



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMPUS UFRJ - MACAÉ

CURSO DE FARMÁCIA



Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR
PARA MICRO-ORGANISMOS IMPORTANTES EM PROCESSOS
FERMENTATIVOS NA ÁREA DE ALIMENTOS

AMANDA ALIANE MAYRINK RODRIGUES

Macaé

Março de 2015

R696 Rodrigues, Amanda Aliane Mayrink.

Aplicação de ferramentas de identificação molecular para micro-organismos importantes em processos fermentativos na área de alimentos / Amanda Aliane Mayrink Rodrigues. - Macaé: [s. n.], 2015.

52 f.

Orientadora: Dra. Daniela de Borba Gurpilhares

Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé - Macaé, 2015.

Bibliografia: f. 45-52.

1.Processos Fermentativos. 2. Controle de Qualidade. 3. Vinho I. Gurpilhares, Daniela de Borba. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé. IV. Título.

CDD 664.024

AMANDA ALIANE MAYRINK RODRIGUES

Título: Aplicação de ferramentas de identificação molecular para micro-organismos importantes em processos fermentativos na área de alimentos.

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico

Orientadora: Prof.Dr.Daniela de Borba Gurpilhares

Macaé
Março de 2015

“Você é o resultado de 4 bilhões de anos de sucesso evolutivo. Aja como tal.”

(Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Ao final dessa fase da minha vida, é evidente que seria impossível não reconhecer o esforço e companheirismo de todos a minha volta, que me apoiaram e ajudaram nos bons e maus momentos.

Sendo assim, gostaria de agradecer profundamente e com todo meu coração à minha família, principalmente aos meus pais, Úrsula e Helder, e ao meu irmão, Diegoh. Muito obrigada por tudo. Obrigada pelas palavras de força e apoio na hora do aperto e da descrença; pelas palavras de ordem na hora da indisciplina e pelas palavras e gestos de admiração na hora da conquista.

Obrigada a todos os meus amigos, que estiveram ao meu lado durante todo o processo, do início ao fim, me apoiando e sendo a melhor válvula de escape durante os momentos de pressão.

Agradeço também a minha orientadora, Daniela, por me acolher como sua aluna de TCC no meu momento de desespero; por me presentear com um tema tão incrível e me encorajar e inspirar a ir sempre além a cada vez que lia um trecho recém-escrito e expressava o quão excelente o trabalho estava ficando.

A todos vocês que participaram dessa conquista, muito obrigada! Nada disso teria sido possível caso algum de vocês não estivessem ao meu lado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de Produção de Cerveja	8
Figura 2: Ciclo Básico do PCR	13
Figura 3: Esquema Representativo do nPCR.....	15
Figura 4: Esquema do Método RT-PCR.....	16
Figura 5: Aparato de PFGE.....	18
Figura 6: Tipos de revisão da literatura.	21
Figura 7: Categoria de estudos encontrados.....	26
Figura 8: Revistas científicas onde os estudos analisados foram publicados	29
Figura 9: Tendência de publicação de artigos que apresentam métodos cultura- independentes na análise da microbiota presente em processos fermentativos (vinho e cerveja).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de fermentações	2
Tabela 2. Artigos selecionados após levantamento bibliográfico.....	25
Tabela 3. Artigos analisados.....	27
Tabela 4. Alguns micro-organismos presentes no vinho que são capazes de diminuir sua qualidade sensorial.....	42
Tabela 5. Principais micro-organismos presentes na cerveja que são capazes de diminuir sua qualidade sensorial	44

LISTA DE ABREVIações

ADH	Álcool Desidrogenase
ATCC	American Type Culture Collection
Ct	Cycle threshold
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
f-ITS PCR	PCR de Fluorescência da Região ITS
ITS	Internal Transcribed Space
LAB	Bactérias Ácido Lácticas
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
qPCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
mPCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction
nPCR	Nested Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reversed Transcription PCR
RNA	Ácido Ribonucleico
SAPD	Specific Amplified Polymorphic DNA
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
VBNC	Viable but not culturable

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O uso de Processos Fermentativos na Área de Alimentos.....	1
1.2. Fermentação Alcoólica.....	3
1.2.1. Produção de Vinho.....	4
1.2.2. Produção de Cerveja.....	6
1.3. Técnicas Analíticas Empregadas no Controle de Qualidade de Alimentos..	10
1.3.1. Método Cultura-dependente.....	10
1.3.2. Métodos Cultura-independentes.....	11
1.3.2.1. Metodologias Baseadas em PCR e suas Variantes.....	12
1.3.2.1.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	12
1.3.2.1.2. <i>Nested</i> PCR.....	14
1.3.2.1.3. Multiplex PCR.....	15
1.3.2.1.4. Transcrição Reversa PCR.....	16
1.3.2.1.5. <i>Real-time</i> PCR.....	17
1.3.2.1.6. Pulsed Field Gel Electrophoresis.....	17
1.3.2.1.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	19
1.3.2.1.8. Random Amplified Polymorphism DNA.....	19

1.3.2.1.9. Repetitive Sequence based-PCR (Rep-PCR).....	20
1.4. Revisão Sistemática: Método de Pesquisa para o Uso de Evidências Científicas.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Análise da Metodologia de Pesquisa.....	24
5.2. Aplicação dos Métodos Cultura-Independentes no Controle de Qualidade do Vinho.....	30
5.3. Aplicação dos Métodos Cultura-Independentes no Controle de Qualidade da Cerveja.....	42
6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

Atualmente, processos fermentativos vão muito além das práticas artesanais e da ciência empírica alcançando escala industrial com aplicação tecnológica. Alguns tipos de micro-organismos são considerados importantes para a obtenção de produtos fermentados, além de conferirem a qualidade sensorial, aroma e sabor, adequado a cada produto. Os métodos convencionais disponíveis para detecção e identificação dos micro-organismos dependem de técnicas de identificação microbiológica e bioquímica. Tais técnicas são, em maioria, cultura-dependentes e estão associadas com certas limitações como, por exemplo, micro-organismos viáveis mas não cultiváveis e necessidade de múltiplos testes para assegurar a confiabilidade dos resultados. Tendo em vista tais limitações, fez-se necessário o desenvolvimento de técnicas cultura-independentes que são baseadas na análise de ácidos nucléicos. O presente trabalho apresenta uma revisão sobre as principais ferramentas de biologia molecular empregadas no controle de qualidade microbiológico e sensorial de produtos alimentícios como cerveja e vinho. A metodologia empregada foi a revisão sistemática de artigos científicos e outras fontes de consulta, buscando dados sobre o modo de controlar a qualidade dos micro-organismos utilizados bem como do produto obtido, e propor aplicação das ferramentas da biologia molecular. Os resultados obtidos demonstraram que as técnicas de biologia molecular são de grande utilidade para a área alimentícia, porém ainda são pouco empregadas.

Palavras-Chave: Cerveja, Controle de Qualidade, Métodos Cultura-Independentes, Processos Fermentativos, Vinho.

ABSTRACT

Currently, fermentation processes are at levels beyond the handmade practice and empirical science, reaching industrial scale with technological application. Some types of microorganisms are considered important for obtaining fermented products, influencing in sensory quality, as flavor, suitable for each product. Conventional methods available for the detection and identification of microorganisms depend on microbiological and biochemical identification techniques. Such techniques are mostly culture-dependent and are related with certain limitations, for example, non-cultivable microorganisms and the need for multiple testing to ensure reliability of results. In view of these limitations, it was necessary developing culture-independent techniques that are based on nucleic acids analysis. This paper presents an overview of the main molecular biology tools used in microbiological control and sensory quality of food products, such as beer and wine. The employed methodology was the systematic review using scientific articles and other sources to search information about control the quality of utilized microorganisms used and the obtained product, and propose application of molecular biology tools. The results showed that molecular biology techniques are very useful for the food industry, but are still not employed.

Key words: Beer, Quality Control, Culture-Independent Methods, Fermentation process, Wine.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento acerca da composição da comunidade microbiana, suas diferentes populações e potenciais interações em matrizes alimentícias é crucial para assegurar uma produção segura e de alta qualidade, como por exemplo, no setor cervejeiro e de produção de vinhos.

Tradicionalmente, a ocorrência de certos micro-organismos, em um dado ambiente ou processo industrial, é estudada por métodos cultura-dependentes. Porém, já é sabido que esses métodos, por vezes, são limitados na identificação de pequenas populações de micro-organismos, para os quais algum método de enriquecimento é necessário. Além disso, métodos convencionais não são capazes de detectar micro-organismos não cultiváveis, o que caracteriza uma séria desvantagem desses métodos. Em matrizes alimentares relativamente simples, tais como em produtos fermentados, em que os micro-organismos cultiváveis normalmente predominam, foi demonstrado que pelo menos 25-50% da comunidade microbiana ativa não pode ser cultivada *in vitro*.

As limitações impostas por métodos cultura-dependentes têm demonstrado a importância do desenvolvimento e uso de métodos cultura-independentes, que são baseadas na análise dos ácidos nucleicos dos micro-organismos. Esses métodos, quando comparados aos convencionais, são em geral mais rápidos, mais específicos, mais sensíveis e mais precisos, permitindo um estudo aprofundado da população microbiana e sua diversidade em um dado ecossistema, principalmente em alimentos fermentados, os quais apresentaram qualidade e segurança influenciadas pelos tipos de micro-organismos presentes.

1.1. O USO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS NA ÁREA DE ALIMENTOS

Os processos fermentativos vêm sendo utilizados há séculos, principalmente na fabricação de bebidas como cerveja e vinho e de alimentos como queijo e pão, podendo ser empregados, também, como método de conservação de alimentos (GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008).

Fermentação é o nome dado, do ponto de vista bioquímico, às trocas ou decomposições químicas de compostos orgânicos através da atividade de micro-organismos vivos. A palavra fermentação é originada do Latim (*fervere* = ferver), e foi definida por Louis Pasteur como “La vie sans l’air” (a vida sem ar), devido a uma condição de ebulição observada na produção de vinhos. Gay-Lussac, após novos estudos, demonstrou que a formação de borbulhas na fermentação se devia a decomposição do açúcar em álcool e gás carbônico. Posteriormente, Pasteur, ao intensificar suas investigações, associou a palavra micro-organismos e enzimas a estes processos (BOURDICHON *et al.*, 2012).

Existem diferentes classes de fermentações, as quais estarão associadas aos tipos de micro-organismos usados como agente do processo, ao tipo de substrato, além do produto formado. Alimentos e bebidas em que ocorrem tais fermentações são: bebidas alcoólicas, pães, queijos, iogurtes, hortaliças (picles e chucrutes), azeitonas, carnes (ex: salame), café, cacau, produtos de soja, fermentados de milho e mandioca e vinagre (Tabela 1) (FELLOWS, 2006).

Tabela 1. Classes de fermentações

Agente da Fermentação	Produto da Fermentação
Leveduras	Álcool Riboflavina* Ergosterol*
Bactérias	Ácido láctico Ácido acético Ácido propiônico Acetona-butanol Cobalamina*
Fungos filamentosos (bolores)	Ácido cítrico Ácido glucônico

*Vitaminas

Dentre as classes de fermentação, a alcoólica, a acética e a láctica são as que apresentam importância na tecnologia de alimentos, tendo em vista que os produtos finais álcool, ácido acético e ácido láctico, respectivamente, impedirão o crescimento de outros micro-organismos que poderão agir como contaminantes. Quanto aos substratos mais empregados nestes processos de obtenção de alimentos fermentados podemos destacar: açúcares (glicose, frutose, sacarose), celulose, pectina, albumina, dentre outros (GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008).

1.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica ocorre através da transformação de uma molécula de açúcar fermentescível, como a glicose ou outro monossacarídeo, em duas moléculas de álcool e gás carbônico por ação de enzimas presentes em leveduras, sendo a mais utilizada a *Saccharomyces cerevisiae*. Essa levedura tem a capacidade, também, de utilizar dissacarídeos, como a sacarose, pois possui uma enzima denominada invertase, responsável pela hidrólise deste composto em uma molécula de glicose e uma de frutose. No entanto, enzimas como amilases e outras, que decompõem açúcares complexos (ex. amido e celulose), não podem ser produzidas pelas leveduras, sendo necessária uma etapa de quebra destes polissacarídeos em glicose, chamada de sacarificação (GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008).

As bebidas alcoólicas podem ser obtidas de diversas fontes naturais de açúcares fermentescíveis e amiláceos como: frutas, cana-de-açúcar, milho, trigo, arroz, batata, centeio, aveia, cevada, raízes e folhas (AQUARONE *et al.*, 2001).

A partir de condições ideais de concentração de açúcar, pH, temperatura e concentração de células da levedura (inóculo) no meio de cultivo (ou mosto), a fermentação segue em tanques agitados, também denominados reatores, afim de se obter como produto final o álcool etílico. Porém, nem todo o açúcar é transformado em álcool, já que parte deste é usado na formação de novas células de leveduras e de produtos secundários como glicerina, ácido succínico, dentre outros (AQUARONE *et al.*, 2001; GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008).

1.2.1. Produção de Vinho

Vinhos são as bebidas alcoólicas obtidas a partir da fermentação do suco de frutas. No entanto, a definição mais aceita e utilizada se refere à bebida alcoólica obtida a partir da fermentação do suco das uvas. Este pode ser classificado quanto à classe (de mesa, espumante, etc); quanto à cor (tinto, rosado e branco); e quanto ao teor de açúcares (brut, extra-seco, seco, meio seco, meio doce, suave e doce) (GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008; CHEYNIER *et al.*, 2010).

O vinho está presente na civilização há pelo menos 7000 anos, com os primeiros sinais de produção em larga escala datando de 5000 a.C. É consumido tanto por funções alimentares quanto sócio-religiosas (SOLEAS, DIAMANDIS, GOLDBERG, 1997; BORNEMAN, SCHMIDT, PRETORIUS, 2013).

A descoberta de um jarro de cerâmica na região do Irã fornece a evidência química mais antiga sobre a existência do vinho. A bebida foi identificada pela presença de sais de cálcio provenientes do ácido tartárico, presente em grandes quantidades somente nas uvas, e também pela presença da resina obtida a partir da árvore de carvalho, antigamente muito utilizada como aditivo no vinho, visando inibir o crescimento bacteriano (SOLEAS, DIAMANDIS, GOLDBERG, 1997).

Para que o vinho seja obtido são necessários diferentes procedimentos, a partir dos quais haverá a transformação da uva em vinho, sendo o processo denominado vinificação. As principais etapas são: colheita da uva; retirada do caule, folhas e outros materiais que possam vir com a uva; esmagamento das uvas; fermentação inicial e maceração (etapa exclusiva do vinho tinto); prensagem; fermentação alcoólica; fermentação malolática; clarificação; filtração e engarrafamento (GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008; SOLEAS, DIAMANDIS, GOLDBERG, 1997).

