

UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA
PRO-REITORIA DE PESQUISA EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO Microbiologia – ênfase Industrial e Ambiental

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA CONTRA BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS (BAL) E LEVEDURAS DE VINHOS E AÇÃO DA NISINA NA
BIOCONSERVAÇÃO DE VINHOS DE MESA SECO BORDÔ E NIÁGARA**

**Título do Relatório: AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA NISINA NA
BIOCONSERVAÇÃO DE VINHOS DE MESA SECO BORDÔ E NIÁGARA**

Daiana Jaqueline Gatti

Videira-SC

2011

Daiana Jaqueline Gatti

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA NISINA NA BIOCONSERVAÇÃO DE VINHOS DE
MESA SECO BORDÔ E NIÁGARA**

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia – ênfase Industrial e Ambiental, na forma de artigo científico como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Jane Mary L. N. Gelinski

Videira-SC

2011

RESUMO

Com a abertura de novos mercados, a indústria vinícola deve adaptar-se às exigências relativas à segurança alimentar, e produzir vinhos de melhor qualidade, garantindo sua “higiene microbiológica”. Na indústria enológica são utilizados diversos agentes para conservação, como o SO₂, ácido sórbico, o dimetil dicarbonato, entre outros. Contudo, todos os conservantes usados em vinho são de origem química e na sua metabolização dão origem a compostos desagradáveis. Dentre eles o SO₂ é o mais usado. A bioconservação é o uso de bactérias lácticas ou o uso de seus metabólitos, tais como as bacteriocinas na bioconservação, ajuda estender a vida útil e a aumentar a segurança de alimentos e bebidas. Dentre as bacteriocinas destaca-se a nisina, a qual é o único agente antimicrobiano de origem bacteriana permitido para uso em alimentos. Neste estudo foi avaliada a aplicação da nisina como bioconservadora em vinhos de mesa seco das variedades Bordô e Niágara, pela inibição de bactérias lácticas e leveduras contaminantes de vinhos. Foram utilizados dois tipos de experimentos: o primeiro baseado em testes de atividade antimicrobiana “in vitro” usando-se nisina numa concentração de 100 UI/mL. O segundo experimento baseou-se na ação direta da nisina sobre vinhos com ou sem tratamento térmico. Os resultados obtidos no primeiro experimento mostraram que duas cepas de bactérias lácticas foram sensíveis à ação da nisina, *Lactobacillus brevis* e *Oenococcus oeni* e uma cepa resistente: *Pediococcus sp.* Assim como para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em relação às análises físico-químicas, grau alcoólico e níveis de SO₂, os vinhos submetidos ao tratamento térmico ficaram bem abaixo dos vinhos sem tratamento térmico (normais), possivelmente pela volatilidade desses compostos. Em comparação aos vinhos com e sem nisina, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos resultados das análises físico-químicas. Da mesma forma não foi observada diferença significativa em relação à presença de bactérias lácticas entre os dois tratamentos a que foram submetidas às amostras de vinhos. Pode-se concluir que a nisina não tem influência sobre as características sensoriais do vinho.

PALAVRAS-CHAVE: Vinho. Bioconservação. Nisina. Contaminantes.

ABSTRACT

With the opening of new markets, the wine industry must adapt to the requirements of food safety and produce better quality wines, ensuring their "microbiological hygiene." In the wine industry uses several agents to conservation, such as SO₂, sorbic acid, dimethyl dicarbonate, among others. However, all the preservatives used in wine are of chemical and its metabolites lead to nasty compounds. Among them SO₂ is the most used. The biopreservation is the use of lactic acid bacteria or its metabolites such as bacteriocins to extend shelf life and increase the food safety. Among the highlights bacteriocins is nisin, which is the single antimicrobial agent of bacterial origin allowed for use in foods. This study evaluated the application of nisin as biopreservatives in dry table wines of Bordeaux varieties and Niagara, the inhibition of lactic acid bacteria and yeast contamination in wine. Two types of experiments: the first based on antimicrobial activity in vitro using a concentration of nisin at 100 IU / mL. The second experiment was based on the direct action of nisin on wines with or without heat treatment. The results obtained in the first experiment showed two strains of lactic acid bacteria were sensitive to the action of nisin, *Lactobacillus brevis* and *Oenococcus oeni* and one resistant strain, *Pediococcus* sp. As well for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The physic-chemical analysis showed that the levels of alcohol and SO₂ of wines subjected to heat treatment were well below the wines without heat treatment (normal), possibly by the volatility of those compounds. Bu, there was no statistically significant differences in the results of physical and chemical analysis between the wines treated with nisin or without nisin. Likewise there was no significant difference regarding the presence of lactic acid bacteria between the two treatments that were submitted to the wine samples. It can be concluded that nisin has no influence on the sensory characteristics of wine.

KEYWORDS: Wine. Biopreservation. Nisin. Contaminants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	2
1.2 PROBLEMA DA PESQUISA.....	3
1.3 OBJETIVO GERAL.....	4
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 VINHO	5
2.1.1 Vinho Niágara.....	5
2.1.2 Vinho Bordô.....	6
2.2 BACTERIOCINA - NISINA.....	7
2.3 ANIDRIDO SULFUROSO (SO ₂)	10
2.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E LEVEDURAS CONTAMINANTE DE VINHO	11
2.4.1 <i>Lactobacillus</i>	11
2.4.2 <i>Oenococcus</i>	12
2.4.3 <i>Pediococcus</i>	12
2.4.4 <i>Saccharomyces</i>	13
3 METODOLOGIA	15
3.1 CEPAS DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) E LEVEDURAS E VINHOS.....	15
3.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MEIO DE CULTURA	15
3.3 TESTES ANTIMICROBIANOS “IN VITRO”	16
3.4 TESTES ANTIMICROBIANOS DIRETOS E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 TESTES ANTIMICROBIANOS “IN VITRO”	18
4.2 TESTES ANTIMICROBIANOS DIRETOS E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	22
4.2.1 Análises Físico-Químicas.....	22
4.2.2 Análises Microbiológicas	27
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Couberam aos antigos gregos, e essencialmente aos romanos, os primeiros registros detalhados sobre o consumo do vinho em todos os níveis da sociedade e sobre a diversificação dos estilos dessa bebida (GASNIER, 2009). Na história da vitivinicultura brasileira, considera-se o início do século passado como o marco inicial da indústria do vinho no Brasil. Principalmente na região sul com o estabelecimento dos imigrantes italianos foi possível conciliar a cultura e a economia e desenvolver um produto que até hoje é símbolo desta terra. Passaram-se mais de 100 anos e o vinho difundiu-se por todo o país (BERNARDI, 2010).

Com a abertura de novos mercados nacional e internacional, a indústria vinícola deve adaptar-se às exigências relativas da segurança alimentar, e produzir vinhos de melhor qualidade. Um dos quesitos importantes na elaboração de um vinho de qualidade é sua “higiene microbiológica”, o que se refere à ausência de doenças no vinho causadas por microrganismos deteriorantes, oriundos do ambiente, dos equipamentos usados no processo ou até mesmo de microrganismos utilizados na própria fermentação, que podem se exceder e causar algum dano ao vinho (BARBOSA; ROSA, 2003).

Uma das técnicas mais utilizadas hoje em dia é a bioconservação a qual ajuda a estender a vida útil e a aumentar a segurança dos alimentos por meio do emprego de microbiota protetora, como as bactérias ácido lácticas – BAL ou o uso de seus metabólitos, como as bacteriocinas (NASCIMENTO et al., 2008).

Numa perspectiva biotecnológica, as BAL têm um potencial de aplicação diversificado, desde o controle do processo fermentativo na produção de alimentos fermentados até a sua utilização como probióticos na saúde humana e animal. No vinho, este grupo de microrganismos é responsável por um processo fermentativo secundário e está envolvido na liberação de compostos aromáticos. E ocasionalmente pode liberar compostos indesejáveis e provocar alterações nas propriedades organolépticas do produto final (INÊS et al., 2008).

A produção de vinhos pode ser considerada como um dos processos biotecnológicos mais prósperos em termos comerciais. Datado desde os tempos romanos, a indústria enológica utiliza quase que totalmente de

conservantes de origem química, como por exemplo, o anidrido sulfuroso ou dióxido de enxofre (SO₂), o ácido sórbico e o dimetil dicarbonato (DMDC). Porém, hoje em dia cresce o número de estudos com outros agentes conservadores na indústria enológica, não químicos, como por exemplo, a lisozima e a nisina (RENOUF et al., 2008).

Este estudo visa à aplicação da bacteriocina nisina como bioconservadora em vinhos de mesa seco das variedades Bordô e Niágara, pela inibição de bactérias lácticas e leveduras contaminantes de vinhos.

1.1 JUSTIFICATIVA

A região do meio oeste catarinense, principalmente o Vale do Rio do Peixe (Videira, Pinheiro Preto, Iomerê, Fraiburgo, Tangará, Caçador, e outras) caracteriza-se como um dos principais pólos da indústria vinícola. Neste, há predomínio de vinhedos conduzidos em sistema latada, com produção predominante de variedades americanas, com destaque para os vinhos brancos da cultivar Niágara e vinhos tintos da cultivar Bordô produzidos nesta região (AEB, 2010).

Sabe-se que a indústria vinícola esta cada vez mais em ascensão em todo o mundo, e a qualidade dos vinhos é de suma importância (AEB, 2010).

As fermentações alcoólica, láctica e acética eram realizadas empiricamente no passado no sentido de preservar os alimentos ou bebidas. Hoje em dia, com o desenvolvimento de sistemas eficientes de refrigeração e de esterilização por calor, poder-se-ia pensar que a fermentação teria perdido a sua importância como método de preservação nos países industrializados. Tal não aconteceu porque cada vez mais a aplicação controlada de microrganismos é efetuada no sentido de preservar ou até melhorar as características físico-químicas e organolépticas dos alimentos. Os alimentos fermentados tornaram-se uma classe independente de géneros alimentícios (INÊS et al., 2008).

