

Cultivo de Videira Protegido com Cobertura Plástica e sua Relação com a Fermentação do Mosto

Gildo Almeida da Silva¹, Henrique Pessoa dos Santos¹, Jandora Severo Poli³, Geraldo Chavarria², Poliana Deyse Gurak³, Carla Crocoli⁴

¹Embrapa Uva e Vinho; Caixa Postal 130 – 95700-000 - Bento Gonçalves – RS - E-mail: gildo@cnpuv.embrapa.br. ²Doutorando UFRGS, Bolsista CNPq- Categoria Doutorado, ³Bolsista CNPq-Categoria DTI, ⁴Estagiário Embrapa/UERGS

RESUMO

O cultivo protegido com cobertura plástica é uma prática empregada por alguns viticultores, visando minimizar impactos climáticos e fitopatológicos. Entretanto, em uvas destinadas à vinificação, o uso de fungicidas e as alterações fisiológicas decorrentes desta tecnologia podem interferir no processo fermentativo. Sendo assim, objetivou-se avaliar o comportamento das leveduras autóctones presentes em uvas das cultivares Riesling Itália e Moscato Giallo produzidas em cultivos sem e com cobertura plástica e estabelecer a diferença entre os dois sistemas no que se refere à fermentação do mosto com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. Também foi objeto deste trabalho determinar o efeito residual de captan, nos dois sistemas, sobre o processo fermentativo. O número de leveduras no cultivo protegido foi significativamente menor que no convencional para as duas cultivares, indicando a presença de agentes inibidores ou falta de algum fator de crescimento. Os resultados também mostraram que o número de leveduras sobre as bagas depende do estado de maturação da uva. A concentração residual de captan após sete dias de carência nos dois cultivos inibiu a fermentação da linhagem selecionada.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, inibição, fungicida, fermentação, cobertura

INTRODUÇÃO

Considera-se que a fonte primária de leveduras relacionadas com a elaboração de vinho seja a uva. Isto porque estes microrganismos contribuem de forma relevante para a composição aromática do vinho (Swiegers et al., 2005). Neste processo, destaca-se a liberação do grupo tiol aromático de determinados precursores de aromas presentes no mosto pela ação das leveduras durante o processo de fermentação (Howell et al., 2004). Como a biodiversidade de microrganismos tem impacto sobre a eficiência da fermentação e sobre a qualidade do vinho (Fleet et al., 2002), qualquer atividade ou prática cultural que provoque redução no número de microrganismos sobre a baga da uva que se destina à elaboração de vinho ou, que, comprometa a atividade destes durante a fermentação deve ser vista com reserva.

O uso de cobertura plástica sobre vinhedos para proteger a cultura da videira de intempéries climáticas e de problemas fitossanitários pode ter repercussão importante sobre a microflora e sobre a atividade dos microrganismos durante a vinificação. Mortimer & Polsinelli (1999) comentam a controvérsia existente sobre a contribuição relativa de leveduras provenientes da uva e do ambiente da cantina. Outro aspecto de pouca importância prática diz respeito à origem das leveduras presentes no cacho de uva. Mais importante que sua origem é a permanência destes microrganismos sobre os cachos. Quando a levedura atinge o cacho de uva, independentemente da origem, sua permanência depende das condições fisiológicas da baga intacta, da disponibilidade de nutrientes expostos, das condições climáticas e do uso de agrotóxicos, especialmente os fungicidas. Mortimer (2000) afirma que microrganismos presentes em uvas danificadas pode ser a principal fonte de agentes da vinificação. Esta afirmação parece óbvia uma vez que tais uvas expõem mais nutrientes prontamente assimiláveis que as uvas intactas.

Há de se considerar que a uva, mesmo sadia e sem danos físicos, apresenta condições de manter as leveduras sobre sua superfície. Segundo Fleet et al. (2002), uvas maduras podem ancorar uma população de leveduras que vão de 10^4 a 10^6 células/cm². Para isso ocorrer, é necessário que as leveduras tenham acesso à baga, se fixem sobre ela, disponham de nutrientes, não entrem em contato com substâncias tóxicas e que o ambiente lhes seja favorável. Foi observado que leveduras se nutrem de exudatos de plantas (Fay & Benavides, 2005). Os nutrientes que as leveduras utilizam consistem em exudatos provenientes do interior da baga (mesocarpo). O movimento de nutrientes do interior das bagas para o meio externo se dá por osmose em virtude de gotas de chuva ou orvalho. A concentração dos nutrientes aumenta com o avanço do processo de maturação. Kosuge & Hewitt (1964) observaram que o exudato proveniente das bagas possuíam açúcares e aminoácidos e que estes poderiam dar suporte ao crescimento de *Botrytis cinerea*. Sobre as bagas há um filme hidrofóbico de algumas micras de espessura que induz à formação de gotículas de água. Este microhabitat é rico em açúcares, apresenta baixa atividade de água e atua como um ambiente seletivo (Rousseau & Donèche, 2001).

Isolamento de leveduras diretamente das bagas dos vinhedos, da região de Bento Gonçalves, com características diferenciadas tem sido obtido (Silva, 1996; Silva, 1999; Silva & Dalarmi, 2003). Embora sejam empregadas leveduras selecionadas no processo de elaboração de vinho, a microflora, com sua diversidade, pode aumentar significativamente a qualidade do produto final e definir nuances regionais (Heard, 1999). Desta forma, a redução do número de microrganismos por práticas de cultivo, seja ela qual for, será sempre indesejável.