Apesar de bastante similar, o processo de vinificação de vinhos tintos apresenta algumas diferenças em relação aos vinhos brancos. Na produção do vinho branco a primeira etapa após o esmagamento é a prensagem. Isso separa as partes sólidas (sementes e cascas) do suco, sendo esse último, fermentado separadamente. Já para a produção do vinho tinto, após o esmagamento inicia-se uma etapa de fermentação, ou seja, todo o mosto é utilizado para a fermentação. Após essa fermentação, segue uma

etapa de maceração, que permite a extração de constituintes presentes nas partes sólidas da uva para o mosto. Nessa etapa, além do pigmento responsável pela coloração avermelhada do vinho, também são transmitidos taninos, compostos voláteis e precursores de aroma. Somente após essa etapa de maceração o vinho tinto segue para etapa de prensagem (CHEYNIER *et al.*, 2010).

O processo de fermentação do suco da uva ao vinho é uma complexa reação que envolve diferentes micro-organismos, como as leveduras e bactérias (COMBINA *et al.*, 2005; GONZALEZ-ARENZANA *et al.*, 2013; COUTO, REIZINHO, DUARTE, 2005; OZILGEN, ÇELIK, BOZOGLU, 1991). Esse processo pode ser analisado em dois estágios fermentativos: fermentação alcoólica e fermentação malolática. No primeiro, os micro-organismos do suco, principalmente leveduras, consomem os açúcares fermentescíveis, produzindo etanol. Já no segundo, as bactérias ácido-lácticas utilizam o ácido málico como substrato para a produção de ácido láctico, que leva a sutil diminuição da acidez do vinho, elevando o pH (GONZALEZ-ARENZANA *et al.* 2013; OZILGEN, ÇELIK, BOZOGLU, 1991).

De acordo com Ozilgen, Çelik e Bozoglu (1991), a produção do vinho é um processo onde há culturas mistas de micro-organismos e produção de múltiplos produtos, iniciado pelos micro-organismos naturais das uvas, entre eles *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Lactobacillus*. Estes autores afirmam, também, que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* está presente, normalmente, em pequenas quantidades nas uvas. Além disso, Combina *et al.* (2005) afirmam que diversos fatores extrínsecos e intrínsecos afetam a ocorrência e crescimento dos micro-organismos nas uvas como, por exemplo, precipitações pluviais, temperatura, maturação do fruto e agrotóxicos, como inseticidas e fungicidas.

Diante da presença de tão variada flora microbiana, alguns autores defendem que a fermentação do vinho é um processo que envolve a substituição sequencial de micro-organismos (PERRONE *et al.*, 2013; COMBINA *et al.*, 2005; OZILGEN, ÇELIK, BOZOGLU, 1991). Tal substituição pode ser explicada pela exclusão competitiva dos micro-organismos, decorrente da alteração da composição do mosto. Durante o esmagamento das uvas, o mosto se torna um ecossistema seletivo pela alta

concentração de açúcares e nitrogênio, além de alteração na quantidade de sais e oxigênio. O consumo do oxigênio promove o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e, à medida que a atividade fermentativa desta aumenta, ocorre também a elevação da temperatura, fator que contribui para a inibição de outras espécies (PERRONE *et al.*, 2013).

A qualidade do vinho, no entanto, está intimamente relacionada com a microbiota geral da fermentação. As várias outras espécies e cepas, que não a *S. cerevisiae*, se desenvolvem durante todo o processo fermentativo e metabolizam os constituintes do suco de uva (principalmente açúcares) a vários produtos voláteis e não-voláteis, que vão influenciar e determinar o tipo e concentração de produtos que contribuem para o sabor e aroma do vinho (COMBINA *et al.*, 2005; COUTO, REIZINHO, DUARTE, 2005).

Os principais produtos formados a partir da fermentação, etanol e dióxido de carbono, contribuem muito pouco para as características organolépticas do vinho. Em contrapartida, ácidos orgânicos, álcoois e ésteres superiores constituem o grupo que formam o buquê aromático fermentativo (COMBINA *et al.*, 2005).

1.2.2. Produção de Cerveja

A cerveja é uma bebida fermentada a base de água e amido e flavorizada pelo lúpulo (DE KEUKELEIRE, 2000). Sua produção é pioneira na aplicação da fermentação em alimentos e a evidência histórica mais antiga da produção de cerveja data de 6000 a.C., na Babilônia (ALMONACID *et al.*, 2012). É uma das bebidas alcoólicas mais antigas e consumidas ao redor do mundo. Um método para sua produção, escrito há 3000 a.C. pelos sumerianos, descrevia a produção do “pão de cerveja”, no qual a farinha de cevada era misturada à água e assada. Posteriormente, um tipo primitivo de cerveja foi produzido pela fermentação alcoólica, com adição de ervas, incluindo lúpulo selvagem, pelos babilônios. Métodos e receitas evoluíram com o tempo, sendo a cerveja, atualmente, produzida com materiais como malte de cevada, lúpulo e alguns adjuvantes como arroz e milho (IIMURE, SATO, 2013).

No Brasil, o artigo 614 do decreto nº 2.314, de 4 de Setembro de 1997, que discorre sobre bebidas, define cerveja como a seguir: “A cerveja é a bebida obtida pela

fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo” (BRASIL, 1997).

Apesar de existir variação na forma de produção da cerveja, dependente do tipo de cerveja que se pretende obter, o processo completo da produção consiste em algumas etapas específicas: a malteação, que é a germinação e torrefação da cevada; seguida pela produção do mosto cervejeiro, que envolve trituração, extração e hidrólise dos componentes da cevada maltada; filtração do mosto e posterior fervura deste com adição do lúpulo; a fermentação, que pode ser separada em primária e maturação; e por último o processamento final, que envolve filtração, estabilização e engarrafamento (Figura 1) (DRAGONE, MUSSATO, SILVA, 2007; IIMURE & SATO, 2013).

A cevada germinada é conhecida como malte e, quando uma suspensão de malte e água são aquecidos, a aproximadamente 60°C, as amilases do malte começam o processo de hidrólise do amido em açúcares fermentescíveis. Essa conversão amido-açúcar é interrompida através de aquecimento. Após a filtração dessa suspensão obtém-se o mosto (solução açucarada), e esse é transferido para um reator cervejeiro onde acontece a adição do lúpulo (*Humulus lupulus L.*) e fervura por no mínimo uma hora. O lúpulo é um ingrediente com importante impacto nas características da cerveja e utilizado em uma quantidade que pode ser considerada “simbólica” quando comparada a da cevada. Além disso, o lúpulo tem várias outras funções, entre elas: criar complexos insolúveis com proteínas e polipeptídeos, contribuindo para a estabilidade coloidal da cerveja; esterilizar o mosto, que garante a estabilidade microbiológica da cerveja; conferir o sabor amargo da bebida, particularmente nas cervejas claras e; estabilizar o creme da cerveja. Após o resfriamento e remoção do lúpulo, o líquido é bombeado para os reatores fermentativos e as leveduras adicionadas com aeração para o crescimento, enquanto durante a fase anaeróbia as leveduras convertem o açúcar em etanol e gás carbônico (DE KEUKELEIRE, 2000).

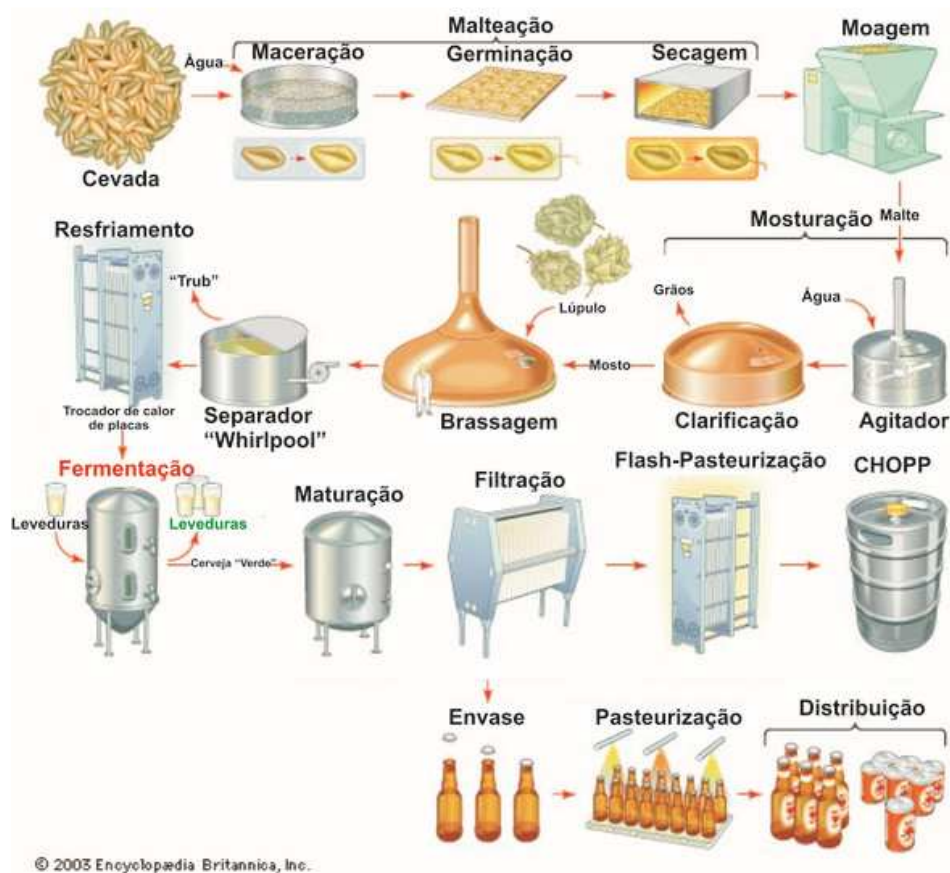


Figura 1: Processo de produção de cerveja. Fonte: www.engenhariadacerveja.com.br

Existem basicamente dois tipos de leveduras utilizadas na fermentação de cerveja, que correspondem às cervejas do tipo *ale* e *lager*. A cerveja tipo *ale*, usualmente fermentada pela *Saccharomyces cerevisiae*, é produzida pela chamada alta fermentação. Essas leveduras fermentam de forma rápida, à temperatura ambiente, produzindo uma cerveja com sabor e aroma frutados. A fermentação é interrompida quando se atinge aproximadamente 12% de etanol, sendo as leveduras recolhidas na espuma do líquido do fermentador. Já a cerveja tipo *lager*, usualmente fermentada pela *Saccharomyces carlsbergensis*, é produzida pela baixa fermentação. Elas trabalham em temperaturas mais baixas, fermentam mais lentamente, produzem cervejas com sabores distintos e sofrem sedimentação após produção de aproximadamente 5% de etanol (POLAINA, 2002; DE KEUKELEIRE, 2000; GAVA, DA SILVA E FRIAS, 2008).

Uma fermentação comum demora aproximadamente uma semana para ser concluída, resultando em uma cerveja denominada “green beer”, não consumível por possuir sabor e odor ruins, causados por compostos formados durante a fermentação, principalmente o diacetil. Dessa forma, a cerveja necessita de um período de algumas semanas de maturação (ou *lagering*), conduzida a 0°C, no qual o diacetil é convertido a acetoina pela diacetil redutase, uma enzima da levedura. Enquanto o diacetil é indesejado por conferir um sabor amanteigado à bebida, a presença da acetoina não tem influência no sabor da cerveja. Tais compostos se decompõem e somente após esse processo a cerveja poderá ser envasada. Para um maior tempo de conservação, a bebida pode ser pasteurizada (DE KEUKELEIRE, 2000; POLAINA, 2002).

Segundo Willaert e Nedovic (2006), a tecnologia tradicional para produção de cerveja usa as leveduras suspensas em um reator para fermentar o mosto e é um processo demorado, sendo que para a obtenção de cervejas do tipo *lager* a fermentação demora aproximadamente 7 dias, sem contar com o período de maturação, que demora semanas. A cerveja resultante desse processo tem um sabor bastante balanceado e bem aceito pelos consumidores. Entretanto, de acordo com Almonacid *et al.* (2012) esse método apresenta algumas desvantagens como o alto custo dos reatores e a necessidade de monitorar e controlar cada lote de produção. Visando solucionar esse problema, pesquisadores tem desenvolvido ao longo do último século um sistema imobilizado para produção da cerveja, onde aplica-se o sistema de fermentação contínua da cerveja como um método mais eficaz em termos de custos para sua produção.

A tecnologia da célula imobilizada (*Immobilised cell technology*, ICT) permite a produção da cerveja *lager* em um período de tempo muito mais curto (1-3 dias). Todavia, uma das maiores dificuldades desse processo é alcançar o balanço correto dos compostos sensoriais e, assim, criar um sabor aceitável aos consumidores em um período tão curto de tempo, sendo, assim, uma tecnologia que só poderá ser introduzida e empregada com sucesso em escala industrial se o sabor atingido puder ser controlado (WILLAERT e NEDOVIC, 2006).

1.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS

A qualidade de um alimento pode ser definida como o conjunto de características que irão influir na aceitabilidade deste produto. Essas características podem ser divididas em três categorias: aparência, textura e *flavor* (sabor e aroma), determinando a qualidade sensorial. Além da qualidade sensorial, os alimentos também podem ser analisados quanto a sua composição microbiológica (GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008).

Micro-organismos podem ser responsáveis por alterações dos alimentos e oferecer risco a saúde, mas também podem ser benéficos, na produção de certos tipos de alimentos. Os micro-organismos de interesse na área de alimentos podem ser classificados como contaminantes ou úteis, sendo os contaminantes agrupados em deteriorantes e patogênicos (GAVA, DA SILVA, FRIAS, 2008). Alimentos fermentados são obtidos através da ação de micro-organismos úteis, os quais, sob condições controladas de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos, promovem melhora nas características sensoriais e reduzem a probabilidade de deterioração desse tipo de alimento (GONZÁLEZ-ARENZANA *et al.*, 2013).

Como alimentos fermentados possuem ecossistemas microbianos, onde bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem coexistir, o entendimento da biodiversidade e da ecologia da microbiota permite um melhor controle do processo fermentativo; o que resultará em maior qualidade e segurança e características sensoriais únicas do produto obtido (COCOLIN, DOLCI, RANTSIOU, 2011). Com isso, a análise da microbiota existente em alimentos pode ser realizada tanto pelo uso de métodos cultura-dependentes, quanto aqueles que são cultura-independentes.