Todas as classes de microrganismos são regra geral, usadas na fermentação de alimentos. Entre as bactérias, as bactérias lácticas são as mais importantes não só por serem indispensáveis na produção de certos alimentos e bebidas, como o vinho, dotando-os de atributos sensoriais únicos e

desejáveis, mas também pela sua atividade antimicrobiana, inibindo microrganismos patogênicos e de deterioração que afetariam a segurança e qualidade dos mesmos (INÊS et al., 2008).

A acidificação é, provavelmente, o fator primário na preservação de produtos de fermentação láctica. Entretanto, outros compostos produzidos pelas bactérias lácticas, como diacetil, dióxido de carbono, peróxido, etanol e bacteriocinas podem exercer ação inibitória sobre diferentes grupos de microrganismos (HELANDER et al., 1997 apud NASCIMENTO et al., 2008).

Do ponto de vista industrial, as bacteriocinas podem ser uma alternativa muito interessante de agente antimicrobiano natural para conservação de alimentos e bebidas. Tudo indica que conservadores naturais, particularmente em adição ou combinação sinérgica com outros fatores e técnicas que já estão em uso, terão um papel importante em um futuro próximo (SCHULZ et al., 2005).

Dentre as bacteriocinas destaca-se a nisina, a qual é o único agente antimicrobiano de origem bacteriana permitido para uso em alimentos, e é considerada segura como aditivo alimentar desde 1988 quando o FDA concedeu-lhes o “status” GRAS (“Generally Recognized As Safe”) (CLEVELAND et al., 2001 apud MELO et al., 2005).

1.2 PROBLEMA DE PESQUISA

O vinho é constituído por um determinado número de elementos comuns que são o resultado, por um lado, dos elementos constituintes da uva e, por outro, da fermentação alcoólica do seu sumo. A qualidade e tipo de vinho dependem da quantidade e relação dos vários elementos entre si. Intencionalmente e com função aditiva, são acrescentados alguns compostos ao vinho, como os conservantes, que permitem aumentar a sua duração, sendo responsáveis pela evolução do vinho ao longo da sua “vida”, controlando o crescimento de microrganismos (LUCAS, 2009).

Na indústria enológica são utilizados diversos agentes para conservação, como o SO₂, ácido sórbico (sob a forma de sorbato de potássio), o dióxido de enxofre, o dimetil dicarbonato (DMDC), entre outros. Mas todos os conservantes usados em vinho são de origem química. Alguns desses aditivos

alimentares podem ser metabolizados por algum grupo de bactérias contidas no vinho e dar origem a compostos desagradáveis. Dentre eles o SO₂ é o mais usado (INÊS et al., 2008).

O SO₂ apresenta vários benefícios na vinificação, primeiramente, destaca-se por ser um conservante e antioxidante e ajuda na estabilização dos pigmentos antociânicos. Entretanto o SO₂ apresenta inconvenientes de origem organoléptica e toxicológica (LUCAS, 2009). O seu uso é estritamente regulamentado, devido aos efeitos indesejáveis (características sensoriais negativas e problemas alergênicos) (INÊS et al., 2008).

O mesmo apontam Renouf et al. (2008), que para o SO₂ ser eficaz em vinhos de pH mais elevado (aproximadamente 5,5), precisa-se aumentar a sua concentração, causando assim odores desagradáveis e apresenta algumas reações alérgicas.

1.3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da nisina como bioconservadora em vinhos de mesa seco, das variedades Bordô e Niágara sobre bactérias lácticas e leveduras contaminantes de vinhos.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver testes de atividade antagônica da nisina sobre bactérias lácticas e leveduras inoculadas experimentalmente em vinhos Bordô e Niágara.

Realizar análises físico-químicas das amostras de vinhos antes e após os testes antagônicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VINHO

A viticultura no Brasil é uma atividade de suma importância econômica em diversos estados. Implantada em uma área de aproximadamente 60.000 ha e com uma produção anual superior a 700.000 toneladas, a viticultura brasileira se concentra nas regiões sul, sudeste e nordeste (EULEUTERIO et al. 2008).

O vinho é a mais higiênica e saudável das bebidas, já dizia o célebre químico e biólogo Luís Pasteur (CORRÊA et al., 2006). Falando em termos biológicos a vinificação é o resultado de uma série de transformações bioquímicas, pela ação de várias enzimas de diferentes microrganismos, primeiramente por leveduras (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*), que são responsáveis pela fermentação alcoólica, principal parte do processo, e de bactérias lácticas (predominantemente *Oenococcus oeni*), que são responsáveis por um processo secundário, a fermentação maloláctica (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2005; RENOUF et al., 2007 apud INÊS, 2008).

O vinho por ser resultante da fermentação natural da uva, tem a sua qualidade influenciada muito diretamente por fatores como: solo, clima, matéria prima (uva) e tecnologia de produção. Os processos que o envolve são simples e tradicionais, nos quais são caracterizados por serem biotecnológicos, que, aliás, são muito prósperos em termos comerciais (BONFIM et al., 2002).

A vinificação traz problemas microbiológicos, tanto na sua vinificação propriamente dita, quanto na sua conservação. A transformação do mosto em vinho implica em se ter bons conhecimentos de elaboração, higiene e segurança microbiológica e boa utilização das leveduras e bactérias. Desta forma, o sucesso de uma boa vinificação esta interligada a boa condução dos fenômenos microbiológicos (CORRÊA et al., 2006).

2.1.1 Vinho Niágara

Niágara Branca é uma cultivar americana de *Vitis labrusca* criada a partir da hibridação Concord x Cassady, realizada em 1868 no Condado de Niágara, em New York, Estados Unidos, onde ainda é a principal casta branca de

origem americana cultivada tanto para uva de mesa como para elaboração de vinho branco e suco. Foi introduzida no Brasil por Benedito Marengo, no estado de São Paulo, em 1894. Somente por volta de 1910 é que passou a ter expressão comercial. De São Paulo expandiu-se para vários estados brasileiros, sendo amplamente difundida no sul e sudeste do país. Além de expressiva área cultivada nas principais regiões produtoras do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, a 'Niágara Branca' encontra-se difusa em pequenas áreas em várias partes do sul do Brasil e sul de Minas Gerais (NACHTIGAL; SCHNEIDER, 2007).

A uva niágara branca produz cachos pequenos a médios, com 12 a 15 cm de comprimento, de aspecto cilíndrico. As bagas são esféricas e brancas esverdeadas. É pouco susceptível ao míldio e à antracnose e moderadamente resistente ao oídio. Embora seja uma cultivar para consumo "in natura", também é utilizada para produção de vinhos brancos de grande aceitação pelo consumidor brasileiro (CHALFUN et al., 2000).

A elaboração de vinhos comuns, ou de mesa é principalmente a partir de cultivares americanas, que são em geral mais rústicas, entretanto mais produtivas, e o seu custo de produção é menor do que uma *Vitis vinífera* (GIOVANNINI, 1999).

O vinho niágara apresenta características sensoriais com aromas primários bem característicos e alguns aromas secundários que lembram banana, sendo os mesmos doces e agradáveis. Possui boa persistência e apresenta sabor característico e amável levemente ácido e marcante. Este gosto "foxado" agrada muito o consumidor brasileiro, apesar de não ser tão aceito pelos europeus (SALVADOR, 2005).

2.1.2 Vinho Bordô

A cultivar Bordô é uma das principais videiras de *Vitis labrusca*, originária dos EUA. Na década de 1850 despertou interesse dos viticultores europeus devido à resistência ao oídio (*Uncinula necator*), moléstia que naquela época causava enorme prejuízo à viticultura mundial. Foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1839 com o nome de 'Ives'. Sua expansão deu-se devido à fácil adaptação à variabilidade de condições edafoclimáticas, à boa

produtividade e longevidade e relativa rusticidade. É bastante demandada para elaboração de vinho tinto, suco, vinagre, geléias e, por sua precocidade, é consumida *in natura*. Embora haja maior valorização de uvas viníferas e o vinho produzido a partir da cv. Bordô apresente aroma e gosto foxados, o seu hábito de consumo, associado às informações indicando os benefícios de pigmentos e taninos existentes nessa uva, faz com que ela mantenha grande potencial de expansão (ROMBALDI et al., 2004).

O vinho bordô agrada a um determinado segmento do mercado brasileiro, especialmente por suas características sensoriais e por uma boa relação custo/benefício (TECCHIO et al., 2007).

Tecchio et al., (2007), descreve as características sensoriais do vinho bordô, sendo a cor intensa e seu matiz violeta. O aroma e os sabores frutados e foxados são característicos das principais cultivares americanas e híbridas, ainda que se verifiquem entre elas diferenças, às vezes, marcantes. Com relação ao corpo do vinho, destaca-se por ter elevada intensidade de cor e por ser muito bem estruturado e encorpado.

2.2 BACTERIOCINA - NISINA

Bactérias láticas são capazes de produzir várias substâncias no curso de seu crescimento *in vitro*, que podem ser inibitórias tanto para si quanto para outras bactérias. Tais substâncias incluem: toxinas, enzimas bacteriolíticas, hemolisinas, subprodutos das vias metabólicas primárias como ácidos orgânicos, amônia e peróxido de hidrogênio e vários outros metabólitos secundários, substâncias antibióticas como garamicina, valinomicina e bacitracina, e as bacteriocinas (SCHULZ et al., 2005).

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias. Além disso, são efetivas em baixa concentração, e não promovem alteração na qualidade sensorial do produto. Por este motivo, observa-se crescente interesse da indústria de alimentos e bebidas sobre o potencial de utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos (NASCIMENTO et al., 2008).

