100 REGIÃO DEMARCADA DO DÃO

ANO CEM: COMEMORAR É COMEÇAR.

UNBOTTLED

1º CONGRESSO INTERNACIONAL DOS VINHOS DO DÃO

INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

1st INTERNATIONAL DÃO WINE CONGRESS

INNOVATION AND DEVELOPMENT

VISEU, PORTUGAL | 3, 4, 5, E 6 DE JUNHO, 2009

VISEU, PORTUGAL | 3rd, 4th, 5th, E 6th DE JUNE, 2009

DÃO VINHOS DO DÃO

ELEGÂNCIA E MATURIDADE

DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA A REDUÇÃO DO TEOR DE SULFUROSO EM VINHOS

Cláudia NUNES[1]; Sílvia M. ROCHA[1]; Jorge A. SARAIVA[1]; José A. LOPES DA SILVA[1]; Sónia MENDO[2]; Manuel A. COIMBRA[1]

[1]DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E [2]DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, UNIVERSIDADE DE AVEIRO, 3810-193 AVEIRO, PORTUGAL. E-MAIL: claudianunes@ua.pt

RESUMO:

A adição de sulfuroso nas diferentes etapas de vinificação tem por objectivo impedir o crescimento microbiológico de espécies nocivas ao vinho, assim como actuar como antioxidante, mantendo as características sensoriais do vinho. Contudo, os produtores têm procurado reduzir a utilização de sulfuroso dada a sensibilidade alérgica a este composto por cerca de um terço dos consumidores.

Neste trabalho, testaram-se três tratamentos diferentes com o objectivo de desenvolver tecnologias para a substituição total ou parcial do sulfuroso: (1) adição de um sesquiterpenóide, (2) adição de uma quitosana e (3) utilização da tecnologia de alta pressão hidrostática. Para este estudo foram utilizados dois vinhos, um tinto e um branco, e os tratamentos seleccionados foram efectuados no fim da fermentação alcoólica. A eficácia dos tratamentos como substituintes do sulfuroso na actividade anti-microbiana e antioxidante em vinhos, assim como na cor, foi avaliada ao longo do armazenamento.

Ao fim de três meses de armazenamento os vinhos brancos e tintos tratados com quitosana e alta pressão não apresentavam crescimento de leveduras e bactérias. No entanto, no vinho sem tratamento e no vinho em que só foi adicionado o sesquiterpenóide verificou-se crescimento de leveduras (5 -8x10^3 UFC/mL). A actividade antioxidante foi superior nos vinhos tratados com sesquiterpenóide (30-40%), quitosana (15-25%) e alta pressão (45%) em comparação com o vinho sem tratamento. No vinho tinto não se verificaram alterações na cor com os tratamentos, enquanto que no vinho branco se observou uma intensidade de cor inferior para os vinhos tratados por adição de sesquiterpenóide e aplicação de alta pressão em relação ao vinho sem tratamento.

Embora ainda preliminares, estes resultados mostram que a adição do sesquiterpenóide ou da quitosana, assim como a utilização da tecnologia de alta pressão hidrostática são tratamentos promissores como substituintes das propriedades de conservação conferidas pelo sulfuroso aos vinhos.

Palavras chave: sesquiterpenóide, quitosana, alta pressão hidrostática, actividade antioxidante, actividade anti-microbiana, cor

1 – INTRODUÇÃO

O anidrido sulfuroso é um produto usado como antisséptico e antioxidante, sendo provavelmente um dos aditivos mais versátil e eficiente para estes propósitos. A presença deste composto inibe o desenvolvimento dos microrganismos, sendo as bactérias mais sensíveis do que as leveduras. A sua capacidade antioxidante deve-se à combinação com o oxigénio livre e à sua acção na inactivação de enzimas como a polifenoloxidase (PPO), a peroxidase e as proteases. No vinho branco, o anidrido sulfuroso impede o seu escurecimento. O anidrido sulfuroso pode inibir a reacção de Maillard, o que também contribui para a estabilização da cor do vinho (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Apesar de todas as vantagens, os sulfitos resultantes da adição de anidrido sulfuroso aos vinhos podem desencadear reacções alérgicas nos consumidores mais sensíveis a estes compostos, originando dores de cabeça, náuseas, irritações gástricas e dificuldades respiratórias, sobretudo em doentes asmáticos (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Consequentemente, a concentração máxima de sulfuroso nos vinhos permitida pela União Europeia tem vindo a ser progressivamente reduzida e a sua presença passou a ser de menção obrigatória no rótulo da garrafa (Regulamento (CE) nº 1493/1999; nº 423/2008).