O uso de cobertura plástica poderá ser, à primeira vista, uma ferramenta importante para reduzir a agressão ao ambiente devido à redução no uso de agrotóxicos. No entanto, a composição da baga com relação a este tratamento pode ser afetada e assim provocar alterações na microflora e no processo fermentativo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação da cobertura plástica, usada em vinhedos de uvas para vinho, sobre o comportamento de leveduras autóctones e selecionada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismos

Como levedura selecionada, foi empregada a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. As linhagens autóctones utilizadas nas fermentações foram aquelas naturalmente presentes nas bagas de uva submetidas a cada tratamento com e sem cobertura plástica.

Cultivo com Proteção de Moscato e Riesling Itália

Foi utilizado um vinhedo com as cultivares Moscato Giallo e Riesling Itália da região de Mato Perso, no município de Flores da Cunha. As duas cultivares foram tratadas com cobertura e sem cobertura plástica. Os tratamentos foram divididos em dois sistemas (MGSC-1, MGCC-1, MGSC-2 e MGCC-2), segundo a época de colheita. Foi incluída a cultivar Riesling Itália apenas no sistema RISC-1 e RICC-1. O experimento foi da seguinte forma esboçado:

- RISC-1 - Riesling Itália sem cobertura - época de colheita com base na avaliação da maturação
- RICC-1 - Riesling Itália com cobertura - época de colheita com base no cultivo sem cobertura
- MGSC-1 - Moscato Giallo sem cobertura - época de colheita com base na avaliação da maturação
- MGCC-1 - Moscato Giallo com cobertura - época de colheita com base no cultivo sem cobertura
- MGSC-2 - Moscato Giallo sem cobertura - época de colheita com base na avaliação da maturação
- MGCC-2 - Moscato Giallo com cobertura - época de colheita com base na avaliação da maturação

Os tratos culturais utilizados foram os mesmos para as duas cultivares. Foram empregados, na dosagem recomendada e para a área com cobertura, os fungicidas Fenorimol (1 aplicação) e Tebuconazol (1 aplicação), totalizando duas aplicações. Para a área sem cobertura foram usados os fungicidas Mancozeb (5 aplicações), Metiram + Piraelostrobina (4 aplicações), Eymoxanil + Mancozeb (3 aplicações), Sulfato de Cobre (4 aplicações), perfazendo um total de 16 aplicações.

Inibição do Processo Fermentativo

A ação dos tratamentos com e sem cobertura plástica sobre a atividade fermentativa foi efetuada, utilizando-se o mosto de uvas colhidas do vinhedo tratado. As uvas foram transferidas assepticamente dos vinhedos para o laboratório, esmagadas e submetidas à fermentação. A avaliação dos fungicidas sobre a

atividade das leveduras autóctones foi feita, efetuando-se uma vinificação sem uso de leveduras selecionadas. A ação sobre a levedura selecionada foi avaliada, utilizando-se uma suspensão, contendo 10^7 células/mL da linhagem *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. O crescimento da linhagem, para o preparo do inóculo, foi feito em meio G7₁₁₄ (Silva & Almeida, 2006), a 18 °C, em incubadora orbital (New Brunswick, USA) a 150 rpm. A padronização do inóculo foi efetuada por microscopia (Microscópio Universal Zeiss, Alemanha), por meio de câmara de Neubauer melhorada. A relação inóculo/meio foi de 1:10. A fermentação foi conduzida a 18 °C e acompanhada diariamente por gravimetria (Longo et al., 1992). As fermentações foram realizadas com três ou cinco repetições e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão.

Meio de Cultura, Contagem em Placa e Isolamento de Células

Mosto ágar foi empregado para isolar e contar o número de células viáveis do mosto. O meio possuiu por litro de água: 20,0 g Ágar Bacto, 10,0 g Extrato de levedura e 250 mL mosto. As amostras de uva foram colhidas dos vinhedos em recipientes estéreis. No mesmo dia da colheita, as uvas foram esmagadas, o mosto foi submetido a diluições em série (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , e 10^{-7}), plaqueado em duplicata e a cultura foi incubada a 25 °C. Os resultados serão expostos em unidades formadoras de colônias por mL (ufc/mL).

Ação do captan residual sobre a fermentação do mosto

Para monitorar os efeitos da cobertura plástica sobre os resíduos de fungicidas, foram realizadas pulverizações com fungicida de princípio ativo captan (125g/L de ingrediente ativo), em quatro cachos previamente marcados aleatoriamente nas áreas coberta e descoberta. Utilizou-se um pulverizador manual com volume de aplicação necessário para atingir o ponto de escorrimento. Foram coletadas amostras com e sem o fungicida. As amostras foram envoltas em papel alumínio e congeladas logo após as coletas. As amostras foram coletadas como segue:

- Primeira aplicação
 - Coleta de mostra no dia da primeira aplicação (11/01),
 - Coleta de amostra no segundo dia após a primeira aplicação (13/01)
 - Coleta de amostra no sétimo dia após a primeira aplicação (18/01)
- Segunda aplicação - Sete dias após a primeira aplicação foi efetuada a segunda aplicação (18/01)
 - Coleta de amostra no segundo dia após a segunda aplicação (20/01)
 - Coleta de amostra no sétimo dia após a segunda aplicação (25/01)

A Análise de resíduos foi feita por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC/MS) (Working Group, 1996).