Algumas das propriedades das bacteriocinas são: (a) apresentam efeito bactericida ou bacteriostático, dependendo da concentração, (b) apresentam pequeno ou amplo espectro de atuação, o qual tem sua produção mediada por plasmídio ou cromossomo, (c) reagem com sítios específicos ou inespecíficos de ligação na bactéria sensível, (d) apresentam modo de ação similar, desestabilizando a força protônica da membrana da célula sensível (ROSA; FRANCO, 2008).

A nisina é uma bacteriocina produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, a qual é a bacteriocina mais bem caracterizada. Descoberta nos anos 20 e classificada como um lantibiótico (apresenta aminoácidos modificados como lantionina e b lantionina, de 34 aminoácidos e peso molecular de 3500 Da (monômero), ela inibe a multiplicação de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes*. É a única bacteriocina produzida comercialmente e legalizada para utilização em alimentos (VERHEUL et al., 1997 apud ROSA; FRANCO, 2008)

As bacteriocinas podem ser divididas em 4 classes de acordo com as propriedades estruturais e físico-químicas (QUADRO 01). As bacteriocinas da classe I e II, as mais conhecidas, apresentam peso molecular inferior a 10 kDa e termo estabilidade. As das classes III e IV não são bem conhecidas, mas apresentam peso molecular superior a 30 kDa são termolábeis e podem ser proteínas hidrofílicas ou complexos formados por proteínas, fosfolipídios e/ou carboidratos (KLAENHAMMER, 1993).

A nisina é a bacteriocina com maior tradição de utilização segura na indústria de alimentos. Em 1953, foi comercializada pela primeira vez na Inglaterra, em 1969, foi avaliada como sendo segura para o uso em alimentos pelo Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization Expert Committee of Food Additives, e em 1983 foi incluída na lista de aditivos alimentares europeus com o número E234. Mais tarde, em 1988, foi aprovada pela U.S. Food and Drug Agency (COTTER et al., 2005 apud RUIZ-LARREA et al., 2006). É utilizada em produtos lácteos (principalmente queijos), produtos cárneos, produtos de ovo líquido, sucos de frutas, alimentos enlatados e cerveja (MELO, 2005; RUIZ-LARREA et al., 2006; ROJO-BEZARES et al., 2007; GALVAGNO et al., 2007; INÊS et al., 2008).

Grupo	Características	Bacteriocinas (grupo Grupo representativo)
I	Lantibióticos, peptídios pequenos (<5KDa) contendo lantionina e B metil lantionina	Nisina, lacticina 481, carnocina UI49, lactocina S, etc.
Ila	Peptídios pequenos, termoestáveis e sintetizados na forma de precursores, os quais saem processados depois da adesão de dois resíduos de glicina. São ativos contra <i>Listeria</i> spp e apresentam a seqüência YGNGV-C comum na parte N-terminal da molécula.	Pediocina pA-1, sakacinas A e P, curvacina A, leucocina A, etc.
Ilb	Sistema de dois componentes, dois peptídios diferentes necessários para a formação de um complexo	Lactococcinas G e F, lactacina F
Ilc	Peptídios que requerem a presença de resíduos de cisteína na forma reduzida para atividade biológica da molécula	Lactococcina B
III	Moléculas grandes sensíveis ao calor	Helveticinas J e V-1829, acidophilucina A lactacinas A e B
IV	Moléculas complexas constituídas por proteínas e uma ou mais moléculas como lipídios ou carboidratos	Plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27, pediocina SJ 1.

QUADRO 01. Classificação das bacteriocinas.

Fonte: Cleveland et al. (2001) apud Rosa e Franco (2008).

Uma propriedade notável da nisina é sua estabilidade à temperatura elevada (120°C) a pH 2,5 sem sofrer perda de atividade (MELO, 2005). Outras vantagens atribuídas a nisina são: segura na cadeia alimentar humana e transmite menos limitações de conservantes químicos, pois são moléculas produzidas naturalmente por microrganismos fermentativos, não há registros de impacto ambiental, por ela ser degradada ao longo da cadeia alimentar humana, protege as propriedades organolépticas de produtos alimentícios, já que não tem impacto sensorial, sua atividade é potencialmente elevada pelo pH e sua utilização permite a rotulagem em produtos orgânicos (RUIZ-LARREA et al., 2006).

Segundo Inês et al. (2008), estudos já foram desenvolvidos no uso da nisina na bioconservação de vinhos, e os resultados apontam ser relevante à aplicação da nisina no controle de bactérias lácticas indesejáveis no vinho, assim a pesquisa sobre bacteriocinas e BAL em vinhos de importância enológica torna-se cada vez mais promissora.

2.3 ANIDRIDO SULFUROSO (SO₂)

O anidrido sulfuroso ou dióxido de enxofre é amplamente reconhecido, tanto nas indústrias de alimentos quanto nas indústrias enológicas, por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. O limite atual legal em vinhos de SO₂ total nos Estados Unidos é de 350 mg L⁻¹, uma concentração bem acima dos níveis normalmente utilizados pelos produtores. No entanto, os vinhos que contêm acima de 10 mg L⁻¹, devem divulgar esta informação no rótulo. Porque o SO₂ é um metabólito de leveduras que pode ser liberado durante a fermentação, assim os vinhos normalmente contêm alguns sulfitos que não foram adicionados durante o processamento (FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

SO₂ inibe microorganismos por vários meios, incluindo a ruptura de pontes disulfeto em proteínas e reação com cofatores NAD⁺, incluindo FAD. Também reage com ATP, para aumentar a probabilidade de mutações letais. Especificamente, o dióxido de enxofre pode decompor a vitamina tiamina em componentes não metabolicamente utilizáveis, embora não seja normalmente um problema a perda de tiamina pode ser uma preocupação quando o suco é armazenado por um período de tempo, antes da sua fermentação. (ROMANO; SUZZI, 1993).

Outra qualidade do SO₂ é auxiliar na proteção do vinho através da sua ação tóxica sobre as leveduras e as bactérias por interferir com os processos bioquímicos dos microorganismos. Esta toxicidade é mais efetiva em bactérias e em certas espécies de leveduras. Também evita as reações de oxidação provocadas pelas leveduras que se desenvolvem mais rapidamente no início da fermentação, sendo esse o motivo pelo qual os mostos necessitam de adição de SO₂, com o objetivo de proteger as antocianinas, os taninos e os compostos aromáticos. A oxidação química do vinho provocada pelo contato com o oxigênio do ar é um fenômeno lento e que provoca a destruição de compostos que são fatores de qualidade nos vinhos. Entretanto este conservante, apesar das suas qualidades acaba dando a defeitos de origem organoléptica e toxicológica (LUCAS, 2009).

Conforme regulamentação pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, no Brasil o limite máximo permitido para vinhos de mesa de anidrido sulfuroso total (SO₂) é de 0,25 g L⁻¹ (MAPA, 2004).

Embora o uso de SO₂ pela indústria enológica durante a produção dos diferentes tipos de vinhos esteja estritamente regulamentado, devido aos seus efeitos indesejáveis (características sensoriais negativas e problemas alergênicos), têm sido investigados vários compostos alternativos, que permitam a estabilização dos vinhos e garantam a sua qualidade final (INÊS, 2008).

2.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E LEVEDURAS CONTAMINANTE DE VINHO

Bactérias ácido lácticas – BAL são microrganismos Gram positivos, não patogênicas (GOLDBERG, 1994), não formadores de esporos, catalase negativos, microaerofílicos, ácido tolerantes e têm como principal produto de fermentação o ácido láctico (KLANDER, 1983). O grupo das BAL, compõem-se de doze gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lastosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pedicoccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Wessella* (JAY, 2000).

Leveduras estão presentes em vários ambientes. As uvas usadas para a elaboração de vinhos trazem consigo, além de *Saccharomyces cerevisiae*, diversos outros gêneros e espécies de leveduras, como por exemplo, os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*, embora não sejam da flora normalmente encontrada na uva, destacam-se pela importância enológica por apresentar potencial na deterioração de vinhos já elaborados. Devido ao metabolismo, as leveduras podem provocar aumento da acidez volátil e a formação de compostos no vinho, levando à depreciação o produto final (SILVA, 2005).

Neste trabalho só iremos descrever sobre o gêneros das bactérias lácticas *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Pedicoccus* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, as quais foram utilizadas nos experimentos.

2.4.1 *Lactobacillus*

Lactobacillus representa um grupo altamente diversificado de bactérias Gram-positivas, microaerofílicas, de curtos ou longos coccobacillus. Espécies dentro deste gênero são geralmente catalase-negativas, embora poucas cepas possam decompor o peróxido de hidrogênio. Seu metabolismo é classificado em homo ou heterofermentativas, dependendo da via fermentativa para hexoses (BEYER; FRIDOVICH, 1985 apud FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

Várias espécies de *Lactobacillus* sp. foram isolados a partir de uvas e vinhos a nível mundial, incluindo: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. diolivorans*, *L. fructivorans*, *L. heterohiochii*, *L. hilgardii*, *L. jensenii*, *L. kunkeei*, *L. leichmanni*, *L. nagelli*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. trichodes*, *L. vermiforme* e *L. yamanashiensis* (DU PLESSIS et al., 2004 apud FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

2.4.2 *Oenococcus*

Bactérias do vinho pertencentes ao gênero *Oenococcus* foram previamente classificados como, *Leuconostoc citrovorum* e *Leuconostoc oenos*. Mais tarde estudos filogenéticos revelam que *L. oenos* representa um subtítulo para separar *Leuconostoc spp* de outros, que resultou na mudança da bactéria a um novo gênero, *Oenococcus* (CARR et al., 2002 apud FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

O. oeni é descritos como Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, catalase-negativos, apresentam células elipsoidal que geralmente são esféricas e ocorrem em pares ou cadeias (CARR et al., 2002 apud FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

Apresenta capacidade de metabolizar o ácido málico encontrado nas uvas para formar ácido láctico através fermentação malolática. Embora outras espécies de bactérias lácticas tenham sido estudadas e utilizadas como cepas comerciais para esta fermentação, cepas de *O.oeni* parecem ter as propriedades fisiológicas tolerantes aos desafios ambientais do vinho e produzem resultados desejáveis dentro de um período de tempo aceitável para o produtor (FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