Os sesquiterpenóides são metabolitos secundários das plantas e algas. Estes compostos apresentam actividade anti-microbiana e antioxidante (Haraguchi et al., 1997; Simões et al., 2008), tendo diferentes aplicações medicinais (Wang et al., 2005; Xu et al., 2000). A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da quitina, um componente do exoesqueleto dos crustáceos, que possui propriedades antioxidantes e anti-microbianas (Shahidi et al., 1999) e também pode impedir o escurecimento do vinho (Spagna et al., 2000).

A tecnologia de alta pressão hidrostática permite pasteurizar alimentos sem aplicação de temperatura, mantendo as propriedades organolépticas e nutricionais. Estudos efectuados em vinho demonstraram que a AP permite inactivar microrganismos sem provocar alterações a nível das características sensoriais do vinho (Mok et al., 2006).

Com este trabalho visa-se a aplicar metodologias que permitam a redução ou mesmo eliminação da adição de sulfuroso de forma a reduzir o teor de sulfitos nos vinhos. Com esse objectivo foi estudado o efeito da aplicação de três tratamentos: adição de um sesquiterpenóide, adição de quitosana e tratamento por alta pressão. Neste estudo foram utilizados dois vinhos, um tinto e um branco, e os tratamentos seleccionados foram efectuados no fim da fermentação alcoólica. A eficácia dos tratamentos como substituintes das propriedades conferidas pelo anidrido sulfuroso na actividade anti-microbiana e antioxidante, assim como a cor, foram avaliadas isoladamente e em combinação ao longo do tempo de armazenamento.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostras

Para este estudo foram utilizados um vinho tinto e um vinho branco, ambos produzidos em microvinificadores pela empresa Dão Sul SA. Durante todo o processo de vinificação não foi adicionado anidrido sulfuroso. Após a fermentação alcoólica os dois vinhos foram sujeitos a três tratamentos: 1) adição de um sesquiterpenóide, 2) adição de uma quitosana e 3) tratamento por alta pressão, de forma isolada e em combinação. Assim, obtiveram-se vinhos brancos (B) e tintos (T) resultantes de cada um dos 3 tratamentos (Sq - sesquiterpenóide; Q – quitosana; P – pressão) e vinhos resultantes da sua combinação (SqQ – sesquiterpenóide e quitosana; SqP – sesquiterpenóide e pressão; QP –quitosana e pressão; SqQP – sesquiterpenóide, quitosana e pressão). A um lote deste vinho foi também adicionado 40 mg/L de anidrido sulfuroso livre (S) e um lote de vinho foi deixado sem nenhum tratamento (S0). Após os diferentes tratamentos os vinhos foram armazenados à temperatura ambiente (≈ 22°C). Todos os vinhos produzidos foram analisados após cada um dos tratamentos (dia 1) e ao longo do armazenamento (15, 30 e 90 dias).

2.2 – Análises microbiológicas

Cada uma das diluições efectuadas das amostras (100 μL) foram inoculadas em placas de Petri contendo meio específico para leveduras (Chloramphenicol Rose Bengal Agar - CRBA) e bactérias (Wallerstein Differential Agar – WLDA). As placas com CRBA foram incubadas em estufa a 25°C durante 5 dias e as placas com WLDA foram incubadas em estufa a 37°C durante 3 dias. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

2.3 – Actividade antioxidante

A actividade antioxidante de todas as amostras ao longo do armazenamento foi determinada usando ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). A solução de ABTS 7 mM foi preparada em persulfato de potássio 1 mg/mL e foi deixada a reagir, no escuro e à temperatura ambiente, durante 12-16 horas para a formação do catião radicalar (ABTS•+). Esta solução de ABTS foi diluída de 1:80 mL. As amostras foram diluídas numa solução de etanol 10% e a 50 μL de amostra foi adicionado 1 mL de solução de ABTS, tendo-se medido a absorvância a 734 nm após 15 minutos. A curva de calibração foi realizada com uma solução de trolox (0-400 μM). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