1.3.1. Método Cultura-dependente

O método cultura-dependente se baseia no uso de meios de cultivo sintéticos nos quais o micro-organismo, ou um conjunto destes, irá crescer e será avaliado quanto as suas propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (DUSKOVÁ *et al.*, 2012). Este método vem sendo extensivamente empregado, não somente em laboratórios de

Microbiologia Geral e Ambiental, mas também quando se quer avaliar a presença de micro-organismos em pacientes (Microbiologia Clínica) e produtos como medicamentos e alimentos.

No entanto, segundo Hugenholtz *et al.* (1998), o conhecimento sobre a diversidade microbiana é limitado devido ao fato de que aproximadamente 99% dos micro-organismos presentes na natureza não são cultiváveis com o uso de técnicas padrão. Alguns micro-organismos não detectados pelos métodos tradicionais foram descritos pela primeira vez por métodos independentes de cultivo. As células destes micro-organismos, definidas como viáveis e não cultiváveis (VBNC – *viable but not culturable*), são metabolicamente ativas, mas incapazes de sofrerem divisão celular necessária ao crescimento em um meio de cultivo. Esta é uma estratégia de sobrevivência e de resposta ao ambiente adverso (ex. falta de nutrientes ou de estresse ácido) encontrado no processo de fermentação de alimentos (COCOLIN *et al.*, 2013).

Os métodos dependentes de cultivo levam a caracterização bioquímica e fenotípica dos micro-organismos, porém apresentam desvantagens como: necessidade de vários testes bioquímicos para determinação do tipo de micro-organismo, não são suficientes para diferenciação inter e intra-espécies, requerem longos tempos de cultivo e são menos confiáveis e reprodutíveis (SINGH *et al.*, 2009).

1.3.2. Métodos Cultura-independentes

Os métodos cultura-independentes começaram a ser aplicados à área de Microbiologia de Alimentos ao final da década de 90. Estes métodos não se baseiam em cultivos, tendo como alvo os ácidos desoxirribonucleicos e ribonucleicos (DNA e RNA, respectivamente) para a identificação e análise de modificações de populações microbianas presentes em ecossistemas específicos, sem que haja influência do estado fisiológico da célula microbiana no resultado da investigação. A maioria das técnicas usadas é baseada em PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) (COCOLIN *et al.*, 2013). Na análise pós-amplificação, o objetivo é detectar a heterogeneidade na sequência de DNA, quer pelo uso de PFGE, através do estudo de mobilidade eletroforética dos produtos do PCR, ou usando endonucleases de restrição

em RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (COCOLIN *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2009). Algumas destas técnicas serão abordadas a seguir.

1.3.2.1. Metodologias Baseadas em PCR e suas Variantes

1.3.2.1.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que foi desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis, rendendo a este pesquisador um Nobel em química. Essa técnica faz ampliações exponenciais de uma sequência de DNA alvo em um curto período de tempo, baseando-se na habilidade da enzima DNA polimerase em sintetizar uma nova fita de DNA complementar à sequência alvo (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014; SINGH *e. al.*, 2012)

Os componentes necessários para o PCR são: DNA molde, DNA polimerase termoestável, *primers* e nucleotídeos (SINGH *et al.*, 2012; LO, CHAN, 2006). *Primers* são fragmentos pequenos de DNA, complementares a região terminal do DNA alvo (presente no DNA molde). São eles que permitem a amplificação de uma região específica do material genético, possibilitando que os nucleotídeos sejam adicionados à sua porção 3' pela polimerase (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014). As polimerases mais utilizadas para o PCR são a *Taq* polimerase, isolada de *Thermus aquaticus*, a *Pfu* polimerase, isolada de *Pyrococcus furiosus* e a *Vent* polimerase, isolada de *Thermococcus litoralis*. Elas são sutilmente diferentes, mas tem uma característica principal que as tornam aplicáveis à técnica: são termoestáveis e bem conhecidas (SINGH *et al.* 2012; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014)

Cada ciclo do PCR consiste basicamente de 4 etapas (Figura 2).

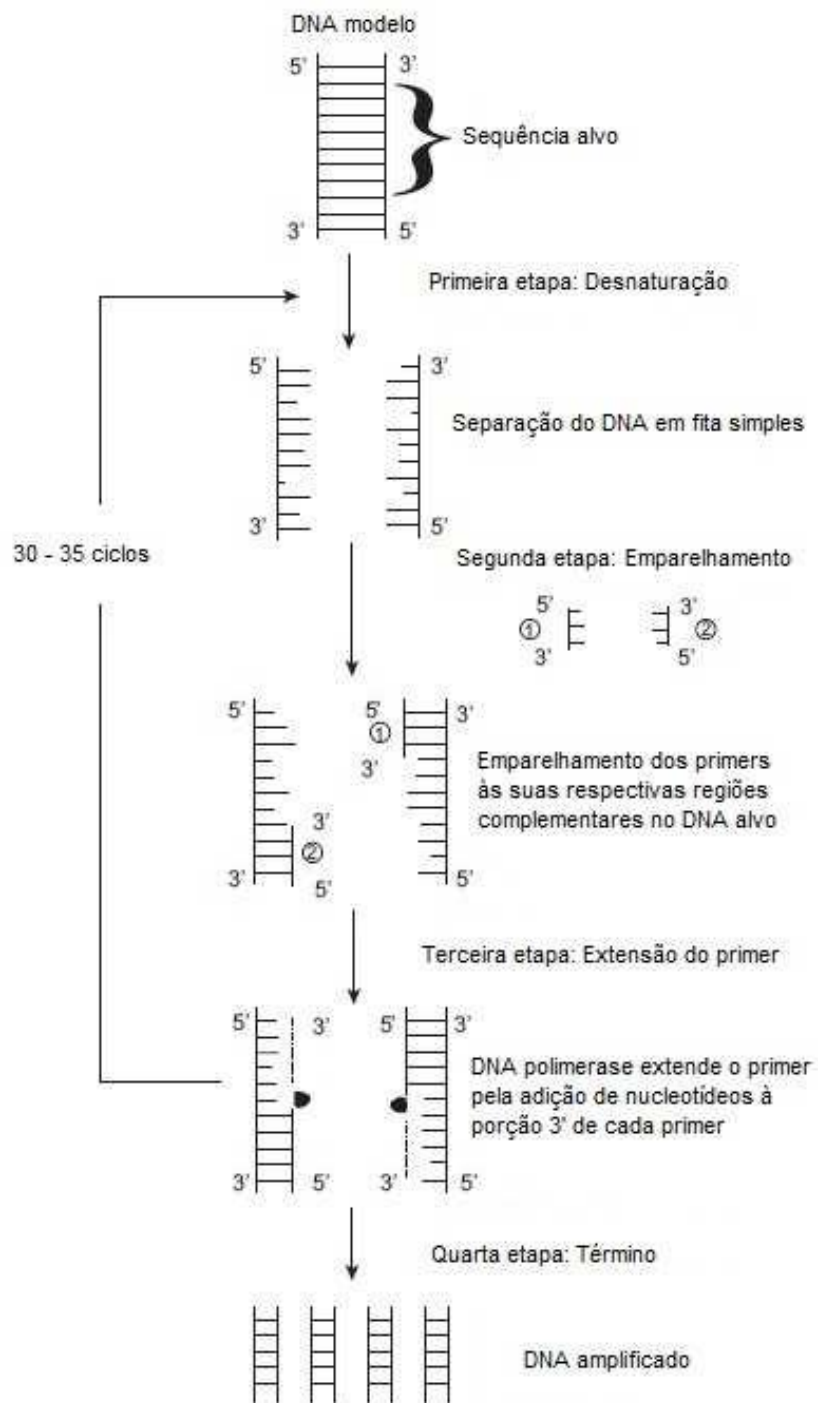


Figura 2: Ciclo básico de PCR. Adaptado de Singh *et al.*, 2012

A desnaturação é a primeira etapa, onde as ligações de hidrogênio da fita dupla de DNA são desfeitas, devido elevação da temperatura (em média 90°C). Após a separação das fitas, segue-se a segunda etapa, que é o emparelhamento dos *primers* à cada fita separada do DNA, permitindo a ligação da polimerase a essa estrutura (DNA alvo-*primer*) e início da terceira etapa, que é a extensão dos *primers*. Nessa etapa a polimerase utiliza os nucleotídeos presentes no meio para fazer a nova fita de DNA, sendo essa complementar ao DNA alvo. Essas três etapas acontecem repetidamente até atingir grande quantidade do DNA amplificado. A última etapa é o término do ciclo de PCR, efetuada com uma extensão final seguida da diminuição da temperatura, a cerca de 4°C, após aproximadamente 30 – 35 ciclos de amplificação (SINGH *et al.* 2012; LO, CHAN, 2006; KOLMODIN, BIRCH, 2002).

1.3.2.1.2. Nested PCR

O *nested* PCR – ou nPCR – é uma modificação da PCR, desenvolvido para aumentar a especificidade dos produtos de amplificação com diminuição da contaminação por produtos oriundos de amplificação indesejada e inesperada de outros sítios de ligação dos *primers*. No PCR comum, os *primers* são desenvolvidos para emparelhar com determinada sequência alvo do DNA. No entanto, caso essa sequência se repita em outra parte do DNA, o *primer* se ligará, levando à amplificação de um produto indesejado (Figura 3) (SINGH *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Como é possível observar na figura 3, o nPCR utiliza dois conjuntos (sets) de *primers*, usados em dois sucessivos ciclos de PCR. No ciclo inicial, o primeiro conjunto de *primers* faz a amplificação de produtos do DNA que, além da região alvo, pode conter produtos de regiões não desejadas. Os produtos do primeiro PCR são então utilizados como DNA molde para um segundo ciclo, utilizando outro conjunto de *primers*, cujos sítios de ligação são parcialmente ou totalmente diferentes do conjunto utilizado na primeira amplificação (SINGH *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

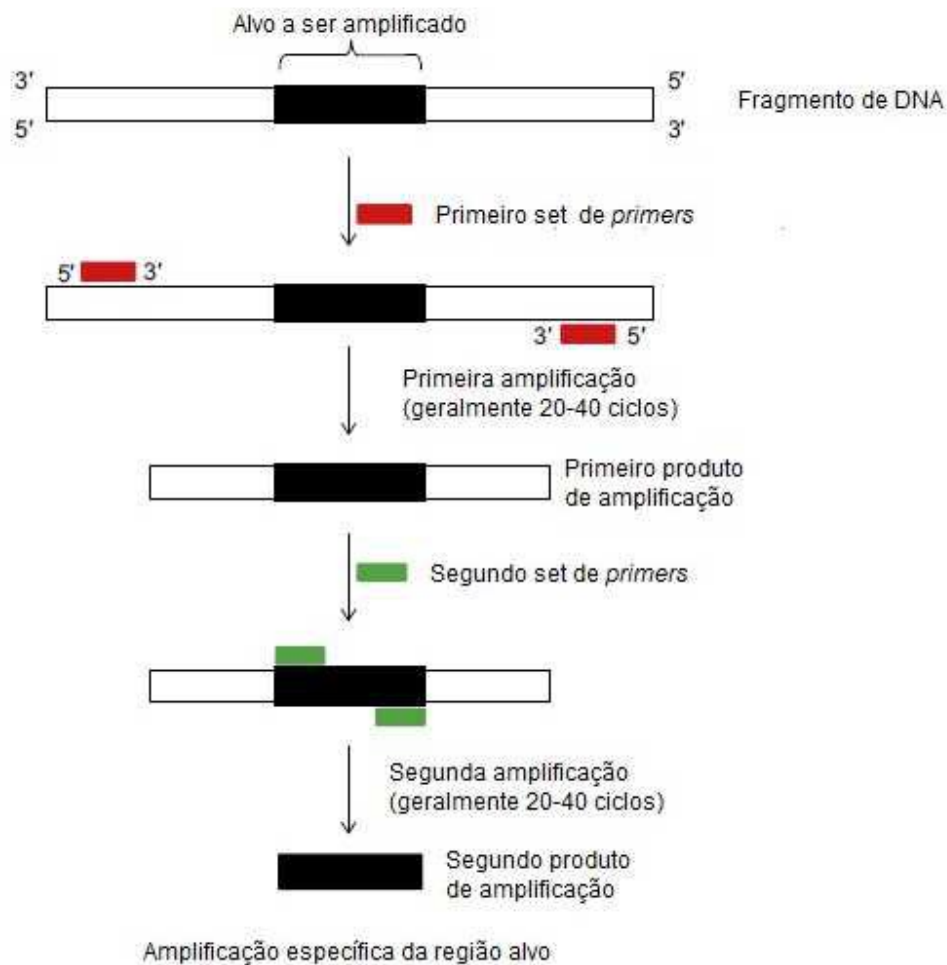


Figura 3: Esquema representativo do nPCR. Adaptado de Singh *et al.*, 2012

1.3.2.1.3. Multiplex PCR

O multiplex PCR (mPCR) é uma técnica que permite a amplificação simultânea de vários alvos em uma reação, usando mais de um conjunto de *primers* no mesmo ciclo. Essa técnica pode levar a formação de um ou mais amplicons de regiões separadas do DNA alvo (SINGH *et al.*, 2012; LO, CHAN, 2006).

Modelos intimamente relacionados, como espécies/cepas do mesmo gênero, podem ser diferenciados através desta técnica. Para isso, os amplicons que distinguem esses modelos estão preferencialmente localizados em regiões não muito variáveis (SINGH *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Entre as vantagens dessa técnica estão o baixo custo, necessidade de pouco volume de amostra e a detecção de diversos patógenos. Um fator chave para sucesso com essa técnica consiste no desenvolvimento dos *primers*, uma vez que todos devem ter a temperatura de emparelhamento aproximada (SINGH *et al.*, 2012; LO, CHAN, 2006).

1.3.2.1.4. Transcriptase Reversa PCR

O Transcriptase Reversa PCR (ou RT-PCR) é a variação do PCR na qual a molécula modelo para amplificação é o RNA, e não o DNA. Nessa técnica, inicialmente, a transcriptase reversa faz a síntese de uma fita de cDNA a partir do RNA modelo. Em seguida, o cDNA é utilizado como material de partida para o PCR. Além dos componentes básicos do PCR, esse método exige a presença da transcriptase reversa, enzima essencial, uma vez que a polimerase só age em moléculas de DNA; e da RNaseH, que cliva a fita de RNA após a transcrição reversa (Figura 4) (SINGH *et al.*, 2012).