Determinação biológica de agentes inibidores

Para verificar a presença de agente inibidor no mosto da Riesling Itáliaico, nos dois sistemas de cultivo, foram feitas fermentações com concentrações decrescentes de mosto, tendo como diluente o meio G7₁₁₄ com 200 g de sacarose/L. As concentrações decrescentes de mosto de uva produzida com e sem cobertura foram da seguinte forma construídas:

Tabela 1. Concentrações crescentes de mosto de uva produzida com cobertura

Mosto Riesling	G7 ₁₁₄	1vvt 10^8 (cél/mL)	código*
9mL	0mL	1mL	1-cc-9m
8mL	1mL	1mL	2-cc-8m
7mL	2mL	1mL	3-cc-7m
6mL	3mL	1mL	4-cc-6m
5mL	4mL	1mL	5-cc-5m
4mL	5mL	1mL	6-cc-4m
3mL	6mL	1mL	7-cc-3m
2mL	7mL	1mL	8-cc-2m
1mL	8mL	1mL	9-cc-1m

Mosto Riesling	G7 ₁₁₄	1vvt 10 ⁸ (cél/mL)	código*
0mL	9mL	1mL	10-cc-0m

*A mesma estratégia foi empregada para o mosto de uva produzida sem cobertura

Delineamento estatístico

Os experimentos foram todos conduzidos num delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Quando oportuno, foi realizada análise de variância e a comparação das médias foi efetuada pelo teste de Tukey (P= 0,05 e P= 0,01).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração de células nos dois sistemas de cultivo e atividade fermentativa

A diferença entre as duas cultivares sem cobertura, RISC-1 e MGSC-1, com relação ao número de células sobre as bagas, não foi significativa (P>0,05) (Figura 1). As diferenças foram elevadas entre os sistemas com cobertura (RICC-1 e MGCC-1) e sem cobertura (RISC-1 e MGSC-1), para as duas cultivares. A análise estatística não pode ser feita para estes dois sistemas porque não foi observada levedura nas bagas da cultivar Moscato Giallo (Figura 1) e, das três placas de Petri utilizadas para a avaliação da Riesling Itálico, duas apresentavam fungos filamentosos e nenhuma célula de levedura foi detectada. Convém salientar que a época de colheita para os dois sistemas foi única, ou seja, todas as uvas foram colhidas no momento indicado pela cultura sem cobertura. Entretanto, destaca-se que as uvas dos tratamentos RICC-1 e MGCC-1 ainda não se mostravam maduras em sua plenitude. Sendo assim, observa-se que a concentração de leveduras da baga depende fortemente da maturação da uva.

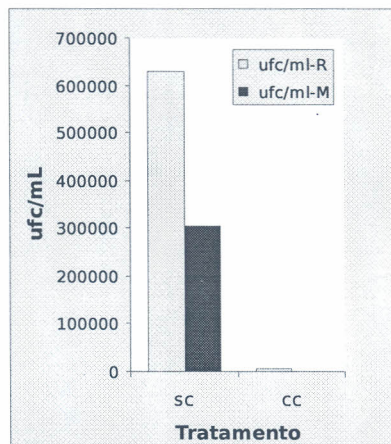


Figura 1. Número de células de levedura presente no mosto de Riesling Itálico (RI) e Moscato Giallo (M) cultivadas sem (sc) e com (cc) cobertura.

Era de se esperar que as cultivares mais freqüentemente tratadas com fungicida (16 aplicações) e com maior diversificação destes (4), RISC-1 e MGSC-1, apresentassem número mais baixo de leveduras que aquelas (RICC-1 e MGCC-1) tratadas com menos freqüência (2) e com menor diversidade (2) de agrotóxicos. A diferença poderia também estar relacionada com o tipo de agrotóxico empregado. Observe que os fungicidas usados no RISC-1 e MGSC-1 foram diferentes daqueles empregados em RICC-1 e MGCC-1. A diferença entre os cultivos com cobertura e sem cobertura com relação ao número de células também pôde estar relacionada com o período de permanência do fungicida no cultivo com cobertura. No sistema coberto, a diluição e a remoção de resíduos de fungicida pela chuva ou orvalho devem ser menores. Além disso, a ação da luz solar tem menos impacto sobre o agrotóxico que no sistema descoberto, devido à diminuição de todo espectro de radiação. A radiação ultravioleta é responsável pela degradação das moléculas de fungicidas.

A fermentação do mosto de uva produzida com cobertura sofreu uma forte inibição na atividade não apenas das leveduras autóctones, mas também da levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* (Figura 2A). Isto mostra que há, no mosto de uva produzida no sistema com cobertura, fatores inibidores ou carência de fator estimulante do metabolismo aeróbico e anaeróbico. O fato de, neste experimento, a colheita ter sido determinada pelo cultivo da uva em sistema descoberto, as uvas do sistema coberto apresentaram um estado de maturação diferente. A diferença na maturação da uva entre os dois sistemas de cultivo explica a baixa concentração de células em ambas cultivares no sistema coberto (Figura 1) e pode justificar a menor atividade da levedura selecionada neste mesmo sistema (Figura 2A). Assim sendo, pode-se concluir que, quanto menos madura for a uva menor será a concentração de levedura fermentativa na baga. Este resultado também foi obtido por Parle & Di Menna (1966), onde verificaram que o número de leveduras em uvas verdes é relativamente baixo e que, neste estágio, as leveduras fermentativas não são encontradas. Assim, pelos resultados microbiológicos, pode-se dizer que a uva da cultivar Riesling Itáliaico no sistema coberto apresentava um grau de maturação mais elevado que a da cultivar Moscato Giallo (Figura 1).

