/V) com um fluxo de eluição de 1 ml/min. Cada análise teve a duração de 20 min.

### **3.3.7. Doseamento dos compostos voláteis ao longo da fermentação: acetato de etilo, etanol e isopentanóis**

Ao longo do período de fermentação foi estudada a evolução dos seguintes compostos voláteis: acetato de etilo, etanol e isopentanóis, recorrendo à técnica de cromatografia gasosa, usando a microextração em fase gasosa.

### **3.3.7.1. Extracção e análise de compostos voláteis dos fermentados por micro extracção em fase sólida**

Com o objectivo de avaliar os compostos voláteis na massa em fermentação, testaram-se fibras utilizadas em SPME com diferentes revestimentos: polimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) 65  $\mu\text{m}$ ; polidimetilsiloxano (PDMS) 100  $\mu\text{m}$ ; divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30  $\mu\text{m}$  e a fibra de poliacrilato 85  $\mu\text{m}$ . A fibra seleccionada foi a de poliacrilato 85  $\mu\text{m}$  porque permitia utilizar uma quantidade de massa superior reduzindo erros inerentes à heterogeneidade dos fermentados. Na análise qualitativa de identificação de compostos encontrados em menores quantidades, foi usada a fibra DVB/CAR/PDMS.

Quer na quantificação quer na análise qualitativa as fibras foram expostas no espaço de cabeça de um *vial* de 20 ml contendo 2 g de amostra do fermentado e 5 ml de água destilada ultra pura. A extracção decorreu à temperatura do laboratório ( $20 \pm 2$  °C) e com agitação magnética (900 rpm), durante 20 minutos. Depois a fibra foi recolhida e transferida para o injector de um cromatógrafo gasoso munido de um detector FID, onde permaneceu durante 6 minutos. O método usado para a quantificação foi o da adição de padrão (Miller, 2005). Para cada amostra realizaram-se pelo menos 5 análises adicionando em cada uma, quantidades crescentes de uma mistura dos padrões de acetato de etilo, etanol e isopentanois (2-metil-1-butanol+ 3-metil-1-butanol).

O doseamento dos compostos voláteis decorreu num cromatógrafo gasoso Hewlett Packard 5890 Série II equipado com detector FID. O gás de arraste utilizado foi o hélio. Os compostos foram separados numa coluna DB-Wax (J & W Scientific) de 30 m x 0,32 mm i.d. com 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme. A temperatura do injector foi 250 °C no modo *split* (*split*, 30:1). A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C durante 5 minutos, depois a temperatura aumentou a uma taxa de 5 °C/min até 240 °C, temperatura onde permaneceu por 5 minutos. A temperatura do detector FID foi de 270 °C.



## **4. Metodologias de análise dos destilados**

### **4.1. Processo de destilação**

A destilação foi efectuada a uma escala piloto. Retirou-se uma amostra de cada fermentador, com cerca de 8 l e estas massas fermentadas foram transportadas para o laboratório (Instituto Superior de Engenharia) em condições de refrigeração ( $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Procedeu-se à destilação de cada uma em separado, num alambique artesanal de cobre com uma capacidade de 4 l, aquecido por uma resistência eléctrica.

A primeira parte do destilado (cabeça), com um aroma forte a acetato de etilo foi separada, em seguida recolheu-se o “coração” do destilado (aguardente) até este atingir um grau alcoólico de 40 %, por fim recolheu-se o “frouxo” até atingir um baixo grau alcoólico (cerca de 10 %) separadamente. Ao longo das destilações monitorizou-se a temperatura de forma a controlar o aquecimento durante a destilação.

### **4.2. Doseamento dos compostos voláteis**

As condições de análise cromatográfica foram semelhantes às usadas para a quantificação dos compostos voláteis do fermentado. Neste caso, o método de análise utilizado foi o da injeção directa de 2  $\mu\text{l}$  de destilado contendo um padrão interno (4 metil-2-pentanol) com base na Norma Portuguesa 3263 (1990). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

### **4.3. Doseamento do grau alcoólico**

Determinou-se o teor alcoólico (volumétrico) das aguardentes destiladas com base na Norma Portuguesa 2143 (1987) utilizando alcoómetros graduados na escala Gay-Lussac DENIS classe II (F 80 01 851) e um termómetro DENIS n° C 660 graduado de  $-1$  a  $+31\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **4.4. Doseamento da acidez**

Determinou-se a acidez na aguardente pela titulação da mesma com uma solução de NaOH 0,1 N utilizou-se como indicador uma solução de fenolftaleína a 1% p/v, com base na Norma Portuguesa NP 2139 (1987).

#### **4.5. Doseamento do teor de cobre**

Utilizou-se um espectrofotómetro UV-Vis (Cintra 101) para o doseamento do teor de cobre nos destilados. Prepararam-se cinco soluções padrão com as concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/l de cobre a partir de uma solução padrão (Panreac). O procedimento de análise foi realizado de acordo com o descrito na NP 2441 (1998). As amostras que apresentassem um teor de cobre superior ao teor de cobre das soluções padrão foram diluídas. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

#### **5. Análise estatística de resultados**

A elaboração de gráficos e o processamento estatístico foi realizado recorrendo ao programa informático da Microsoft Office Excel 2007 (V.12) em ambiente Windows 7.

No caso da análise de voláteis por cromatografia em fermentados, foram testadas as diferenças entre os três processos fermentativos para cada um dos voláteis estudados, para tal, foi efectuada uma análise de variância (ANOVA) aos resultados obtidos. Com uma variável independente (tempo em dias) e como variáveis dependentes os resultados obtidos para os voláteis (acetato de etilo, etanol, isopentanois). Recorrendo à formulação de hipóteses é possível testar se  $H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3$  [o comportamento é igual] versus  $H_1$ : Pelo menos um é diferente. Utilizando a estatística de teste  $F$  é possível testar as duas hipóteses e verificar qual delas se aplica neste caso, com um intervalo de confiança de 95 % ( $p<0,05$ ).

### III- Resultados

Durante a fermentação do medronho foi possível observar diversas alterações microbiológicas e físico-químicas, ao longo do tempo, em três fermentações independentes (Fermentação 5, Fermentação 7, Fermentação 10, respectivamente F5, F7, F10) as quais serão descritas nos capítulos seguintes.

#### 1. Parâmetros microbiológicos

A evolução da microbiota aeróbia total e da contagem de leveduras nas Fermentações F5, F7, F10 está representada nos gráficos da Figura 16 (A - F5; B - F7; C - F10).

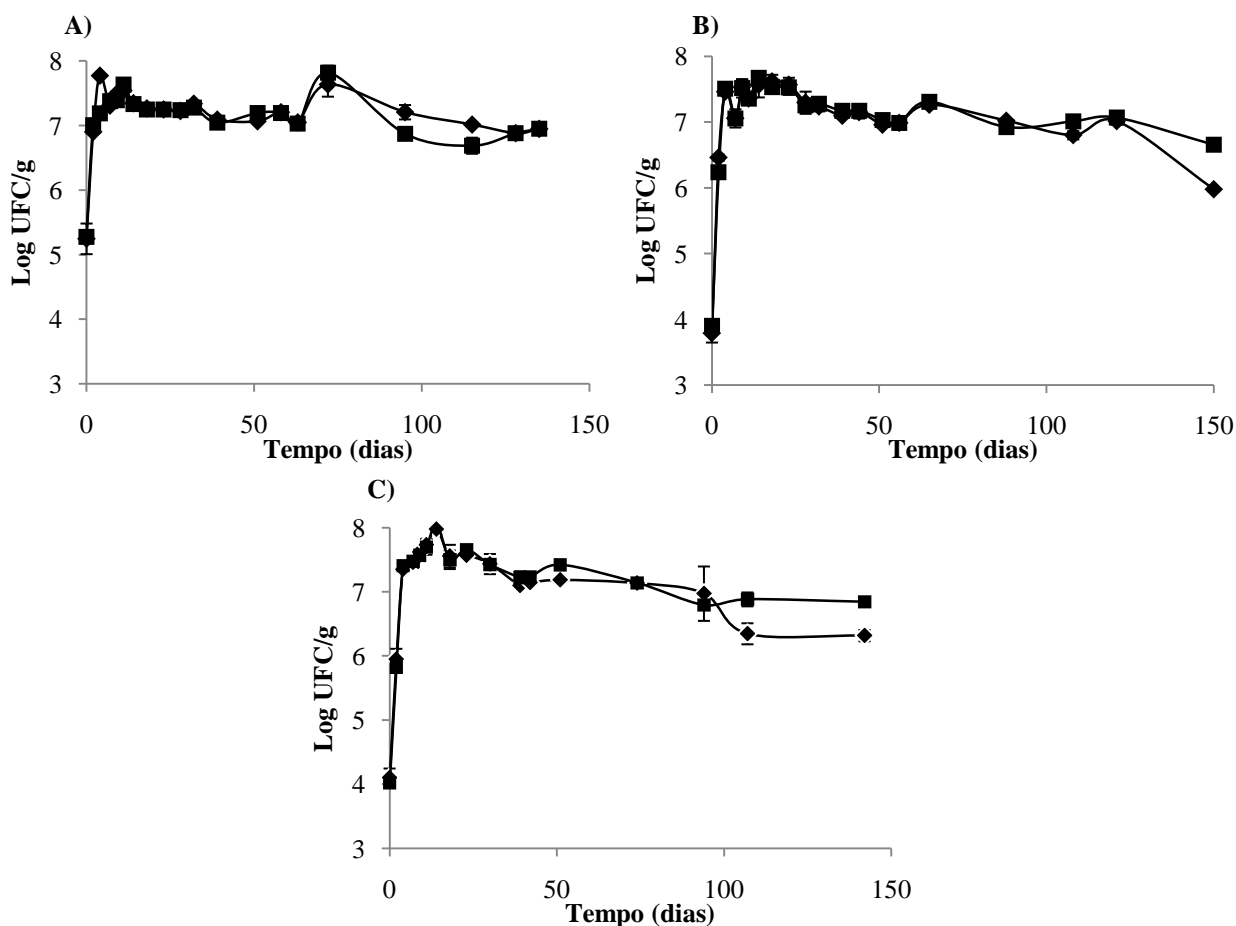


Figura 16 - Dinâmica da população de leveduras (◆) e da microbiota aeróbia total (■) na Fermentação 5 (A), na Fermentação 7 (B) e na Fermentação 10 (C) (os pontos representados são as médias dos resultados observados em duplicado com o desvio padrão correspondente).

A população microbiana aumentou exponencialmente até ao quarto dia nas três fermentações estudadas, a partir daí manteve-se em fase estacionária durante grande parte do período em que decorreu o estudo, tendo sofrido uma redução na fase final. Pode verificar-se que a população de leveduras apresentou valores muito próximos dos da microbiota aeróbia total, tendo variado entre 3,7 e 5,2 log UFC/g de fermentado no início da fermentação e 5,9 e 6,9 log UFC/g, no final do estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Cavaco *et al.* (2007) no que diz respeito à contagem de leveduras. Embora os frutos utilizados nas três fermentações tivessem sido colhidos em locais diferentes, o padrão de crescimento da microbiota estudada foi semelhante.

## **2. Identificação de leveduras por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)**

No decurso dos processos estudados, obtiveram-se 63, 58 e 51 isolados de leveduras das Fermentações F5, F7 e F10, respectivamente, correspondendo a um total de 172 isolados. Algumas leveduras ao longo do estudo tornaram-se inviáveis, não sendo possível identificá-las, pelo que se obteve no final 164 isolados de leveduras.

Os isolados das três fermentações foram identificadas por RFLP. A amplificação da região 5,8S rRNA-ITS permitiu obter bandas com tamanho compreendido entre 390 bp (*Metschnikowia* sp.) e 850 bp (*Saccharomyces cerevisiae*). A identificação de cada isolado está registada na Tabela XII, onde é possível consultar o tamanho em (bp) dos amplificadores e os fragmentos obtidos pelas endonucleases de restrição (*Cfo*I, *Hae*III e *Hinf*I). Os perfis de restrição obtidos foram comparados com os publicados (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Sabate *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2002; Esteve Zarzoso *et al.*, 2003; de Llanos-Frutos *et al.*, 2004; Arroyo-López *et al.*, 2006).

Das 164 estirpes isoladas foi possível identificar 18 perfis de restrição diferentes que corresponderam às espécies *Aureobasidium pullulans*, *Candida apicola*, *Candida zemplinina*, *Cryptococcus tephrensis*, *Dothichiza pithyophila*, *Dioszegia zsoltii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Lachancea thermotolerans* (redefinição de *Kluyveromyces thermotolerans*), *Metschnikowia* aff. *fruticola*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula*

*nothofagi*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, e aos gêneros *Cryptococcus* sp., *Metschnikowia* sp., *Sporidobolus* sp..

**Tabela XII - Tamanho em bp (pares de bases) dos produtos de PCR, dos fragmentos resultantes da actividade de três endonucleases de restrição e percentagem de isolados das diferentes espécie das três Fermentações.**

Espécies isoladas	% de isolados	Amplificado (bp)	<i>Cfo</i> I (HspA I)	<i>Hae</i> III (bsur I)	<i>Hinf</i> I
<i>Aureobasidium pullulans</i>	4,1	600	190+180+100	450+150	290+180+130
<i>Candida apicola</i>	0,6	750	340+310+100	730	390+195+160
<i>Candida zemplinina</i>	2,3	475	215+110+80+60	475	235+235
<i>Cryptococcus</i> sp.	0,6	590	250+180+90	490+100	305+285
<i>Cryptococcus tephrensensis</i>	1,2	540	270+230+40	400+50+50+30	240+240+60
<i>Dioszegia zsolitii</i>	1,2	550	290+260	525	280+210
<i>Dothichiza pithyophila</i>	1,2	600	290+180+100	450+150	290+180+130
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	13,4	775	320+310+105	775	385+200+160+80
<i>Issatchenkia orientalis</i>	2,3	480	180+170+70+60	380+90	200+200+90
<i>Lachancea thermotolerans</i>	6,4	700	310+280+90	300+210+95+95	340+340
<i>Metschnikowia</i> aff. <i>fructicola</i>	2,9	390	200+100+90	290+100	390
<i>Metschnikowia</i> sp.	9,9	390	205+95+90	280+90	200+190
<i>Pichia membranaefaciens</i>	14,5	500	175+110+90+75	330+90+50	275+200
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,2	640	320+240+80	425+215	340+225+75
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	1,2	640	320+240+80	425+215	340+225+75
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	850	375+325+150	325+230+170+125	375+365+110
<i>Sporidiobolus</i> sp.	1,7	600	280+220+100	600	260+150+120+90
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0,6	800	330+220+150+100	800	410+380

As seguintes figuras (Figuras 17, 18 ,19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25) apresentam as fotografias dos 18 perfis, obtidos dos géis de RFLP após a coloração com brometo de etídio (1,5 mg/l).