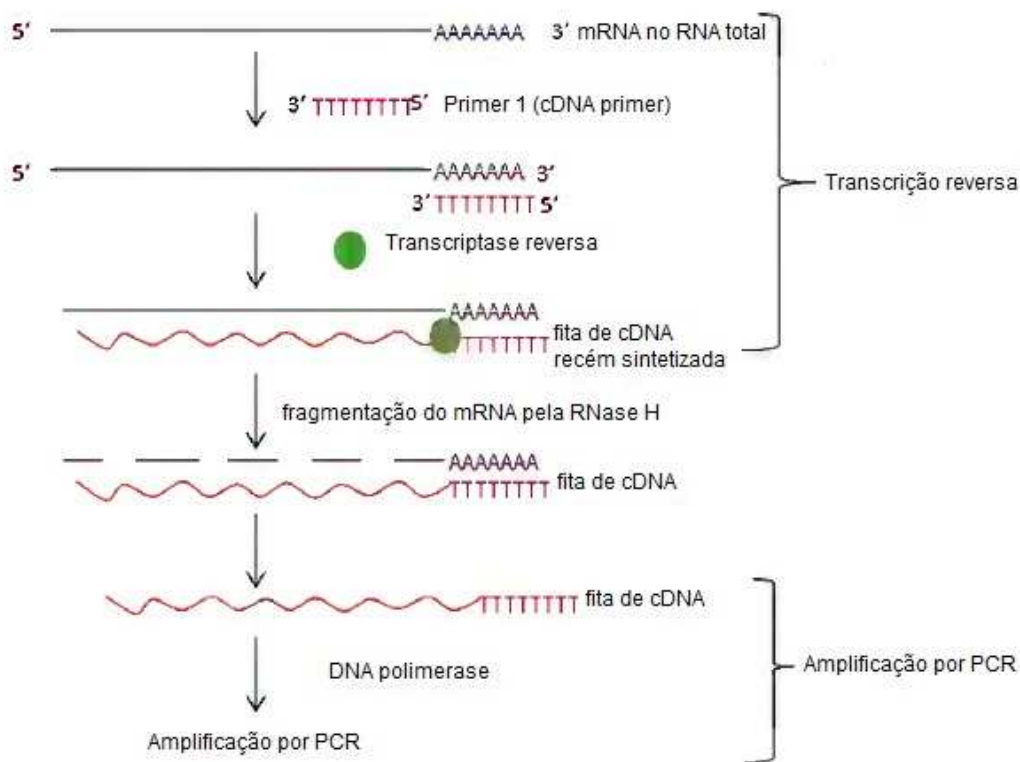


Figura 4: Esquema do método RT-PCR. Adaptado de Singh *et al.*, 2012

1.3.2.1.5. Real-time PCR

O *real-time* PCR (PCR em tempo real ou qPCR) foi desenvolvido para fazer a amplificação de PCR e visualização/verificação do produto em tempo real, utilizando uma sonda alvo-específica fluorescente na reação, eliminando assim a fase de análise pós-PCR (SINGH *et al.*, 2012; PRYOR, WITTEWER, 2006).

A fluorescência é emitida durante ou após o emparelhamento da sonda com o seu DNA complementar alvo. Esse sinal é prontamente encaminhado para um computador, onde cada ponto é automaticamente plotado em um gráfico e a extensão de amplificação do produto se dá como uma plotagem contínua, ou seja, a detecção e quantificação do sinal fluorescente gerado aumenta de forma diretamente proporcional à quantidade do produto de PCR ou amplicon gerado (SINGH *et al.*, 2012; LO, CHAN, 2006).

1.3.2.1.6. Pulsed Field Gel Electrophoresis

A eletroforese é uma técnica que utiliza a aplicação de uma corrente elétrica constante através de um bloco de gel de agarose, separando as moléculas de DNA de até ~50kb de maneira tamanho-dependente. No entanto, essa metodologia é incapaz de separar moléculas de DNA maiores (SINGH *et al.*, 2012; HERSCHLEB, ANANIEV, SCHWARTZ, 2007).

A eletroforese de campo pulsado (PFGE) é uma metodologia desenvolvida para a separação de moléculas grandes de DNA, explorando a capacidade de permear/arraste dessas moléculas. Essa separação é alcançada por pulsos elétricos aplicados no gel em direções diferentes, periodicamente alternados, exigindo que as moléculas de DNA assumam novas posições no gel constantemente (HERSCHLEB, ANANIEV, SCHWARTZ, 2007). No primeiro pulso, a molécula de DNA se orienta no gel, sofre alongamento e migra na direção da corrente elétrica. Quando o segundo pulso é aplicado, em direção diferente, a molécula precisa se reorientar, sofrer alongamento novamente e então migra na direção da nova corrente (Figura 5). Dessa forma o tempo necessário para reorientação depende do tamanho da molécula -

moléculas maiores levarão mais tempo para se reorientar e, conseqüentemente, haverá maior mobilidade e migração da molécula (LAHTI, 1996).

Após a separação das moléculas no gel, os resultados podem ser analisados a partir do perfil de bandas obtido. Quando os padrões de banda do DNA são semelhantes, ou seja, quando duas amostras diferentes apresentam o mesmo padrão de corrida no gel, as amostras são consideradas como sendo iguais. Já se o padrão de banda do DNA for diferente, as amostras são consideradas diferentes (SINGH *et al.*, 2012).

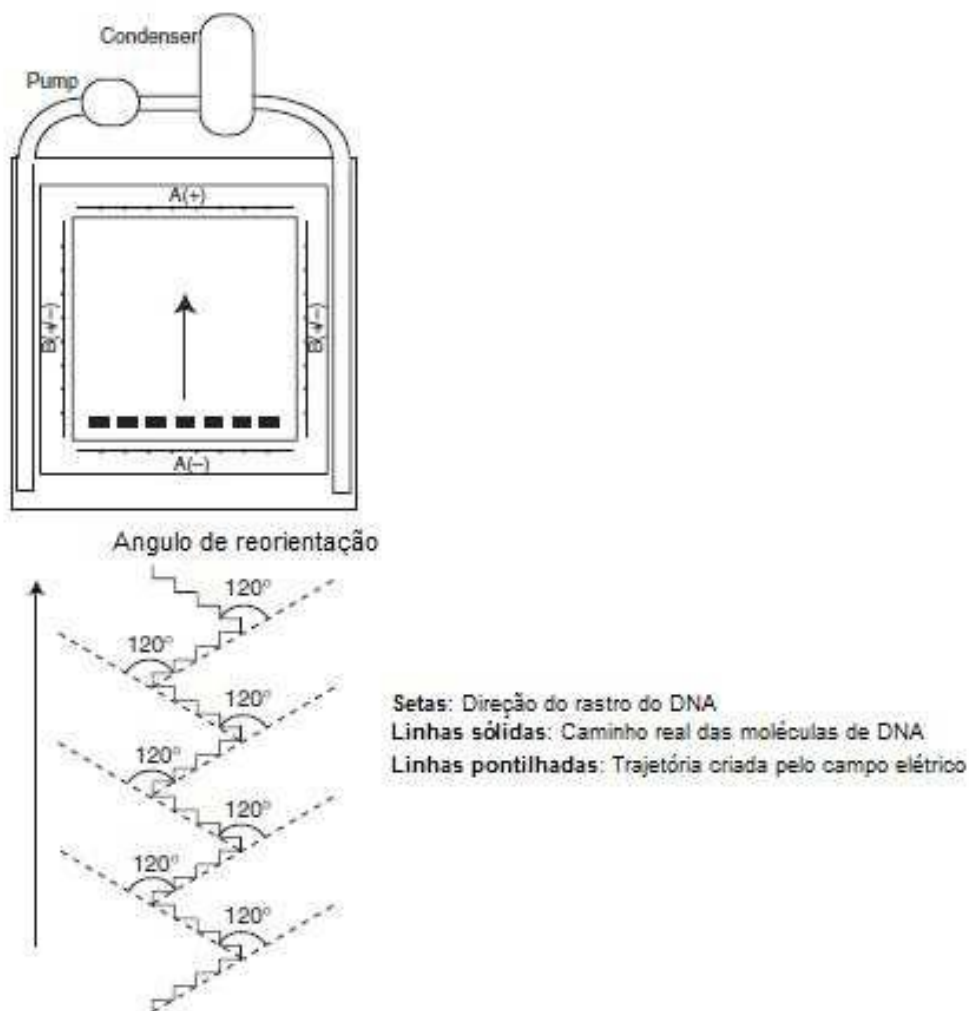


Figura 5: Aparato de PFGE. Adaptado de Herschleb, Ananiev e Schwartz, 2007.

1.3.2.1.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

A técnica de RFLP é baseada nos padrões únicos dos sítios das nucleases de restrição, pela clivagem de moléculas de DNA em regiões específicas. Cada enzima reconhece uma sequência única de nucleotídeos na fita de DNA. Essa sequência é polindrômica, ou seja, a fita complementar do DNA tem a mesma sequência na direção inversa – isso permite que o DNA seja cortado na mesma região pela enzima. Os fragmentos gerados pela clivagem são então separados por eletroforese para determinar o número e tamanho dos mesmos (SINGH *et al.*, 2012).

O isolamento de DNA suficiente para a análise de RFLP consome muito tempo e exige muito trabalho. Portanto essa técnica tem sido combinada ao PCR convencional, de forma que o material genético é amplificado antes de sofrer digestão das enzimas do RFLP, permitindo um maior número de análises em menor tempo (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014).

1.3.2.1.8. Random Amplified Polymorphic DNA

A reação de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) é uma técnica molecular baseada em PCR utilizada para estudar os padrões polimórficos do DNA. O *primer* do RAPD é desenhado com sequência arbitrária, de forma que sequências aleatórias e desconhecidas do DNA alvo sejam amplificadas, sendo assim, não é necessário um conhecimento prévio da sequência do DNA alvo (VALENTINI *et al.*, 1996; RANDAZZO, CAGGIA, NEVIANI, 2009).

Para que a amplificação aconteça, a posição de emparelhamento do *primer* nas fitas complementares é essencial. Ele não pode emparelhar muito distante um do outro e suas porções 3' devem estar em direções opostas (SINGH *et al.*, 2012; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014).

Essa técnica tem sido considerada como valiosa, pois além de mais rápida e menos onerosa que outras técnicas (por exemplo, PFGE), é útil para a distinção de diferentes cepas da mesma espécie, com alto nível de discriminação dessas cepas (SINGH *et al.*, 2012; RANDAZZO, CAGGIA, NEVIANI, 2009). O método mais utilizado para análise dos produtos de amplificação dessa técnica é a eletroforese, que revelará

padrões de bandas diferentes para os diferentes produtos de amplificação (VALENTINI *et al.*, 1996; DAVIS *et al.*, 1995).

1.3.2.1.9. Repetitive Sequence based-PCR (Rep-PCR)

A técnica de Rep-PCR *fingerprint* consiste na amplificação dos segmentos contidos entre sequências repetidas intercaladas não-codificantes mais extensas ao longo do DNA bacteriano, por exemplo (VERSALOVIC, BRUIJN, LUPSKI, 1998).

1.4. REVISÃO SISTEMÁTICA: MÉTODO DE PESQUISA PARA O USO DE EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS

A revisão é uma forma de pesquisa que utiliza fontes de informações bibliográficas para obtenção de resultados de pesquisa de outros autores, com o objetivo de fundamentar teoricamente um determinado tema. Os artigos de revisão dividem-se em duas categorias: revisão narrativa e revisão sistemática, sendo esta última subdividida em outras 4 categorias (BOTELHO, CUNHA, MACEDO, 2011; SAMPAIO, MANCINI, 2007) (Figura 6).

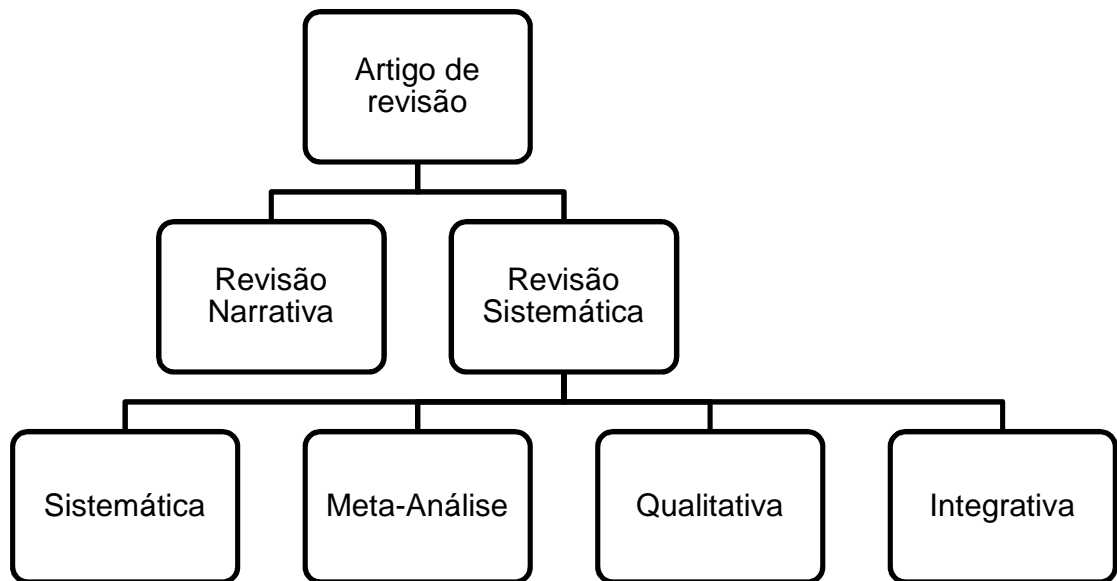


Figura 6: Tipos de revisão da literatura. Adaptado de Botelho, Cunha, Macedo, 2011

Embora ambas sejam denominadas revisão, as características e objetivos apresentados por cada uma são distintos.

A revisão narrativa seria considerada a revisão bibliográfica tradicional, na qual um assunto específico é descrito de modo teórico ou contextual. Neste tipo de revisão a estrutura é diferente de um artigo original, uma vez que não apresenta metodologia de busca de referências e critérios (inclusão e exclusão) usados na seleção dos trabalhos, não permitindo reprodutibilidade (BOTELHO, CUNHA, MACEDO, 2011).

As revisões sistemáticas são empregadas para evitar vieses e fornecer resultados mais objetivos, facilitando a síntese da conclusão sobre determinado tema (LINDE, WILLICH, 2003; SAMPAIO, MANCINI, 2007). Para executar esse tipo de revisão algumas etapas devem ser consideradas como: definição do objetivo pautado em uma pergunta norteadora, identificação da literatura e a escolha dos critérios de inclusão e exclusão de artigos, para coletar e analisar os dados dos estudos incluídos (BOTELHO, CUNHA, MACEDO, 2011; SAMPAIO, MANCINI, 2007).