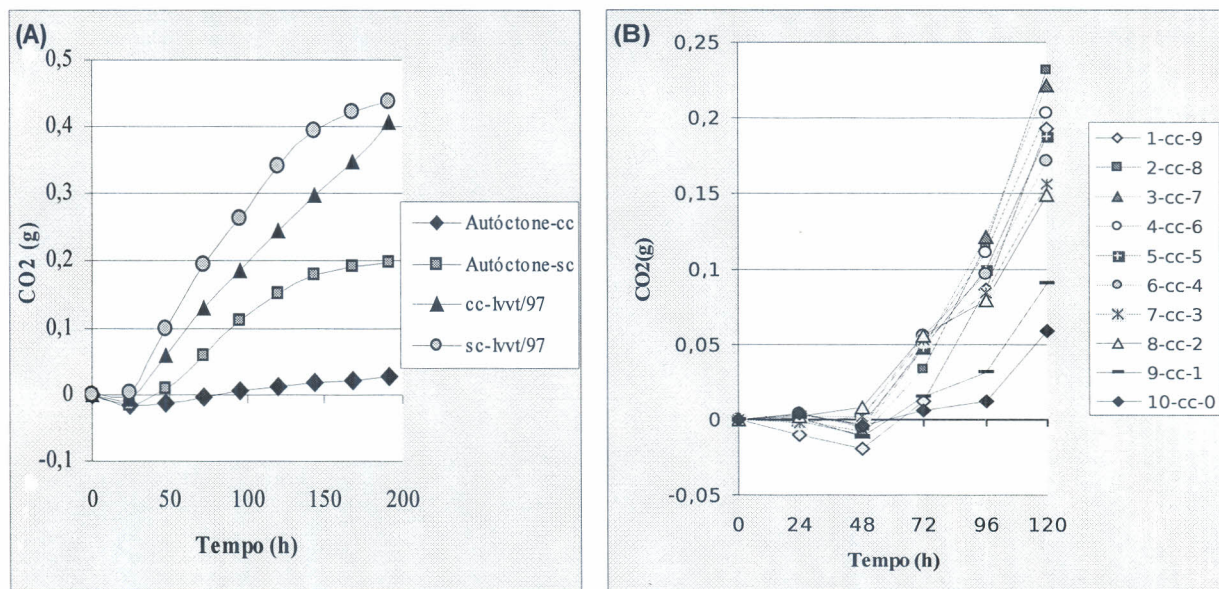


Figura 2. (A) Atividade metabólica das leveduras autóctones e selecionada *Sacch. cerevisiae* durante a vinificação do mosto de uvas Moscato Giallo produzidas no sistema com cobertura (cc) e sem cobertura (sc) plástica. (B) Atividade metabólica da levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* durante 5 dias de fermentação em concentrações crescentes de mosto de uva Riesling Itáliaico produzida no sistema com cobertura (cc) de plástico. Cada ponto representa a média de três repetições. O modelo da diluição do mosto está na seção Materiais e Métodos.

Determinação biológica de agentes inibidores

Para verificar a presença de agente inibidor no mosto da Riesling Itáliaico, nos dois sistemas de cultivo, efetuou-se uma fermentação com concentrações crescentes de mosto, tendo como diluente o meio G₇₁₁₄ com 200 g de sacarose/L. Pode-se observar que, em 120 horas de fermentação, a atividade da levedura selecionada foi aumentando com o incremento da concentração de mosto de 0 à 8 nos dois sistemas de cultivo (Figuras 2B e 3A). Neste intervalo, os dois sistemas se equivalem. Quando a concentração do mosto no meio de cultura atinge o máximo, há uma queda mais acentuada na atividade da levedura com o mosto proveniente de uvas produzidas com cobertura (Figura 3A).

Observa-se que, em cinco dias de fermentação, a atividade metabólica da levedura aumentou, de forma não linear, com o incremento do mosto de 0 a 80% do meio (Figura 2B). É interessante notar que a maior diferença de atividade está na faixa de 0 a 20%, ou seja, quando a quantidade de mosto atingiu valores acima de 20%, as diferenças se tornam menores. Isto mostra que o mosto obtido de uvas produzidas sob proteção plástica apresenta algum tipo de inibidor do metabolismo celular. Na

concentração de 90% de mosto, a levedura respondeu a este aumento com uma atividade que se posicionou nas concentrações de mosto compreendidas entre 50 e 60%.

Percebe-se que a inibição da fermentação é menos severa no mosto de uva produzida sem cobertura (Figura 3A). O aumento da atividade da levedura foi gradual, embora não linear, até o mosto atingir, da mesma forma, a concentração de 80% de mosto. No entanto, a atividade do microrganismo, quando o mosto atingiu a concentração de 90%, se situou entre os valores correspondentes às concentrações de 70 e 80%, ou seja, bem acima daqueles encontrados com mosto proveniente de cobertura (Figura 2B).

Analisando a atividade do microrganismo apenas no quinto dia de fermentação (Figura 3B), verifica-se que o comportamento dos dois sistemas são rigorosamente semelhantes. De 0 a 20% há um aumento brusco na atividade da levedura e a partir deste valor, evidencia-se uma redução da atividade microbiana. A passagem de 80 para 90% provocou uma queda de atividade nos dois sistemas, porém, foi mais acentuada no meio onde o mosto da uva foi cultivada sob proteção de plástico.

Considerando a concentração máxima de mosto (Figura 3B), percebe-se que há interferência do sistema de cultivo no comportamento da levedura. A razão para estas diferenças pode estar relacionada com os fungicidas empregados ou simplesmente com as alterações fisiológicas impostas pelo sistema de produção utilizado, devido a restrição de água e radiação solar imposta pela cobertura plástica.