2.4.3 *Pediococcus*

Das espécies de *Pediococcus* apenas quatro foram isoladas de vinhos, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* e *P. pentosaceus* (EDWARDS; JENSEN, 1992 apud FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

Pediococcus ssp. são caracterizados como Gram-positivas, com motilidade, catalase- negativa, e bactérias aeróbias microaerofilia (WEISS, 1992 apud FUGELSANG; EDWARDS, 2007). *Pediococcus* são quimio-organotróficos e tem o fator de crescimento complexo e exigências de aminoácidos. Além disso, estas são as únicas bactérias lácticas que se dividem em dois planos, o que resulta na formação de pares, tétrades ou grandes grupos de célula esférica (AXELSSON, 1998 apud FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

2.4.4 *Saccharomyces*

O gênero *Saccharomyces* tem passado por inúmeras mudanças desde a sua descoberta, há 150 anos. Quando a primeira publicação sobre taxonomia de leveduras foi compilada por Guilliermond, em 1912, o gênero *Saccharomyces* compreendia 46 espécies divididas em 06 grupos separados de acordo com a atividade fermentativa sobre os açúcares. Em 1952, o número total de espécies deste gênero foi reduzido a 30, uma vez que várias espécies foram agrupadas como sinônimos em *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* variedade *elipsoideus*, *S. carlsbergensis* ou *S. willianus*, enquanto novas espécies foram introduzidas ao gênero. Entretanto, várias outras divisões ocorreram e outras novas espécies foram descritas, principalmente o grupo *Saccharomyces sensu stricto*, obtendo-se como resultado, em 1970, 41 espécies dentro do gênero *Saccharomyces*. Então reduziram drasticamente o gênero *Saccharomyces* em 7 espécies, *Saccharomyces sensu stricto*, previamente com 21 espécies, tornou-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e outras espécies foram introduzidas em outros gêneros como *Zygosaccharomyces* e *Toluraspota*. (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 1993 apud GUIMARÃES, 2005).

Saccharomyces aparecem microscopicamente como células globosas ou ovóides, com brotamento multilateral e, possivelmente, pseudohifas. As colônias são suaves, geralmente filamentos, e, ocasionalmente, altas e opacas.

As duas espécies principais encontradas nos vinhos, *S. bayanus* e *S. cerevisiae* fermentam glicose, sacarose e assimilam maltose. *Saccharomyces* não pode utilizar açúcares como as pentoses (FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

3 METODOLOGIA

As etapas e procedimentos adotados nesta pesquisa estão discriminados a seguir.

3.1 CEPAS DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) E LEVEDURAS E VINHOS

As bactérias lácticas, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Pediococcus sp.*, e *Oenococcus oeni* foram doadas pela Estação Experimental de Videira/SC, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma cepa denominada “B” e outra “T” foram doadas pela Associação Enológica Brasileira. A cepa de *S. cerevisiae* denominada “B” é utilizada na fermentação de vinho branco, e a denominada “T” na de vinho tinto.

Desta forma, formou-se o banco de cepas para a realização desta pesquisa. Todas essas cepas têm importância na indústria enológica, seja na fermentação alcoólica ou malolática, entretanto se não cuidadas ou “usadas” corretamente podem contaminar e causar danos ao vinho.

Os vinhos de mesa seco Bordô e Niágara, foram adquiridos no comércio local.

3.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MEIO DE CULTURA

As bactérias lácticas foram cultivadas em condições microaerofílicas a 30°C por 48 horas no meio de cultura MRS – De Man, Rogosa & Sharpe (Oxoid, Inglaterra), conforme Rojo-Bezares et al., (2007), suplementado com 2% de vinho filtrado e esterilizado. Para *Oenococcus oeni*, o cultivo foi também em condições microaerofílicas a 30°C, mas o tempo de incubação foi de 3 a 4 dias em meio de cultura MLO (caldo malolático) suplementado com 3% de extrato de tomate, conforme Rojo-Bezares et al., (2007) e Terrade et al., (2009).

Conforme Rojo-Bezares et al., (2007), as leveduras foram cultivadas em condições aeróbicas em 25°C por 24 horas e o meio de cultura utilizado foi o YPED (Yeast Extrac Peptone Dextrose).

3.3 TESTES ANTIMICROBIANOS “IN VITRO”

O primeiro teste antimicrobiano das BAL versus nisina e SO₂ foi realizado pelo método “difusão em ágar” em ágar MRS suplementado com 2% vinho. Em uma das cavidades do ágar inoculou-se 50µL da solução de nisina a 100 U.I. mL⁻¹ preparada em água destilada e esterilizada, em outra cavidade adicionou-se 50µL de vinho de mesa seco bordô com 32,0 mg L⁻¹ de SO₂ livre, em outra cavidade 50µL de vinho de mesa seco niágara com 32,0 mg L⁻¹ de SO₂ livre, e na última cavidade adicionou-se 50µL de água esterilizada como controle. Feito isso, incubou-se as placas a 30°C por 48 horas em condições anaeróbicas. Exceto para *O. oeni*, que foi testado em meio de cultura MLO, suplementado com 3% de extrato de tomate, e incubado a 30°C de 3 a 4 dias em condições microaerofílicas.

O teste antimicrobiano das leveduras seguiu-se a mesma metodologia, usando o meio de cultura YPED. E as placas foram incubadas a 25°C por 24 horas em condições aeróbicas.

O segundo teste antimicrobiano das cepas de BAL, também foi realizado por difusão em ágar, mas apenas com duas cavidades. Utilizou-se os meios de cultura próprio para cada cepa. Na primeira cavidade adicionou-se 50µL de vinho a 32,0 mg L⁻¹ de SO₂ livre, combinado com solução de nisina a 100 U.I. mL⁻¹ e na segunda cavidade somente 50µL de vinho a 32,0 mg L⁻¹ de SO₂ livre.

Todos os testes foram realizados em triplicatas e cada triplicata feita duas repetições.

3.4 TESTES ANTIMICROBIANOS DIRETOS E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Este teste antimicrobiano foi realizado diretamente no vinho. Preparou-se 3 diferentes amostras de vinho, na primeira amostra foram inoculadas todas as cepas de BAL, na segunda amostra inoculou-se as cepas de BAL mais solução de nisina a 100 U.I. mL⁻¹, e a última amostra, que se considerou controle, não foi adicionado nada ao vinho. Testou-se nos vinhos bordô e niágara normais e em vinhos esterilizados a 121°C por 15 minutos. Totalizando 12 amostras de vinhos (3 niágara normal, 3 de bordô normal, 3 de niágara esterilizado e 3 de bordô esterilizado). Não foram adicionadas as cepas da

levedura nas amostras, porque a nisina não apresentou ação antimicrobiana contra elas nos testes de difusão em ágar.

Todos os vinhos antes das preparações das amostras foram filtrados e passaram por uma análise físico-química, conforme Avila et al. (1997), determinando sua densidade (mg L^{-1}), grau alcoólico (% v/v), acidez total (meq L^{-1}) e anidrido sulfuroso livre $-\text{SO}_2$ (mg L^{-1}), para fins de comparação no término do teste antimicrobiano.

As amostras dos vinhos foram armazenadas em local fechado, longe da luz e umidade, por um período de 60 dias, em seguida analisou-se a população microbiana e os parâmetros físico-químicos (RUIZ-LARREA et al., 2006) dos mesmos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados os testes de variância (Teste ANOVA) dos tratamentos com e sem nisina entre o vinho niágara normal com bordô normal. E após entre os mesmos vinhos com tratamento térmico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes antimicrobianos “in vitro” e dos testes realizados diretamente no vinho serão descritos a seguir.

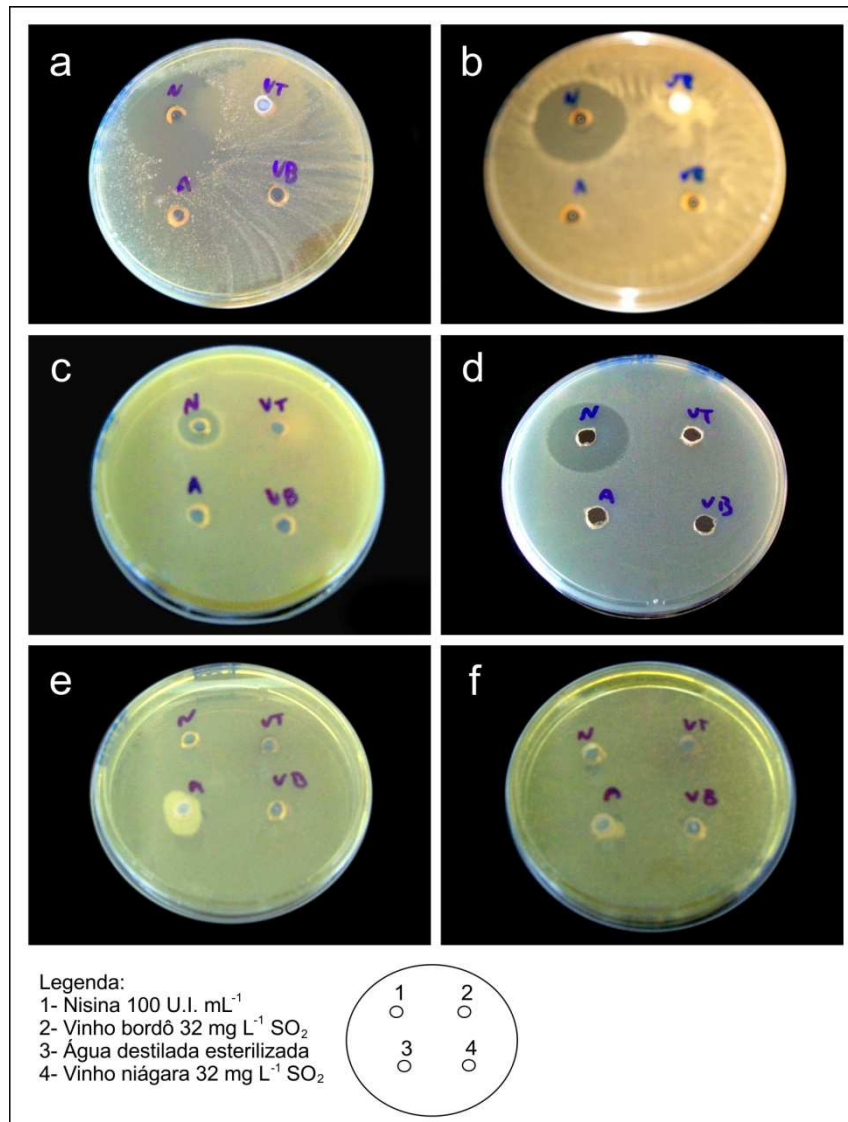
4.1 TESTES ANTIMICROBIANOS “IN VITRO”

Os resultados obtidos no primeiro teste antimicrobiano “in vitro” das cepas de bactérias lácticas e leveduras podem ser visualizados na Fotografia 01 (Experimento 1(a)).