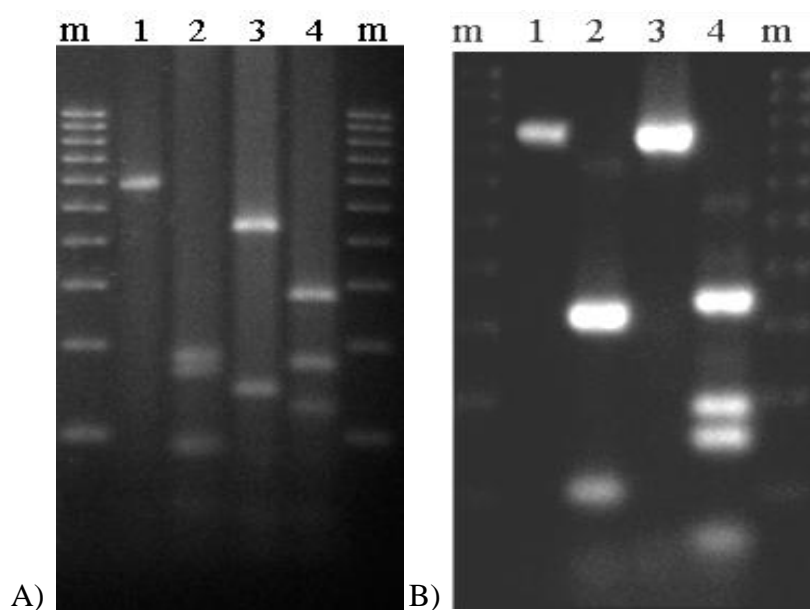


Figura 17 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo*I (2), *Hae*III (3) e *Hinf*I (4) das espécies *Aureobasidium pullulans* (A) e *Candida apicola* (B). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

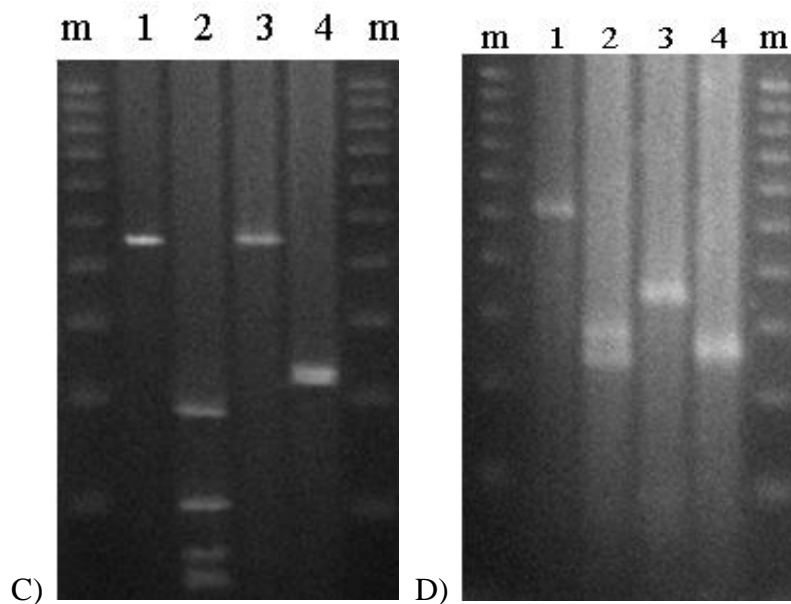


Figura 18 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e *HinfI* (4) das espécies *Candida zemplinina* C) e *Cryptococcus tephrensis* (D). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

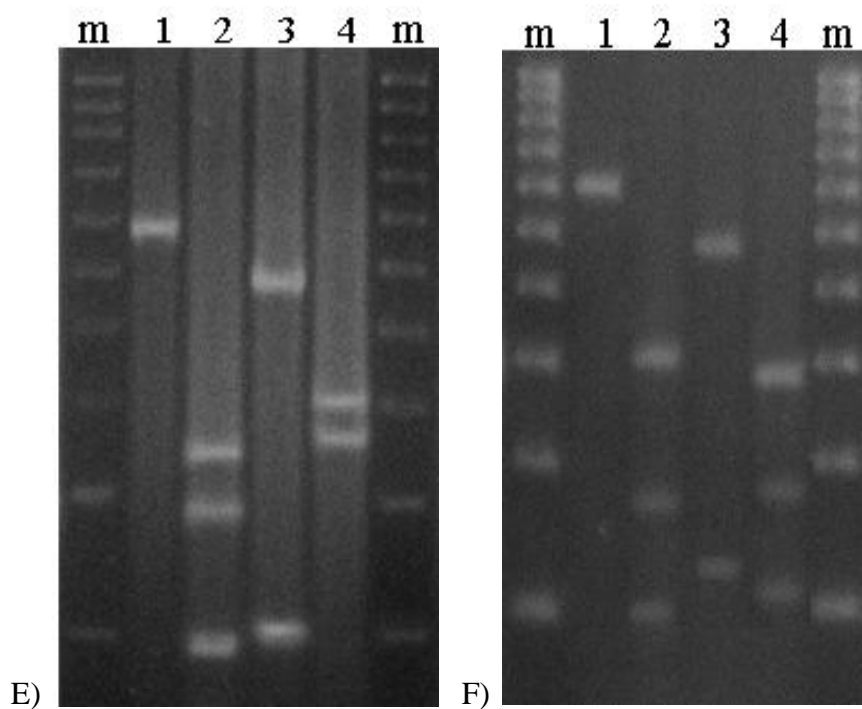


Figura 19 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *CfoI* (2), *HaeIII* (3) e *HinfI* (4) das espécies *Cryptococcus* sp. (E) e *Dothichiza pithyophila* (F). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

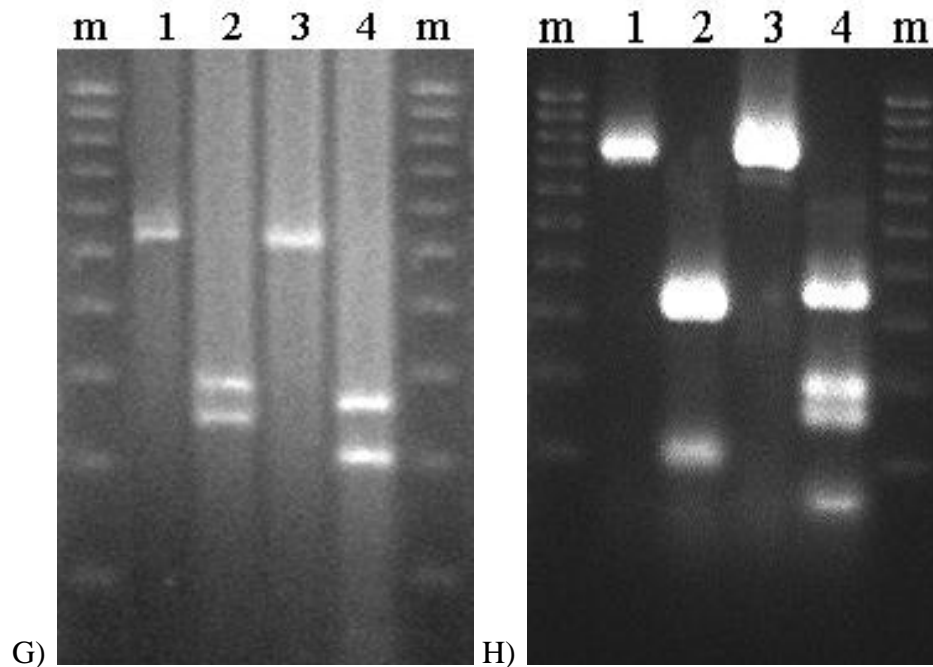


Figura 20 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo*I (2), *Hae*III (3) e *Hinf*I (4) das espécies *Dioszegia zsoldii* (G) e *Hanseniaspora uvarum* (H). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

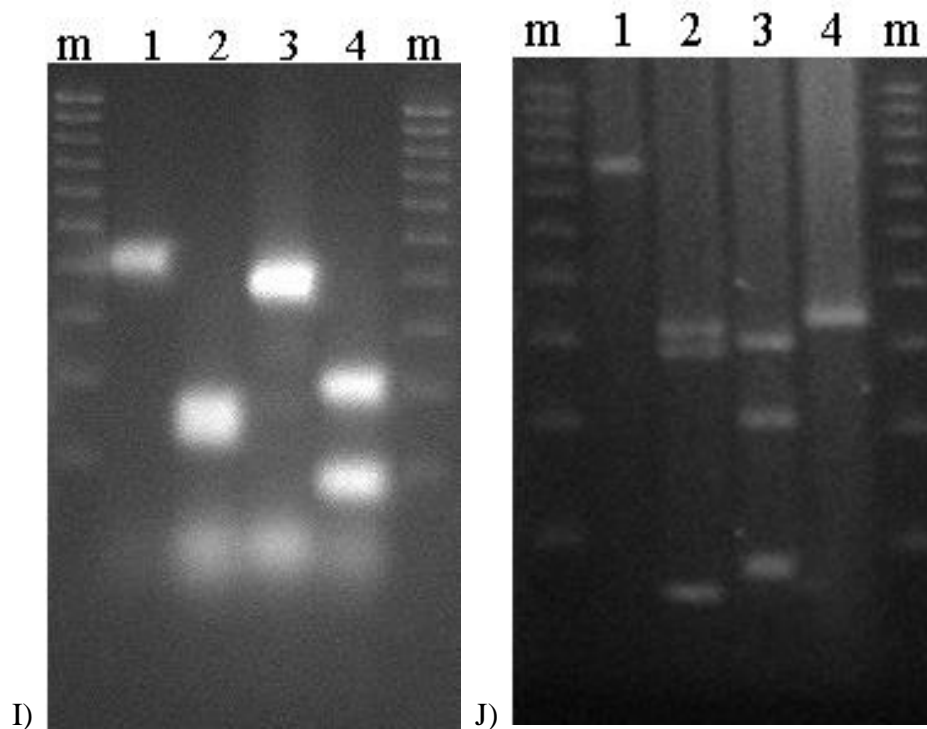


Figura 21 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo*I (2), *Hae*III (3) e *Hinf*I (4) das espécies *Issatchenkia orientalis* (I) e *Lachancea thermotolerans* (J). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

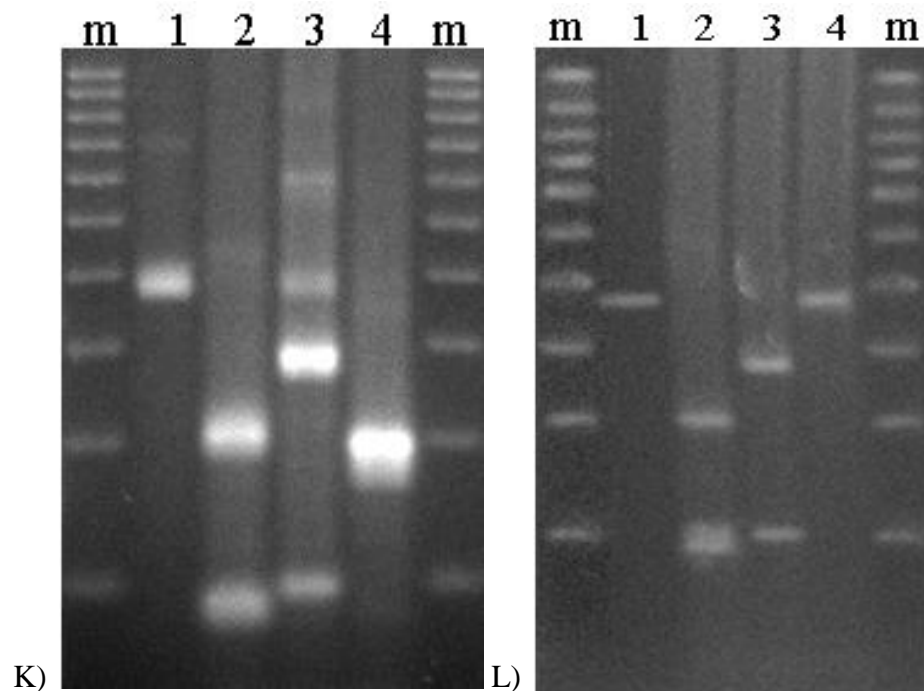


Figura 22 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo*I (2), *Hae*III (3) e *Hinf*I (4) das espécies *Metschnikowia* sp. (K) e *Metschnikowia* aff. *fructicola* (L). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

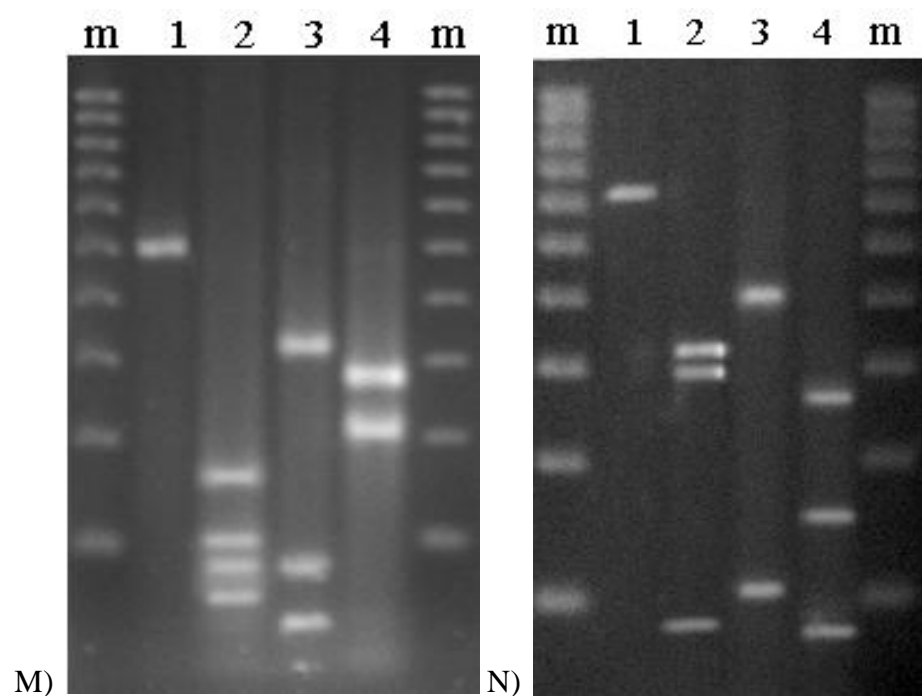


Figura 23 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo*I (2), *Hae*III (3) e *Hinf*I (4) das espécies *Pichia membranifaciens* (M) e *Rhodotorula nothofagi* (N). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).



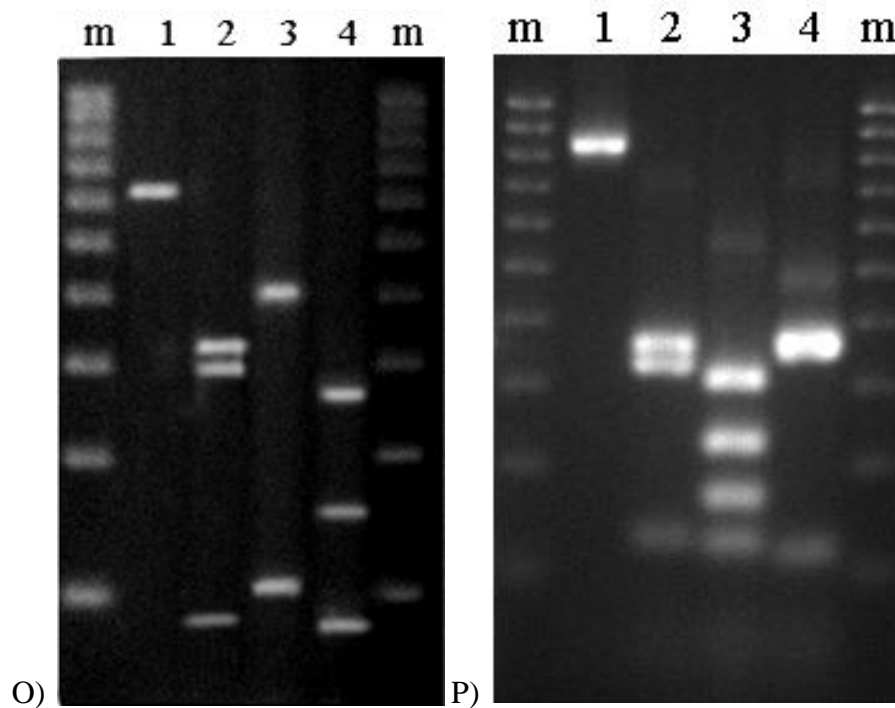


Figura 24 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo*I (2), *Hae*III (3) e *Hinf*I (4) das espécies *Rhodotorula mucilaginosa* (O) e *Saccharomyces cerevisiae* (P). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

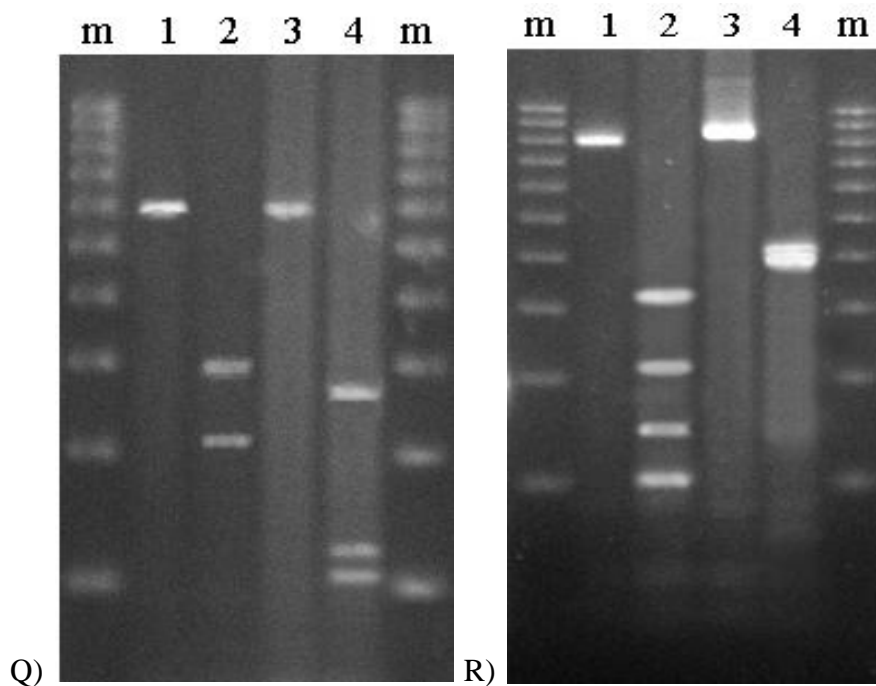


Figura 25 - Tamanho em bp (pares de bases) da região ITS-5.8S rRNA amplificada por PCR (1) e restrição dos amplificados de PCR com endonucleases *Cfo*I (2), *Hae*III (3) e *Hinf*I (4) das espécies *Sporidiobolus* sp.(Q) e *Torulaspora delbrueckii* (R). As bandas m correspondem ao marcador de DNA (100 bp DNA ladder, Biorad).