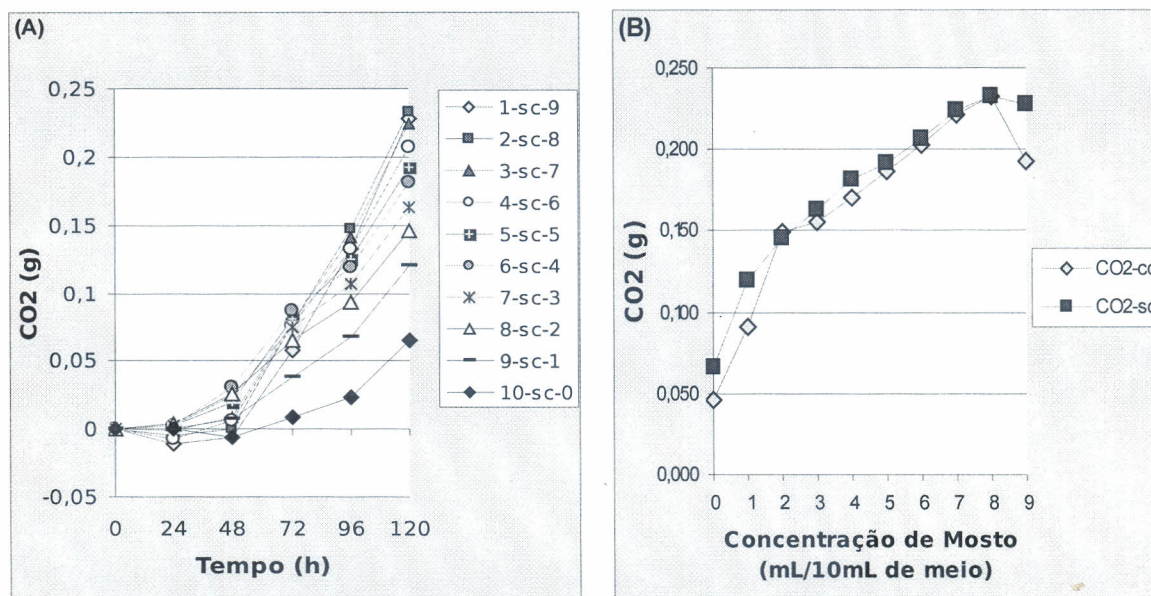


Figura 3. (A) Atividade metabólica da levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* durante 5 dias de fermentação em concentrações crescentes de mosto de uva Riesling Itália produzido no sistema sem cobertura (sc) de plástico. Cada ponto representa a média de três repetições. (B) Atividade metabólica da levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* após 5 dias de fermentação em concentrações crescentes de mosto de uva Riesling Itália produzido nos sistemas com (cc) e sem cobertura (sc) de plástico. Foram consideradas apenas as concentrações de 20 a 80%. Cada ponto representa a média de três repetições.

Ação do captan residual sobre a fermentação do mosto

Para investigar a ação de resíduos de agrotóxicos sobre a atividade da *Sacch. cerevisiae* foram feitas aplicações de captan sobre as uvas e efetuadas análises residuais por cromatografia (GC-MS) em diferentes períodos de colheita. Todas as concentrações residuais de captan foram extremamente inibidoras (Figura 4). Silva et al. (2007) mostraram a ação do captan sobre *Sacch. cerevisiae*. Dependendo da concentração, as células se desestruturaram fisicamente, perdem atividade e viabilidade.

Pode-se observar uma vez mais que a levedura foi mais inibida no mosto de uvas da cultivar Moscato Giallo produzidas com cobertura que naquele proveniente de uvas sem cobertura. Quando se

compara com o mosto da cultivar Lorena, percebe-se que existe um componente inibidor importante no mosto da cultivar Moscato Giallo cultivado nos dois sistemas.

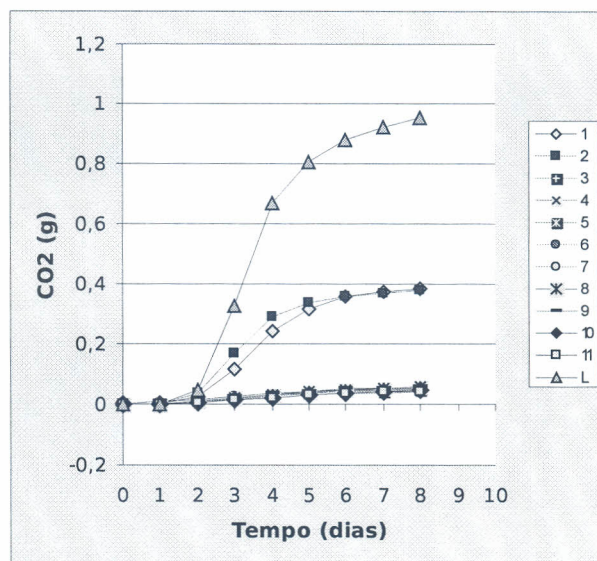


Figura 4. Atividade metabólica da levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* em diferentes concentrações residuais de captan. Cada ponto representa a média de três repetições. 1- com cobertura e sem captan; 2- sem cobertura e sem captan; 3- primeiro tratamento com captan e coleta de amostra (tempo zero); 4 e 5 - com cobertura e sem cobertura, respectivamente, dois dias depois do primeiro tratamento com captan; 6 e 7- com cobertura e sem cobertura, respectivamente, sete dias depois do primeiro tratamento com captan; 8 e 9- com cobertura e sem cobertura, respectivamente, dois dias após o segundo tratamento com captan; 10 e 11- com cobertura e sem cobertura, respectivamente, sete dias após o segundo tratamento com captan; L- levedura inoculada no mosto da cultivar Lorena sem tratamento com captan.