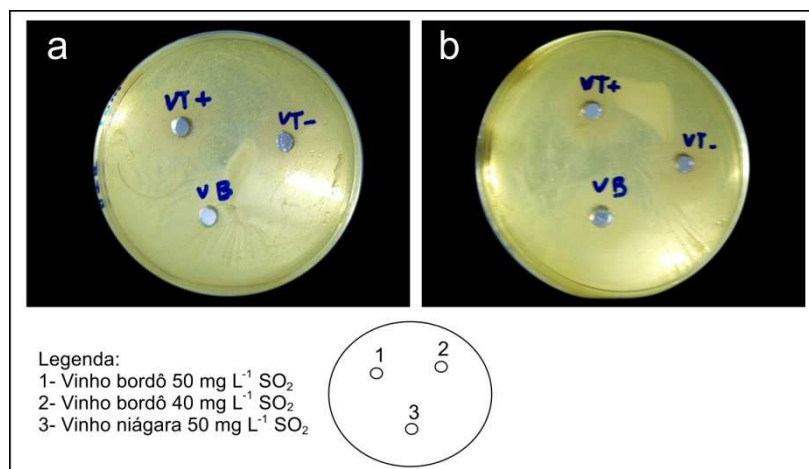
Na Fotografia 01, a foto (a) demonstra o teste contra a bactéria láctica *Lactobacillus brevis*, a foto (b) da bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, a foto (c) *Pediococcus sp.*, e a foto (d) *Oenococcus oeni*. As fotos (e) e (f) são as cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* “B” e “T”, respectivamente. Nota-se que somente a solução nisina (100 U.I. mL⁻¹) apresentou halo de inibição contra todas as cepas das bactérias lácticas. Entretanto para a levedura não houve formação do halo de inibição com nenhuma das soluções.

Então optou-se por realizar mais um teste (Experimento 1(b)) com a levedura *S. cerevisiae*. Na Fotografia 02 pode-se observar que mesmo aumentando os níveis de SO₂ nos dois vinhos testados, não há formação do halo de inibição tanto para a cepa “B” (foto (a)) como para a cepa “T” (foto (b)).

A nisina tem a habilidade de inibir o crescimento microbiano de bactérias Gram-positivas como, por exemplo, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, inclusive algumas cepas patógenas de importância alimentar como, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, entre outras. E não é evidenciado seu potencial contra microrganismos Gram-negativos bem como em leveduras (MELO, 2005).



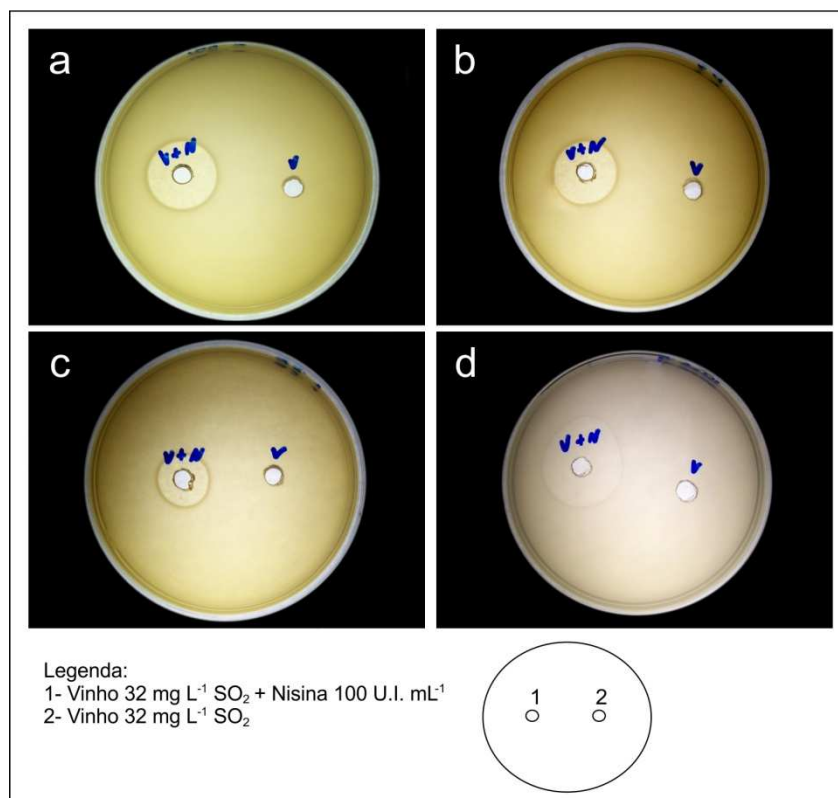
Fotografia 01. Experimento 1(a) - Teste antimicrobiano das bactérias lácticas e cepas da levedura. Fonte: A autora.



Fotografia 02. Experimento 1(b) - Teste antimicrobiano das cepas de levedura com aumento dos níveis de SO₂ livre. Fonte: A autora.

A sensibilidade ao SO_2 varia com a espécie e com a estirpe. O efeito bactericida do SO_2 é atribuído à fração de SO_2 livre que entra na célula por difusão e, no seu interior, é convertida em íão bisulfito (HSO_3^-), que reage com proteínas, ácidos nucleicos e alguns cofatores, inibindo enzimas e consequentemente conduzindo à morte das células (HELANDER; SANDHOLM, 2000).

No segundo teste antimicrobiano (Experimento 2) das bactérias lácticas a solução de nisina foi prepara em vinho branco niágara esterilizado, na mesma concentração (100 U.I. mL^{-1}). Podem-se observar os resultados na Fotografia 03.



Fotografia 03. Experimento 2 - Teste antimicrobiano da nisina combinada com vinho contra BAL. Fonte: A autora

As imagens apresentadas na Fotografia 03 tratam-se das cepas das bactérias lácticas, sendo (a) *Lactobacillus brevis*, (b) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, (c) *Pediococcus sp.*, e (d) *Oenococcus oeni*. Novamente percebe-se que para todas as cepas o halo de inibição só ocorreu na presença da nisina.

Na Tabela 01 observar-se a diferença no diâmetro do raio dos halos de inibição das BAL (média das três duplicatas e duas repetições), dos dois experimentos realizados.

TABELA 01. Ação da nisina sobre as BAL em teste de difusão em ágar

BAL \ Experimento*	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. del. subsp. lactis</i>	<i>Pediococcus sp</i>	<i>O. oeni</i>
1	1,06 cm	0,84 cm	0,40 cm	0,78 cm
2	0,64 cm	0,47 cm	0,43 cm	0,90 cm

*Diâmetro dos raios (cm) dos halos de inibição das BALs. Fonte: A autora.

Nota-se que a cepa mais sensível à nisina no primeiro teste foi a *Lb. brevis* (maior halo de inibição 1,06 cm), e a mais resistente foi a *Pediococcus* (menor halo de inibição 0,40 cm). Já no segundo teste antimicrobiano a cepa mais sensível foi a *O. oeni* (maior halo de inibição 0,90 cm) e a mais resistente foi a *Pediococcus* (menos halo de inibição 0,43 cm).

Como pode-se perceber somente para *Pediococcus* e *O. oeni* a nisina teve seu efeito inibitório reforçado na presença do SO₂ e etanol (etanol contido no vinho) (Experimento 2).

Conforme os resultados obtidos por Rojo-Bezares et al., (2007), a cepa *O. oeni* também foi a mais sensível a nisina, dentre as demais 64 BAL estudadas (*Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. paracasei*, *Pediococcus parvulus*, entre outras), 23 bactérias acéticas BAA e 20 leveduras. A concentração inibitória mínima de nisina para *O. oeni* foi de 0,024 µg mL⁻¹ e 12,5 µg mL⁻¹ para as outras espécies de BAL do vinho. Em seu estudo também detectou que a nisina aumenta seu potencial inibitório quando está em combinação com o metabissulfito de potássio (SO₂) e etanol.

Em outro estudo realizado por Ruiz-Larrea et al., (2006), onde foram testadas diferentes concentrações de metabissulfito de potássio (18, 25 e 100 mg/mL) e de nisina (0; 0,78; 6,25 e 50 mg L⁻¹) em vinho tinto na região de Rioja – Espanha o maior efeito inibitório foi notado na combinação 25mg mL⁻¹ de SO₂ e 50mg L⁻¹ de nisina para todas as cepas BAL, BAA e leveduras após 2 meses de armazenamento.

4.2 TESTES ANTIMICROBIANOS DIRETOS E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados obtidos do teste antimicrobiano direto, ou seja, realizado na própria garrafa de vinho e testado por 60 dias de armazenamento, mais suas análises físico-químicas e microbiológicas estão detalhadas a seguir.

