

Avaliação da presença de leveduras contaminantes em vinhos Syrah do Nordeste do Brasil

Presence of contaminant yeasts evaluation in Syrah wines from Northeast of Brazil

Eudberg Alves de Oliveira¹; Ana Julia de Brito Araújo²; Vanessa de Souza Oliveira²; Juliane de Souza Oliveira²; Russaika Lirio Nascimento³; Gildeilza Gomes Silva²; Carliana Araújo Pereira⁴; Herbert M. de L. Targino⁵; Glaucianne Cavalcante da Conceição²; Carlos Alberto Tuão Gava⁶; Giuliano Elias Pereira⁷

Resumo

Este trabalho objetivou verificar a presença de leveduras contaminantes em vinhos elaborados a partir de uvas da variedade Syrah, provenientes de videiras do Campo Experimental de Bebedouro, da Embrapa Semiárido, com suspeita de contaminação. As uvas Syrah foram colhidas em março de 2011 e apresentavam injúrias por causa do ataque de pássaros e insetos, bem como apresentavam problemas de sanidade, decorrentes da pluviosidade no período de maturação. Os vinhos foram elaborados no Laboratório de Enologia pelo método tradicional e, ao final das fermentações alcoólica e malolática, foram estabilizados e engarrafados. A

¹Estudante de Tecnologia em Alimentos, IF SERTÃO-PE / Estagiário Embrapa Semiárido.

²Bolsista CNPq, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³Bolsista FACEPE, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴Estudante de licenciatura em Biologia UPE/ Estagiária Embrapa Semiárido

⁵Assistente, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁶Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁷Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Enologia, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho/Semiárido, Petrolina, PE. gpereira@cpatsa.embrapa.br.

metodologia utilizada para a caracterização dos micro-organismos utilizou um meio seletivo para leveduras resistentes a conservantes. A análise revelou a presença de leveduras resistentes ao antioxidante utilizado nos vinhos, mostrando, dessa forma, que de acordo com o estado da matéria-prima, são necessárias medidas de prevenção e controle desde o campo, como a seleção das bagas no campo e na adega, eliminando-se as podres, bem como a adição de quantidades mais elevadas de conservantes e uso de técnicas para eliminar e evitar a proliferação desses micro-organismos durante a estabilização do vinho em garrafas.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., vinhos tropicais, contaminação, análise microbiológica.

Introdução

Durante o processo de vinificação, em no mínimo três estádios diferentes, os micro-organismos podem atuar de forma devastadora. A primeira e principal fonte de contaminação por micro-organismos resistentes envolve a matéria-prima in natura. Consequentemente, as interações microbianas que ocorrem nas uvas contribuirão para a diversidade de espécies encontradas durante a elaboração dos vinhos (TOIT; PRETORIUS, 2000). Essa diversidade, muitas vezes, inclui leveduras resistentes aos conservantes, capazes de causar alterações no vinho durante a estabilização e no produto engarrafado.

Leveduras resistentes a conservantes incluem uma grande variedade de espécies, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (PITT; HOCKING, 2009). Uma das mais importantes alterações causadas por essas leveduras é a refermentação. Essa alteração, que é notada pela produção de dióxido de carbono e ocorrência de turvação, verifica-se em vinhos com teor final de açúcares residuais superiores a 2 g.L⁻¹, nos quais essas leveduras estejam presentes. As leveduras frequentemente envolvidas nesse tipo de alteração são *Zygosaccharomyces bailli* e *Saccharomyces ludwigii*.

Outra alteração importante é chamada de flor, causada por leveduras de metabolismo aeróbio, como *Candida* spp. e *Pichia* spp., que se desenvolvem, sobretudo, em vinhos jovens e com baixo teor alcoólico. A sintomatologia consiste no aparecimento de um véu esbranquiçado, constituído por leveduras, que surge na superfície do vinho e vai se tornando cada vez mais espesso, até se decantar.

Da sedimentação, origina turvação no vinho. As alterações produzidas consistem na perda de grau alcoólico e na diminuição de ácidos orgânicos, de glicerol e, sobretudo, de etanol. Como principal produto secundário da degradação desse último, verifica-se a produção de acetaldeído, que ao se combinar com os polifenóis causa o amarelecimento dos vinhos brancos. Em vinhos tintos, podem causar danos olfativos, como notas de solventes e acetona (PEYNAUD, 1997).

Sabe-se que as leveduras remanescentes das bagas das uvas, potencialmente resistentes aos conservantes, podem ser influenciadas por vários fatores, como adesão à superfície, tolerância a estresses ambientais (temperatura, luz do sol, dessecação, entre outros fatores), aplicação de defensivos químicos e interação com outros micro-organismos. Um exemplo disso foi constatado por Gilis et al., (2008), que relataram a ocorrência de *Brettanomyces* em bagas de uvas danificadas por pássaros e abelhas em vinhedos da França e América do Sul. Os autores salientam que a presença deste gênero parece estar diretamente ligada com a integridade física da uva.