Ao longo da fermentação observou-se uma sucessão de espécies de leveduras, registada na Figura 26. Em geral, os isolados não pertencentes ao género *Saccharomyces* apareceram durante as primeiras fases da fermentação, sendo subsequentemente substituídos por *S. cerevisiae*. A espécie *Pichia membranaefaciens* foi também detectada nas fases finais dos processos estudados.

Espécies	Linha de tempo da fermentação		
	Inicial	Intermédia	Fase final
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-----		
<i>Candida apicola</i>			-----
<i>Candida zemplinina</i>		-----	
<i>Cryptococcus sp.</i>	-----		
<i>Cryptococcus tephrensis</i>	-----		
<i>Dioszegia zsoltii</i>	-----		
<i>Dothichiza pithyophila</i>	-----		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-----		
<i>Issatchenkia orientalis</i>	-----	-----	
<i>Lachancea thermotolerans</i>	-----	-----	
<i>Metschnikowia sp.</i>	-----		
<i>Metschnikowia fructicola</i>	-----		
<i>Pichia membranaefaciens</i>		-----	-----
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-----		
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	-----		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-----	-----	-----
<i>Sporidiobolus sp.</i>	-----		
<i>Torulaspora delbrueckii</i>		-----	

Figura 26 - Cronograma da sucessão das espécies de leveduras ao longo das Fermentações.

### 3. Sequenciação parcial do gene 26S rRNA

A sequenciação da região D1/D2 do gene 26S rRNA permitiu confirmar algumas das identificações efectuadas anteriormente por RFLP, nomeadamente em alguns casos em que a análise dos fragmentos de restrição não se revelou, numa primeira abordagem, conclusiva. Na Tabela XIII registou-se a percentagem da identificação das espécies estudadas por sequenciação parcial do rRNA.

**Tabela XIII - Percentagem de identificação por sequenciação da região D1/D2 das espécies isoladas nas três fermentações.**

<b>Espécies isoladas</b>	<b>% de identificação por sequenciação (D1-D2)</b>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	100
<i>Candida apicola</i>	99
<i>Candida zemplinina</i>	100
<i>Cryptococcus</i> sp.	99
<i>Cryptococcus tephrensensis</i>	100
<i>Dioszegia zsoldii</i>	100
<i>Dothichiza pithyophila</i>	98
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100
<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
<i>Lachancea thermotolerans</i>	99
<i>Metschnikowia</i> aff. <i>fructicola</i>	99
<i>Metschnikowia</i> sp.	99
<i>Pichia membranaefaciens</i>	99
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
<i>Sporidiobolus</i> sp.	100
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100

#### 4. Parâmetros físico-químicos do processo fermentativo

##### 4.1. Doseamento do resíduo seco solúvel (°Brix)

A evolução do resíduo seco solúvel ou °Brix ao longo das Fermentações F5, F7, F10 está representado no gráfico da Figura 27.

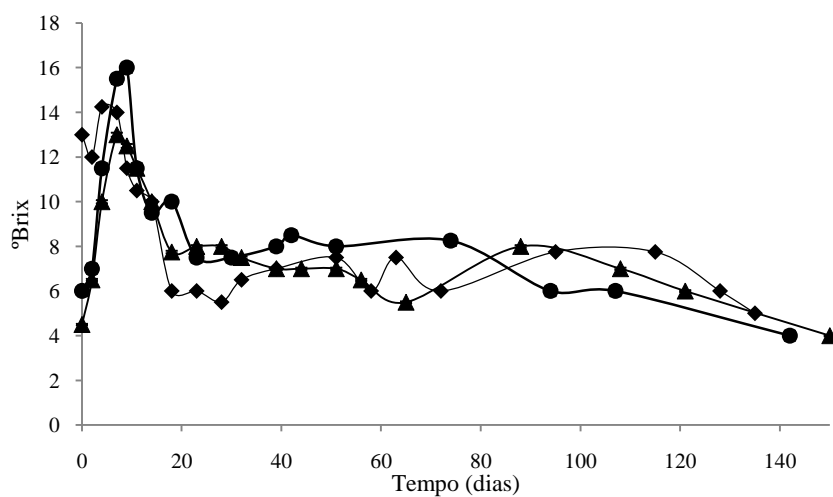


Figura 27 - Evolução do ° Brix na Fermentação 5 (◆), Fermentação 7 (▲) e Fermentação 10 (●).

O valor dos sólidos solúveis totais aumentou nas três Fermentações durante os primeiros sete dias, atingindo valores de 13 a 15,5 °Brix, seguindo-se uma diminuição acentuada deste parâmetro durante cerca 12 dias. Posteriormente, observou-se uma ligeira diminuição no final do período estudado, tendo-se obtido valores finais de 4 a 5 °Brix. O aumento observado durante a primeira fase da fermentação resulta, provavelmente, da hidrólise enzimática dos carboidratos complexos presentes nas estruturas celulares dos frutos. A subsequente diminuição, deve-se à utilização dos açúcares pelos microrganismos presentes em particular, as leveduras.

#### 4.2. Identificação e quantificação de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos pesquisados durante os três processos foram os seguintes: ácido málico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico e ácido gálico. Na Tabela XIV está representada a evolução dos referidos ácidos na Fermentação 5 (F5).

**Tabela XIV - Evolução dos ácidos orgânicos na Fermentação 5.**

Tempo (dias)	Concentração (g/l)							
	Ácido Oxálico	Ácido Tartárico	Ácido Málico	Ácido Acético	Ácido Láctico	Ácido Cítrico	Ácido Succínico	Ácido Gálico
0	ND	ND	78 ± 1,5	543 ± 12,3	ND	3,5x10 <sup>-3</sup> ± 2,5x10 <sup>-3</sup>	0,5 ± 0,2	3,9 ± 1,2
4	ND	ND	252 ± 1,5	586 ± 92	ND	5,1 ± 2,1	103 ± 0,2	ND
9	ND	ND	32 ± 6,5	625 ± 82	ND	0,9 ± 0,7	1,1 ± 0,9	3,7 ± 0,6
28	ND	ND	ND	892 ± 104,9	ND	5,1x10 <sup>-3</sup> ± 1,3x10 <sup>-4</sup>	ND	3,7 ± 0,1
72	ND	ND	78 ± 1,5	543 ± 12,3	ND	3,5x10 <sup>-3</sup> ± 2,5x10 <sup>-3</sup>	0,5 ± 0,2	3,9 ± 1,2

ND- Não detectado

O ácido oxálico, o ácido tartárico e o ácido láctico não foram detectados ao longo da F5 com o método utilizado. O ácido existente em maior quantidade foi o ácido acético o qual aumentou ao longo do período de fermentação, a sua concentração variou de 543 ± 12,3 g/l a 892 ± 104,9 g/l no final da fermentação. O ácido málico foi o ácido com a segunda maior concentração, presente no processo em estudo. O ácido cítrico foi o ácido presente em menor quantidade. O ácido succínico esteve presente numa baixa concentração. O ácido gálico também foi detectado embora em pequenas concentrações.

Na Tabela XV está representada a evolução dos referidos ácidos na Fermentação 7 (F7).

**Tabela XV - Evolução dos ácidos orgânicos na Fermentação 7.**

Tempo (dias)	Concentração (g/l)							
	Ácido Oxálico	Ácido Tartárico	Ácido Málico	Ácido Acético	Ácido Láctico	Ácido Cítrico	Ácido Succínico	Ácido Gálico
0	4 ± 0,2	44 ± 3,5	4 ± 0,3	72 ± 6,6	ND	5 ± 0,1	68 ± 9,5	11 ± 1
4	27 ± 6,4	11 ± 8,1	4 ± 0,9	190 ± 7,7	12 ± 0,2	ND	9 ± 1,8	ND
9	35 ± 6,4	14 ± 2,3	48 ± 0,9	ND	14 ± 0,2	ND	7 ± 1,8	ND
32	8 ± 0,8	ND	43 ± 3,4	79 ± 1	138,6 ± 2,3	0,6 ± 1x10 <sup>-3</sup>	14 ± 2,3	4 ± 0,5
51	39 ± 5,2	18 ± 3,4	468 ± 85	ND	960 ± 89,1	ND	65 ± 9,6	ND
110	8 ± 0,8	ND	43 ± 3,4	7 ± 0,8	147 ± 21,5	0,3 ± 0,1x10 <sup>-5</sup>	14 ± 4x10 <sup>-3</sup>	3 ± 0,1

ND- Não detectado

Na Fermentação 7 identificou-se os ácidos oxálico, tartárico, málico, acético, láctico, cítrico, succínico e gálico. O ácido acético atingiu o valor máximo, 190 ± 7,7 g/l ao fim de 4 dias tendo a sua concentração diminuído até ao final. Os ácidos oxálico, tartárico, gálico e cítrico foram detectados em pequenas concentrações ao longo da fermentação, em alguns períodos do processo. Observou-se um aumento da concentração de ácido láctico até ao dia 51, tendo diminuído no ponto seguinte. Observou-se um comportamento idêntico no caso do ácido málico.

O doseamento de ácidos orgânicos ao longo da Fermentação 10 (F10) está representado na Tabela XVI.

**Tabela XVI - Evolução dos ácidos orgânicos na Fermentação 10.**

Tempo (dias)	Concentração (g/l)							
	Ácido Oxálico	Ácido Tartárico	Ácido Málico	Ácido Acético	Ácido Láctico	Ácido Cítrico	Ácido Succínico	Ácido Gálico
0	ND	ND	177 ± 0,4	635 ± 28	8,7 ± 0,1	28 ± 1	1,1 ± 0,6x10 <sup>-2</sup>	4 ± 0,6x10 <sup>-2</sup>
4	ND	ND	28 ± 1,3	972 ± 34,2	190 ± 23	12 ± 1	0,7 ± 1,5 x10 <sup>-2</sup>	ND
11	ND	ND	212 ± 44,1	263 ± 31,6	66 ± 17,1	2 ± 0,2	34 ± 5	3,3 ± 0,2
30	ND	ND	47 ± 4,6	36 ± 11,6	95 ± 1,2	11 ± 0,2	2 ± 0,5	3 ± 0,4
51	ND	ND	29 ± 1,6	9 ± 0,6	1 ± 0,3	1 ± 0,1	1 ± 0,5	3,6 ± 0,5
96	ND	ND	ND	112 ± 13,4	ND	1 ± 0,1	4 ± 0,7	ND

ND- Não detectado

O ácido oxálico e o ácido tartárico não foram detectados ao longo da Fermentação 10. O ácido acético aumentou até ao quarto dia e depois observou-se uma redução seguida de um

aumento no fim do processo. Ao longo do período de fermentação o ácido cítrico foi o ácido presente em menor quantidade. O ácido gálico esteve presente numa baixa concentração e não foi detectado no período final da fermentação. O ácido láctico e o succínico foram detectados em pequenas concentrações ao longo do processo. O ácido málico apresentou a segunda maior concentração no início, no processo em estudo, este foi diminuindo ao longo do processo, não sendo detectado na fase final.

#### 4.3. Determinação do pH e doseamento da acidez total

A evolução dos valores de pH e da acidez total nas Fermentações F5, F7, F10 está representada nos gráficos da Figura 28 (A-F5; B-F7; C-F10).

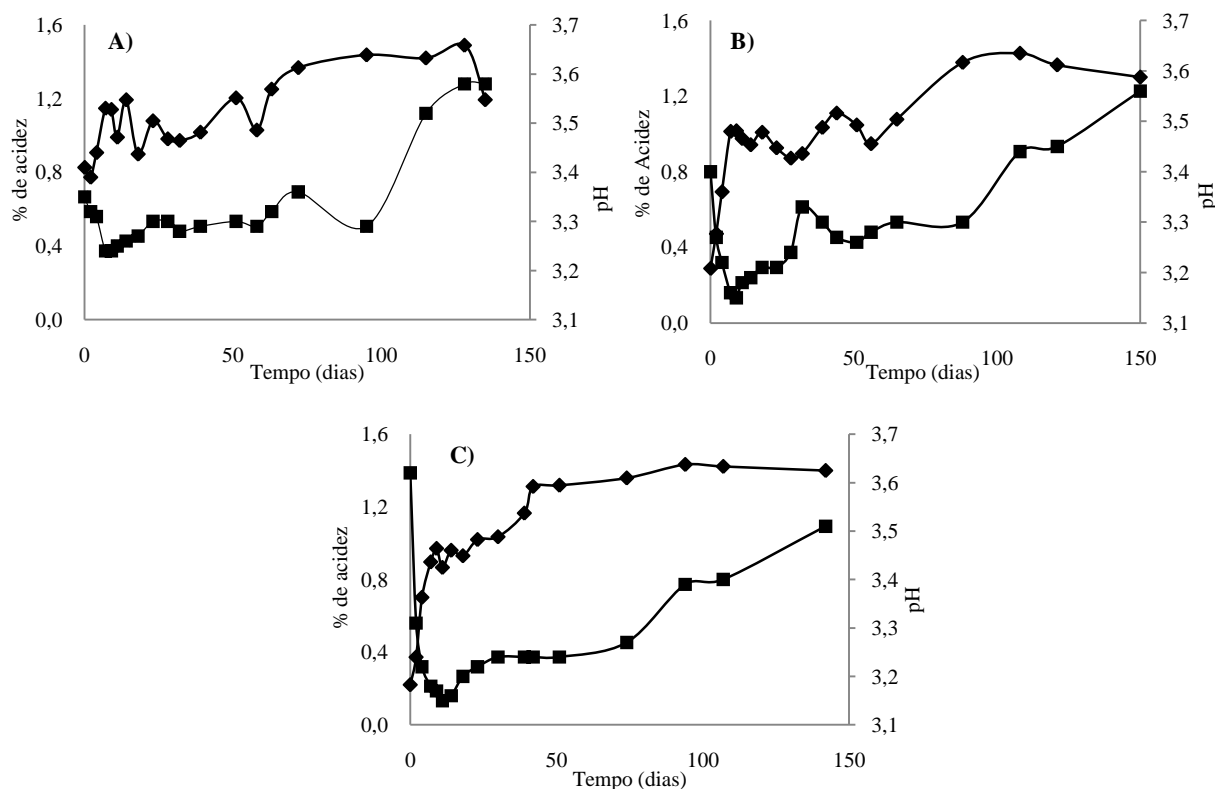


Figura 28 - Evolução dos valores de pH (■) e da % de acidez expressa em ácido láctico (◆) na Fermentação 5 (A), na Fermentação 7 (B) e na Fermentação 10 (C).