4.2.1 Análises Físico-Químicas

Os parâmetros físico-químicos (densidade relativa, grau alcoólico, anidrido sulfuroso livre (SO₂) e acidez total) dos vinhos normais e com tratamento térmico antes e após o período de armazenamento (60 dias) estão descritos nas Tabelas 02 e 03, respectivamente. Optou-se por fazer um tratamento térmico (autoclavagem) nas amostras dos vinhos (bordô e niágara) para fins de comparação físico-química e análise microbiológica, sendo que teoricamente os vinhos com tratamento térmico estariam totalmente livres de contaminação.

As amostras “Controles” são de vinhos que não foram submetidos aos tratamentos.

As amostras “Sem nisina” são os vinhos que receberam inóculo de bactérias lácticas.

As amostras “Com nisina” são os vinhos que receberam inóculo de bactérias lácticas mais a nisina (100 U.I. mL⁻¹).

TABELA 02. Parâmetros Físico-Químicos dos Vinhos Normais

Análises Físico-Químicas	Niágara Normal				Bordô Normal			
	Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento			Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento		
	Controle	Controle	Sem Nisina	Com Nisina	Controle	Controle	Sem Nisina	Com Nisina
Densidade Relativa (mg L ⁻¹)	0,991	0,991	0,991	0,991	0,995	0,995	0,995	0,995
Álcool (% v/v)	10,3	10,3	10,5	10,5	10,5	10,5	10,3	10,5
SO ₂ livre (mg/L)	32,0	22,4	22,4	25,6	32,0	22,4	19,2	19,2
Acidez Total (meq L ⁻¹)	100,0	97,0	96,0	98,0	103,0	105,0	99,0	103,0

Fonte: A autora.

TABELA 03. Parâmetros Físico-Químicos dos Vinhos com Tratamento Térmico

Análises Físico-Químicas	Niágara com Tratamento Térmico				Bordô com Tratamento Térmico			
	Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento			Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento		
	Controle	Controle	Sem Nisina	Com Nisina	Controle	Controle	Sem Nisina	Com Nisina
Densidade Relativa (mg L ⁻¹)	0,996	0,996	0,996	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000
Álcool (% v/v)	7,2	7,2	7,0	7,0	7,0	7,0	6,9	7,0
SO ₂ livre (mg/L)	16,0	9,6	9,6	9,6	16,0	9,6	12,8	12,8
Acidez Total (meq L ⁻¹)	101,0	104,0	100,0	100,0	112,0	112,0	110,0	110,0

Fonte: A autora.

Dos resultados obtidos, considerando todas as amostras, a densidade relativa foi o único parâmetro que não modificou com os 60 dias de armazenamento, e nota-se que não houve diferença em nenhum dos tratamentos (com ou sem nisina). Porém nos vinhos que passaram pelo tratamento térmico observa-se que a densidade aumenta em relação aos demais vinhos, sugere-se que isso acontece porque no processo de autoclavagem o vinho evapora, deixando o açúcar contido mais concentrado. Conforme Avila et al. (1997), apesar de o vinho ser considerado seco por estar com a densidade relativa a $0,991 \text{ mg L}^{-1}$ (niágara) e $0,995 \text{ mg L}^{-1}$ (bordô) ainda contem algumas gramas de açúcar, em torno de 5 g L^{-1} .

Os vinhos com tratamento térmico apresentam álcool muito menor que os normais, isso acontece porque o álcool é uma substância volátil e como o vinho passou por o processo de autoclavagem já eram esperados esses valores.

Em relação ao anidrido sulfuroso (SO_2) observa-se que após os 60 dias de armazenamento seu valor decaiu em todas as amostras. E da mesma forma que o álcool quando submetido a tratamento térmico (em autoclave) ele também volatiliza.

Quanto à acidez total não observamos relação com o passar do tempo e nem com os diferentes tratamentos.

No Gráfico 01 verifica-se o resultado das análises físico-químicas das amostras dos vinhos após 60 dias de armazenamento (Grau Alcólico, Densidade Relativa, Anidrido Sulfuroso Livre, Acidez Total).

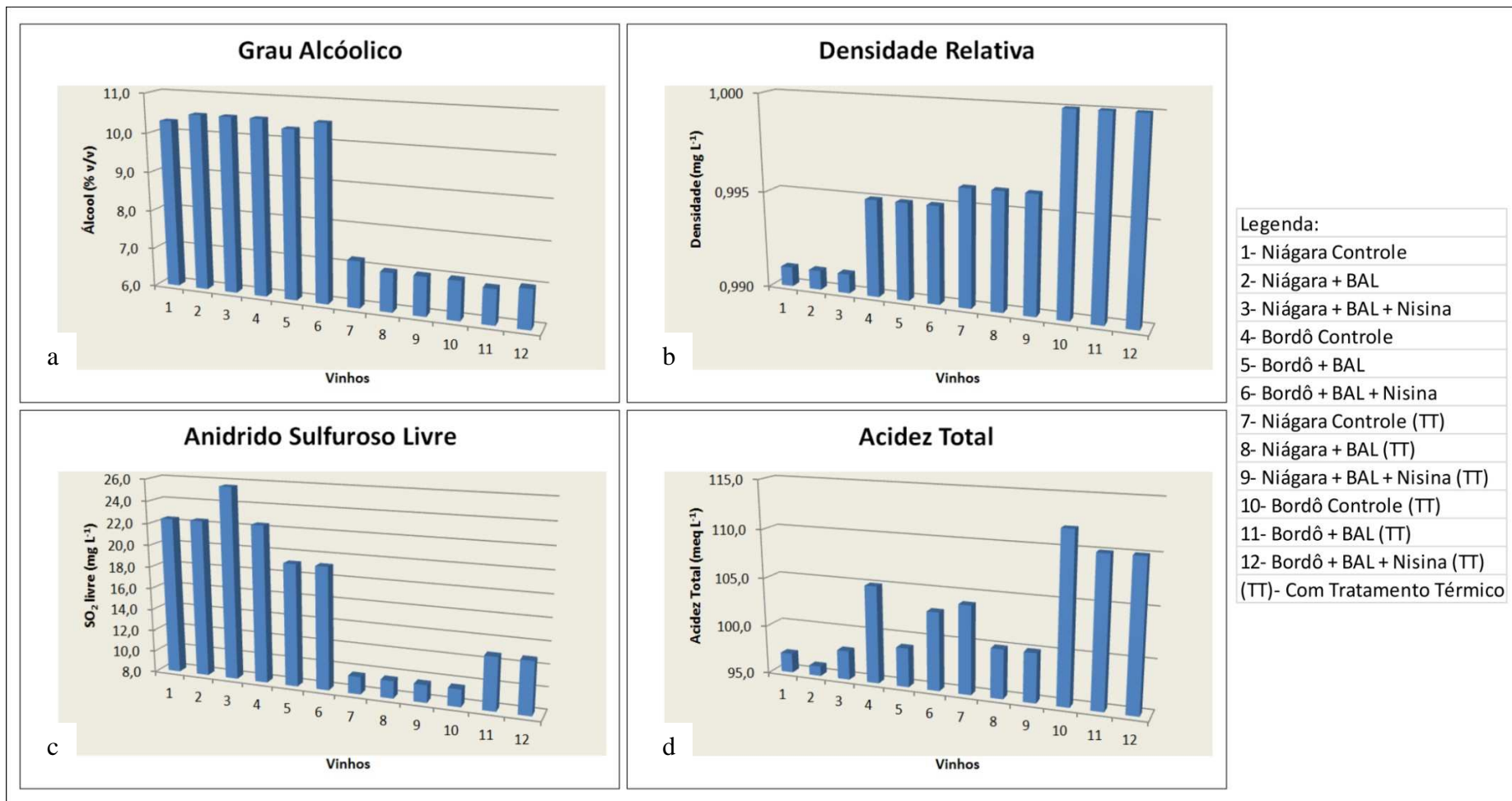


Gráfico 01. Análises Físico-Químicas: (a) Grau alcoólico; (b) Densidade relativa; (c) Anidrido sulfuroso livre e (d) Acidez total em amostras dos vinhos após 60 dias de armazenamento. Fonte: A autora.

Como observado por Tecchio, et al., (2007), em seu trabalho realizado em Flores da Cunha, RS, com o objetivo de caracterizar físico-quimicamente o vinho bordô, encontrou praticamente os mesmos resultados, como, densidade ($0,996 \text{ mg L}^{-1}$), álcool (10,5 % v/v), e acidez total ($91,0 \text{ meq L}^{-1}$). O baixo teor de álcool caracteriza essa cultivar por ter baixo potencial de produção de açúcar.

Em uma análise físico-química realizada no vinho niágara por Salvador, (2005), os valores obtidos também são parecidos, como densidade ($0,992 \text{ mg L}^{-1}$), álcool (10,5 % v/v), anidrido sulfuroso (32 mg L^{-1}) e acidez total ($90,0 \text{ meq L}^{-1}$).

Os principais ácidos contidos no vinho são o tartárico, málico e cítrico, láctico e acético. O ácido tartárico é o mais específico na uva e no vinho, também é o mais forte e mais resistente à ação de decomposição das bactérias. O que é normal acontecer em cultivares *Vitis labrusca*, como o bordô e niágara (CORRÊA et. al., 2006).

No Brasil, os parâmetros físico-químicos para vinho de mesa, como o caso do bordô e niágara, estabelecidos pela Portaria N° 55, de 27 de julho de 2004, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), são:

- Açúcar Total para ser considerado seco (g L^{-1}) – máximo 5.
- Álcool Etílico (% v/v) - máximo 13,0 e mínimo 10,0;
- Acidez Total (meq L^{-1}) – máximo 130,0 e mínimo 55,0;
- Anidrido Sulfuroso total (g L^{-1}) – máximo 0,25;

Na prática enológica a determinação do anidrido sulfuroso se dá pelo SO_2 livre e não pelo SO_2 total, ficando numa faixa máxima de $35,0 \text{ mg L}^{-1}$, porque é o SO_2 livre que vai atuar diretamente no vinho em caso de contaminação (FUGELSANG; EDWARDS, 2007) Como pode-se notar todos os vinhos analisados estão dentro da faixa estipulada pela Portaria.