2.4 – Cor

A cor dos vinhos foi avaliada por medição das absorvâncias a 420, 520 e 620 nm. A intensidade da cor do vinho foi determinada pelo somatório das três absorvâncias.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Análises microbiológicas

Na tabela 1 são apresentados os resultados das contagens das colónias de leveduras presentes nas amostras de vinho tinto ao longo do armazenamento (1, 15, 30 e 90 dias). No vinho tinto sem tratamento (S0), com sulfuroso (S) e com adição do sesquiterpenóide (Sq) verificou-se crescimento de leveduras. A presença de leveduras nestes vinhos manteve-se ao longo dos 90 dias de armazenamento (5 - $7x10^3$ UFC/mL). Os vinhos tratados com a quitosana e alta pressão não apresentavam crescimento de leveduras logo após os tratamentos (1 dia) nem ao fim de três meses de armazenamento.

Tabela 1 – Contagem de leveduras (UFC/mL) presentes nas amostras de vinho tinto ao longo do armazenamento.

Amostras	Vinho tinto			
	1 dia	*15 dias*	*30 dias*	*90 dias*
S0	5×10^5	1×10^4	2×10^4	5×10^3
S	2×10^3	1×10^3	2×10^3	5×10^3
Sq	1×10^3	2×10^4	6×10^4	7×10^3
Q	0	0	0	0
SqQ	0	0	0	0
P	0	0	0	0
SqP	0	0	0	0
QP	0	0	0	0
SqQP	0	0	0	0

No vinho branco tratado apenas por adição do sesquiterpenóide (Sq) verificou-se crescimento de leveduras, $8x10^3$ UFC/mL após 90 dias de armazenamento (Tabela 2). Neste vinho o número de colónias de leveduras é superior ao do vinho sem tratamento (S0). Tal como se tinha verificado no vinho tinto, as amostras de vinho branco tratadas com quitosana e com alta pressão apresentam uma inibição do crescimento de leveduras, que se manteve ao longo do período de armazenamento do vinho, pelo menos até 90 dias.

Tabela 2 – Contagem de leveduras (UFC/mL) presentes nas amostras de vinho branco ao longo do armazenamento.

Amostras	Vinho branco			
	1 dia	*15 dias*	*30 dias*	*90 dias*
S0	4×10^3	8×10^3	5×10^4	7×10^2
S	0	0	0	0
Sq	4×10^4	5×10^4	6×10^4	8×10^3
Q	0	0	0	0
SqQ	0	0	0	0
P	0	0	0	0
SqP	0	0	0	0

QP	0	0	0	0
SqQP	0	0	0	0

Apesar de terem sido inoculadas as amostras de vinho em placas contendo meio específico para o crescimento de bactérias não se observou o crescimento de nenhuma colónia em qualquer um dos vinhos tintos e brancos analisados ao longo dos três meses de armazenamento.

3.2 – Actividade antioxidante

A actividade antioxidante de todos os vinhos tintos (Figura 1) e brancos (Figura 2) foi determinada após os tratamentos (dia 1) e ao longo do seu armazenamento (15, 30 e 90 dias). No vinho tinto verificou-se uma actividade antioxidante superior (15 – 45%) em todos os vinhos tratados em relação ao vinho sem tratamento ao fim de 90 dias de armazenamento. Este aumento é superior no vinho tratado com adição do sesquiterpenóide (Sq – 40%) e com tratamentos com alta pressão (P, SqP, QP, SqQP – 32 a 45%).

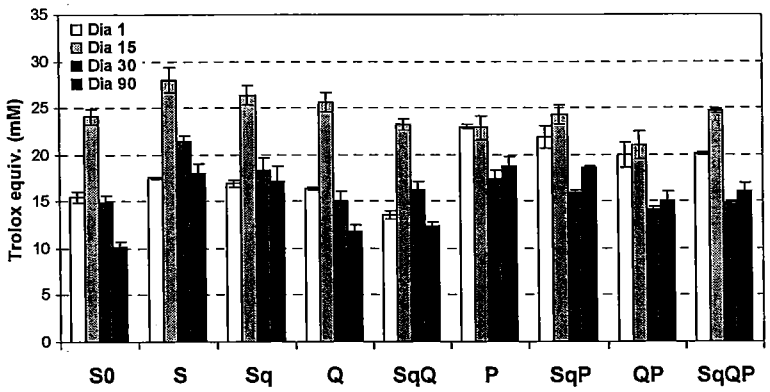

Figura 1 – Actividade antioxidante dos vinhos tintos ao longo do armazenamento.