No início das fermentações o mosto apresentou valores de pH de 3,4 na F5 e na F7 e de 3,6 na F10. Durante os sete primeiros dias o pH diminuiu, tendo-se registado valores mínimos de 3,2 (F5, F7, F10). A acidez total no início das fermentações apresentou valores diferentes para cada fermentação. A acidez inicial foi de 0,8 %, de 0,3 % e de 0,2 % expressa em ácido láctico nas Fermentações F5, F7 e F10, respectivamente. Apesar de algumas oscilações ao longo dos processos, todos eles apresentaram um aumento da percentagem de acidez ao longo do tempo tendo-se obtido valores finais de acidez de 1,2 % na F5, 1,3 %, na F7 e um valor de 1,4 % na F10.

#### 4.4. Identificação e quantificação dos açúcares

A evolução dos açúcares presentes ao longo da Fermentação 5 está representada na Tabela XVII.

**Tabela XVII - Evolução dos açúcares (frutose, glucose, sacarose) na Fermentação 5.**

Tempo retenção (min)	Açúcares	Tempo (dias)					
		0	4	9	28	72	115
6,5	Frutose (g/l)	159 ± 27,8	473 ± 14,9	483 ± 49,7	69 ± 1,2	50 ± 2,2	48 ± 5,7
7,9 – 8,1	Glucose (g/l)	149 ± 7,1	112 ± 2,1	94 ± 14	61 ± 14,5	14,5 ± 3,4	ND
10,782	Sacarose (g/l)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND- Não detectado

No processo F5 não foi detectada sacarose com o método utilizado e o açúcar presente em maior concentração foi a frutose 483 g/l. A concentração de glucose foi diminuindo mais rapidamente quando comparada com a de frutose.

A Tabela XVIII representa a evolução dos açúcares ao longo da Fermentação F7.

**Tabela XVIII - Evolução dos açúcares (frutose, glucose, sacarose) na Fermentação 7.**

Tempo retenção (min)	Açúcares	Tempo (dias)					
		0	4	9	32	51	110
6,5	Frutose (g/l)	67 ± 1,2	307 ± 97,3	82 ± 12,3	64 ± 3,1	ND	24 ± 1,5
7,9 – 8,1	Glucose (g/l)	ND	99 ± 3,5	ND	ND	ND	ND
10,782	Sacarose (g/l)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND- Não detectado

No processo F7 não foi detectada sacarose com o método utilizado e o açúcar presente em maior concentração foi a frutose  $307 \pm 97,3$  g/l. A glucose só foi detectada ao quarto dia, não sendo mais detectada ao longo do processo.

A evolução dos açúcares ao longo da Fermentação F10 está representada na Tabela IXX.

**Tabela IXX - Evolução dos açúcares (frutose, glucose, sacarose) na Fermentação 10.**

Tempo retenção (min)	Açúcares	Tempo (dias)					
		0	4	11	30	51	96
6,5	Frutose (g/l)	$1419 \pm 841,3$	$394 \pm 29,7$	$89 \pm 1,2$	$57 \pm 12,1$	$41 \pm 2,3$	$12,3 \pm 7,3$
7,9 – 8,1	Glucose (g/l)	$62 \pm 1,2$	$102 \pm 82,7$	ND	ND	$42 \pm 15,2$	ND
10,9	Sacarose (g/l)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND- Não detectada

No processo F10 também não foi detectada sacarose com o método utilizado e o açúcar presente em maior concentração foi a frutose  $1419 \pm 841,3$  g/l. A glucose foi diminuindo mais rapidamente em relação à frutose.

#### 4.5. Doseamento dos compostos voláteis ao longo da fermentação: acetato de etilo, etanol e isopentanóis

A concentração de acetato de etilo ao longo do período de fermentação nos três processos (F5, F7 e F10) está representado no gráfico da Figura 29.

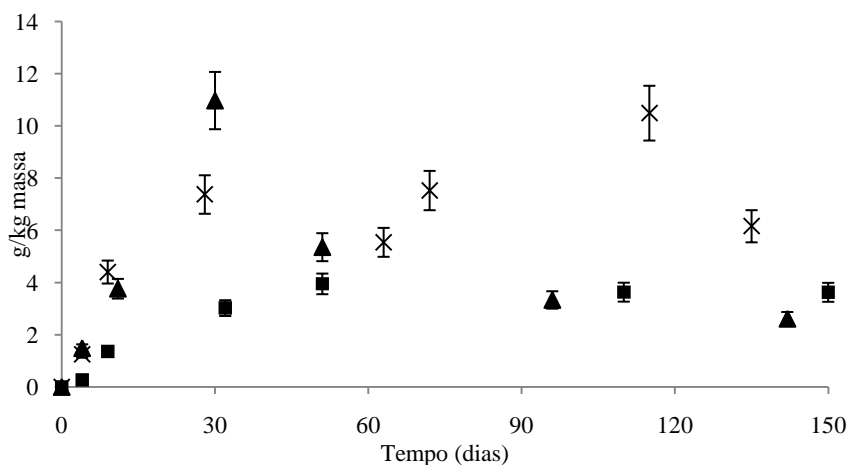


Figura 29 - Evolução da formação de acetato de etilo nas Fermentações: F 5 (X), F 7 (■) e F 10 (▲).

No início da fermentação não se detectou a presença de acetato de etilo, com a metodologia usada, em nenhum dos processos estudados. Posteriormente, a concentração deste



composto aumentou ao longo do tempo nos 3 processos fermentativos, tendo-se detectado valores de 6,2, 3,6 e 2,6 g/kg de massa de fermentado no final das fermentações F5, F7 e F10, respectivamente.

Através da análise de variância (ANOVA) a um factor (ANEXO I), obtivemos  $F_{calc}=2,07$  e o valor de  $F_{[0,05;3-1;18-3]}=3,68$ , pode então afirmar-se que não se rejeita  $H_0$ , verifica-se que através do teste de  $F$  o comportamento das três fermentações em relação à formação do acetato de etilo é semelhante.

A concentração de etanol ao longo do período de fermentação nos três fermentadores (F5, F7 e F10) está representada no gráfico da Figura 30. O etanol é o principal produto resultante da actividade das leveduras.

A concentração de etanol aumentou ao longo do período de fermentação nos três processos fermentativos estudados. No final das fermentações detectaram-se valores de etanol de cerca de  $740 \pm 20$  g por kg de massa de fermentado nos três processos.

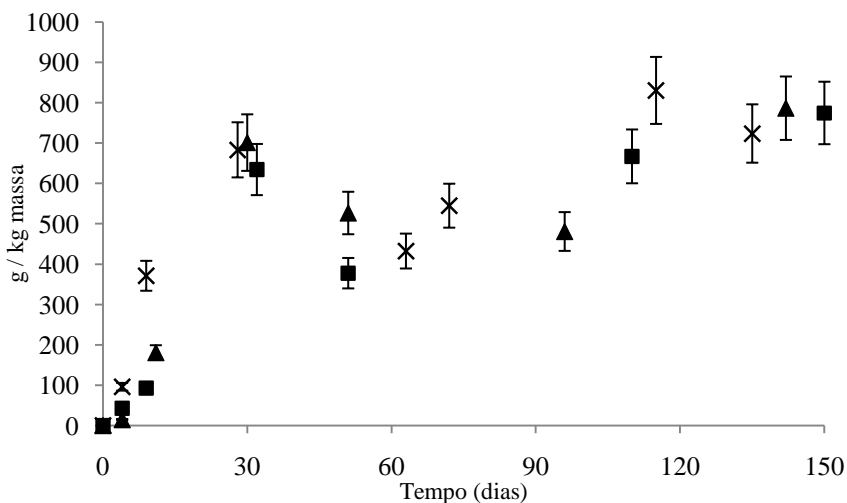


Figura 30 - Evolução da formação de etanol nas Fermentações: F 5 (x), F 7 (■) e F 10 (▲).

Através da análise de variância (ANOVA) a um factor (ANEXO II), obtivemos para  $F_{calc}=0,16$  e o valor de  $F_{[0,05;3-1;18-3]}=3,68$ , não se rejeita  $H_0$ , através do teste de  $F$  podemos afirmar que a formação do etanol apresenta comportamento semelhante nas três fermentações.

A concentração de isopentanóis ao longo do período de fermentação nos três processos (F5, F7 e F10) está representado no gráfico da Figura 31. Os isopentanóis resultam de actividades metabólicas das leveduras presentes ao longo da fermentação. Este tipo de compostos tem um papel de relevo no aroma que conferem aos destilados.

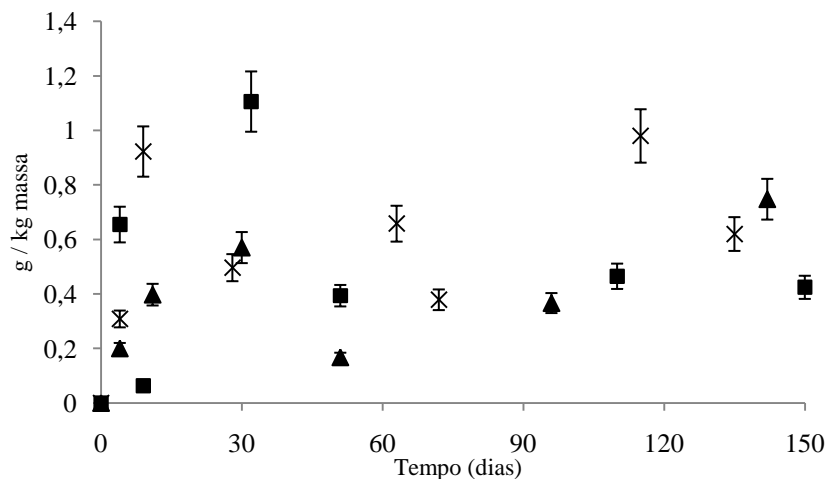


Figura 31 - Evolução dos isopentanóis nas Fermentações: F 5 (×), F 7 (■) e F 10 (▲).

Tal como os outros compostos voláteis não foi detectado inicialmente com a técnica usada. A sua concentração também sofreu algumas variações ao longo do período de fermentação nos três processos estudados.

Utilizando a análise de variância (ANOVA) a um factor (ANEXO III), obtivemos para  $F_{calc}=1,48$  e o valor de  $F_{[0,05;3-1;18-3]}=3,68$ , aplicando o teste de  $F$ , não se rejeita  $H_0$ , assim é possível afirmar que a formação dos isopentanóis apresenta um comportamento que é comum nas três fermentações.

#### 4.6. Monitorização das temperaturas do processo fermentativo

A temperatura ambiente do interior da sala de fermentação foi registada regularmente ao longo do tempo e a sua variação está representada na Figura 32.

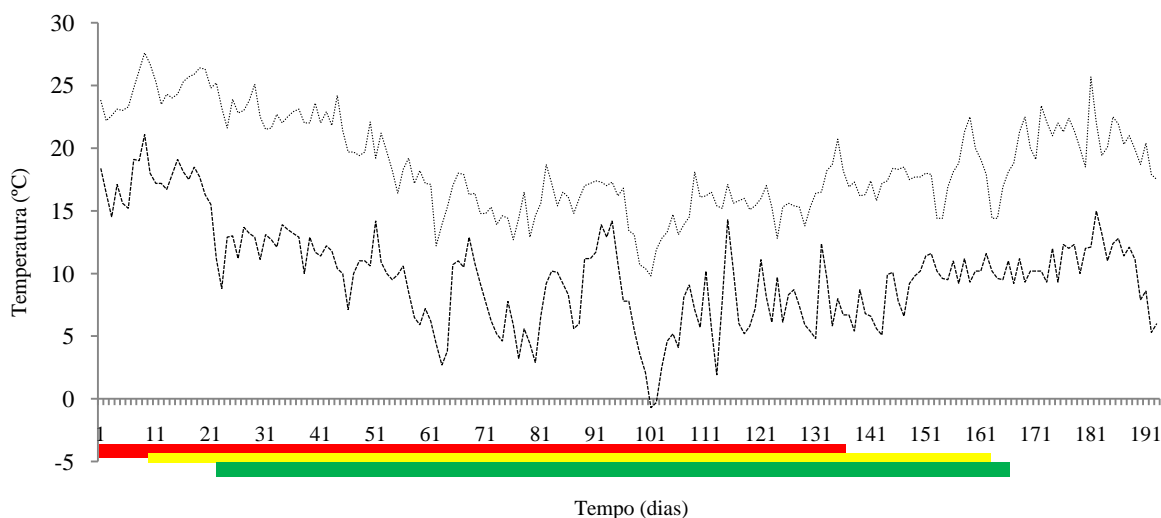


Figura 32 - Variação das temperaturas máximas (.....) e mínimas (- - -) da sala de fermentação no período em que decorreram as fermentações: Fermentação 5 (■), Fermentação 7 (■) e Fermentação 10 (■).

Ao longo dos processos fermentativos estudados a temperatura da sala de fermentação sofreu várias oscilações. Durante o período em que decorreu a Fermentação 5 o valor mais baixo das temperaturas mínimas foi de  $-0,7^{\circ}\text{C}$  no dia 101. O valor mais alto das temperaturas máximas foi de  $27,6^{\circ}\text{C}$  no dia 9. Para a Fermentação 7 o valor mais baixo das temperaturas mínimas foi  $-0,7^{\circ}\text{C}$  no dia 93 de fermentação. O valor mais alto das temperaturas máximas foi de  $27,6^{\circ}\text{C}$  no dia 2. Na Fermentação 10 o valor mais baixo das temperaturas mínimas foi de  $-0,7^{\circ}\text{C}$ . Sendo que o mais alto das temperaturas máximas foi de  $25,2^{\circ}\text{C}$  no primeiro dia (dia 0).

## 5. Análises físico-químicas no destilado

De acordo com o Decreto-Lei 238/2000 de 26 de Setembro os destilados de medronho para poderem ser consumidos têm que cumprir determinadas especificações no que diz respeito a algumas características químicas indicadas na Tabela IV.

Realizaram-se duas destilações para cada fermentado. A análise dos voláteis das aguardentes em estudo foi realizada imediatamente após as destilações, deste modo foi rapidamente observado que vários compostos estavam claramente alterados pelo contacto com o oxigénio e pelas variações de temperatura, razão pela qual se optou por colocar no frigorífico a massa do segundo fermentado de amostra do fermentador F7, enquanto aguardava que se fizesse a primeira destilação, o que não tinha sido feito com a primeira Fermentação (F5). Para reduzir os efeitos de espera, foi decidido fazer as duas destilações do terceiro fermentador em análise

(F10) na destilaria e não no laboratório (a cerca de 100 km da destilaria). Os resultados obtidos dos vários parâmetros analisados nos destilados, resultantes das Fermentações 5, 7 e 10, estão registados na Tabela XX.