A nisina como já dita anteriormente não causa nenhum efeito sensorial no produto, e observa-se crescente interesse da indústria de alimentos e bebidas sobre o potencial de utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos (NASCIMENTO et al., 2008).

4.2.2 Análises Microbiológicas

Os resultados obtidos da análise microbiológica de todas as amostras antes e após os 60 dias de armazenamento e seus devidos tratamentos estão descritos nas Tabelas 04 (Vinhos Normais) e 05 (Vinhos com Tratamento Térmico).

As amostras “Vinho Base” são os vinhos submetidos ao inóculo das bactérias lácticas, para realização do teste antimicrobiano.

As amostras “Vinho + BAL” são os vinhos que foram submetidos ao inóculo das bactérias lácticas, ou seja, é a mesma amostra do vinho base, porém após os 60 dias de armazenamento.

As amostras “Vinho + BAL + Nisina” são os vinhos que foram submetidos ao inóculo das bactérias lácticas mais a nisina, também é a mesma amostra do vinho base, mas com a nisina presente e analisada após os 60 dias de armazenamento.

As amostras “Controle” são os vinhos sem tratamento e armazenados por 60 dias. Em comparação aos vinhos com e sem nisina, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos resultados das análises físico-químicas. Da mesma forma não foi observada diferença significativa em relação à presença de bactérias lácticas entre os dois tratamentos a que foram submetidas às amostras de vinhos.

TABELA 04. Parâmetro Microbiológico dos Vinhos Normais.

Análise Microbiológica	Niágara Normal				Bordô Normal			
	Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento			Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento		
	Vinho Base (com inóculo das BALs)	Vinho + BAL	Vinho + BAL + Nisina	Controle sem inóculo	Vinho Base (com inóculo das BALs)	Vinho + BAL	Vinho + BAL + Nisina	Controle sem inóculo
Contagem de UFC mL ⁻¹ das bactérias lácticas: <i>Lb. brevis</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> ; <i>Pediococcus</i> ; <i>O. oeni</i>	4 x 10 ⁷ UFC mL ⁻¹	3,6 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹	2,4 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹	5,5 x 10 ³ UFC mL ⁻¹	4 x 10 ⁷ UFC mL ⁻¹	2,4 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹	3,1 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹	4,7 x 10 ⁴ UFC mL ⁻¹

Fonte: A autora.

TABELA 05. Parâmetro Microbiológico dos Vinhos com Tratamento Térmico.

Análise Microbiológica	Niágara com Tratamento Térmico				Bordô com Tratamento Térmico			
	Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento			Vinho antes do tratamento	Vinho após tratamento		
	Vinho Base (com inóculo das BALs)	Vinho + BAL	Vinho + BAL + Nisina	Controle sem inóculo	Vinho Base (com inóculo das BALs)	Vinho + BAL	Vinho + BAL + Nisina	Controle sem inóculo
Contagem de UFC mL ⁻¹ das bactérias lácticas: <i>Lb. brevis</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> ; <i>Pediococcus</i> ; <i>O. oeni</i>	4 x 10 ⁷ UFC mL ⁻¹	3,1 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹	2,1 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹	4,2 x 10 ³ UFC mL ⁻¹	4 x 10 ⁷ UFC mL ⁻¹	1,7 x 10 ⁵ UFC mL ⁻¹	10 ⁵ UFC mL ⁻¹	4,5 x 10 ³ UFC mL ⁻¹

Fonte: A autora.

Nota-se que em todos os tratamentos houve um decréscimo na quantidade de bactérias inoculadas, sendo a concentração inicial em todos os casos de 10^7 UFC mL⁻¹ e a final em média de 10^5 UFC mL⁻¹.

Apesar do nº log de UFC dos vinhos com nisina ser sempre menor que os vinhos sem nisina, tanto para os normais quanto para os vinhos com tratamento térmico, não houve diferença significativa entre os resultados.

Outro ponto importante é que mesmo o vinho não sendo contaminado propositalmente (controle) há presença de microrganismos contaminantes no final do período de armazenamento (log de 10^3 UFC mL⁻¹).

O Gráfico 02 mostra os detalhes da análise microbiológica, para os vinhos normais e com tratamento térmico, respectivamente.

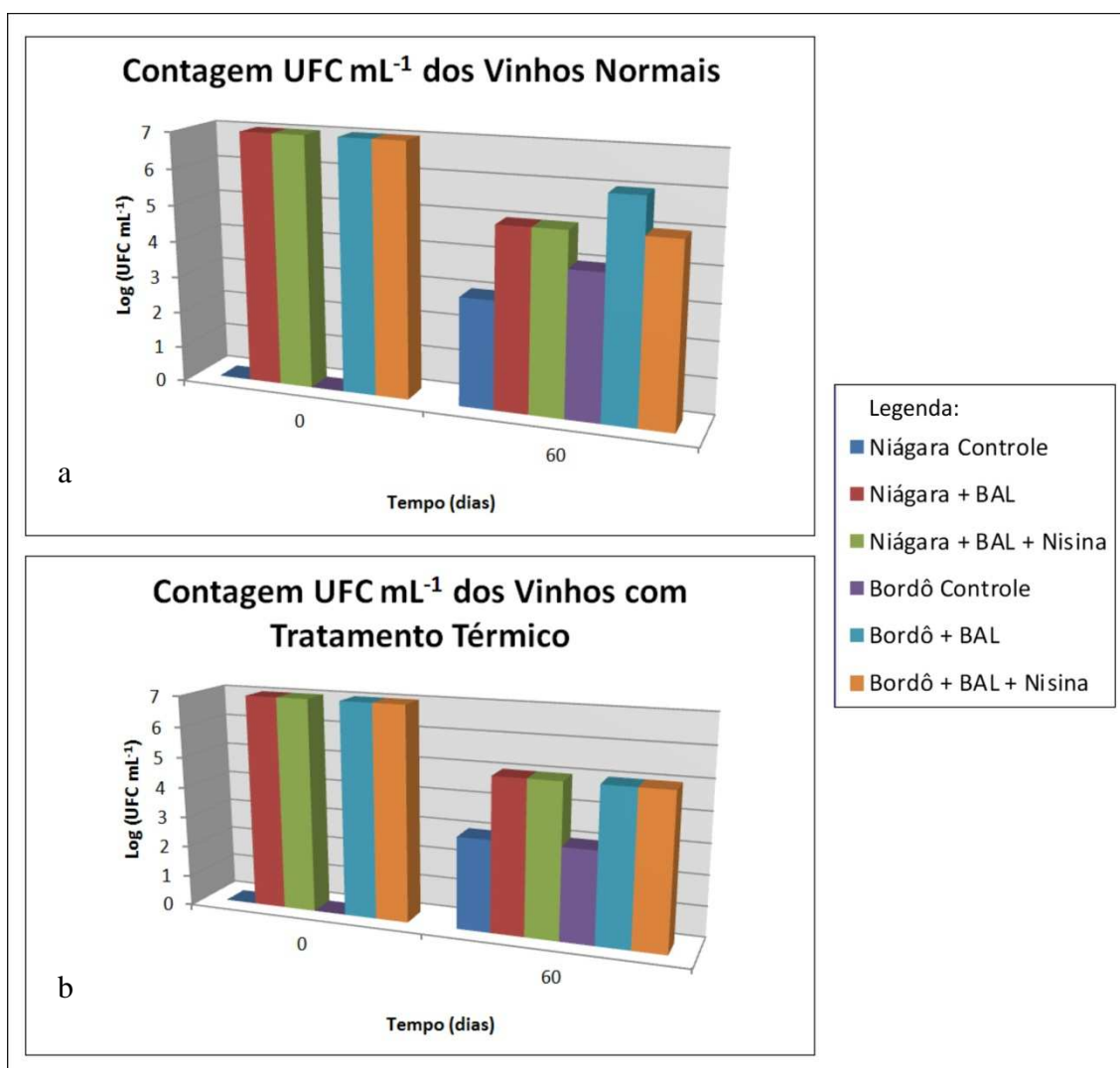


Gráfico 02. Resultados das análises microbiológicas das amostras dos vinhos (a) Sem tratamento térmico e (b) Com tratamento térmico, após 60 dias de armazenamento. Fonte: A autora.

Vanderlinde e Benedet, (1996), analisaram vinhos branco, rose e tinto, (secos e suaves), e encontraram maiores concentrações de bactérias, leveduras e fungos nos dois tipos de vinhos tintos, porém citam que os vinhos brancos e roses sofreram filtrações mais rigorosas.

As bactérias lácticas causam diversos efeitos no vinho, principalmente na fermentação malolática (FML). Dentre os efeitos benéficos pode-se citar: a) decréscimo na acidez (descarboxilação do ácido L-málico a ácido L-lático); b) melhorias nas características organolépticas pela fermentação malolática; c) aumento da estabilidade microbiológica dos vinhos (INÊS et al., 2009).

Há um conjunto de atividades enzimáticas detectadas em várias espécies de BAL que contribuem para uma maior complexidade do aroma dos vinhos após a FML, como a hidrólise dos glucosídeos pela ação de α -glucosidases com o objetivo de realçar a fração aromática dos vinhos (MATTHEWS et al., 2004)

Outra atividade enzimática com relevância positiva em termos enológicos é a da enzima tanino-acil-hidrolase, vulgarmente designada por tanase, que catalisa a hidrólise das ligações éster em taninos hidrolisáveis tais como o ácido tânico, libertando glucose e ácido gálico. A atividade da tanino-acil-hidrolase, apesar de pouco dispersa entre as BAL, deve ser usada como critério na seleção de culturas maloláticas 'starter', uma vez que confere vantagens no processo de vinificação ao reduzir a adstringência e turvação no vinho. Em um estudo realizado por Vaquero et al., (2004) em um conjunto de 78 estirpes pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*, a tanase apenas foi detectada em estirpes de *Lactobacillus plantarum*.