É importante salientar que as revisões são estudos retrospectivos e secundários, sendo assim, a qualidade da fonte primária influencia diretamente na qualidade da revisão (LINDE, WILLICH, 2003; SAMPAIO, MANCINI, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, processos fermentativos vão muito além das práticas artesanais e da ciência empírica, alcançando escala industrial com aplicação tecnológica. Os micro-organismos podem ser considerados agentes destes processos e, além de serem importantes para a obtenção dos produtos fermentados, a qualidade sensorial, aroma e sabor adequado dependerá da microbiota envolvida. Com isso, o uso métodos de detecção e identificação dos micro-organismos faz-se necessário. No entanto, técnicas convencionais de identificação microbiológica e bioquímica são limitadas, uma vez que estas são cultura-dependentes. Baseando-se na importância do tipo de micro-organismo envolvido na obtenção de um produto alimentício, na influência da qualidade do produto obtido a partir da ação deste, nas limitações de técnicas usuais para identificação de micro-organismos e o fato que o uso de evidências científicas tem sido um norteador na escolha de ações, torna-se necessário estudos sobre o desenvolvimento de técnicas cultura-independentes e a aplicabilidade dessas ferramentas na investigação detalhada da biodiversidade microbiana e seu impacto na microbiologia dos alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar dados da literatura sobre o desenvolvimento e aplicação de técnicas de identificação microbiana cultura-independentes e seu possível uso na área de alimentos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer uma revisão sistemática acerca do uso de ferramentas da biologia molecular empregadas na Microbiologia, determinando critérios de inclusão e exclusão;
- Determinar as ferramentas da biologia molecular podem ser aplicadas em processos fermentativos visando o controle de qualidade microbiológico e sensorial de produtos alimentícios como vinho e cerveja;
- Analisar o nível dos estudos incluídos, aplicabilidade dos métodos propostos por estes e seus resultados;

4. METODOLOGIA

Visando atender o objetivo proposto neste estudo, selecionamos o método de revisão sistemática, a qual utiliza como fonte de dados a literatura sobre determinado tema, mediante aplicação de uma busca criteriosa com apreciação crítica e síntese da informação obtida (SAMPAIO, MANCINI, 2007).

A pergunta norteadora deste trabalho foi: “Técnicas baseadas em biologia molecular podem ser métodos de escolha para avaliação do controle de qualidade microbiológico e sensorial de vinhos e cervejas?”

Para elaboração da introdução e dados complementares ao estudo, foram utilizados livros e artigos, usados de modo independente à metodologia de análise.

A base de dados utilizada para a busca de artigos foi o *ScienceDirect*, onde foi aplicada uma metodologia sistemática de busca. As palavras-chaves utilizadas na busca bibliográfica foram: “molecular biology tools, quality control, microorganisms, food”, “molecular biology tools, quality control, microorganisms, wine” e “molecular biology tools, quality control, microorganisms, beer”.

As etapas para esse levantamento bibliográfico foram: definição da pergunta norteadora, busca na literatura, definição dos critérios de inclusão e exclusão, avaliação dos estudos encontrados, levantamento e interpretação dos resultados e compilação dos resultados obtidos. Durante a busca na literatura, os artigos foram selecionados pelo

título, resumo e palavras-chave. Os critérios de inclusão foram: artigos completos e que utilizaram métodos de biologia molecular para avaliar a qualidade de cervejas e vinhos. Foram excluídos os artigos sobre estudos relacionados a microbiologia ambiental, segurança alimentar (quando o foco do artigo era sobre micro-organismos patogênicos e toxinas), artigos de revisão e estudos os quais abordavam alimentos que não cerveja e vinho.

As informações extraídas dos artigos incluídos foram a aplicabilidade de ferramentas de biologia molecular para controle de qualidade de cervejas e vinhos, quais eram esses métodos (com a confiabilidade dos resultados apresentados) e se esses podem vir a substituir métodos tradicionais de controle de qualidade, como aqueles denominados “cultura-dependentes”.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DA METODOLOGIA DE PESQUISA

A pesquisa foi realizada no período de 24 a 28 de Fevereiro de 2014 na base de dados *ScienceDirect*. Após a busca na literatura, foram selecionados 97 artigos (Tabela 2).

Como é possível observar, com os termos de busca “molecular biology tools, quality control, microorganisms, food” foram selecionados 22 artigos originais, enquanto a utilização de “molecular biology tools, quality control, microorganisms, wine” resultou em 14 artigos e “molecular biology tools, quality control, microorganisms, beer”, também em 14 artigos.

Todos os artigos encontrados com os termos “molecular biology tools, quality control, microorganisms, food” que cumpriam os critérios de inclusão e exclusão também foram encontrados quando utilizado os outros termos de pesquisa.

Tabela 2. Artigos selecionados após levantamento bibliográfico

Palavras-chaves	Fonte Bibliográfica			Total
	Capítulos de Livros	Artigo de Revisão	Artigo Original	
<i>Molecular biology tools, quality control, microorganisms, food</i>	11	19	22	52
<i>Molecular biology tools, quality control, microorganisms, wine</i>	1	4	14	19
<i>Molecular biology tools, quality control, microorganisms, beer</i>	3	9	14	26

Os artigos de revisão e capítulos de livros foram eliminados, visando cumprir um dos critérios de exclusão, ou seja, a não utilização de artigos que não fossem originais, restando 50 estudos (Figura 7).

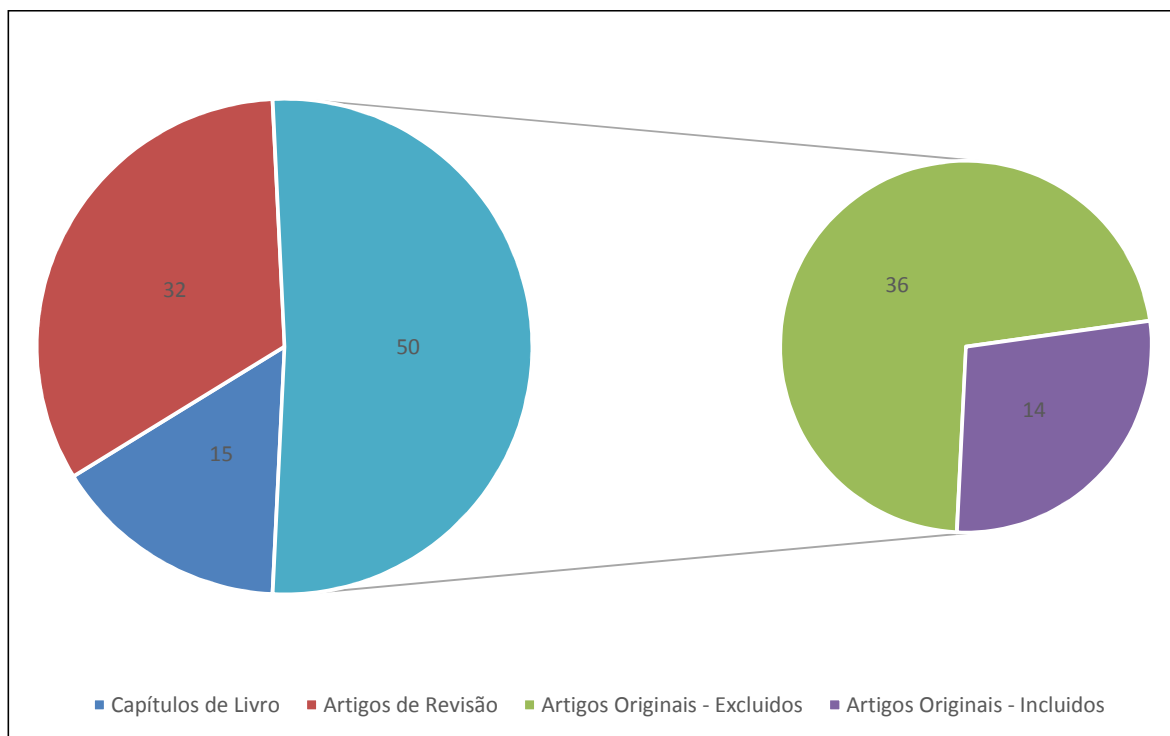


Figura 7: Categoria de estudos encontrados

Ao final da aplicação dos critérios de exclusão estabelecidos e de seleção dos estudos, estes foram reduzidos a apenas 14 artigos, os quais foram analisados (Tabela 3).

Dentre os 14 artigos analisados, 12 artigos foram encontrados com os termos “molecular biology tools, quality control, microorganisms, wine” e 2 artigos com os termos “molecular biology tools, quality control, microorganisms, beer”.

Tabela 3. Artigos analisados

Título	Técnica empregada	Referência
<i>Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must</i>	PCR-RFPL da região 5.8S-ITS	Clemente-Jimenez <i>et al.</i> , 2004
<i>Biodiversity study of wine yeast belonging to the “terroir” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed Saccharomyces cerevisiae strains exhibiting atypical andu nique 5.8S-ITS restriction patterns</i>	PCR-RFPL da região 5.8S-ITS rRNA, RAPD-PCR, Sequenciamento da região D1/D2 do fragmento 26S do rRNA	Tofalo <i>et al.</i> , 2014
<i>Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina</i>	PCR-RFLP da região 5.8S-ITS	Combina <i>et al.</i> , 2005
<i>Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR</i>	Multiplex PCR; nSAPD-PCR; SAPD-PCR	Petri <i>et al.</i> , 2013
<i>Biological diversity of Saccharomyces yeasts of spontaneously fermenting wines in four wines regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis</i>	PCR-RFPL; Cariotipagem eletroforética	Csoma <i>et al.</i> , 2010
<i>Indigenous lactic acid bacteria communities in alcoholic and malolatic fermentations of Tempranillo wines elaborated in ten wineries of La Rioja (Spain)</i>	PCR; PFGE	González-Arenzana <i>et al.</i> , 2013
<i>The genome of wine yeast Dekkera bruxellensis provides a tool to explore its food-related properties</i>	Sequenciamento genético	Piskur <i>et al.</i> , 2012
<i>Wine yeast molecular typing using a simplified method for</i>	PCR fingerprinting; Northern blot	Maqueda <i>et al.</i> , 2010

simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA

Yeast diversity investigation of wine-related samples from two different Slovakian wine-producing areas through a multistep procedure

f-ITS PCR e sequenciamento da região ITS1-5.8s rDNA-ITSII

Kraková *et al.*, 2012

Role of non-Saccharomyces yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of Hanseniaspora uvarum as a starter culture

PCR-RFPL da região ITS1-5.8S-ITSII

Hong e Park, 2013

Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations

PCR-RFLP da região 26S rDNA; sequenciamento da região D1/D2 do rDNA

Couto, Reizinho e Duarte, 2005

*Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine*

Real-time PCR

Willenburg e Divol, 2012

Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum

Real-time PCR

Haakensen *et al.*, 2008

Application of Rep-PCR Fingerprint in rapid identification of beer-spoilage bacteria

Rep-PCR

Zhu *et al.*, 2006

Dentre os artigos analisados, todos foram publicados em revistas internacionais sendo: 6 publicados na *International Journal of Food Microbiology*, 5 na *Food Microbiology*, 1 na *Food Research International*, 1 na *LWT - Food Science and Technology* e 1 na *Chinese Journal of Biotechnology*. Os dois periódicos com maior número de publicações, selecionados para essa revisão, são os que apresentam o maior fator de impacto, sendo: *International Journal of Food Microbiology* igual a 3,115; *Food Microbiology* igual a 3,374. As demais revistas, a partir das quais os artigos

encontrados atenderam o critério de inclusão desta revisão, também apresentaram um elevado fator de impacto: *Food Research International* com fator de impacto de 3,050 e *LWT–Food Science and Technology* de 2,468, enquanto o fator de impacto do *Chinese Journal of Biotechnology* não foi encontrado. Para esta última revista, no entanto, foi encontrado o indicador SJR (Scimago Journal Rank), que é igual a 0,160. O SJR mede o impacto de citações contextuais baseado no número total de citações de um determinado assunto, ou seja, expressa o quão específico um artigo do periódico é em relação a discussão científica global (Figura 8).

A área de escopo dessas revistas é parecida, sendo os assuntos de interesse de publicação relacionados à química de alimentos; incidência, comportamento e tipos de micro-organismos encontrados em alimentos e bebidas; deterioração de alimentos; micro-organismos envolvidos em fermentação de alimentos e bebidas, aspectos microbiológicos da qualidade e deterioração de alimentos, entre outros. Os pré-requisitos para publicação nessas revistas são artigos com informações inovadoras e que elevem a qualidade científica da área.

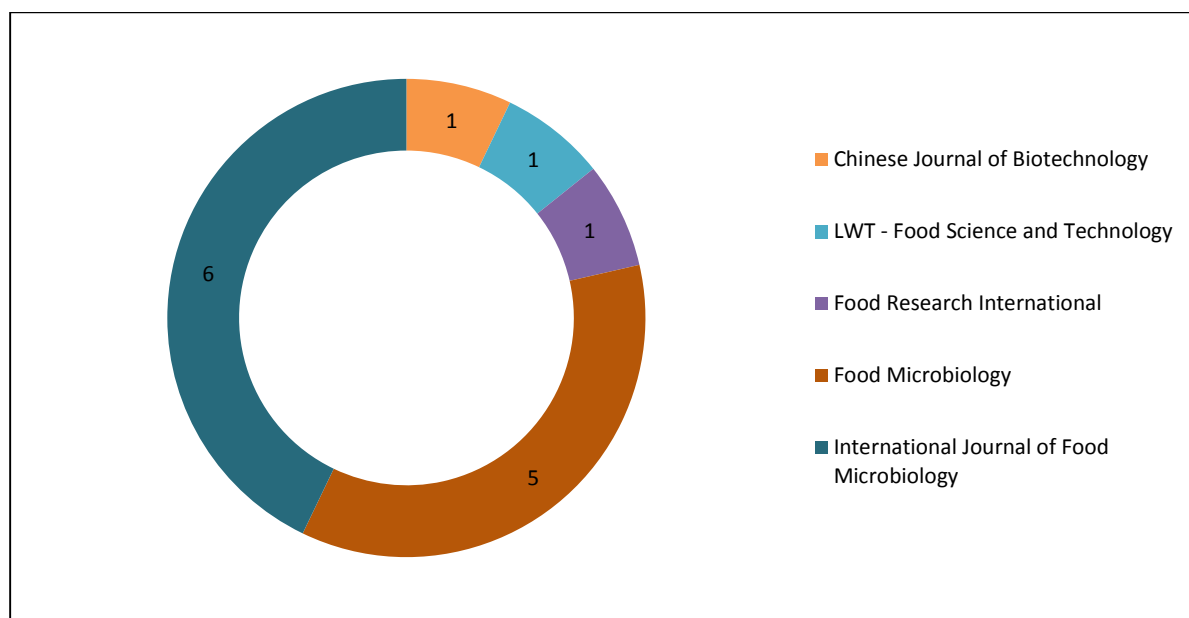


Figura 8. Revistas científicas onde os estudos analisados foram publicados

Foi possível, também, observar que a maior parte dos artigos foram publicados nos últimos 5 anos, ou seja, nos anos de 2010, 2012, 2013 e 2014 obtivemos um total de 9 artigos analisados, enquanto os outros 5 artigos foram publicados em anos anteriores, mais ainda considerados recentes (Figura 9).