A concentração residual mínima de captan foi de aproximadamente 9 mg/Kg. Em todas as concentrações residuais de captan a inibição do microrganismo foi total com relação à formação de CO₂. Hochstein & Cox (1956) também verificaram o comprometimento da atividade de *Fusarium* devido à presença de captan. Com este produto químico, os esporos deste fungo acumularam ácido pirúvico. Isto é um indício de comprometimento da piruvato desidrogenase. Como obtivemos inibição da formação de CO₂ em condições anaeróbicas, muito provavelmente houve também comprometimento da piruvato des:arboxilase.

Diferentes épocas de colheita

Amostras das uvas da cultivar Moscato Giallo nos sistemas com e sem cobertura foram obtidas na época de colheita do sistema sem cobertura, ou seja, fora da época de colheita do sistema com cobertura. Observa-se que o número de leveduras presentes nas bagas é elevado apenas nas uvas do sistema descoberto (Figura 5A). O mosto da uva cultivada com cobertura possuiu uma concentração de levedura extremamente baixa. Quando a colheita foi feita com base na maturação do vinhedo com cobertura, o número de células aumentou (Figura 5B) com relação à época de colheita com base na cultura sem cobertura (Figura 5A). Mesmo assim, a diferença foi altamente significativa ($P < 0,01$) quando se compara o número de células nas bagas do vinhedo com e sem cobertura. Isto indica que a presença e o desenvolvimento das leveduras autóctones sobre a baga dependem, muito provavelmente, da composição química de sua superfície. É necessário que haja uma boa formação de pruína e uma eficiente difusão do substrato da polpa para a superfície da baga. A produção de pruína e a difusão devem ser mais acentuadas nas uvas sem cobertura devido à maior incidência de luz solar e à maior atividade de água, respectivamente. Não é suficiente apenas a uva estar madura, mas o transporte de substâncias tem que ser eficiente, assim como a formação de fatores de crescimento sobre a baga. A proporção dos componentes da pruína depende, além da cultivar (Fleet, 2002), de fatores ambientais como temperatura e exposição à luz solar (Rosenquist & Morrison, 1989; Comménil et al., 1997).

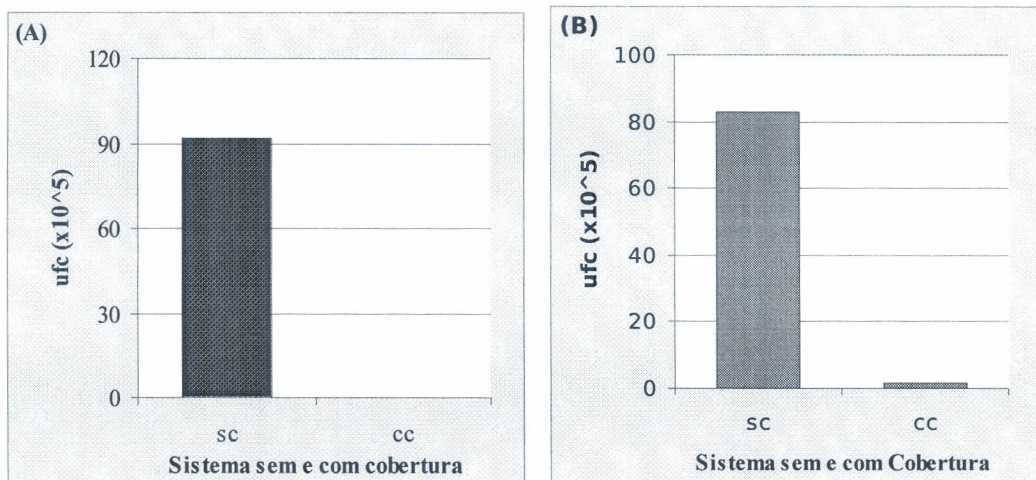


Figura 5. (A) Número de células de levedura presente no mosto de Moscato Giallo cultivada sem (sc) e com (cc) cobertura, na época de colheita do sistema sem cobertura. (B) Número de células de levedura presente no mosto de Moscato Giallo cultivada sem (sc) e com (cc) cobertura, na época de colheita do sistema com cobertura

Os testes de fermentação mostraram que o mosto de uva com cobertura apresentou um certo grau de inibição quando comparado com o mosto da uva sem cobertura até os cinco primeiros dias de fermentação (120 h) (Figura 6A). No mesmo período, a levedura já tinha atingido o máximo de produção de CO₂ com o mosto da cultivar Lorena (testemunha). A levedura no mosto da cultivar com cobertura continuou sua atividade, atingindo a produção máxima entre 8 e 9 dias (192 e 216 h). Esta diferença entre os mostos de uva com e sem cobertura se deve, provavelmente, aos fungicidas empregados na uva sem cobertura. O efeito sinérgico do etanol formado e os resíduos de fungicida podem estar contribuindo para a redução progressiva da atividade da levedura após os cinco dias de fermentação. A baixa velocidade de formação de CO₂ da *Sacch. cerevisiae* se explica pela reduzida concentração de ativador da fermentação na baga da uva (pruína ou cera). A cera possui cerca de 60 a 80 % de ácido oleanólico (Radler, 1965) e se comporta como fator de crescimento importante para as leveduras (Bréchet et al., 1971; Lafon-Lafourcade et al., 1979). Como a síntese deste composto depende da luz solar, presume-se que as uvas com cobertura, embora não possuam resíduos de fungicida, possuam menos pruína que as sem cobertura. Assim, o mosto destas uvas não permite apenas que a levedura atinja sua velocidade máxima de formação de CO₂.