Entre os principais efeitos nocivos das bactérias lácticas no vinho, está a degradação da arginina e formação de carbamato de etilo. A arginina é um dos aminoácidos presente em maiores concentrações no mosto e no vinho. A sua utilização originam citrulina e carbamoil fosfato, precursores do carbamato de etilo, composto potencialmente carcinogênico (INÊS et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

Apesar de os dados obtidos com a ação da nisina na inibição de microrganismos contaminantes de vinho em testes antimicrobianos diretamente no vinho, é possível concluir que a nisina tem potencial como bioconservadora de vinhos, comprovado pelos testes antimicrobianos “in vitro”, contra as bactérias lácticas testadas (*Lb. brevis*; *Lb. delbrueckii*; *Pediococcus*; *O. oeni*). Já para as cepas (“B” e “T”) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a nisina não tem o mesmo potencial.

Em relação às análises físico-químicas, grau alcoólico e níveis de SO₂, os vinhos submetidos ao tratamento térmico ficaram bem abaixo dos vinhos sem tratamento térmico (normais), possivelmente pela volatilidade desses compostos. Em comparação aos vinhos com e sem nisina, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos resultados das análises físico-químicas.

A nisina não influencia sobre as características organolépticas e sensoriais do vinho.

REFERÊNCIAS

- AEB - REGIÕES VITIVÍNICOLAS BRASILEIRAS.** Disponível em:
http://www.enologia.org.br/conteudo.asp?id_artigo=346&id_categoria=4&sTipo=artigo&sSecao=curiosidades&sSubSecao=&bSubMenu=1&sParamMenu=
Acesso em: 09 Jun de 2010.
- AVILA, L. D.; BORTOLINI, A.; BALESTRIN, V. L. B. C. **Metodologias Analíticas Físico-Químicas – Laboratório de Enologia.** Apostila do Curso Superior de Tecnologia EM Viticultura e Enologia. Escola Agro técnica Federal “Presidente Juscelino Kubitschek”. Bento Gonçalves – RS, 1997.
- BARBOSA, S. K. B. & ROSA, L. C. **Aplicação da Appcc (Haccp) na indústria vinícola – situação atual e perspectivas.** XXIII Encontro Nac. de Eng. de Produção - Ouro Preto, MG, Brasil, 21 a 24 de out de 2003.
- BERNARDI, C. **Avaliação Nacional de Vinhos – Safra 2010.** Associação Brasileira de Enologia. 2010.
- BONFIM, T. M. B.; MACHADO, I. M. P.; CHOCIAI, J. G.; RUSCHEL, A. P.; DÜCK, B.; CÁCERES, L. M. G.; CHOCIAI, M. B. **Quality of the Wine Produced in Colombo City in Harvest of 2001.** Visão Acadêmica, Curitiba, v.3, n.1, p.43-48, Jan-Jun/ 2002.
- CHALFUN, N. N. J., PIO, R., VILLA, F. **Recomendações Técnicas para a Cultura da Videira.** Ciência Rural, v. 30, n. 4, 2000.
- CORRÊA, J. I., WALDRICH, K. M., LAZZARI, M. F. **Vinhos.** Trabalho apresentado para a disciplina de Engenharia Bioquímica. Florianópolis, agosto de 2006.
- EULEUTERIO, M. D., MALGARIM, M. B., STEFANOVICZ, B. R., MENDES, P. C. D., AYUB, R. A. **Diferentes tipos de poda na produção da videira cv. Niágara Branca.** 4º Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais. 25 a 29 agosto de 2008.
- FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine Microbiology – Practical Applications and Procedures.** Second Edition. Springer Science and Business Media, LLC. 2007.
- GALVAGNO, M. A., GIL, G. R., IANNONE, L. J., CERRUTTI P. **Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process.** Revista Argentina de Microbiologia. 39: 170-176, 2007.
- GASNIER, V. **O Livro do Vinho.** Consultoria deste edição Josimar Melo. Nome original do livro: How to choose wine (tradução Elvira Serapicos). Segunda edição – São Paulo. Publifolha – 2009.

GIOVANNINI, E., **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999.

GOLDBERG, I. (Ed). **Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals**. Functional Foods, New York : Chapman & Hall Inc., cap. 9,14 e 20, 1994.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, Identificação e Seleção de Cepas de Levedura *Saccharomyces cerevisiae* para Elaboração de Vinho**. Dissertação de Mestre apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HELANDER, I.M; SANDHOLM, T.M. **Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin**. International Journal of Food Microbiology. 60 (2-3), 2000.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. **Review: Wine Lactic Acid Bacteria – Part I**. *Ciência Téc. Vitiv.* 23 (2) p.81-96. Portugal, 2008.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. **Review: Wine Lactic Acid Bacteria – Part II**. *Ciência Téc. Vitiv.* 24 (1) 1-23. 2009

JAY, J. **Modern food microbiology**, 6th ed., Mayland: An Aspen publication, 2000.

KLAENHAMMER, T.R. **Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria**. *FEMS Microbiol. Rev.*, n.12, p.39-85, 1993.

KLANDER, O., **Carbohydrate metabolism in lactic bacteria**. *Ant van Leuw.*, v.49,p.209-224, 1983.

LUCAS, D. C. **Influência da Adição de Dimetil Dicarbonato (DMDC) em Vinhos Tintos**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro. Departamento de Química. 2009.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e dos Derivados da Uva e do Vinho**. Portaria nº 55, de 27 de julho de 2004.

MATTHEWS A., GRIMALDI A., WALKER M., BARTOWSKY E., GRBIN P., JIRANEK V. **Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification**. *Appl Environ. Microbiol* 70 (10): 5715-5731, 2004.

MELO, N. R.; SOARES, N, F, F.; GONÇALVES, M, P, J. **Nisina: Um Conservante Natural para Alimentos**. *Revista Ceres*, 52 (303), p. 921- 938, 2005.

MORENO-ARRIBAS M.V., POLO M.C. **Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends**. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (4), 265-286, 2005.

NACHTIGAL, J. C., SCHNEIDER, E. P. **Recomendações para produção de videiras em sistemas de base ecológica.** *Embrapa Uva e Vinho.* ISSN 1808-4648 Outubro, 2007.

NASCIMENTO, M. S., MORENO, I., KUAYE, A. Y. **Bacteriocinas em alimentos: uma revisão.** *Braz. J. Food Technol.*, v. 11, n. 2, p. 120-127, abr./jun. 2008

PIARD, J.C.; LOIR, Y.L.; POQUET, I.; LANGELLA, P. **Bactérias Lácticas.** *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento - Encarte Especial.* p 80-84, 2001.

RENOUF, V., STREHAIANO, P., LONVAUD-FUNEL, A. **Effectiveness of Dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine.** *Food Control.* 19. p. 208–216. 2008.

ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C.; RUIZ-LARREA, F. **Antimicrobial activity of Nisin Against *Oenococcus oeni* and Other Wine Bactéria.** *International Journal of Food Microbiology* cap.116 p. 32–36, 2007.

ROMANO, P., SUZZI, G. **Sulphur dioxide and wine microorganisms.** In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* G.H. Fleet (Ed.), Chapter 13, pp. 373–393. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 1993.

ROMBALDI, C. V., FERRI, V. C., BERGAMASQUI, M., LUCHETTA, L., ZANUZO, M. R. **Produtividade e Qualidade de Uva, cv. Bordô (ives), sob dois sistemas de cultivo.** *R. bras. Agrociência*, v.10, n. 4, p. 519-521, out-dez, 2004

ROSA, C, M., FRANCO, B, D, G, M. **Bacteriocinas de Bactérias Lácticas.** *Conscientiae Saúde. Rev. Cient., Uninove - São Paulo.* V. 1 : 09-15. 2008.

RUIZ-LARREA, F.; ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; NAVARRO, L.; DÍEZ, L.; PORTUGAL, C. B.; FERNÁNDEZ, R.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. **Bacteriocins for Wine Microbiological Control and Reduction of SO₂ Levels.** Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino. Universidad de La Rioja.. Spain, 2006.

SALVADOR, D. **Avaliação de cortes entre variedades na elaboração de vinho branco de mesa.** Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves Curso superior de tecnologia em viticultura e enologia. Bento Gonçalves, 2005.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. **Bacteriocinas e Enzimas Produzidas por *Bacillus* Spp. para Conservação e Processamento de Alimentos.** *Alim. Nutr.*, Araraquara v.16, n.4, p.403-411 , out./dez. 2005.

SILVA, A S. **Dekkera e Brettanomyces: Leveduras não Competitivas que Deterioram Vinhos.** Embrapa. ISSN 1516-8107 Dezembro, 2005

TECCHIO, F. M., MIELE, A., RIZZON, L. A. **Notas Científicas - Características sensoriais do vinho Bordô.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.42, n.6, p.897-899, jun. 2007.

TECCHIO, F. M., MIELE, A., RIZZON, L. A. **Composição Físico-Química do vinho Bordô de Flores da Cunha, RS elaborados com uvas maturadas em condições de baixa precipitação.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1480 – 1483, set – out, 2007.

TERRADE, N.; NOEL, R.; COUILLAUD, R.; ORDUÑA, R, M. **New Chemically Defined Medium for Wine Lactic Acid Bactéria.** Food Research International cap. 42 p. 363–367. 2009.

VANDERLINDE, R., BENEDET, H. D. **Contagem Microbiológica em Vinhos e sua Importância na Manutenção da Qualidade do Produto.** B. CEPPA, Curitiba, v.14, n.1, p. 105-110, jan-jun, 1996.

VAQUERO I., MARCOBAL A., MUNOZ R. **Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine.** *Int. J.Food Microbiol.* 96 (2): 199-204, 2004.