**Tabela XX - Características da aguardente resultante da Fermentação 5 (F5A e F5B), da Fermentação 7 (F7A e F7B) e da Fermentação 10 (F10A e F10B).**

Determinações	Método	Unidades	Especificações	Resultados					
				F5A	F5B	F7A	F7B	F10A	F10B
Teor alcoólico	NP 2143	% vol	≥ 42	52,7 ± 0,1	49,1 ± 0,1	46,0 ± 0,1	46,8 ± 0,1	45,0 ± 0,1	51,5 ± 0,1
Acidez total (ácido acético)	NP 2139	g / hl álcool puro	≤ 200	101,6 ± 0,2	108,4 ± 0,2	193,0 ± 0,2	185,1 ± 0,2	135,3 ± 0,2	137,5 ± 0,2
Substâncias voláteis** <sup>+</sup>		g / hl álcool puro	≥ 200	531,4 ± 53,1	619,5 ± 62,0	747,0 ± 74,7	547,7 ± 54,8	580,1 ± 58,0	428,3 ± 42,8
Etanal <sup>+</sup>	NP 3263	g / hl álcool puro	≥ 5 ≤ 40	42,2 ± 4,2	60,6 ± 6,1	80,0 ± 8,0	52,9 ± 5,3	43,0 ± 4,3	29,3 ± 2,9
Acetato de Etilo <sup>+</sup>	NP 3263	g / hl álcool puro	≤ 300	340,3 ± 34,0	610,5 ± 61,1	414,6 ± 41,5	286,1 ± 28,6	349,3 ± 34,9	255,4 ± 25,5
Metanol <sup>+</sup>	NP 3263	g / hl álcool puro	≥ 500 ≤ 1000	826,8 ± 82,7	861,1 ± 86,1	895,7 ± 89,6	853,1 ± 85,3	785,6 ± 78,6	763,9 ± 76,4
2-Butanol <sup>+</sup>	NP 3263	g / hl álcool puro	< 2	-	-	-	-	-	-
1-propanol <sup>+</sup>	NP 3263	g / hl álcool puro	≥ 10 ≤ 40	12,9 ± 1,3	15,9 ± 1,6	20,4 ± 2,0	18,9 ± 1,9	14,5 ± 1,5	13,2 ± 1,3
Isobutanol <sup>+</sup>	NP 3263	g / hl álcool puro	≥ 30 ≤ 70	41,6 ± 4,2	58,1 ± 5,8	77,0 ± 7,7	65,3 ± 6,5	53,4 ± 5,3	38,5 ± 3,9
Isopentanois <sup>+</sup>	NP 3263	g / hl álcool puro	≥ 80 ≤ 185	94,4 ± 9,4	124,6 ± 12,5	141,6 ± 14,2	124,6 ± 12,5	119,9 ± 12,0	93,3 ± 9,3
Total de álcoois superiores <sup>+</sup>		g / hl álcool puro	≥ 130 ≤ 300	208,8 ± 20,9	139,0 ± 13,9	238,9 ± 23,9	208,8 ± 20,9	187,8 ± 18,8	144,9 ± 14,5
Lactato de Etilo <sup>+</sup>		g / hl álcool puro	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isobutanol/ (1—propanol) <sup>+</sup>		g / hl álcool puro	≥ 1,5 ≤ 4,0	3,2 ± 0,3	3,7 ± 0,4	3,8 ± 0,4	3,5 ± 0,4	3,7 ± 0,4	3,1 ± 0,3
Cobre	NP 2441	mg/l de bebida	≤ 15	7,9 ± 0,02	3,9 ± 0,02	4,4 ± 0,02	4,6 ± 0,02	3,2 ± 0,10	2,1 ± 0,10

\* De acordo com o Decreto-Lei 238/2000 de 26 de Setembro para a Aguardente de medronho.

\*\* Não incluem os álcoois etílico e metílico, de acordo com o Regulamento (CE) n.º110/2008, do Conselho de 15 de Janeiro.

<sup>+</sup> As análises de cromatografia gasosa para determinação de voláteis podem apresentar um erro de 10 % inerente á técnica usada.

Deve realçar-se uma duplicação no teor de acetato de etilo do 2º destilado do fermentador F5 (F5B) comparativamente com o teor deste composto na 1ª destilação (F5A). A refrigeração imediata da massa F7B conduziu a uma redução de compostos voláteis.

Por outro lado, quando se retira da zona mais interior do fermentador também apresenta melhores características como já tinha sido observado nos trabalhos efectuados no âmbito do Projecto PAMAF 4057 (Galego, 2006).

A aguardente obtida através da destilação da amostra F10A apresentou um valor de 349,3±34 g/hl álcool puro, para o acetato de etilo, este facto pode ser explicado pela origem da massa utilizada nesta destilação ser proveniente da parte superior do fermentador. O contacto da massa fermentada com o oxigénio (devido às sucessivas colheitas de amostras) pode potenciar o

aparecimento deste composto. Apesar disso, verifica-se uma melhoria significativa nos restantes parâmetros analisados.

O destilado F10B está conforme o Decreto-Lei 238/2000 de 26 de Setembro, pois cumpre com todas as especificações. A destilação F10B é das que apresentou os melhores resultados, pelo facto de a amostra ter sido retirada directamente da parte inferior do fermentador para o destilador.

## 6. Discussão

As fermentações dos frutos de medronheiro (*Arbutus unedo* L.) foram estudadas em três processos independentes (Fermentação 5, Fermentação 7 e Fermentação 10 designadas por F5, F7 e F10, respectivamente).

As leveduras foram os microrganismos responsáveis pela fermentação dos açúcares presentes nos frutos. A predominância deste tipo de microbiota foi, certamente, favorecida pelas condições iniciais do mosto no que diz respeito ao pH (3,35 a 3,62) e à concentração de açúcares (4,5 a 13 °Brix).

A identificação dos 164 isolados de leveduras recolhidas ao longo dos três processos fermentativos permitiu verificar que as espécies encontradas em cada uma das três fermentações são muito semelhantes. Foram identificadas 15 espécies (*Aureobasidium pullulans*, *Candida apicola*, *Candida zemplinina*, *Cryptococcus tephrensensis*, *Dothichiza pithyophila*, *Dioszegia zsoltii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia aff. fructicola*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula nothofagi*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*) e em relação a três grupos de isolados apenas se conseguiu chegar ao género (*Cryptococcus* sp., *Metschnikowia* sp. e *Sporidiobolus* sp.). Dos grupos (espécies e géneros) encontrados, verificou-se que 6 pertenciam ao Filo Basidiomycota e 12 ao Filo Ascomycota.

As leveduras pertencentes ao Filo Basidiomycota estão normalmente associadas à microbiota existente na superfície das plantas, solos e meios aquáticos, apresentando colónias com colorações rosa, salmão, laranja ou brancas (Fell *et al.*, 2001; Renker *et al.*, 2004; Inácio *et al.*, 2005). Das leveduras isoladas das três fermentações 7,1 % encontram-se incluídas neste Filo, estando associadas às fases iniciais da fermentação correspondendo às espécies, *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus tephrensensis*, *Dioszegia zsoltii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula nothofagi* e *Sporidiobolus* sp.. Estas leveduras foram sendo substituídas por espécies fermentativas nas fases de fermentação mais avançadas

Durante as fases iniciais da fermentação também foi possível encontrar algumas espécies pertencentes ao Filo Ascomycota, incluídas no género *Metschnikowia* (*M. fructicola* e *Metschnikowia* sp.) e *Hanseniaspora* (*H. uvarum*). As espécies do género *Metschnikowia* são

caracterizadas pelas suas propriedades oxidativas enquanto que as do género *Hanseniaspora* pela sua fraca fermentação. Estes géneros estão referidos como sendo os mais comuns associados normalmente às fases iniciais de fermentação de maçã e uva (Sipiczki *et al.*, 2001; Valles *et al.*, 2007; Sangorrin *et al.*, 2007; Ocón *et al.*, 2010). O género *Metschnikowia* está representado nas fermentações de medronho por 12,8 % e o género *Hanseniaspora* por 13,4 % do total de espécies isoladas. As leveduras apiculadas *Hanseniaspora uvarum* foram reportadas como sendo comuns na microbiota epífita das uvas assim como nas fases iniciais das fermentações de vinho (Sabate *et al.*, 2002; Sangorrín *et al.*, 2007; Ocón *et al.*, 2010) e têm sido associadas a aspectos de deterioração, através da produção de acetatos (Romano *et al.*, 2003).

Na Fermentação 7 foi possível isolar a espécie *Torulaspora delbrueckii* (0,6 % das espécies totais isoladas) e algumas espécies de *Torulaspora* possuem aplicações biotecnológicas na produção de pão e vinhos (Oshima *et al.*, 1987; Oda *et al.*, 1997). A utilização desta espécie na fermentação de vinhos está associada à produção de aromas em vinhos brancos, capaz de um enriquecimento em termos organolépticos, esta levedura apresenta uma fraca tolerância ao etanol cessando a sua função antes da fase intermédia da fermentação (König *et al.*, 2009). Esta espécie foi também identificada em estudos de fermentação de azeitona (Romo-Sanchez *et al.*, 2010).

O isolamento de *Candida apicola* na Fermentação 10, correspondeu a 0,6 % do total de isolados. Algumas leveduras do género *Candida* estão associadas a processos fermentativos, tendo sido isoladas da superfície de frutos (uvas) e a sua moderada tolerância ao etanol permite que se mantenham até à fase intermédia da fermentação. Isto acontece quando o processo fermentativo é realizado a temperaturas que se situem entre os 15 e 20 °C. A sua presença está relacionada com a produção de flavours desejáveis nos vinhos (Querol e Fleet, 2006).

Outras espécies oxidativas como *Aureobasidium pullulans* e *Dothichiza pithyophila* também foram encontradas nos primeiros dias das fermentações correspondendo a 5,3 % dos isolados. *A. pullulans* não foi isolada na Fermentação 7 enquanto que *D. pithyophila* não foi isolada nas outras duas fermentações (F5 e F10). Ambas pertencem à família *Dothideaceae* e estão associadas a plantas. *A. pullulans* trata-se de uma levedura com enorme potencial biotecnológico, que apresenta uma coloração preta, pode ser encontrada em ambientes com bastante humidade assim como habitats pouco ricos em água (sendo extremamente adaptativa a ambientes que oferecem factores de stress para as células) e na superfície de folhas e de frutos

(Schoch *et al.*, 2006; Zalar *et al.*, 2008). Diversos trabalhos têm reportado *A. pullulans* como uma levedura presente no ambiente vinícola, tendo sido isolada da superfície de uvas assim como do mosto do vinho nas fases iniciais de fermentação (Sabate *et al.*, 2002; Fleet, 2003; Renouf *et al.*, 2005)

*Lachancea thermotolerans* (6,4 %) e *Candida zemplinina* (2,3 %) foram duas das leveduras, comuns nas três fermentações que apareceram na fase intermédia. Em 2003 Cletus P. Kurtzman sugeriu a alteração do nome da espécie *Kluyveromyces thermotolerans* para *L. thermotolerans* com base na classificação através da análise da sequência de multigenes (Kurtzman, 2003). Esta espécie foi isolada previamente em alimentos (Senses-Ergul *et al.*, 2006) frutos, plantas e geleias de frutos (ameixa), (Kurtzman e Fell, 1998) bem como em fermentações vínicas (Vilela-Moura *et al.*, 2008). *Candida zemplinina* é mais uma das espécies isoladas que se encontra relacionada com a vinificação, presente nas uvas e no vinho durante a sua fermentação (mosto) (Baleiras-Couto *et al.*, 2005; Csoma e Sipiczki, 2008) mas também foi relatada a sua presença durante a fermentação das sementes de cacau (*Theobroma cacao*) (Nielsen *et al.*, 2007). *C. zemplinina* trata-se de uma levedura com propriedades osmotolerantes bem como capacidade de crescer a baixas temperaturas (Sipiczki, 2003), é uma espécie que se revela um pouco controversa quanto à sua presença e a forma como pode afectar a qualidade de um fermentado ou contribuir para o mesmo, os diferentes isolados obtidos em laboratório possibilitaram observar a produção de ácido acético, glicerol e ácido succínico associado a estas leveduras, a sua inibição ocorre quando as quantidades de etanol aumentam (Sipiczki, 2003; Csoma e Sipiczki, 2008).

Uma das espécies isolada nas três fermentações que prolongou a sua presença desde a fase inicial até ao fim da fase intermédia foi a espécie *Issatchenkia orientalis* representando 2,3 % dos isolados. Esta espécie tem sido associada à vinificação (Ocón *et al.*, 2010; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004). A sua utilização na produção de vinhos têm vindo a ser estudada devido à sua capacidade de degradar o ácido málico e à sua tolerância ao etanol (Seo *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). A sua presença durante a fermentação alcoólica sugere uma contribuição significativa no processo fermentativo a nível da qualidade do produto final.

Nos três processos fermentativos (F5, F7 e F10) a espécie *Saccharomyces cerevisiae* proliferou a partir do início da fase intermédia de fermentação tendo-se mantido até ao fim da fase final dos processos, representando 30,2 % dos isolados. Trata-se de uma levedura com



elevada tolerância ao etanol, presente num meio com elevada concentração de açúcar e pouco oxigénio. Estes factores permitiram que *S. cerevisiae* adquirisse um papel de grande importância no processo fermentativo, tornando-se uma das espécies predominantes assim como a responsável pelo processo. A sua predominância tem sido referida em numerosos processos fermentativos de frutos ou mostos ricos em açúcar (maçã, cana-de-açúcar, agave, uva) (Lachance, 1995; Fährsman e Ganou-Parfait, 1998; Sabate *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005; Combina, 2005; Coton *et al.*, 2006; Valles *et al.*, 2007; Sangorrín *et al.*, 2007; Nova *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2009).

Em geral, detectou-se, em paralelo com *S. cerevisiae*, uma espécie com capacidade de formação de biofilmes, *Pichia membranaefaciens* (14,5 %). O aparecimento desta levedura está associado a fermentações longas de agave (Lachance, 1995). É também associada à produção de acetaldeídos, acetato de etilo, acetato isoamílico, em vinhos, possuindo uma boa tolerância ao etanol mas sensível o dióxido de enxofre livre (Rankine, 1966).

Durante os processos foi possível verificar que nos três fermentadores a microbiota total possuiu valores idênticos aos da contagem de leveduras. Assim, podemos depreender que a microbiota geral era composta na sua maioria por leveduras.

No Fermentador 7 e no Fermentador 10 verificou-se um ligeiro decréscimo na parte final no crescimento de leveduras em relação à microbiota aeróbia total. Apesar de ser pouco significativa, a diferença pode ser explicada pelo aparecimento de outros microrganismos que estariam a desenvolver-se neste período para além das leveduras. Por vezes nesta fase final podem começar a desenvolverem-se bactérias produtoras de ácido acético. Este factor revela-se como um indicador de contaminação. Será de prever que a recolha das amostras poderá ter sido um factor que despoletou esta contaminação, devido à entrada de oxigénio no sistema de fermentação (König *et al.*, 2009).

A fermentação do medronho é um processo complexo a nível da microbiota, visto que envolve ao longo do tempo uma sequência de diversas espécies de leveduras, contribuindo assim para numerosas reacções microbianas. A sucessão de diferentes espécies de leveduras foi previamente constatada por outros autores em fermentações naturais, no mosto de uvas com vista à obtenção de vinho (Jemec *et al.*, 2001), no mosto da cana-de-açúcar com vista à produção de

destilados (cachaça) (Morais *et al.*, 1997; Pataro *et al.*, 1998; Schwan *et al.*, 2001; Nova *et al.*, 2009) e no mosto da agave com o propósito de obter tequila (Lachance, 1995).

Durante o estudo efectuado as elevadas concentrações de açúcares, as alterações na acidez, a produção de etanol bem como de outras substâncias, podem ter actuado em conjunto, de forma a seleccionar leveduras resistentes a estes factores de stress, que foram capazes de levar a cabo o processo fermentativo, provocando também o desaparecimento de outras espécies mais sensíveis a estas condições de stress. A produção de um fermentado com base na sua microbiota epifítica dificulta a obtenção de produtos homogéneos quanto às suas características, devido a vários factores que podem influenciar a proliferação de uma ou outra espécie. É de referir também o risco que apresenta uma fermentação deste tipo a nível económico.