O vinho branco tem uma actividade antioxidante muito inferior (cerca de 10 vezes) ao obtido no vinho tinto, o que está de acordo com o descrito na bibliografia (Fernandez-Panchon et al., 2008). Nos vinhos brancos também se verificou que as amostras com os diferentes tratamentos apresentaram valores superiores (20 – 53%) de actividade antioxidante em relação ao vinho sem tratamento (S0) e valores idênticos ou mesmo superiores do que o vinho em que foi adicionado sulfuroso (S) (Figura 2). Todos os vinhos tratados com AP (P, SqP, QP e SqQP) apresentaram actividades antioxidantes superiores em relação aos outros tratamentos.

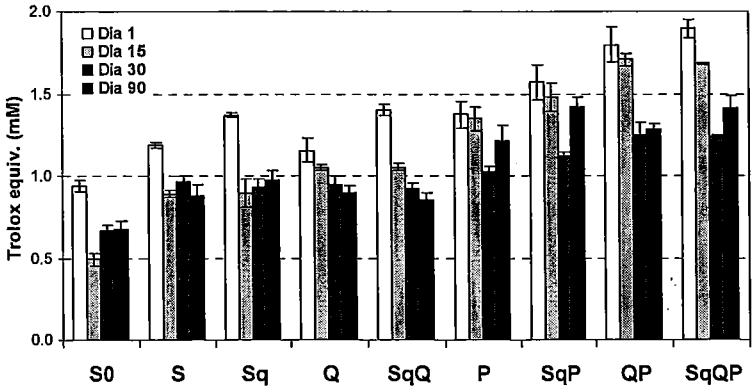

Figura 2 – Actividade antioxidante dos vinhos brancos ao longo do armazenamento.

3.3 – Medição da cor

Na figura 3 são apresentados os valores de intensidade da cor do vinho tinto após os tratamentos (1 dia) e ao fim de 15 dias de armazenamento. Entre as amostras de vinho tinto não se observaram diferenças significativas na intensidade da cor, principalmente ao fim de 15 dias após os tratamentos.

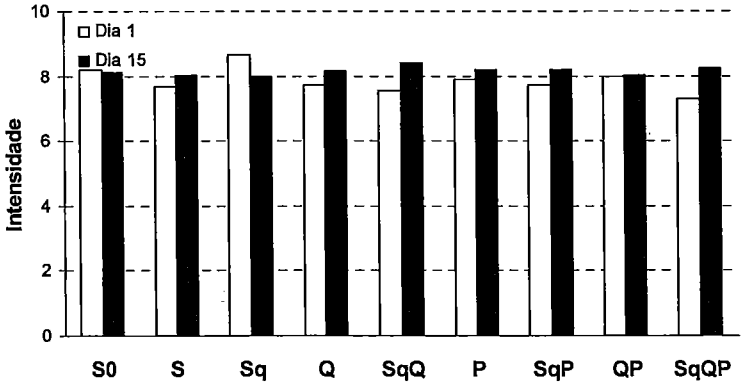

Figura 3 – Intensidade da cor dos vinhos tintos ao longo do armazenamento.

No vinho branco, 1 dia após os tratamentos (Figura 4), observou-se que as amostras contendo o sesquiterpenóide e a quitosana de forma isolada e em combinação (Sq, Q, SqQ, QP e SqQP) apresentaram uma intensidade de cor superior em relação ao vinho sem tratamento e tratado com anidrido sulfuroso. No entanto, ao fim de 30 dias de armazenamento verifica-se um aumento na intensidade da cor para a amostra que não foi tratada (S0), enquanto que nas amostras tratadas com o sesquiterpenóide, a quitosana e alta pressão, este aumento não se verificou. Com o armazenamento durante 90 dias, os vinhos em que foi adicionada a quitosana (Q, SqQ, QP e SqQP) têm uma intensidade de cor idêntica ao vinho sem tratamento (Figura 4).