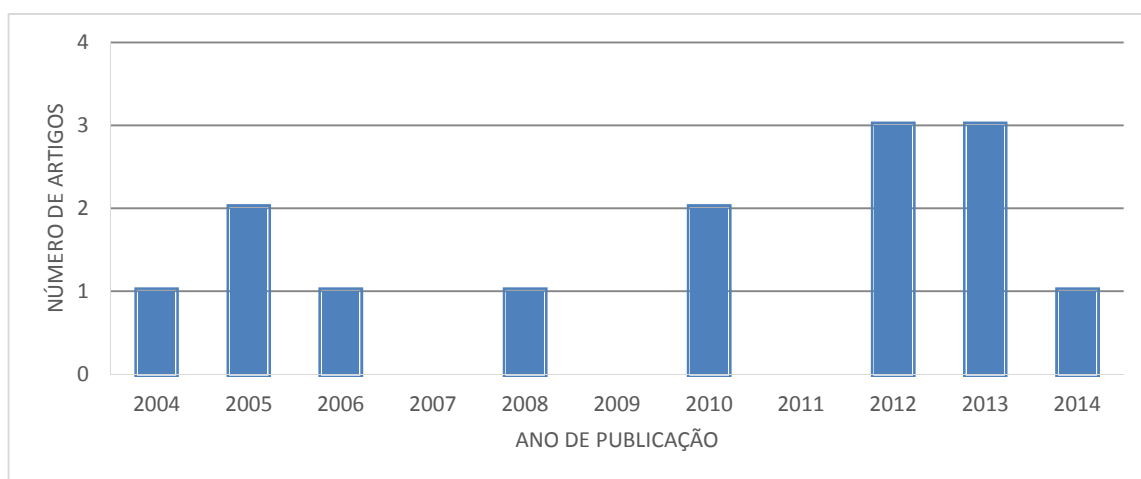


Figura 9: Tendência de publicação de artigos que apresentam métodos cultura-independentes na análise da microbiota presente em processos fermentativos (vinho e cerveja)

5.2. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS CULTURA-INDEPENDENTES NO CONTROLE DE QUALIDADE DO VINHO

A maior parte dos estudos analisados utilizaram a técnica de PCR para amplificação do material genético. Alguns autores, inclusive, combinaram diferentes técnicas baseadas em PCR, como Haakensen *et al.* (2008), que combinaram qPCR com multiplex PCR e Petri *et al.* (2013), que utilizaram PCR, multiplex PCR e nPCR.

Os produtos obtidos pela amplificação de PCR foram analisados de diferentes formas. Clemente-Jimenez *et al.* (2004), Combina *et al.* (2005), Couto, Reizinho, Duarte (2005), Csoma *et al.* (2010), Hong, Park (2013) e Tofalo *et al.* (2014) utilizaram o

método RFLP para fazer a digestão dos amplicons e seguir com eletroforese para identificação dos produtos. Esses autores, com exceção a Couto, Reizinho, Duarte (2005), utilizaram o segmento entre 18S e 28S RNA para a amplificação da sequência de DNA alvo dos isolados, pois esse segmento apresenta a região ribossomal 5.8S, altamente conservada, e também uma zona variável, que é a região *ITS* (*Internal Transcribed Space*). A combinação dessas duas regiões no mesmo fragmento a torna útil para estudos com diferentes níveis de classificação taxonômica. Já Couto, Reizinho, Duarte (2005) utilizaram a região 26S do rRNA para monitorar a diversidade de espécies de leveduras durante a fermentação do vinho.

Como mencionado anteriormente, a fermentação do vinho é complexa em termos de presença de múltiplos micro-organismos e substituição desses durante o processo fermentativo. Combina *et al.* (2005) e Clemente-Jimenez *et al.* (2004) tiveram interesse em avaliar a dinâmica das leveduras selvagens durante a fermentação espontânea de vinhos de duas regiões distintas: Mendoza, na Argentina e Valle del Andarax, na Espanha, respectivamente. Nestes dois trabalhos, os autores amplificaram a região entre 18S rRNA e 28S rRNA por PCR e os genes amplificados foram tratados com enzimas de restrição (RFLP) para identificação das espécies de leveduras. A análise do perfil de restrição desses amplicons teve elevada correlação com o método convencional de identificação, sendo capaz de analisar corretamente a maioria dos isolados a respeito do gênero e da espécie. Combina *et al.* (2005) alegaram que a maioria dos resultados obtidos pela análise do padrão 5.8S-*ITS* apresentaram boa confiabilidade para identificação das leveduras isoladas, no entanto outras técnicas de identificação devem ser utilizadas, principalmente se o padrão 5.8S-*ITS* de algum isolado não tiver sido previamente descrito. Isso ocorreu com a identificação da espécie *Candida bombi*, a qual não tinha seu padrão de 5.8S-*ITS* descrito. Esses autores, além de avaliarem as características morfológicas, sexuais e fisiológicas (método cultura-dependente), foram capazes de descrever um padrão do amplicon 5.8S-*ITS* da *C. bombi*.

A amplificação por PCR da região 5.8S-*ITS* com posterior análise RFLP também foi o método escolhido por Clemente-Jimenez *et al.* (2004) e, após a digestão

enzimática dos amplicons, sete perfis diferentes foram obtidos. Seis perfis foram identificados após comparação da massa molecular dos produtos de restrição com padrões previamente descritos, sendo identificadas as seguintes leveduras: *Candida stellata*, *Issatchenkia terrícola*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum*. Visando identificar o sétimo perfil e confirmar a identidade das leveduras já determinadas pela análise do padrão de restrição, os produtos de PCR dos sete grupos foram sequenciados e comparados com as sequências de DNA disponíveis nas bases de dados. O sétimo perfil foi identificado como *Issatchenkia orientalis*. Como confirmação final dos resultados obtidos por Clemente-Jimenez *et al.* (2004), a mesma metodologia de PCR-RFLP da região 5.8S-ITS foi aplicada a sete espécies certificadas, obtidas do *Spanish Type Culture Collection* e do *American Type Culture Collection* (ATCC), resultando em tamanhos de amplificação e perfis de restrição em concordância com o obtido da amostra.

Couto, Reizinho, Duarte (2005) e Hong, Park (2013) afirmam que, apesar de rapidamente substituídas, as leveduras selvagens não-*Saccharomyces* participam da fermentação do vinho, tendo elevada influência sobre o sabor e aroma do produto final, uma vez que estas são as maiores responsáveis pela produção de compostos secundários, resultando em um tipo único de vinho. Nesses dois estudos, os pesquisadores fizeram uso de métodos moleculares para avaliar e caracterizar as leveduras não-*Saccharomyces* durante a fermentação do vinho.

Couto, Reizinho, Duarte (2005), realizaram a caracterização morfológica das leveduras, gerando 13 perfis diferentes de colônias. Além disso, utilizaram PCR para amplificar a região 26S do rDNA submetendo os amplicons à digestão enzimática e, visando validar os resultados obtidos, os autores fizeram sequenciamento da região D1/D2 dos segmentos amplificados, sendo as sequências obtidas comparadas às disponíveis no *GenBank*. A digestão enzimática resultou em 19 perfis diferentes, com variação de 1 a 49 no número de cepas de cada perfil. Para validação dos perfis encontrados e identificação dessas cepas, foram isoladas 3 cepas aleatoriamente dos 5 perfis com maior número de cepas, e dos demais perfis, somente uma cepa foi isolada. A partir dessas, fez-se o sequenciamento da região D1/D2. As espécies das cepas

identificadas foram: *Hanseniaspora uvarum* NRRL Y-1614, *Torulaspota delbrueckii* CBS 133, *Candida cf stellata* 10-372, *Candida* sp. JW01-7-11-2-1-y2, *Zygoascus hellenicus* NRRL Y-17139, *Pichia kluyveri* NRRL Y-11519, *Saccharomyces ludwigii* NRRL Y-12793, *Issatchenkia hanoiensis* UWO HBI1.3.13, *Zygosaccharomyces bailii* NRRL Y-2227, *Candida diversa* NRRL Y-5713, *Hanseniaspora vineae* NRRL Y-17529, *Schizosaccharomyces pombe* NRRL Y-12796, *Issatchenkia terricola* NRRL YB-4310, *Issatchenkia occidentalis* NRRL Y-7552, *Candida valida* CBS 638, *Candida cantarellii* NRRL Y-17650 e *Kluyveromyces thermotolerans* NRRL Y-8284. Esses autores defendem que a técnica utilizada nesse trabalho aparenta ser um método confiável para diferenciar as espécies de leveduras do vinho, uma vez que os resultados foram validados pelo sequenciamento da região D1/D2, definido como o mais adequado para identificação de leveduras.

Já o objetivo de Hong, Park (2013) foi analisar a diversidade de leveduras nas uvas coreanas durante a fermentação espontânea do vinho obtido de *Vitis labrusca*, bem como identificar as leveduras que poderiam vir a elevar a qualidade do vinho. Os autores isolaram e cultivaram as espécies e, após análise fenotípica, seguiram com a técnica de PCR e PCR-RFLP da região *ITSI-5.8S-ITSII*. Além disso, uma análise filogenética que comparou a sequência de nucleotídeos da região amplificada com o banco de dados *GenBank* foi efetuada. A técnica de PCR-RFLP da região *ITSI-5.8S-ITSII* revelou dois tipos diferentes de padrão de restrição das leveduras: um no estágio inicial da fermentação e outro no estágio final. Essa mudança de perfil de restrição aconteceu entre o dia 8 e 10 de fermentação, justamente o período de maior consumo do açúcar do meio e produção de álcool. Depois desse período, o perfil de PCR foi dominante para a mesma levedura, a *Saccharomyces cerevisiae* W-3. A análise filogenética de 20 cepas isoladas revelou que todas estavam próximas à *Hanseniaspora uvarum*. Essa espécie de levedura, junto com a *Hanseniaspora guillermondii* são as não-*Saccharomyces* mais encontradas em uvas *Vitis vinifera*. No entanto na *Vitis labrusca*, somente a *H. uvarum* estava presente.

Kraková *et al.* (2012), Csoma *et al.* (2010) e Tofalo *et al.* (2014) estudaram a biodiversidade das leveduras dos vinhos. Enquanto Csoma *et al.* (2010) e Tofalo *et al.*

(2014) tinham como objetivo avaliar a diversidade de espécies das cepas de *Saccharomyces*, Kraková *et al.* (2012) foi mais abrangente na análise da biodiversidade.

Kraková *et al.* (2012) isolaram as leveduras de várias amostras diferentes: uvas, fase inicial da fermentação, 7-10 dias de fermentação e fase final da fermentação. Neste trabalho, o procedimento proposto pelos autores foi analisar essas leveduras em multi-etapas, sendo a primeira etapa o cultivo combinado ao de PCR de fluorescência da região *ITS* (f-*ITS* PCR) e, por fim, uma etapa de identificação através do sequenciamento da região *ITS*I-5.8S- *ITS*II do rDNA das leveduras selecionadas. Das leveduras isoladas pelo método de cultivo, 430 foram aleatoriamente escolhidas e analisadas pelo f-*ITS* PCR. Esse método focou na amplificação do fragmento *ITS*II somente e, além de reduzir o número de isolados, resultou em padrões diferentes para cada espécie isolada. A identificação completa foi alcançada através da amplificação e sequenciamento da região *ITS*I-5.8S-*ITS*II, que abrange mais do que o fragmento *ITS*II utilizado previamente. As leveduras identificadas por esse método foram: *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia* sp., *Metschnikowia chrysoperlae*, *Pichia fermentans*/*P. kluyveri*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Saccharomycopsis vini*, *Saccharomyces cerevisiae*/*S. boulardii* e *Torulaspora delbruekii*. Os autores afirmam que quando várias cepas são isoladas, é útil possuir uma estratégia de análise confiável capaz de selecionar a microbiota de forma rápida, e que a proposta da metodologia multi-etapas pode ser empregada de forma rotineira para esse tipo de análise, pois os resultados não são avaliados de modo ambíguo.

Csoma *et al.* (2010) tiveram como objetivo caracterizar a composição da população de *Saccharomyces*, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (também denominada *Saccharomyces bayanus* var *uvarum*), durante a fermentação espontânea de vinhos da Hungria. Eles combinaram a utilização de métodos de identificação de propriedades fisiológicas, cariotipagem eletroforética e PCR-RFLP. Nas amostras recolhidas na fase inicial de fermentação, foram observadas colônias de leveduras de diferentes tamanhos, cores e morfologia, mas com o progresso da fermentação, a morfologia das colônias foram gradualmente se tornando

homogêneas, indicando a morte ou eliminação por competição de certos tipos de leveduras. Esses métodos morfológicos não são capazes de diferenciar espécies de *Saccharomyces* entre si, sendo assim, os autores só os utilizaram para caracterização inter-espécie, e aplicaram os métodos moleculares para identificar as espécies de *Saccharomyces* presentes a partir de 86 isolados escolhidos aleatoriamente. Para identificação desses 86 isolados, Csoma *et al.* (2010) utilizaram PCR-RFLP de três regiões diferentes: *ITSI-5.8S-ITSII* do rRNA, o segmento NTS 2 e o gene cromossomal *MET2*. As enzimas de restrição utilizadas foram a *HaeIII*, *BanI*, *PstI* e *EcoRI*, específicas para cada região. A *HaeIII* diferencia as espécies *Saccharomyces cerevisiae* da *Saccharomyces uvarum* pois cliva a região *ITSI-5.8S-ITSII* do rRNA da primeira em 4 fragmentos, enquanto a segunda espécie é clivada em 3 fragmentos. A *BanI* é capaz de diferencia-las pois só cliva o segmento NTS 2 da *S. uvarum*. Já as enzimas *PstI* e *EcoRI* são utilizadas para distinção dessas espécies, pois a primeira cliva o gene *MET2* somente da *S. uvarum*, enquanto a segunda cliva somente esse gene da *S. cerevisiae*. A combinação desses testes foi capaz de separar os isolados em 2 grupos, sendo a maioria dos isolados pertencentes a *S. cerevisiae* e somente 8 cepas apresentaram o padrão de bandas idênticos àqueles da *S. uvarum*. De forma a completar a identificação taxonômica, foi feita a cariotipagem desses 8 isolados. Sete deles apresentaram o perfil de cariotipagem eletroforética similar com aqueles disponíveis de *S. uvarum*. O oitavo isolado apresentou essa característica cariotípica menos aparente do que os outros 7, mas ainda assim seu padrão cariotípico teve mais relação com a espécie *S. uvarum* do que com a *S. cerevisiae*. Tais resultados obtidos pelos métodos moleculares evidenciaram que os métodos de caracterização fisiológica para diferenciação entre as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* são muito variáveis e podem fornecer uma identificação taxonômica ambígua na ausência dos testes moleculares. Além disso, a confirmação da identificação das espécies por cariotipagem eletroforética corroborou com os resultados encontrados pelo PCR-RFLP, demonstrando que esse método pode ser aplicado de forma satisfatória para identificação em nível de espécies.