A presença das leveduras isoladas numa fermentação possibilita formular explicações para o aparecimento de determinados compostos voláteis ao longo do processo, assim como os compostos voláteis presentes nos destilados. Estudos futuros poderiam contribuir para seleccionar uma mistura de espécies, provenientes do processo fermentativo do medronho, com o objectivo de produzir e obter um perfil organoléptico e aromático típico da região e evitar a presença de aromas, sabores e compostos, não permitidos por lei, no produto final. Desta forma, será possível obter um produto com maior qualidade bem como minimizar o risco a nível económico.

Ao longo da fermentação a análise do teor de resíduo seco solúvel, revelou-se com resultados semelhantes nos três processos estudados. Verifica-se para as três fermentações um aumento inicial que pode ser explicado pelo rebentamento da película que envolve a polpa do fruto (rica em açúcares) (Özcan e Haciseferoğullari, 2006) e a sua dissolução no líquido existente no fermentador. Outro factor poderá ter sido a hidrólise enzimática dos carboidratos complexos presentes nas estruturas celulares dos frutos, em açúcares mais simples (Sumerly e Alvarez, 1997). No final das fermentações verificou-se que não existiu um consumo total dos açúcares solúveis. Estas situações podem ser explicadas pela incapacidade das leveduras em degradar alguns açúcares ou pela inibição causada pelo etanol produzido durante a fermentação (Querol e Fleet, 2006).

A diminuição dos açúcares nas fermentações decorreu como observada em trabalhos anteriores (Galego, 1995; Cavaco *et al.*, 2007), pois através do metabolismo das leveduras ocorre a utilização dos açúcares como fonte de carbono (Najafpour e Kang, 2002; Querol e Fleet, 2006; König *et al.*, 2009). Em nenhuma das fermentações foi detectada a presença de sacarose. Durante a fermentação verifica-se uma preferência pelo consumo de glucose, sendo a frutose o último açúcar a ser utilizado.

A acidez da massa fermentada nos três ensaios experimentais, aumentou ao longo do tempo, tendo apresentado algumas oscilações, que poderão ser explicadas pelo facto da massa não ser homogénea possuindo sementes e grânulos sólidos próprios do fruto.

Este trabalho possibilitou também analisar a progressão da formação de compostos voláteis (acetato de etilo, etanol e isopentanois) durante a fermentação do medronho. No caso das fermentações estudadas regularmente, estes compostos apenas são analisados no produto final, ou seja no destilado, não existindo ao longo do processo uma quantificação destes compostos, esta foi uma primeira tentativa de o fazer, embora com um erro superior a 10 % há uma indicação da evolução do teor de álcool e da ligação que isso vai ter com a inibição de actividade de algumas estirpes de leveduras (*Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus tephrensis*, *Dioszegia zsoitii*, *Dothichiza pithyophila*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula nothofagi* e *Sporidiobolus* sp). Os compostos estudados apresentam um perfil semelhante nas três fermentações, verificando-se, que embora as fermentações tenham decorrido durante mais de três meses, no final do primeiro mês (meados de Novembro) os compostos voláteis estavam a atingir os teores próximos dos máximos encontrados no final.

As características dos destilados finais analisadas estão conformes com o regulamento o Regulamento (CE) n.º110/2008, do Conselho de 15 de Janeiro, contudo apresentam algumas não conformidades relativamente ao Decreto-Lei 283/2000 de 26 de Setembro, como seja o caso do etanal e do acetato de etilo das amostras F5B e F7A. Na F7A apenas o etanal não está conforme com o referido regulamento. O etanal é um composto que pode ter origem nas partes verdes dos frutos ou pode ser produzido devido a fenómenos oxidativos (Versini *et al.*, 1995; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Atendendo ao cuidado com que se prepararam as fermentações e aos resultados obtidos na destilação industrial, só os fenómenos oxidativos justificam este aumento.

Previamente à destilação, a massa fermentada não deve ser exposta ao ar, em recipientes não cobertos enquanto aguardam a colocação no alambique, para evitar os fenómenos oxidativos que originam principalmente o excesso de etanal e aumento de acidez. Estas tarefas devem ser realizadas a temperaturas baixas e deve-se evitar aberturas desnecessárias dos tanques de fermentação.

Os resultados apresentados neste estudo constituem uma contribuição para compreender melhor a base do processo fermentativo do medronho, com o objectivo de produzir aguardente de medronho. Esta bebida tradicional, produzida essencialmente nas áreas serranas do sul de Portugal, revela-se como um produto único com elevada importância tanto a nível económico como social, como tal, justifica-se cada vez mais o crescente interesse em preservar esta bebida, assim como, em melhorar e garantir a sua qualidade. Nos últimos anos, produtores, investigadores, técnicos e associações locais tem apostado em trabalhar em conjunto de forma a contribuir cada vez mais para o conhecimento sobre este produto e do seu processo produtivo. Para melhorar a qualidade desta bebida espirituosa, tem sido especialmente dedicada atenção à qualidade da matéria-prima e à fase fermentativa do processo. O presente estudo realça a importância das leveduras inerentes ao processo e da complexa microbiota associada à fermentação dos frutos. Contudo, os estudos deveriam prosseguir de forma a compreender melhor a relação da população de leveduras e da sua actividade fisiológica com a qualidade do produto final.

## 7. Considerações finais

No presente trabalho foram estudados três processos fermentativos diferentes utilizando frutos provenientes da Serra do Caldeirão, do Azinhalinho (S.B. Messines, Concelho de Silves, Distrito de Faro.). Foi efectuada uma caracterização físico-química e microbiológica das fermentações e uma identificação das leveduras envolvidas nos processos.

A fermentação de frutos de *Arbutus unedo* é uma prática comum no sul de Portugal e noutras regiões do mediterrâneo para produzir uma bebida destilada típica designada por aguardente de medronho. Os resultados obtidos permitiram constatar o envolvimento de diversas espécies de leveduras, que se foram sucedendo ao longo do período de tempo estudado, culminando com a predominância de *S. cerevisiae* nas fases finais.

A natureza da população microbiana é um parâmetro determinante na qualidade dos alimentos fermentados e das bebidas destiladas, uma vez que espécies adaptadas a determinados substratos e climas dão origem a produtos com características específicas. Nesta perspectiva pretende-se futuramente preparar uma cultura iniciadora composta por estirpes isoladas no presente trabalho, que possuam características que contribuam para a definição do perfil organoléptico do produto final, garantindo assim a uniformidade das características de diferentes lotes e diferentes produções evitando perdas económicas.

Assim propõem-se os seguintes trabalhos futuros:

- Estudar diferentes propriedades tecnológicas dos principais grupos de microrganismos isolados (tolerância de baixo pH, tolerância e formação de etanol).
- Estudar a produção de metabolitos dos principais grupos de microrganismos isolados.
- Estudar a actividade "killer" dos isolados obtidos.
- Testar o efeito de diferentes misturas de leveduras com objectivo de preparar uma cultura iniciadora ("starter").
- Acompanhar a formação de um maior número de compostos voláteis;

- Colaborar com outros produtores de outras zonas do Algarve, para comparar se as espécies de leveduras nas fermentações naturais são idênticas, de forma a mapear a variedade da microbiota na região.

Uma produção de aguardente de medronho com a utilização de culturas iniciadoras (*starter*), seria uma estratégia. O facto de ser mais fácil controlar a fermentação, sem que exista o risco de proliferarem outras leveduras que podem colocar em risco o processo fermentativo torna-se uma vantagem. Como foi verificado, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é uma das espécies que resiste até ao fim da fermentação. O estudo da associação desta levedura com outras espécies bem como a sua inoculação no processo inicial, seria uma forma de aumentar a rentabilidade e qualidade do produto final e evitar o consumo desnecessário de açúcares por outras leveduras que entram em competição no início do processo fermentativo. Desta forma poder-se-ia prevenir a formação de alguns metabolitos indesejáveis.

A produção de aguardente de medronho, realizada por destilação do fermentado do fruto de *Arbutus unedo*, aplicando o controlo adequado permite obter um produto de qualidade. A obtenção de produtos de elevada qualidade contribuirão para a valorização da aguardente de medronho enquanto produto regional tradicional e consequentemente constituem uma mais valia para a região e para os produtores.

## 8. Referências Bibliográficas

Alarcao-E-Silva, M., Leitao, A.E.B., Azinheira, H.G., Leitao, M.C.A. 2001. The Arbutus berry: Studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 27-35.

Alberti, G., Inglima, I., Arriga, N., Piermatteo, D., Pecchiari, M., Zaldei, A., Papale, D., Peressotti, A., Valentini, R., Cotrufo, M.F., Miglietta, F. 2007. Cambiamenti nel regime pluviometrico in ecosistemi mediterranei: il progetto MIND. *Forest@4* (4), 460-468. [online] URL: <http://www.sisef.it/forest@/>.

Alpendurada, F. M. 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 889, 3-14.

Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M., Parish, M.E. 2002. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1955-1961.

Arroyo-Lopez, F.N., Duran-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernandez, A. 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23, 791-796.

Baleiras-Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 102, 49-56.

Blast.ncbi.nlm.nih.gov/. acedido a Maio - Agosto 2009 e Maio - Junho 2010.

Bortoluzzi, J. H., Silva, C. A., Madureira, L. A. S., Carasek, E., Soldi, V. 2006. Aplicação da técnica de spme-gc-ms na determinação de produtos de degradação térmica do poli(metil metacrilato). 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 8533-8543.

Boulton, C., Quain, D. 2001. *Brewing yeast and fermentation*, Blackwell Science Ltd, London.

Catarino H., 1999. A chegada dos árabes à Península Ibérica: A invasão de Tarique em 711 e a ocupação do território. In: *O Algarve da Antiguidade aos Nossos Dias*, Marques M. G. M., Lisboa, Colibri, 61-67.

Cantagrel, R.; Lurton, L.; Vidal, J.P., Galy, B., 1990. La distillation charentaise pour l'obtention des eaux-de-vie de cognac. In: *Les Eaux-de-vie Traditionnelles D'origine Viticole*, A. Bertrand, Lavoisier – TEC & Doc, Paris 1991, 60-69.

Cavaco, T., Longuinho, C., Quintas, C., Saraiva de Carvalho, I. 2007. Chemical and microbial changes the natural fermentation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) Fruits. *Journal of Food Biochemistry* 31, 715-725.

Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vigo, F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21, 149-155.

Combina, M., Elia, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 99, 237-247.

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D. 2006. Yeast ecology in french cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 130-135.

Csoma, H., Sipiczki, M. 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 8, 328-336

de Llanos-Frutos, R., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. 2004. Identification of species of the genus *Candida* by use of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Antoine van Leeuwenhoek* 85, 175-185.

Deacon, J. W. 2006. *Fungal biology*. Blackwell Publishing, England

Decreto-Lei 238/2000 de 26 de Setembro. Diário da República I série A, Imprensa Nacional 223, 5145-5147.

Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C., Sabatelli, M.P. 2007. Spontaneous and inoculated yeast population dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology* 115, 281-289.

Dórea, H.S., Gaujac, A., Navickiene, S. 2008. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. *Scientia Plena* 4, 077201.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337.

Esteve-Zarzoso, B., Zorman, T., Belloch, C., Querol, A. 2003. Molecular characterization of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Systematic Applied Microbiology* 26, 404-411.

Fahrasmane, L., Ganou-Parfait, B. 1998. Microbial flora of rum fermentation media. *Journal of Applied Microbiology* 84, 921-928.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, Á., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain



sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 1351-1371.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio J.P. 2001. Basidiomycetous yeasts. The mycota VII. Systematics and Evolution. Part B. (McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. and Lemke, P. A., eds.).Springer-Verlag, Berlin.

Fleet, G.H. 1993. Wine Microbiology and biotechnology, Harwood Academic Publishers, London.

Fleet, G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology 86, 11-22.

Galego, L.R. 1995. “Optimização de parâmetros para a aguardente de medronho”. Dissertação de Mestrado - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Galego, L.R. 2006. Traditional Algarvian distillates and liqueurs historic scientific aspects. Available at: <http://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/197/1/Galego.pdf> (accessed on 31 March 2010).

Galego, L.R. & Almeida, V.R. 2007. Aguardentes de frutos e licores do Algarve. Lisboa, Colibri.

Gascon, J.A.G. 1993. Subsídios para a monografia de Monchique (1940). Reeditado por Algarve em Foco Editora, Faro.

Gilman, E.F., Watson, D.G. 1993. *Arbutus unedo* Strawberry tree. Forest Service, Department of Agriculture Florida. Fact Sheet ST-85.

Globalgarve, 2003. Vilas e aldeias do Algarve rural. Globalgarve Cooperação e Desenvolvimento, SA.

Gomes, F.C.O., Silva, C.L.C, Marini, M.M., Oliveira, E.S., Rosa, C.A. 2009. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil Journal of Applied Microbiology 103, 2438-2447.

Gómez, S.M. 1998 . Rum aroma descriptive analysis. Submitted to the Graduate School Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science in The Department of Food Science, U.S.

Google Earth - [www.google.pt/earth/](http://www.google.pt/earth/) acedido e instalado a 28/4/2009, versão 5.

Guillamón, J. M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Archives of Microbiology 169, 387-392.

INDE, 1993. Documentos de trabalho produzido para a Associação In Loco, Lisboa.

Inácio, J., Portugal, L., Spencer-Martins, I., Fonseca, A. 2005. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. FEMS Yeast Research 5, 1167-1183.

Jemec, K.P., Cadez, N., Zagorc, T., Bublic, V., Zupec, A., Raspor, P. 2001. Yeast Population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. Food Microbiology 18, 247-259.

Kim, D., Hong, Y., Park, H. 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. Biotechnology Letters 30, 1633-1638.

König, H., Uden, G., Fröhlich, J. 2009. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag Berlin, Germany.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek 73, 331-371.

Kurtzman, C.P., Fell 1998. The yeasts: A taxonomic study. Elsevier Science, 4<sup>th</sup> edition. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.

Kurtzman, C.P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. FEMS Yeast research 4, 233-245.

Labanca, R.A., Glória, M.B.A., Gouveia, V.J.P., Afonso, R.J.C.F. 2006. Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no estado de minas gerais. Química Nova, volume 29, 1110-1113.

Lachance, M.-A. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. Kluwer Academic Publishers. Antonie van Leeuwenhoek 68, 151-160.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. International Journal of Food Microbiology 86, 23-50.

Louro, E. 1996. Livro de Alportel monografia. Reedição (1929). Porto, Portugal .

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. International Journal of Food Microbiology 114, 234-242.

Mereti, M., Grigoriadou, K., Nanos, G.D. 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. Scientia Horticulturae, 93, 143-148.

Miller, J.M. 2005. Chromatography: Concepts and contrasts. John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, U.S.A. 2<sup>nd</sup> edition.

Morais, P.B., Rosa, C.A., Linardi, V.R., Pataro, C., Maia, A.B.R.A. 1997. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentation for Brazilian sugar-cane "aguardente" production. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13, 241-243.

Najafpour, G.D., Kang, L.J. 2002. Evaluation and Isolation of ethanol producer strain smp-6. The proceedings of RSCE and 16<sup>th</sup> SOMChe, 28-30 Oct. Malaysia.

Navarre, C. 2008. Enologia: Técnicas de produção do vinho. 2<sup>a</sup> Edição, Publicações Europa América, Mem Martins, Portugal.

Neves, H.J.C, Freitas, A.M.C. 1996. Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução. Fravi - Indústrias Gráficas, Lda, 1<sup>a</sup> edição, Póvoa de Santa Iria, Portugal.

Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S., Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analyzed using culture-dependent and culture-independent methods. International Journal of Food Microbiology 114, 168-186.