A legislação brasileira define os conservantes como “substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas”, permitindo o uso de diferentes conservantes, sendo os benzoatos e sorbatos mais utilizados (BRASIL, 1999). A escolha de um conservante para a aplicação específica, no caso de vinhos, é baseada em diversos fatores, tais como propriedades físicas e químicas (solubilidade, pKa, reatividade, toxicidade), tipos de micro-organismos de interesse e tipos e propriedades dos vinhos a serem conservados. A combinação de mais de um conservante também pode ser utilizada para o aumento da eficiência em um determinado produto (SOFOS, 1995).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar a possível contaminação de vinhos tintos elaborados com uvas da variedade Syrah, provenientes do Campo Experimental de Bebedouro, pertencente à Embrapa Semiárido, que se encontravam injuriadas por pássaros, insetos e fungos causadores de podridão.

Material e Métodos

As uvas Syrah foram colhidas pela manhã no Campo Experimental de Bebedouro, na Embrapa Semiárido, em Petrolina, PE, em março de 2011, apresentando injúrias decorrentes do ataque de pássaros e insetos, bem como apresentavam problemas de sanidade, por causa da pluviosidade ocorrida no período de maturação, causando o aparecimento de fungos, a exemplo de *Botrytis cinerea*. Os vinhos

foram elaborados no Laboratório de Enologia da Embrapa Semiárido, por meio do método tradicional, com controle das temperaturas das fermentações alcoólica e malolática (25° C e 18° C, respectivamente). Os vinhos foram sulfitados, com dose de 10 ppm de metabissulfito de potássio. Em seguida, foram estabilizados e engarrafados, depois analisados para a detecção das leveduras presentes.

O meio de cultura utilizado para determinação de leveduras resistentes aos conservantes foi desenvolvido por Pitt e Hocking (2009). Para o meio, utilizaram-se 100 g de glicose; 5 g de extrato de levedura; 15 g de ágar; 1 L de água pura e 5 mL de ácido acético. O meio, sem a adição do ácido acético, foi preparado e esterilizado em autoclave a 121 °C por 10 minutos para evitar reação de Maillard que é o escurecimento da glicose presente no meio. No momento do uso, o ágar foi fundido e resfriado a 45 °C e adicionado o ácido acético glacial. O meio sólido completo foi inoculado imediatamente para evitar a volatilização do ácido acético. Utilizou-se caldo triptona glicose extrato de levedura 0,5% de ácido acético, como meio de enriquecimento antes do plaqueamento. Dessa forma, foram inoculadas três alíquotas de 1 mL da amostra em três tubos de 20 mL contendo caldo triptona glicose extrato de levedura 0,5% de ácido acético. Os tubos foram postos em incubadora 30 °C/48 horas. Após a incubação, inoculou-se 0,1 mL do conteúdo de cada tubo em uma placa separada contendo ágar triptona glicose extrato de levedura 0,5% de ácido acético (em superfície). As placas foram dispostas em incubadora a 30 °C/48 horas e observou-se se houve desenvolvimento de colônias.

Resultados e Discussão

O cultivo em meio seletivo permitiu verificar a presença de leveduras resistentes aos conservantes (Figura 1), constatando o fato citado na literatura de que um dos prováveis fatores de contaminação de uvas é a incidência de injúrias nas bagas antes da colheita, ou uma concentração final de SO₂ molecular muito baixa.

No caso deste estudo, a dose aplicada no momento da vinificação foi de 10 g.100L⁻¹ de dióxido de enxofre, recomendada por apresentarem problemas de sanidade (RIBÉREAU-GAYON et al., 2004). O trabalho foi qualitativo, apenas identificando a presença de leveduras, não tendo sido realizado trabalho de identificação, o que demandaria outras técnicas. Algumas espécies de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces*, frequentemente relatadas como leveduras contaminantes, exigem pelo menos 2 mg.L⁻¹ de SO₂ molecular para serem inibidas (WARTH,

1985). Essa concentração é difícil de ser obtida, pois a presença de SO_2 molecular depende do pH, da acidez do mosto e do vinho. O valor de SO_2 molecular, presente no vinho era de $0,26 \text{ mg.L}^{-1}$. Os mecanismos de resistência ao SO_2 variam, mas estão relacionados com taxas diferentes de difusão através da membrana celular, síntese de compostos que se ligam ao SO_2 e sensibilidade enzimática (ROMANO; SUZZI, 1993). Uma alternativa que vem começando a ser utilizada é a filtração em membranas, podendo ser uma alternativa antimicrobiana. A membrana deve ter poros com tamanho máximo de $0,45 \mu\text{m}$, bem como a filtração por osmose reversa (RIBÉREAU-GAYON et al., 2004).