O objetivo de Tofalo *et al.* (2014) foi caracterizar a comunidade de leveduras das uvas da região de Moltepulciano d'Abruzzo, visando criar um banco de dados de *S. cerevisiae*, fornecendo dados e propriedades enológicas para potencial aplicação industrial. Ao final da fermentação de todas as amostras, foram isoladas 430 leveduras. Testes morfológicos e fisiológicos foram utilizados para classificação geral do coletado e 35 leveduras isoladas foram classificadas como não-*Saccharomyces*, sendo excluídas dos ensaios. Para garantir que as outras cepas pertenciam ao gênero *Saccharomyces*, esses autores realizaram uma análise por PCR-RFLP da região 5.8S-ITS do rRNA, que gerou dois perfis de padrão de restrição diferentes. Enquanto 381 leveduras resultaram no padrão de restrição clássico da *S. cerevisiae*, 14 leveduras geraram um padrão de restrição diferente do esperado. Para determinar a razão desses perfis diferentes, a região 5.8S-ITS de 3 cepas (duas pertencentes ao padrão inesperado e uma pertencente ao padrão clássico) foi novamente amplificada e as bandas obtidas foram sequenciadas e, nas cepas com padrão de restrição diferente, foi encontrada uma mutação na região ITS1, que permitiu a inserção de outro sítio de clivagem para a enzima de restrição utilizada, gerando o perfil de bandas diferente. As 395 cepas de *S. cerevisiae* foram submetidas a técnica de RAPD-PCR para avaliar a diversidade de cepas entre os isolados, resultando em 3 grandes grupos. A reprodutibilidade dos ensaios e condições do PCR foi maior que 98% e os padrões de banda que tiveram nível de similaridade superiores a 97%, foram considerados biótipos. O RAPD-PCR permitiu uma melhor discriminação das cepas de *S. cerevisiae*.

Como já mencionado na introdução, além da fermentação alcoólica, o vinho conta também com a fermentação malolática, exercida pelas bactérias ácido lácticas (LAB). Até o momento 25 espécies de LAB, pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* foram isoladas do mosto e do vinho. Apesar do papel positivo que estas exercem no produto final, algumas LAB são responsáveis pela produção de vários tipos diferentes de deterioração de vinhos. Dentro desse contexto, é importante a rápida identificação dessas bactérias, e Petri *et al.* (2013) e González-Arenzana *et al.* (2013) utilizaram métodos moleculares para avaliação e identificação das LAB comumente encontradas no vinho.

Petri *et al.* (2013) desenvolveram um método de multiplex PCR para detectar e identificar essas bactérias. Inicialmente, eles fizeram um SAPD-PCR (método derivado do RAPD-PCR que utiliza sequências polimórficas específicas do DNA, não sequências aleatórias) e, com os amplicons do SAPD-PCR, eles fizeram um *nested* SAPD-PCR (nSAPD-PCR) e analisaram os amplicons dessas duas ampliações em eletroforese. Com o SAPD-PCR eles obtiveram os padrões de banda característicos para as espécies de LAB, enquanto o nSAPD-PCR distinguiu entre as cepas de uma mesma espécie. Bandas específicas, tanto do SAPD- quanto do nSAPD-PCR foram selecionadas para a elaboração dos *primers* SCAR (*sequence characterized amplified regions*) específicos do multiplex PCR para detecção das espécies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus* e *Weissella paramesenteroides*. Treze *primers* SCAR foram gerados. SCAR são fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando *primers* específicos de 15-30pb desenhados a partir de sequências de nucleotídeos estabelecidas por fragmentos amplificados por RAPD. No entanto, nesse caso, os *primers* SCAR foram baseados nas sequências específicas de diferentes bandas nSAPD-PCR. A especificidade desses *primers* SCAR foram testadas em espécies intimamente relacionadas de LAB, assim como com espécies de bactérias ácido acéticas e também com a *S. cerevisiae*, não emparelhando com nenhum desses micro-organismos. Além disso, esses *primers* apresentaram temperatura de emparelhamento similares e não foram complementares entre si, características que torna possível o seu uso para sistemas de multiplex PCR. O método proposto permitiu a identificação rápida e simultânea de 13 espécies de LAB frequentemente encontradas no mosto ou vinho. Por causa da sua simplicidade, esse método pode ser muito conveniente para uso em laboratórios de análise de vinhos, além disso, o limite de detecção determinado para esse método é apropriado para o uso prático.

González-Arenzana *et al.* (2013) analisaram a diversidade das LAB e também as diferentes cepas de *Oenococcus oeni* durante a fermentação alcoólica e malolática para

detectar como elas se desenvolvem e qual é predominante. Amostras de vinhos de 10 vinícolas diferentes foram coletadas em diferentes fases da vinificação de dois a três anos consecutivos. Após isolamento e cultivo das bactérias, foi feita a identificação das espécies, tanto por métodos convencionais (morfologia, coloração de Gram e reação da catalase), quanto por métodos moleculares (baseados em PCR). As diferentes cepas de *Oenococcus oeni* foram identificadas por PFGE utilizando duas enzimas de restrição (*SfiI* endonuclease e *Apal*). Das 11 diferentes espécies identificadas, 7 delas pertenciam ao gênero *Lactobacillus*, e a maior parte dessas bactérias foi detectada durante a fermentação alcoólica. Já a *O. oeni* foi detectada durante todo o processo de fermentação, sendo a espécie predominante ao final da fermentação alcoólica, seguida pela *L. plantarum* e *L. mali*. A identificação de cepas da *O. oeni* foi alcançada com sucesso nesse estudo através da utilização de PFGE. Cada cepa foi caracterizada por um perfil de PFGE. A análise de *cluster* (agrupamentos) e inspeção visual dos padrões do PFGE de 925 cepas de *O. oeni* revelou 112 padrões sem relação. Desses 112 padrões sem relação, 60% apareceram somente em um estágio da vinificação, enquanto os outros 40% foram isolados em mais de um estágio e, apesar de 15 padrões terem sido isolados tanto na fermentação alcoólica quanto na fermentação malolática, nenhum foi encontrado em todas as fases dessas fermentações. Além disso, foi capaz de identificar que dos 112 genótipos definidos pelo PFGE, 99 eram únicos a particular subzona de vinificação. Esses resultados sugerem que a microbiota de LAB poderia ser, inicialmente, coincidente em ecossistemas de vinificação próximos uns dos outros e que posteriormente ela pode ter sido submetida a um processo de seleção em cada vinícola por conta do processo e condição de vinificação desta. A mesma conclusão se aplica a *O. oeni*, indicando que exista uma microbiota endêmica dessa bactéria bem adaptada as condições específicas dessa região, e uma posterior adaptação dessas no ambiente de vinificação a cada ano.

O foco de pesquisa de Willenburg, Divol (2012) e Piskur *et al.* (2012) foi a levedura *Brettanomyces bruxellensis*, também conhecida como *Dekkera bruxellensis* (fase teleomorfa). Essa levedura além de apresentar elevada produção e tolerância ao etanol, produz compostos fenólicos que podem levar a deterioração do vinho se

presente em grandes quantidades e apresenta resistência ao dióxido de enxofre, principal conservante utilizado no vinho, tornando difícil seu controle. Portanto, esse micro-organismo representa um sério problema para a indústria de vinhos, levando a enormes prejuízos econômicos como consequência da deterioração do produto.

Willenburg, Divol (2012) compararam métodos de qPCR e *primers* descritos na literatura em DNA e mRNA extraídos diretamente de amostras de vinho tinto contaminados artificialmente com *Brettanomyces bruxellensis* e em amostras naturalmente contaminadas. Eles também testaram a capacidade do qPCR detectar *B. bruxellensis* que foram induzidas ao estado VBNC (*viable but not culturable*). Além de 4 vinhos suspeitos de estarem contaminados por *Brettanomyces*, os autores fizeram uma contaminação artificial de outro vinho em escala de 10^6 a 10^1 células.mL⁻¹ e a partir de amostras dessa diluição fizeram a curva padrão para posterior determinação da eficiência do método do PCR pela plotagem dos valores de Ct (*cycle threshold* = limiar do ciclo, ou seja, quantidade de ciclos necessários para que a fluorescência ultrapasse o limiar e fique visível) do qPCR pelo log do número de células em cada diluição. Quatro pares de *primers* para detecção de *B. bruxellensis*, previamente descritos na literatura e com diferentes genes alvos, foram comparados nesse estudo. Os *primers* DBrux F e DBrux R tinham como alvo o domínio D1/D2 da região 26S rRNA; Brett 1 e Brett 2 e Rad1 e Rad2 foram desenhados para amplificar o gene *RAD4* em diferentes locais e o par de *primers* Act 1 e Act 2 desenhados para amplificar o *actin* gene da *B. bruxellensis*. Os *primers* foram capazes de amplificar todas as cepas de *B. bruxellensis* testadas, enquanto não emparelharam com a *Brettanomyces anomalus*, *S. cerevisiae*, e com outras espécies não-*Saccharomyces* testadas. Esses resultados determinaram uma boa especificidade dos *primers* testados. Com a metodologia de qPCR, os limites de detecção foram estabelecidos para os 4 pares de *primers* em 3 cepas diferentes de *B. bruxellensis*. Os ensaios de qPCR mostraram diferentes níveis de sensibilidade, examinados com o DNA e mRNA extraídos das amostras de vinho contaminados artificialmente e suas diluições. Os pares DBrux F e R e Act 1 e 2 apresentaram linearidade na ordem de 5 pontos para todas as cepas, com limite de detecção para DNA e RNA do primeiro par igual a 10^2 células.mL⁻¹ e para o segundo par igual a 10

células.mL⁻¹. Os outros dois pares de *primers* apresentaram linearidade de 3 e 4 pontos somente, com limite de detecção para DNA e RNA igual a 10² células.mL⁻¹ e 10³ células.mL⁻¹, respectivamente, tornando a detecção de micro-organismos em baixa quantidade inviável. Dos 4 pares de *primers*, o Act 1 e 2 foram escolhidos para as análises de *B. bruxellensis* VBNC e para análise dos vinhos naturalmente contaminados. Para a análise de *B. bruxellensis* VBNC, o método de qPCR foi comparado com cultura dos micro-organismos e microscopia fluorescente. Como era de se esperar, as leveduras antes de serem induzidas ao estado VBNC foram identificadas pelos 3 métodos. No entanto, após a indução desse estado pela adição de SO₂ no meio, o método cultura-dependente não foi capaz de detectar a presença desses micro-organismos, pois não houve crescimento destes no meio de cultura. No entanto, a microscopia fluorescente detectou que as leveduras ainda eram viáveis, só não eram capazes de crescer no meio de cultura; resultado similar ao encontrado pela análise por qPCR utilizando os *primers* Act 1 e 2, que identificou a presença dessas células.

A análise dos vinhos suspeitos de estarem naturalmente contaminados foi feita pela adição direta do vinho em meios de cultura e incubação por 7-14 dias. Após esse período de tempo a extração de DNA e mRNA foi feita sem diluição. Não houve crescimento em nenhuma dos meios, no entanto, a análise de qPCR mostrou amplificação de *B. bruxellensis* em todas as amostras, com população estimada tanto pelo DNA quanto pelo mRNA de 10³-10⁴ por vinho. A desvantagem de utilizar DNA em análises de qPCR é que tanto o material das células viáveis quanto o das células já mortas e lisadas serão amplificados, levando a uma estimativa imprecisa da população analisada. Portanto, esse estudo demonstrou que o uso do mRNA como molde para o qPCR foi satisfatório, resultando em uma estimativa precisa do tamanho da população quando comparado a microscopia de fluorescência e meio de cultura, tanto para amostras contaminadas artificialmente, quanto para vinhos naturalmente contaminados.

Piskur *et al.* (2012) tiveram como objetivo determinar a sequência genômica completa da *B. bruxellensis* Y879 (CBS2499) e utilizar o genoma obtido para deduzir suas propriedades relevantes no ramo alimentício. Como o genoma da *S. cerevisiae* já é extensivamente estudado, foi feita também uma comparação entre os dois, uma vez

que esses apresentam semelhanças fisiológicas como a tolerância a elevados níveis de etanol, capacidade de crescer em meio ácido e sem oxigênio. Na *S. cerevisiae* existem 7 genes ADH (álcool desidrogenase), sendo 5 deles (ADH1-5) codificadores para conversão de acetaldeído em etanol e, destes, os genes ADH1, ADH3, ADH4 e ADH5 fazem essa conversão durante a fermentação do açúcar, enquanto o ADH2 é responsável pela reação reversa, oxidando o álcool à acetaldeído. Os autores observaram que na *B. bruxellensis* os homólogos dos genes ADH1, ADH2, ADH3 e ADH5 também estão presentes, e que os genes ADH1 e ADH2 podem ter funções similares aos presentes na *S. cerevisiae*. Já os genes ADH6 e ADH7 são responsáveis pela conversão de longas cadeias de aldeídos e álcoois, envolvidos na síntese de compostos aromáticos (álcoois superiores) e precursores de ésteres aromáticos na *S. cerevisiae*. Genes similares são observados na *B. bruxellensis* e tal descoberta coincide com as observações anteriores de que essa levedura apresenta um intenso perfil aromático. Os autores afirmam que a disponibilidade da sequência genômica completa da *B. bruxellensis* fornece uma ferramenta para o conhecimento de enzimas envolvidas na produção dos compostos “*off-flavor*”.

Nem todos os micro-organismos presentes no processo de fabricação do vinho são considerados necessários, uma vez que podem ser responsáveis pela alteração de seu sabor e aroma. Na tabela 4 são abordados alguns estudos que determinaram a presença de micro-organismos que são responsáveis pela alteração negativa na qualidade do vinho.