Nova, M.X.V., Schuler, R.P.P., Brasileiro, B., Moraes, M.A. 2009. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. Food Microbiology 26, 460-466.

Norma Portuguesa NP 785, 1985. Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação do resíduo seco solúvel. Processo corrente.

Norma Portuguesa NP 2139, 1987. Bebidas alcoólicas e espirituosas: Determinação do teor de acidez total.

Norma Portuguesa NP 2143, 1987. Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor alcoólico em volume (grau alcoólico volumétrico).

Norma Portuguesa NP 2441, 1998. Determinação do teor de cobre. Método colorimétrico. Processo corrente.

Norma Portuguesa NP 3263, 1990. Bebidas alcoólicas e espirituosas: Determinação dos teores de etanol, acetato de etilo, metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-propeno-1-ol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol.

Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., López, R., Santamaría, P. 2010. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. Food Microbiology, In Press, Corrected Proof, Available Online 3 July 2010.

Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., Fukunaga, M. 1997. Reexamination of yeast strains classified as *Torulaspora delbrueckii* (Lindner). International Journal of Systematic Bacteriology 47, 1102-1106.

Oliveira, A. 1987. Monografia de São Bartolomeu de Messines (1909). Algarve em Foco Editora, Reedição, Faro.

Oliveira, A. 1998. Monografia do Concelho de Loulé (1905). Algarve em Foco Editora, Reedição, Faro.

Oliveira, E.S., Rosa, C.A., Morgano, M.A., Serra, G.E. 2005. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21, 1569-1576.

Oshima, Y. Sugaura, T., Horita, M., Sasaki, T. 1987. Industrial application of artificially Induced diploid strains of *Torulaspora delbrueckii*. Applied and Environmental Microbiology 57, 1512-1514.

Ouyang, G., Pawliszyn, J. 2008. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. Analytica Chimica Acta 627, 184-197.

Özcan, M. M., Hacıseferoğullari H. 2007. The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. Journal of Food Engineering 78, 1022-1028.

PAMAF nº 4057 - Investigação-Acção sobre aguardente de medronho (Relatório de Projecto de Investigação).

PAMAF nº 8005 - Estudo do envelhecimento da aguardente de medronho (1ª fase) (Projecto de Investigação).

Pataro, C., Santos, A., Correa, S.R., Morais, P.B., Linardi, V.R., Rosa, C.A. 1998. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in a cachaça destillery. Revista de Microbiologia 29, 69-73.

Pawliszyn, J. 1999. Applications of solid phase microextraction. Royal Society of Chemistry: Hertfordshire, UK.

Pereira, N.E., Cardoso, M.G., Azevedo, S.M., Morais, A.R., Fernandes, W., Aguiar, .M. 2003. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de minas gerais. Ciência e Agrotecnologia, Lavras 27, 1068-1075.

Queiroz, M.E.C., Lanças, F.M. 2005. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova 28, 880-886.

Querol, A., Fleet, G. 2006. The yeast handbook: Yeasts in food and beverages. Springer- Verlag Berlin, Germany.

Rankine, B.C. 1966. *Pichia membranaefaciens*, a yeast causing film formation and off-flavour in table wine. American Journal of Enology and Viticulture, 17, 82-86.

Regulamento (CEE) nº 1576/89, de 29 de Maio de 1989, Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 160, 0001-0017.

Regulamento CE nº 110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Janeiro de 2008 Jornal Oficial da Comunidade Europeia, L 39, 16-54.

Renker, C., Blanke, V., Börstler, B., Heinrichs, J., Buscot, F. 2004. Diversity of *Cryptococcus* and *Dioszegia* yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. FEMS Yeast Research 4, 597-603.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 316-327.

Ribeiro, J.S, Teófilo, R.F., Augusto, F., Salva, T.J.G., Thomaziello, R.A., Ferreira, M.M. 2007. Multiotimização do processo de extracção de voláteis de café utilizando spme-gc-fid e planeamento composto central. 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa-Pernambuco, Brazil.

Ribéreau-Gayon. 2006. Handbook of enology. John Wiley & Sons Ltd, London, UK.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, M. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology 86, 169-180.

Romo-Sánchez, S., Alves-Baffi, M., Arévalo-Villena, M., Ubeda-Iranzo, J., Briones-Pérez, A. 2010. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. Food Microbiology 27, 487-492.

Rouessac, F., Rouessac, A. 2000. Chemical Analysis: Modern instrumentation methods and techniques. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiological Research 157, 8.

Sangorrin, M.P., Lopes, C.A., Rivero, A., Caballero, A.C. 2007. Rapid identification and susceptibility to killer toxins of yeasts isolated from non-systemic mycoses. Revista Argentina Microbiologia 39, 230-236.

Sangorrin, M.P., Lopes, C.A., Giraudo, M.R., Caballero, A.C. 2007. Diversity and killer

behavior of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology* 119, 351–357.

Schwan, R., Mendonça, A., Silva Jr, J., Rodrigues, Valéria, Wheals, A. 2001. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 7.

Schoch, C.L., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W., Crous, P.W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98, 1041-1052.

Senses-Ergul, S., Ágoston, R., Belák, Á., and Deák, T. 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology* 108, 120-124.

Seo, S., Rhee, C., Park, H. 2007. Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. *The Journal of Microbiology* 45, 521-527.

Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., Antunovics, Z. 2001. Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 97-105.

Sipiczki, M. 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2079-2083.

Skoog, D.A.; West, D.M., Holler, F.J. 1992. Fundamentals of analytical chemistry. Saunders College Publishing. 6<sup>th</sup> edition. Florida, U.S.A..

Soufleros, E.; Bertrand, A., 1990. La production artisanale du «Tsipouro» a Naoussa (Grece). In: Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole, A. Bertrand, Lavoisier – TEC & Doc, Paris 1991, 19-27.

Soufleros, E.H., Mygdalia, S.A., Natskoulis, P. 2005. Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate "Koumaro" by aromatic and mineral composition. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 699-716.

Souza, M.D.C.A. 2006. Identificação, quantificação e comparação das substâncias químicas responsáveis pelos aromas da cachaça de alambique e do rum comercial tratados pelo processo de irradiação. Tese de Doutorado, São Paulo, Brasil.

Spencer, J.F.T., Spencer, A.L.R. 2001. Food microbiology protocols. Humana Press, Totowa New Jersey, USA, 2001.

Sumerly, R.H., Alvarez, H. 1997. Hidrolisados de amido no Brasil e sua produção. Botucatu; Centro de Raizes Tropicais, 49.

Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., Shinoda, T. 2002. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1826-30.

Valente, A.L.P., Augusto, F. 2000. Microextração por fase sólida. *Química Nova* 23, 523-530.

Valles, B.S., Bedriñana, R.P., Tascón, N.F., Simón, A.Q, Madrera, R.R. 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* 24, 25-31.

Vera-Guzmán, A.M., Guzmán-Geronimo, R.I., López, M.G. 2010. Major and minor compounds in a Mexican spirit, young mezcal coming from two *Agave* Species. *Czech Journal of Food Science* 28, 127-132.

Versini, G., Seeber, R., Serra, A.D., Sferlazzo, G., Carvalho, J.H.B., Reniero, F. 1995. Aroma compounds of *Arbutus* destillates. *Food Flavours: Generation, Analysis and Process Influence*, G Charalambours, London, Elsevier Science, 1779-1790.

Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Côrte-Real, M., 2008. Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Applied Microbiology Biotechnology* 80, 881-890.

Walker, G. M. 2000. *Yeast-physiology and biotechnology*. Chichester: John Willey and Sons. Sussex, UK.

White, T. J., Bruns T., Lee, S., Taylor, J. 1990. PCR Protocols. A guide to methods and applications. In amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. San Diego: Academic Press, 315-322.

Zalar, p., Gostincăr, C., Hoog, G.S., Uršič, V., Sudhadham, M., Gunde-Cimermar, N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* 61, 21-38.

# ANEXOS



## ANEXO I

Análises de variância para o comportamento do acetato de etilo nas três fermentações.

**Tabela I - Quadro de análise de variância (ANOVA).**

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média da soma de Quadrados	F
Tratamentos	$k-1$	$SS_H = \sum_{i=1}^k \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T^2}{N}$	$MS_H = \frac{SS_H}{k-1}$	$F = \frac{MS_H}{MS_E}$
Erro	$N-k$	$SS_E = SS_T - SS_H$	$MS_E = \frac{SS_E}{N-k}$	
Total	$N-1$	$SS_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$		

Formulação de hipóteses para o teste de  $F$

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$  - Não existem diferenças significativas entre os comportamentos

$H_1: \mu_i \neq \mu_j$  - Existem diferenças significativas entre os comportamentos

Aceita-se  $H_0$  se  $\begin{cases} F_{calc} < F_{(\alpha; k-1; N-k)} \\ <=> \\ p-value > \alpha \end{cases}$

Para o acetato de etilo obtivemos os seguintes valores em na Tabela II

**Tabela II - Valores em g de acetato de etilo/kg massa de fermentado.**

Fermentação 5	Fermentação 7	Fermentação 10
1,25	0,27	1,49
4,40	1,36	3,77
7,37	3,02	10,97
5,54	3,95	5,36
10,49	3,63	3,34
6,16	3,63	2,61

Efectuando a análise de variância obtivemos a tabela III.

**Tabela III - Quadro de análise de variância para o comportamento do acetato de etilo nas três fermentações**

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média da soma de Quadrados	F
Tratamentos	2	$SS_H=31,66$	$MS_H = 15,83$	$F = 2,06$
Erro	15	$SS_E=115,45$	$MS_E = 7.70$	
Total	17	$SS_T= 147,11$		

Sendo assim, aceita-se  $H_0$  pois  $\{2,06 < 3,68$

Podemos dizer então que as três fermentações não apresentam diferenças significativas na formação do acetato de etilo.

## ANEXO II

Análises de variância para o comportamento do etanol nas três fermentações.

**Tabela IV - Quadro de análise de variância (ANOVA).**

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média da soma de Quadrados	F
Tratamentos	$k-1$	$SS_H = \sum_{i=1}^k \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T^2}{N}$	$MS_H = \frac{SS_H}{k-1}$	$F = \frac{MS_H}{MS_E}$
Erro	$N-k$	$SS_E = SS_T - SS_H$	$MS_E = \frac{SS_E}{N-k}$	
Total	$N-1$	$SS_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$		

Formulação de hipóteses para o teste de  $F$

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$  - Não existem diferenças significativas entre os comportamentos

$H_1: \mu_i \neq \mu_j$  - Existem diferenças significativas entre os comportamentos

Aceita-se  $H_0$  se  $\begin{cases} F_{calc} < F_{(\alpha; k-1; N-k)} \\ <=> \\ p-value > \alpha \end{cases}$

Para o etanol obtivemos os seguintes valores em na Tabela V

**Tabela V - Valores em g de etanol/kg massa de fermentado.**

Fermentação 5	Fermentação 7	Fermentação 10
95,78	42,71	14,58
370,93	92,39	180,70
683,21	634,32	701,12
432,27	377,37	526,57
830,49	666,96	480,72
723,65	774,61	786,40

Efectuando a análise de variância obtivemos a tabela VI.

**Tabela VI - Quadro de análise de variância para o comportamento do etanol nas três fermentações**

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média da soma de Quadrados	F
Tratamentos	2	$SS_H=28320,83$	$MS_H = 14160,41$	$F = 0,16$
Erro	15	$SS_E=1302875,31$	$MS_E = 86858,35$	
Total	17	$SS_T= 1331196,13$		

Sendo assim, aceita-se  $H_0$  pois  $\{0,16 < 3,68$

Podemos dizer então que as três fermentações não apresentaram diferenças na formação de etanol ao longo das fermentações.

### ANEXO III

Análises de variância para o comportamento dos isopentanóis nas três fermentações.

**Tabela VII - Quadro de análise de variância (ANOVA).**

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média da soma de Quadrados	F
Tratamentos	$k-1$	$SS_H = \sum_{i=1}^k \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T^2}{N}$	$MS_H = \frac{SS_H}{k-1}$	$F = \frac{MS_H}{MS_E}$
Erro	$N-k$	$SS_E = SS_T - SS_H$	$MS_E = \frac{SS_E}{N-k}$	
Total	$N-1$	$SS_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$		

Formulação de hipóteses para o teste de  $F$

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$  - Não existem diferenças significativas entre os comportamentos

$H_1: \mu_i \neq \mu_j$  - Existem diferenças significativas entre os comportamentos

Aceita-se  $H_0$  se  $\begin{cases} F_{calc} < F_{(\alpha; k-1; N-k)} \\ <=> \\ p-value > \alpha \end{cases}$

Para os isopentanóis obtivemos os seguintes valores em na Tabela VIII

**Tabela VIII - Valores em g de isopentanóis/kg massa de fermentado.**

Fermentação 5	Fermentação 7	Fermentação 10
0,31	0,65	0,20
0,92	0,06	0,40
0,50	1,11	0,57
0,66	0,39	0,17
0,98	0,46	0,37
5,84	0,42	0,75

Efectuando a análise de variância obtivemos a tabela IX.

**Tabela IX - Quadro de análise de variância para o comportamento dos isopentanóis nas três fermentações**

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Média da soma de Quadrados	F
Tratamentos	2	$SS_H=4,63$	$MS_H = 2,31$	$F = 1,48$
Erro	15	$SS_E=23,44$	$MS_E = 1,56$	
Total	17	$SS_T= 28,07$		

Sendo assim, aceita-se  $H_0$  pois  $\{1,48 < 3,68$

Podemos dizer então que as três fermentações apresentam comportamentos semelhantes na formação dos isopentanóis.

## ANEXO IV

Poster apresentado no encontro MICROBIOTEC de 28 a 30 de Novembro de 2009 em Vilamoura, Portugal



# Characterization of the natural fermentation of Medronho (*Arbutus unedo* L.)

Santo, D.; Cavaco, T.; Quintas, C.; Galego, L.

Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve, Campus da Penha, Faro, Portugal  
a23235@ualg.pt; tcavaco@ualg.pt; cquintas@ualg.pt; lgalego@ualg.pt

## Introduction

"Aguardente de Medronho" is a traditional spirit produced in the South of Portugal, much appreciated due to its sensory characteristics. It is manufactured by fermenting the berries of the Mediterranean shrub *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). Historically this product has been a complement to farmers' income, and on account of that fact, over the last years efforts have been made to improve the quality of the production process and of the final product.

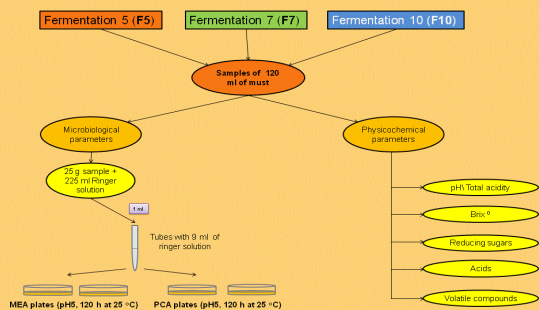
The present study investigated the fermentation process and its influence in the quality of the distillate. The evolution of the total viable counts and of the yeast populations during the fermentation process were controlled. The changes of pH, Brix, reducing sugars, acids, ethanol, ethyl acetate and isopentanol were also monitored. Fruits were harvested during the month of November, mixed with water in 500 l stainless steel vessels that were immediately closed and then allowed to ferment over a specific period of time. This process, took place at room temperature, during autumn and winter, relying on the natural microbiota initially present on the fruits and on the surrounding environment. The objective of this work was to study three independent semi-industrial fermentations carried out on a traditional way (F5, F7 and F10).



Figure 1 – Aspects of the *Arbutus unedo* L. tree, flowers and fruits

## Methodology

Samples were collected on a regular period of time and were analyzed according to the following diagram:



Sugars and acids were evaluated by High-performance liquid chromatography (HPLC). Volatile compounds (ethanol, ethyl acetate and isopentanol) were studied by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC) with a fiber of Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). The SPME fiber was exposed for fixed time (20 minutes) in the head-space of the vial at laboratory temperature (20 ± 2 °C) with magnetic stirring. The fiber was then withdrawn into the needle and transferred to the injector of the GC.