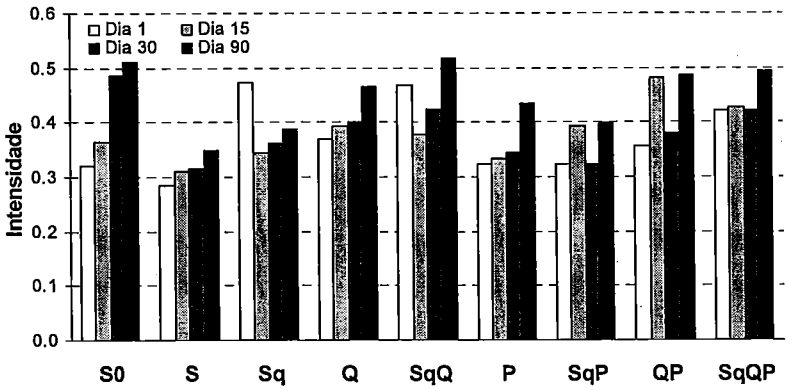

Figura 4 – Intensidade da cor dos vinhos brancos ao longo do armazenamento.

4 – CONCLUSÕES

Para a concentração testada, a adição do sesquiterpenóide ao vinho tinto e branco não parece conferir actividade anti-microbiana, pois não foram observadas diferenças em relação ao vinho sem tratamento. No entanto, verificou-se que a adição da quitosana e a aplicação de alta pressão inibem o crescimento de leveduras nos dois vinhos, pelo menos durante 90 dias de armazenamento.

A actividade antioxidante foi superior nos vinhos tratados com sesquiterpenóide (30-40%), quitosana (15-25%) e alta pressão (45%) em comparação com o vinho sem tratamento ao fim de 90 dias de armazenamento. Estes resultados demonstram que todos os tratamentos (sesquiterpenóide, quitosana e alta pressão) aumentam a capacidade antioxidante do vinho.

No vinho tinto, não se verificaram alterações na cor com os tratamentos. No vinho branco observou-se que a adição do sesquiterpenóide e a aplicação de alta pressão impedem o seu escurecimento ao longo do armazenamento.

Estes resultados, apesar de ainda serem preliminares, mostram que a adição do sesquiterpenóide ou quitosana ou a utilização da tecnologia de alta pressão são tratamentos com potencial para substituir a adição de anidrido sulfuroso em vinhos após a fermentação.

BIBLIOGRAFIA:

Fernandez-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. (2008) "Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence", Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48: 649-671.

Haraguchi, H., Ishikawa, H., Sanchez, Y., Ogura, T., Kubo, Y., Kubo, I. (1997) "Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*", Bioorganic & Medicinal Chemistry 5: 865-871.

Mok, C., Song, K.T., Park, Y.S., Lim, S., Ruan, R., Chen, P. (2006) "High hydrostatic pressure pasteurization of red wine", Journal of Food Science 71: M265-M269.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (Ed.), (2006). Handbook of Enology - The Microbiology of Wine and Vinifications, vol. 1. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex.

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999) "Food applications of chitin and chitosans", Trends in Food Science & Technology 10: 37-51.

Simões, M., Rocha, S., Coimbra, M.A., Vieira, M.J. (2008) "Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Antibiotic Susceptibility Using Sesquiterpenoids", Medicinal Chemistry 4: 616-623.

Spagna, G., Barbagallo, R.N., Pifferi, P.G. (2000) "Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning", Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 4619-4627.

Wang, L.Y., Unehara, T., Kitanaka, S. (2005) "Anti-inflammatory activity of new guaiane type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*", Chemical & Pharmaceutical Bulletin 53: 137-139.

Xu, Z.H., Chang, F.R., Wang, H.K., Kashiwada, Y., McPhail, A.T., Bastow, K.F., Tachibana, Y., Cosentino, M., Lee, K.H. (2000) "Anti-HIV agents 45 and antitumor agents 205. Two new sesquiterpenes, leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*", Journal of Natural Products 63: 1712-1715.

Agradecimentos:

Cláudia Nunes agradece à FCT a bolsa de Pós-Doutoramento (SFRH/BPD/46584/2008). Os autores agradecem ao Projecto iCentro (iC-01-01-FDR-0153) e à Unidade de Investigação QOPNA 62/94 o financiamento do trabalho e à empresa Dão Sul S.A., Carregal do Sal, a disponibilização das amostras.