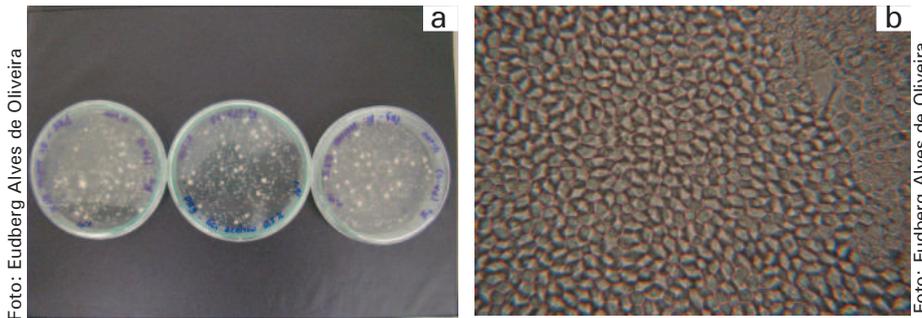


Figura 1. Placas onde podem ser visualizadas as leveduras que se desenvolveram no meio seletivo (PRY), resistentes aos conservantes (a); e células de leveduras isoladas na placa (a), através de microscopia de contraste de fase (b).

Os vinhos foram analisados quimicamente e apresentaram teor alcoólico de $12,3\% \text{ }^\circ\text{GL}$, densidade $0,9937$, $15,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de SO_2 livre (o que corresponde a $0,26 \text{ mg.L}^{-1}$ de SO_2 molecular), $20,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de SO_2 total, e $0,62 \text{ g.L}^{-1}$ de acidez volátil. Estes valores mostram que o processo tecnológico foi eficiente para evitar uma contaminação maior, segundo as recomendações técnicas, bem como a oxidação e a produção excessiva de ácido acético, pelo baixo valor da acidez volátil (o limite é de $1,2 \text{ g.L}^{-1}$). O vinho foi descartado, pois apresentou altos índices de acetaldeído, cujo aroma típico é de cola e acetona, o que comprometeu a qualidade sensorial do produto.

O presente trabalho mostrou que a qualidade da matéria-prima é fundamental para a obtenção de vinhos de qualidade. O estudo revelou a presença de leveduras contaminantes, que degradaram compostos e causaram defeitos olfativos graves nos vinhos, e estão sendo analisadas para descrição do tipo e espécie. Algumas técnicas,

como pasteurização rápida, uso da osmose inversa, bem como a irradiação, possivelmente poderiam minimizar os defeitos encontrados (RIBÉREAU-GAYON et al., 2004; PEYNALD, 1997). Além destes, existem meios físicos que atuam em sinergia com a adição de conservantes, como o uso de membranas filtrantes e a lavagem prévia das uvas, que também podem minimizar os danos. Um fator primordial que também deve ser observado é a integridade física das bagas antes, durante e após a colheita e, finalmente, a higienização de equipamentos e utensílios usados no processo de vinificação.

Conclusões

Identificou-se a presença de leveduras contaminantes nos vinhos elaborados, mesmo tendo sido utilizadas doses elevadas de antioxidantes para evitar a degradação.

A presença de leveduras resistentes aos conservantes enológicos mostra que é preciso ter cuidado com a qualidade das uvas na colheita para vinificação, sendo necessário adotar outros mecanismos para evitar a perda dos produtos, quando se trata de matéria-prima com problemas de sanidade.

Agradecimentos

À Embrapa Semiárido, pelo apoio às atividades de pesquisa, bem como aos funcionários e bolsistas/estagiários dos Laboratórios de Controle Biológico e de Enologia.

Referências

BRASIL. Resolução RDC nº 389, de 5 de agosto de 1999. Aprova o regulamento técnico sobre o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 ago. 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/389_99.htm>. Acesso em: 16 jan. 2011.

GILLIS, J. F.; BARBIN, P.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Presencia de la levadura *Brettanomyces* en bayas de uva: influencia de los factores de la viña. **Revista Enologia**, Mendoza, v. 1, p. 1-8, 2008.

PEYNAUD, E. **Connaissance et travail du vin**. Paris: Dunod, 1997. 341 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. (Ed.). **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Springer, 2009.

RIBEREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A. **Traité d’Oenologie: microbiologie du vin : vinifications**. 5. éd. Paris: Dunod Paris, 2004. 661 p.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Sulphur dioxide and wine microorganisms. In: FLEET, G. H. (Ed.). **Wine microbiology and biotechnology**. Chur: Harwood Academic Publishers, p. 373–393, 1993.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. (Ed.). **Food additive toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 501-529.

TOIT, M. du; PRETORIUS. I. S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons for nature’s own arsenal: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 21, p. 74-96, 2000.

WARTH, A. D. 1985. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 48, p. 564–569, 1985.