Para mostrar que as leveduras autóctones apresentam comportamento fermentativo semelhante à linhagem selecionada, utilizou-se como inóculo um volume de mosto de cada sistema para nove volumes de mosto da cultivar Lorena. Observa-se que a velocidade foi menor apenas com o inóculo de uvas com cobertura e que no final de 216 horas os valores CO₂ foram semelhantes. Isto se deve ao número de células presentes em cada inóculo (Figura 6B). Quando a fermentação foi efetuada no mosto de cada sistema, a formação de CO₂ foi menor naquele referente ao mosto de uva com cobertura. Os resultados indicam que a diferença de comportamento das linhagens autóctones está vinculada à composição do mosto e não à atividade das leveduras.

Quando a colheita foi efetuada com base no cultivo com cobertura, a atividade da linhagem selecionada nos mostos dos dois sistemas foi exatamente igual (Figura 7A). O mesmo não foi verificado com as leveduras autóctones (Figura 7B). A atividade da levedura selecionada no mosto da cultivar Lorena dá a dimensão da deficiência do mosto da cultivar Moscato proveniente de uvas com e sem cobertura. Este fato indica haver uma interação entre os componentes da baga e as leveduras autóctones. Se o mosto de uva do sistema coberto, colhida na época própria, fosse diferente daquele obtido no sistema descoberto, a linhagem selecionada não teria se comportado nos dois mostos de forma idêntica (Figura 7A). Como foi observada diferença de atividade apenas nas linhagens autóctones, os dois sistemas de

cultivo devem alterar, portanto, a população microbiana autóctone. Isto vem comprovar a deficiência do sistema coberto em dar suporte nutricional à microflora da baga.

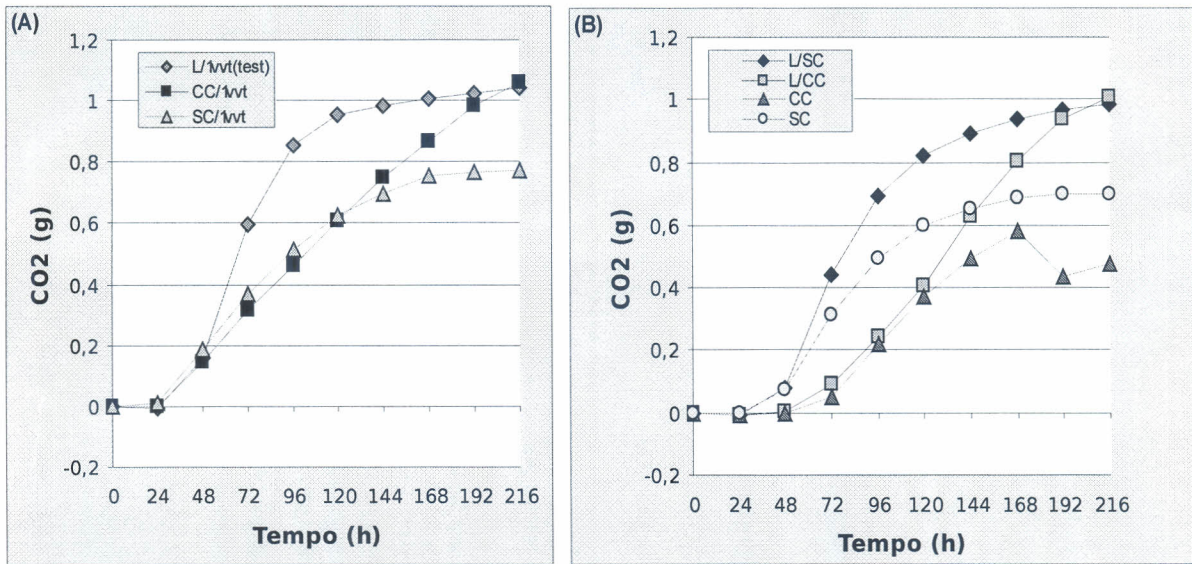


Figura 6 - (A) Atividade metabólica da levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* durante 9 dias de fermentação em mosto de uva com (cc) e sem cobertura (sc) colhida na época do sistema sem cobertura. Cada ponto representa a média de cinco repetições. **(B)** Atividade metabólica durante 9 dias de fermentação das leveduras autóctones presentes nos mostos de uva com (cc) e sem (sc) cobertura. A inoculação foi de um volume de mosto da cultivar Moscato Giallo de cada sistema para nove volume do mosto da cultivar Lorena (L). Cada ponto representa a média de cinco repetições.