Tabela 4. Alguns micro-organismos presentes no vinho que são capazes de diminuir a sua qualidade sensorial

Produto	Micro-organismo deteriorante	Efeito	Referência
Vinho	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Produção de compostos fenólicos como 4-etilguaicol e 4-etilfenol, que podem levar à deterioração do vinho se presente em elevadas quantidades	Piskur <i>et al.</i> , 2012; Willenburg <i>et al.</i> , 2012
	Cepas de <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , espécies de LAB	Vinhos viscosos e de baixa qualidade (<i>ropy wines</i>); Compostos <i>off-flavors</i> como ácido acético, diacetil e manitol.	Petri <i>et al.</i> , 2013

5.3. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS CULTURA-INDEPENDENTES NO CONTROLE DE QUALIDADE DA CERVEJA

Os dois autores cujo produto fermentado de estudo foi a cerveja foram Zhu *et al.* (2006) e Haakensen *et al.* (2008), que utilizaram variações do método de PCR para a análise de bactérias deteriorantes de cerveja. Enquanto Haakensen *et al.* (2008) propuseram um método baseado em qPCR para detectar as bactérias pertencentes ao Filo *Firmicutes*, sabidamente responsáveis pelo maior número de incidentes de deterioração de cerveja, Zhu *et al.* (2006) utilizaram a técnica de rep-PCR *fingerprint* (*repetitive sequence-based PCR DNA fingerprint*) para identificação cepa-específica de bactérias isoladas de duas cervejarias.

Haakensen *et al.* (2008) alegam que mais de 90% dos incidentes relatados de deterioração de cerveja estão relacionados ao Filo *Firmicutes*, e por isso detecção e diferenciação dessas bactérias das não-*Firmicutes* é de grande importância para a indústria cervejeira. De fato, o método proposto por estes autores foi capaz de detectar todas as bactérias do Filo *Firmicutes* estudadas (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Pediococcus*, *Selenomonas*, *Streptococcus* e *Zymophilus*), enquanto as bactérias não pertencentes a esse Filo não foram detectadas. Eles afirmam, inclusive, que o método de qPCR pode ser utilizado como um sistema único de detecção da presença desse Filo.

Já Zhu *et al.* (2006) alegam que as bactérias mais problemáticas para a indústria cervejeira são dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, influenciando de diferentes formas na fermentação. Com o objetivo de avaliar o resultado do rep-PCR *fingerprint* na identificação das bactérias deteriorantes da cerveja e validar seu poder de identificação, os autores isolaram 59 bactérias de cervejarias, LAB presentes na superfície do malte e LAB preservadas em laboratório, extraíram o DNA e seguiram com a técnica de PCR específico para LAB. Com os amplicons deste PCR específico, foi feito o sequenciamento do gene codificador 16S rRNA. O sequenciamento dessa região se mostrou adequado para a identificação de bactérias deteriorantes de cerveja, pois essa porção 5' do gene 16S rRNA apresenta uma região hipervariável, útil para a identificação das LAB. Para gerar o rep-PCR *fingerprint* foram utilizados os *primers* BOXA1R e GTG₅ nos isolados, porém nenhum dos dois *primers* foi capaz de agrupar todas as cepas da mesma espécie juntas. Os autores alegam que se o número de rep-PCR *fingerprint* em bases de dados aumentasse consideravelmente, ou se uma biblioteca desses *fingerprints* focasse em uma pequena região ou cervejaria fosse construída, uma cepa recontaminante poderia ser rapidamente identificada utilizando esta mesma base de dados. Porém, pelo fato de uma cepa deteriorante de cerveja não poder ser rapidamente discriminada da não deteriorante, um rep-PCR *fingerprint* pode ser muito valioso.

Na literatura ainda existe muitos poucos trabalhos que abordam a influência de diferentes tipos de micro-organismos na qualidade final do produto cerveja. Neste

trabalho, pudemos observar que, dentre os artigos encontrados (apenas dois), a abordagem se refere aos micro-organismos considerados contaminantes (Tabela 5).

Tabela 5. Principais micro-organismos presentes na cerveja que são capazes de diminuir a sua qualidade sensorial

Produto	Micro-organismo deteriorante	Efeito	Referência
<i>Cerveja</i>	Espécies dos gêneros <i>Lactobacillus</i> e <i>Pediococcus</i>	<i>L. brevis</i> – superatenuação <i>L. lindineri</i> – resistente aos compostos do lúpulo	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	Filo <i>Firmicutes</i>	Não especificado (contaminantes)	Haakensen <i>et al.</i> , 2008

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados nessa revisão, é possível observar que os métodos de biologia molecular atenderam o objetivo proposto no sentido de definir e elucidar a microbiota envolvida nos processos fermentativos de obtenção de vinho e cerveja, bem como demonstrar uma estreita relação entre estes micro-organismos e a qualidade sensorial destes produtos. No processo de obtenção do vinho, a microbiota se mostrou mais complexa e importante para a geração de *flavors* e *off-flavors*. Já no processo de produção de cerveja, os micro-organismos se apresentaram de modo não muito diverso, porém o Filo *Firmicutes* foi o de maior predominância no caso de obtenção de um produto com qualidade/sabor inferior, se caracterizando como um Filo de micro-organismos deteriorantes de tal produto.

Além disso, fica evidente que a utilização de métodos moleculares aplicados ao controle de qualidade microbiológico e sensorial de vinhos e cervejas são de grande utilidade e estão se mostrando cada vez mais necessários por serem métodos mais

rápidos, mais confiáveis e mais específicos quando comparados aos métodos cultura-dependentes. No entanto, por serem métodos desenvolvidos e empregados a partir do final dos anos 90, início dos anos 2000, mais estudos são necessários para avaliar corretamente suas aplicações e definir se esses métodos podem ser autônomos e independentes de métodos cultura-dependentes, portanto ainda devem ser utilizados de forma complementar aos métodos convencionais.

Outra aplicação dos métodos cultura-independentes seria devido a impossibilidade de se fazer alterações em matérias-primas, tornando as ferramentas de biologia molecular úteis na identificação e no auxílio a manipulação da população microbiana, visando melhorar a qualidade microbiológica e sensorial de produtos alimentícios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMONACID, S. F., NÁJERA, A. L., YOUNG, M. E., SIMPSON, R. J., ACEVEDO, C. A. A comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, p.750-758, 2012.

AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDEL, W., LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na produção de alimentos**. 1 ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v.4, 523p.

BORNEMAN, A. R., SCHMIDT, S. A., PRETORIUS, I. S. At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. **Trends in Genetics**, v.29, p.263-271, 2013.

BOTELHO, L. L. R., CUNHA, C. C. A., MACEDO, M. O método da revisão integrativa nos estudos organizacionais. **Gestão e Sociedade**, v.5, p.121-136, 2011.

BOURDICHON, F., CASAREGOLA, S., FARROKH, C., FRISVAD, J. C., GERDS, M. L., HAMMES, W. P., HARNETT, J., HUYS, G., LAULUND, S., OUWEHAND, A., POWELL, I. B., PRAJAPATI, J. B., SETO, Y., SCHURE, E. T., BOVEN, A. V., VANKERCKHOVEN, V., ZGODA, A., TUIJELAARS, S., HANSEN, E. B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**. v.154, p.87-97, 2012.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 2.314 de 04.9.1997, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14.7.1994 – normas gerais sobre registro, padronização, classificação, inspeção e fiscalização da produção e do comércio de bebidas.

CHEYNIER, V., SCHNEIDER, R., SALMON, J. M., FULCRAND, H. Chemistry of wine. In: MANDER, L., LIU, H. W. **Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology**. v.3, c.3.26, p.1119-1164, 2010.

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

COCOLIN, L., ALESSANDRIA, V., DOLCI, P., GORRA, R., RANTISOU, K. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.167, p.29-43, 2013.

COCOLIN, L., DOLCI, P., RANTSIOU, K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. **Meat Science**, v.89, p.296-302, 2011.

COMBINA, M., ELÍA, A., MERCADO, L., CATANIA, C., GANGA, A., MARTINEZ, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines

from Mendoza, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.237-243, 2005.

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

CSOMA, H., ZAKANY, N., CAPECE, A., ROMANO, P., SIPICZKI, M. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, p.239-248, 2010.

DAVIS, T.M., YU, H., HAIGIS, K. M., MCGOWAN, P. J. Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.19, p.582-588, 1995.

DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v.23. p.108-112, 2000.

DRAGONE, G., MUSSATO, S. I., SILVA, J. B. A. Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.37-40, 2007.

DUSKOVÁ, M., SEDO, O., KSICOVÁ, K., ZDRÁHAL, Z., KARPÍSKOVÁ, R. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **International Journal of Food Microbiology**, v.159, p.107-114, 2012.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**: princípios e aplicação. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p.170-175, 2007.

GAVA, A. J., DA SILVA, C. A. B., FRIAS, J. R. G. Conservação de Alimentos por fermentações. In: **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo, 2008. p. 377-398

GONZALEZ-ARENZANA, L., SANTAMARÍA, P., LÓPEZ, R., LÓPEZ-ALFARO, I. Indigenous lactic acid bacteria communities in alcoholic and malolactic fermentations of Tempranillo wines elaborated in ten wineries of La Rioja (Spain). **Food Research International**, v.50, p.438-445, 2013.

HAAKENSEN, M., DOBSON, C. M., DENEER, H., ZIOLA, B. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the *Firmicutes* Phylum. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.236-241, 2008.

HERSCHLEB, J., ANANIEV, G., SCHWARTZ, D. C. Pulsed-field gel electrophoresis. **Nature Protocols**, v.2, p.677-684, 2007.

HONG, Y. A., PARK, H. D. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. **Food Microbiology**, v.34, p.207-214, 2013.

HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B. M., PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.4765-4774, 1998.

IIMURE, T., SATO, K. Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. **Food Research International**, v.54, p.1013-1020, 2013.

KRAKOVÁ, L., CHOVANOVÁ, K., ZENISOVÁ, K., TURCOVSKÁ, V., BREZNÁ, B., KUČHTA, T., PANGALLO, D. Yeast diversity investigation of wine-related samples from two different Slovakian wine-producing areas through a multistep procedure. **LWT – Food Science and Technology**, v.46, p.406-411, 2012.

KOLMODIN, L. A., BIRCH, D. E. Polymerase chain reaction: Basic principles and routine practice. In: CHEN, B. Y., JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**, v.192, p.3-18, 2002.

LAHTI, C. J. Pulsed field gel electrophoresis in the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.10, p.326-330, 1996.

LIMA, J. F. C., MONTENEGRO, L. M. L., MONTENEGRO, R. A., CABRAL, M. M. L., LIMA, A. S., ABATH, F. G. C., SCHINDLER, H. C. Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, p.690-697, 2009.

LINDE, K., WILLICH, S. N. How objective are systematic reviews? Differences between reviews on complementary medicine. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.96, p.17-22, 2003.

LO, Y. M. D., CHAN, K. C. A. Introduction to the polymerase chain reaction. In: LO, Y. M. D., CHIU, R. W. K., CHAN, K. C. A. **Clinical Applications of PCR**, v.336, c.1, p. 1-10, 2006.

MAQUEDA, M., ZAMORA, E., RODRÍGUEZ-COUSIÑO, N., RAMÍREZ, M. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. **Food Microbiology**, v.27, p.205-209, 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **National Library of Medicine**, Maryland, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe>. Acesso em 02 novembro 2014

OLIVEIRA, M. C. S., REGITANO, L. C. A., ROESE, A. D., ANTHONISEN, D. G., PATROCÍNIO, E., PARMA, M. M., SCAGLIUSI, S. M. M., TIMOTEO, W. H. B., JARDIM, S. N. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**, p.20-23, 2007.

OZILGEN, M., ÇELIK, M., BOZOGLU, T. F. Kinetics of spontaneous wine production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.252-256, 1991.

PERRONE, B., GIACOSA, S., ROLLE, L., COCOLIN, L., RANTSIOU, K. Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, p.156-163, 2013.

PETRI, A., PFANNEBECKER, J., FRÖHLICH, J., KÖNIG, H. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. **Food Microbiology**, v.33, p. 48-54, 2013.

PISKUR, J., LING, Z., MARCET-HOUBEN, M., ISHCHUK, O. P., AERTS, A., LABUTTI, K., COPELAND, A., LINDQUIST, E., BARRY, K., COMPAGNO, C., BISSON, L., GRIGORIEV, I. V., GABALDÓN, T., PHISTER, T. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. **International Journal of Food Microbiology**, v.157. p.202-209, 2012.

POLAINA, J. Brewer's Yeast: Genetics and Biotechnology. **Applied Mycology and Biotechnology**, v.2, p.1-17, 2002.

PRYOR, R. J., WITWERT, C. T. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. In: LO, Y. M. D., CHIU, R. W. K., CHAN, K. C. A. **Clinical Applications of PCR**, v.336, c.3, p. 19-32, 2006.

RANDAZZO, C. L., CAGGIA, C., NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, v.78, p.1-9, 2009.

SAMPAIO, R. F., MANCINI, M. C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.11, p.83-89, 2007.

SINGH, A., SINGH, M. P., SHARMA, V., VERMA, H. N., ARORA, K. Molecular Techniques. In: PICÓ, Y. **Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications**. c.13, p.407-461, 2012.

SINGH, S., GOSWAMI, P., SINGH, R., HELLER, K. J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.448-457, 2009.

SOLEAS, G. J., DIAMANDIS, E. P., GOLDBERG, D. M. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. **Journal of Clinic Laboratory Analysis**, v.11, p.287-313, 1997.

TOFALO, R., PERPETUINI, G., FASOLI, G., SCHIRONE, M., CORSETTI, A., SUZZI, G. Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “*terroir*” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. **Food Microbiology**, v.39, p.7-12, 2014.

VALENTINI, A., TIMPERIO, A. M., CAPPuccio, I., ZOLLA, L. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) interpretation requires a sensitive method for the detection of amplified DNA. **Electrophoresis**, v.17, p.1553-1554, 1996.

VERSALOVIC, J., BRUIJN, F. J., LUPSKI, J. R. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: BRUIJN, F. J., LUPSKI, J. R., WEINSTOCK, G. M. **Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis**, p.437-454, 1998.

WILLAERT, R., NEDOVIC, V. A. Primary beer fermentation by immobilized yeast – a review on flavour formation and control strategies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.1353-1367, 2006.

WILLENBURG, E., DIVOL, B. Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p.131-136, 2012.

ZHU, L. J., ZHENG, F. Y., ZHAO, Y. Z., XING, X. N., LI, Q., GU, G. X. Application of Rep-PCR fingerprint in rapid identification of Beer-spoilage bacteria. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.22, p.1013-1020, 2006.