## Results

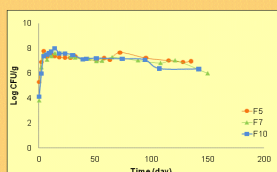


Figure 2- Yeast growth evolution on F5, F7 and F10.

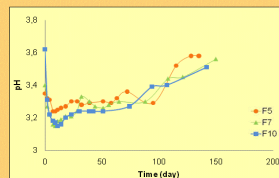


Figure 3- Evolution of the pH value on F5, F7 and F10.

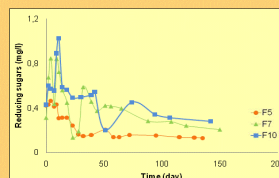


Figure 4- Evolution of the reducing sugars on F5, F7 and F10.

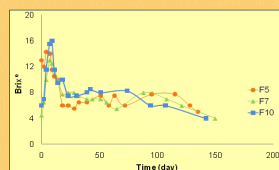


Figure 5- Evolution of Brix\* value on F5, F7 and F10.

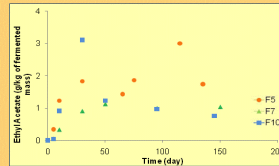


Figure 6- Ethyl acetate evolution on F5, F7 and F10.

Table I- Acetic acid and lactic acid levels on F5, F7 and F10

Fermentation 5 (g/ml)			Fermentation 7 (g/ml)			Fermentation 10 (g/ml)		
Day	Acetic Acid	Lactic Acid	Day	Acetic Acid	Lactic Acid	Day	Acetic Acid	Lactic Acid
0	0.543 ± 0.0123	ND	0	0.072 ± 0.0064	ND	0	0.635 ± 0.0087	ND
4	0.506 ± 0.0092	ND	4	0.190 ± 0.0121	ND	4	0.972 ± 0.15	ND
28	0.625 ± 0.0820	ND	9	0.014 ± 0.0002	ND	11	0.263 ± 0.066	ND
45	0.892 ± 0.1686	ND	32	0.079 ± 0.0010	ND	30	0.036 ± 0.0056	ND
72	-	-	51	0.560 ± 0.0891	ND	51	0.009 ± 0.0006	ND
115	-	-	110	0.007 ± 0.0008	ND	96	0.102 ± 0.0134	ND

Table II- Fructose (F), Glucose (G) and Saccharose (S) levels on F5, F7 and F10

Fermentation 5 (g/ml)				Fermentation 7 (g/ml)				Fermentation 10 (g/ml)			
Day	F	G	S	Day	F	G	S	Day	F	G	S
0	ND	0.067 ± 0.0119	0.149 ± 0.0071	0	ND	0.150 ± 0.0278	0.0019	0	ND	0.149 ± 0.0071	0.0021
4	1.419 ± 0.062 ± 0.0119	0.062 ± 0.0119	0.0073	4	0.387 ± 0.0093	0.0093	0.0002	4	0.473 ± 0.102 ± 0.0052	0.102 ± 0.0052	0.0145
28	0.085 ± 0.00123	ND	ND	9	0.082 ± 0.0123	ND	ND	11	0.482 ± 0.094 ± 0.0140	0.094 ± 0.0140	ND
45	0.0570 ± 0.0121	ND	ND	32	0.064 ± 0.0031	ND	ND	30	0.060 ± 0.061 ± 0.0052	0.061 ± 0.0052	ND
72	0.041 ± 0.0023	ND	ND	51	ND	ND	ND	51	0.05 ± 0.0022	0.0115 ± 0.0034	ND
115	0.0123 ± 0.0078	ND	ND	110	0.024 ± 0.0015	ND	ND	96	0.048 ± 0.0057	0.0057	ND

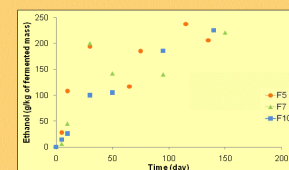


Figure 6- Ethanol evolution on F5, F7 and F10.

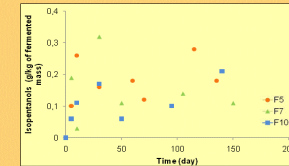


Figure 7- Isopentanol evolution on F5, F7 and F10.

Table III- Results of the analysis of the distillates from F5, F7 and F10

Analysis	Method	Units	Parameters*	F5	F7	F10
Alcoholic degree	NP 2143	% volume	≥ 42	50.8 ± 0.1	45.4 ± 0.1	49.3 ± 0.1
Total acidity (Acetic Acid)	NP 2139	g / hl pure alcohol	≤ 200	105.0 ± 0.2	189.1 ± 0.2	136.4 ± 0.2
Volatile compounds**		g / hl pure alcohol	≥ 200	575.5 ± 57.5	647.4 ± 64.7	504.2 ± 50.4
Ethanol	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 5 ± 40	51.4 ± 5.1	66.5 ± 6.7	36.2 ± 3.6
Ethyl Acetate	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 300	475.4 ± 47.5	350.4 ± 35.0	302.4 ± 30.2
Methanol	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 500 ± 1000	844.0 ± 84.4	874.4 ± 87.4	774.8 ± 77.5
2-Butanol	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 2	-	-	-
1-propanol	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 10 ± 40	14.4 ± 1.4	19.7 ± 2.0	13.9 ± 1.4
Isobutanol	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 30 ± 70	49.9 ± 5.0	71.2 ± 7.1	46.0 ± 4.6
Isopentanol	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 80 ± 185	109.5 ± 11.0	133.1 ± 13.3	106.6 ± 10.7
Superior alcohols	NP 3263	g / hl pure alcohol	≥ 130 ± 300	173.9 ± 17.4	223.9 ± 22.4	166.4 ± 16.6
Ethyl Lactate		g / hl pure alcohol	-	-	-	-
Isobutanol/ (1-propanol)		g / hl pure alcohol	> 15 < 4.0	3.5 ± 0.4	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.3
Copper	NP 2441	mg/l of distillate	≤ 15	5.9 ± 0.6	4.5 ± 0.5	2.6 ± 0.3

## Final considerations

The starting conditions of the must (pH 3.3-3.6) may have favored the growth of yeasts. The initial yeast population varied between 3.7 ± 5.2 log CFU/g in the 3 fermentations. During the first 4 days, the number of yeasts grew exponentially to log 7.6 CFU/g, and from then onwards, a slight decrease of those numbers was observed (5.9 ± 6.9 log UFC/g). This reduction in the yeast population may be explained by the level of ethanol attained during the fermentation (217 ± 10 g/kg of fermented must). Additionally, the presence of sugars which were not degraded at the end of the Processes could be due to the stress caused by ethanol, thus inhibiting the yeasts.

In Processes 5 and 7, 90% of the total ethanol was produced during the first month, while in Process 10, only 50% of the ethanol was produced during the same period of time.

Ethyl acetate, probably resulting from the yeasts activity, reached a value of 1.18 ± 0.05 g/kg of fermented must. On the other hand the level of the isopentanol (including isoamyl alcohol) increased during the course of alcoholic fermentation, reaching values of 0.17 ± 0.05 g/kg of fermented must. These compounds are responsible for the distillate's flavor.

The quality parameters of the distillate obtained after the fermentation period were in accordance with both the European Directive (Regulation (EC) N° 110/2008 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2008) and the specific Portuguese "medronho" distillate legislation (Decreto-Lei n° 238/2000 of 26 September 2000).

## Acknowledgments

M. Sousa Martins - Aguardente de Medronho - Livros Tradicionais  
S.B. Macieira





## ANEXO V

Poster apresentado no IFT (Institute of Food Technologists) Annual Meeting & Food Expo, 17 a 20 Julho, Chicago, U.S.A. 2010.



# Yeast population dynamics during the natural fermentation of the Portuguese spirit “Aguardente de Medronho”

\*Santo, D.; \*Galego, L.; \*Gaspar, N.; \*\*Gonçalves, T.; \*Quintas, C.

\*Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve, Campus da Penha, Faro, Portugal

\*\*Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Rua Larga 3004-504, Coimbra, Portugal

a23235@ualg.pt; lgalego@ualg.pt; nungaspar@ualg.pt; mifog@ci.ucp.pt; equintas@ualg.pt

## Abstract

“Aguardente de medronho” is a distilled beverage produced in the south of Portugal from the fermentation of *Arbutus unedo*’s fruits (Mediterranean shrub). Yeasts were the predominant group on this alcoholic fermentation and may contribute to the sensory attributes of the final product either in the positive (desirable flavour components) or negative (off-flavour compounds) way. Therefore, the aim of this work was to study the evolution of yeast population, assessed through the isolation and identification of the yeasts species obtained during three independent medium-scale traditional fermentations. Isolates were identified through the 5.8S rRNA-ITS region restriction analysis and by sequencing D1/D2 region of the 26S rRNA gene. From the 164 yeast isolates, 18 ITS-RFLP different profiles were obtained. A representative strain of each profile, known or unknown was identified by sequencing the D1/D2 region of the 26S rRNA gene and the obtained sequences were compared to the NCBI Gene bank database using Blast. The yeasts species identified were: *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lachancea thermotolerans* (formerly *Kluyveromyces thermotolerans*), *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. nothofagi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus tephrensis*, *Dioszegia zsoltni*, *Dothichiza pithyophila*, *Metschnikowia fructicola*, *Cryptococcus* sp., *Metschnikowia* sp., *Sporidiobolus* sp.

A great diversity of non-Saccharomyces yeasts was observed in fresh must. However, as the fermentation progressed the species diversity was considerably reduced with *Saccharomyces cerevisiae* becoming the dominant yeast at the end of fermentation.



Figure 1 – Aspects of the *Arbutus unedo* L. tree, flowers and fruits

## Introduction

*Arbutus unedo* L., strawberry tree, is an evergreen shrub that belongs to the Ericaceae family and is a typical specie from the Mediterranean region. The strawberry tree fruits are berries rich in sugars, vitamins, organic acids, phenolics, but they are rarely consumed as fresh fruit being used to produce jams or jellies or used in the traditional medicine. However, the fruits’ main application is in the production of distilled beverage named “Aguardente de medronho”. In Portugal this beverage is an artisanal product made on small or semi-industrial scale between September and January.

Its production is done according to the following diagram:



## Objectives

The aim of this work was to study the diversity of the yeast population, assessed through the isolation and identification of the yeasts species obtained during three independent medium-scale traditional industrial fermentations.

## Acknowledgments

Al. Sousa Martins - Aguardente de Medronho

L. Galego - Faculdade de Medicina

E.B. Mendes

F. M. M. M. M.

F. M. M. M. M.

F. M. M. M. M.

F. M. M. M. M.

F. M. M. M. M.

F. M. M. M. M.

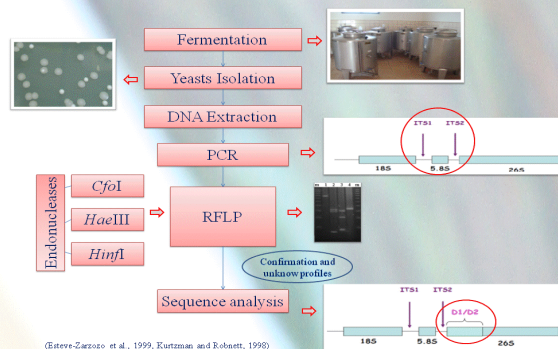
F. M. M. M. M.

F. M. M. M. M.

F. M. M. M. M.

## Methodology

Yeasts were identified according to the following diagram:

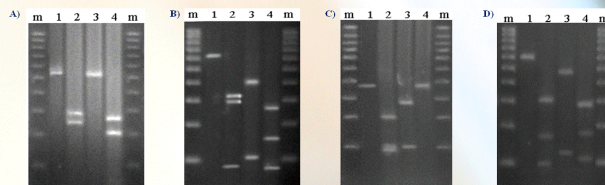


(Esteve-Zarzoso et al., 1999; Kurtzman and Robnett, 1998)

## Results

Isolated species	Amplified product (bp)	Cfo I	Hae III	Hinf I	Isolates	% of the sequence identification
<i>Aureobasidium pullulans</i>	600	290-150-100	450-150	290-150-130	4.3 %	100
<i>Candida apicola</i>	750	340-510-100	730	390-195-160	0.6 %	99
<i>Candida zemplinina</i>	475	215-110-50-60	475	235-235	2.4 %	100
<i>Cryptococcus</i> sp. *	590	250-150-90	490-100	305-285	0.6 %	99
<i>Cryptococcus tephrensis</i> *	540	270-230-40	400-50-50-30	240-240-60	1.2 %	100
<i>Dioszegia zsoltni</i> *	550	290-260	525	280-210	1.2 %	100
<i>Dothichiza pithyophila</i> *	600	290-150-100	450-150	290-150-130	1.2 %	95
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	775	320-510-105	775	385-200-160-50	14.0 %	100
<i>Issatchenkia orientalis</i> *	480	150-170-70-60	350-90	200-200-90	2.4 %	100
<i>Lachancea thermotolerans</i> *	700	310-250-90	300-110-95-95	340-340	6.7 %	99
<i>Metschnikowia fructicola</i> *	390	200-100-90	290-100	390	5.0 %	99
<i>Metschnikowia</i> sp. *	390	205-95-90	250-90	200-190	5.5 %	99
<i>Pichia membranifaciens</i>	500	175-110-90-75	330-90-50	275-200	17.1 %	99
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	640	320-240-50	425-215	340-225-75	1.2 %	100
<i>Rhodotorula nothofagi</i> *	640	320-240-50	425-215	340-225-75	1.2 %	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850	375-325-150	325-230-170-125	375-365-110	31.7 %	100
<i>Sporidiobolus</i> sp. *	600	280-220-100	600	260-150-120-90	1.5 %	100
<i>Tortulasporea delbrueckii</i>	800	330-220-150-100	800	410-350	0.6 %	100

\* Profiles identified using the sequence analysis of the D1/D2 of the 26S rRNA gene



RFLP profiles of the species *Dioszegia zsoltni* (A), *Rhodotorula nothofagi* (B), *Metschnikowia fructicola* (C) and *Dothichiza pithyophila* (D). Size of the PCR-amplified region (1) and restriction analysis of these PCR products with the endonucleases *Cfo*I (2), *Hinf*I (3) and *Hae*III (4). Lanes m correspond to molecular size standards (100-bp DNA ladder).

## Final considerations

A wide variety of yeasts species, included in the phyla Ascomycota and Basidiomycota were identified throughout the fermentation processes. As the fermentation evolves a succession of microbial species took place.

The earlier fermentation samples, corresponding to the first two days, contained a rich mixture of species including *Aureobasidium pullulans* (yeast-like fungus), *Cryptococcus* sp., *C. tephrensis*, *Dioszegia zsoltni*, *Dothichiza pithyophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia* sp., *M. fructicola*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. nothofagi* and *Sporidiobolus* sp.

As ethanol concentration increases and oxygen availability decreases, the majority of those species disappeared with the exception of *Hanseniaspora uvarum*. Further on, *Candida zemplinina*, *Lachancea thermotolerans* and *Issatchenkia orientalis* were identified during the intermediate phases of the fermentations as well as *Saccharomyces cerevisiae*.

In the final stages of the fermentation, before the distillation, *S. cerevisiae* became the dominant species in the three processes studied. The film producer *Pichia membranifaciens* was also found in the intermediate and later stages of the fermentation associated to a film produced at the surface of the must.

In all the fermentation cases studied *S. cerevisiae* took over the processes in the intermediate and final stages of the fermentation, representing 32.9% of the isolates.

In the future, we intend to select native strains to replace natural/spontaneous fermentations by mixtures of strains isolated from wild fermentations. Using defined starters may be a way to obtain a more reliable and better quality alcoholic and distilled beverages.