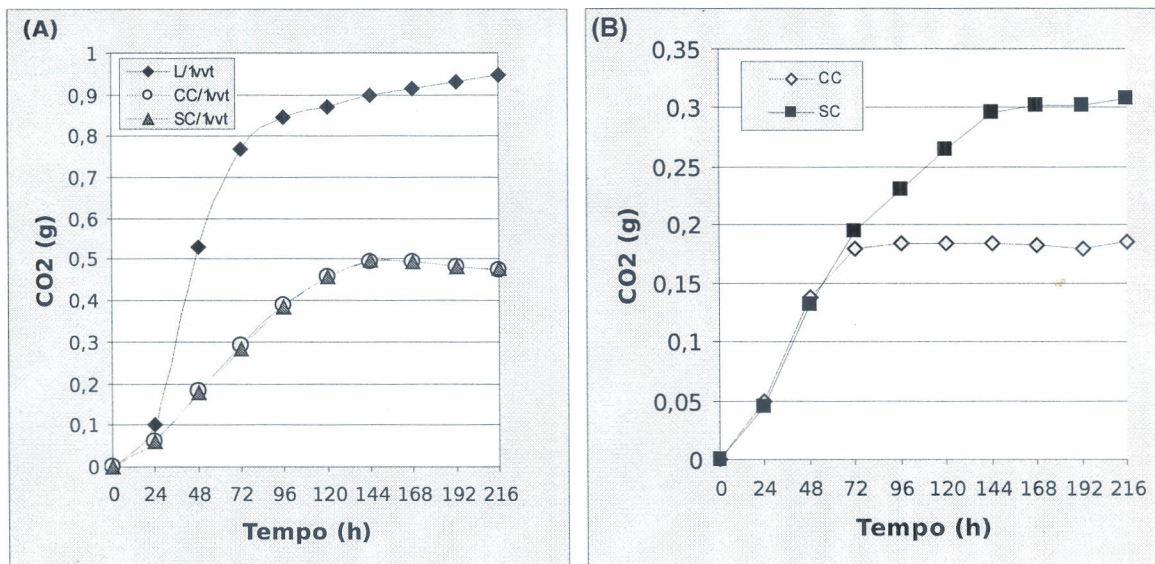


Figura 7- (A) Atividade metabólica da levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* durante nove dias de fermentação em mosto de uva com (cc) e sem cobertura (sc) colhida na época do sistema com cobertura. Cada ponto representa a média de cinco repetições. **(B)** Atividade metabólica das leveduras autóctones durante nove dias de fermentação em mosto de uva com (cc) e sem cobertura (sc) colhida na época do sistema com cobertura. Cada ponto representa a média de cinco repetições.

CONCLUSÕES

O sistema de cultivo com cobertura plástica atua sobre a população microbiana, reduzindo seu número e interferindo no processo fermentativo das leveduras. A época de colheita deve respeitar o grau de maturação particular de cada sistema, pois o número de leveduras das bagas depende do grau de maturação da uva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bréchet, P.; Cahuvet, J.; Depuy, P.; Crosson, P.; Rabatu, A. (1971), Acide oéanolique, facteur de croissance anaérobie de la levure de vin. *Ann. Technol. Agric.*, 20, 103-110.
- Comménil, P.; Brunnet, L.; Audran, J. (1997), The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *J. Exper. Bot.*, 48, 1599-1607.
- Fay, J.C.; Benavides, J.A. (2005) Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 1, 66-71.
- Fleet, G.H.; Prakitchaiwattana, C.; Beh, A.L.; Heard, G. (2002), The yeast ecology of wine grapes. *In-Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, ed. Maurizio Ciani. Kerala, India, p. 1-17.
- Heard, G. M. (1999), Novel yeasts in winemaking – looking to the future. *Food Aust.*, 51, 347-352.
- Hochstein, P.E.; Cox, C.E. (1956). Studies on the fungicidal action of N-(trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide (captan). *American Journal of Botany*, 43, 437-441.
- Howell, K S.; Swiegers, J. H.; Elsey, G. M.; Siebert, T. E.; Bartowsky, E. J.; Fleet, G. H.; Pretorius, I. S.; Lopes, M. A. de B. (2004), Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol Lett.*, 240, 125-129.
- Kosuge, T.; Hewitt, W. B. (1964). Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 54, 167-172.
- Lafon-Lafourcade, S.; Larue, F.; Ribereau-Gayon, P. (1979), Evidence for the existence of "survival factors" as an explanation for Some Peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 1069-1073.
- Longo, E.; Cansado, J.; Siero, C.; Calo, P.; Velazquez, J. B.; Villa, T. G. (1992) Influence of the curing killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on the fermentative behaviour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 147-150.
- Mortimer, R. K. (2000), Evolution and variation of the yeast *Saccharomyces* genome. *Genome Res.*, 10, 403-409.
- Mortimer, R.; Polsinelli, M. (1999), On the origins of wine yeast. *Res Microbiol.*, 150, 199-204.
- Parle, J. N.; Di Menna, M. (1966), The source of yeasts in New Zealand wine. *N. Z. J. Agric. Res.*, 9, 98-107.
- Radler, F. (1965), The main constituents of the surface waxes of varieties and species of the genus *Vitis*. *American Journal of Viticulture and Enology*, 16, 159-167.
- Rosenquist, J. K.; Morrison, J.C. (1989), Some factors affecting cuticle and wax accumulation on grape berries. *Am. J. Enol. Viticult.*, 40, 241-244.
- Rousseau, S.; Donèche, B. (2001). Effects of water activity (a_w) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry. *Vitis*, 40, 75-78.
- Silva, G. A. da. (1996), The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Itálico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46, 112-121.
- Silva, G. A. da. (1999), Comportamento de leveduras isoladas no Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade killer. Resumo apresentado no IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, dezembro, Bento Gonçalves, RS.
- Silva, G. A. da; Dalarmi, L. (2003), Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra de 2003. Resumo apresentado no X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, dezembro, Bento Gonçalves, RS.
- Silva, G. A. da; Almeida, E. A. (2006), Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 49, 411-419.
- Silva, G. A. da; Gava, R; Sonogo, O.; Garrido, L (2007), Fungicidas empregados na viticultura e sua ação sobre atividade de leveduras autóctones e selecionada. Trabalho apresentado no Sinaferm 2007, Curitiba, (PR). No prelo.
- Swiegers, J.H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I. S. (2005), Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 13-173.
- Working Group "Ontwikkeling En Verbetering Van Residu-Analysemethoden". (1996), *Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs*. General Inspectorate for Health Protection, Bilthoven.