

INSTITUTO NACIONAL  
DE INVESTIGAÇÃO  
AGRÁRIA

CENTRO NACIONAL  
DE ESTUDOS  
VITIVINÍCOLAS

# DE VINEA ET VINO PORTUGALIAE DOCUMENTA

LISBOA - PORTUGAL

DEZ. - 1979

VOL. 9

## PRIMEIRAS OBSERVAÇÕES SOBRE A INFLUÊNCIA DE PESTICIDAS NA FLORA MICROBIOLÓGICA DE UVAS E MOSTOS (\*)

POR

MARIA VITÓRIA SAN ROMÃO  
LUIZ CRUZ CARNEIRO

*Com a colaboração técnica de*

A. PEDRO BELCHIOR  
FILOMENA LUIZ ALEMÃO  
ODETE GONÇALVES BENTO

### INTRODUÇÃO

NÚMEROSOS trabalhos têm sido levados a efeito no sentido de, a par do estudo de eficácia dos produtos usados no tratamento das várias doenças da videira, detectar a influência que esses produtos poderão exercer quer na evolução da fermentação alcoólica dos vinhos, quer nas qualidades organolépticas dos mesmos.

Estas perturbações poderão ser atribuídas quer à presença de resíduos do próprio produto ou seus produtos de transformação, quer à possível selecção da flora microbiana — leveduras e bactérias. Neste último caso, poderá pensar-se numa inibição das bactérias lácticas e possível maior resistência das bactérias acéticas.

---

(\*) Este trabalho foi executado com a colaboração da Divisão de Controle de Pragas e Doenças — DGPPA, com base nos ensaios de homologação daquela Divisão.

Recebido para publicação em 14/11/79.

Duma maneira geral são referidas perturbações de fermentação no caso do uso da diclofluanida, especialmente em anos pouco chuvosos, e tanto mais evidentes quanto menor é o volume de mosto em ensaios (CASSIGNARD, 1972, 1975, 1976; A. BOLAY e col., 1976; S. SAPIIS-DOMERQ, 1976; B. KARDIMTCHEVA, 1977).

No que respeita aos fungicidas sistémicos com base em benomil, metil-e etiltiofanatos, não têm sido detectadas perturbações, quer no aspecto fermentativo quer no organoléptico, indicando-se contudo que estão sempre presentes no vinho resíduos daqueles produtos, apenas em parte elimináveis por tratamento com bentonite (A. BOLAY, 1972, 1975, 1976). Quanto ao benomil contudo, as opiniões dividem-se (CASSIGNARD, 1972, 1975).

Produtos com base vinchozoline e iprodiona não parecem ter qualquer problema. Os produtos à base de N-(triclorometil) ftalimida em associação ou não com cobre, parecem ter influência no arranque das fermentações.

Apontado ainda por um autor (FOULONNEAU, 1977), uma possível modificação progressiva da flora da vinha, especialmente em casos de uso de diclofluanida.

Assim, na continuação do ensaio efectuado por nós na vindima de 1977, no sentido de completar o estudo sobre a eficácia de alguns produtos antibotrytis, levado a efeito pelo Laboratório de Fitofarmacologia — DGPPA, nas vinhas do CNEV, foi este ano efectuado novo ensaio tentando estudar-se a influência daqueles produtos no desenrolar da fermentação alcoólica dos mostos na flora microbiana presente nas uvas e ao longo da fermentação e ainda nas qualidades organolépticas dos vinhos obtidos por fermentação espontânea dos mostos resultantes de uvas tratadas pelos produtos em estudo, por comparação com uma tetemunha não tratada.

#### MATERIAL E MÉTODOS

— Produtos em ensaio

Procimidona	p.m.	50 %	75
Vinclozolina	p.m.	50 %	75
Benomil	p.m.	50 %	30
Diclofluanida	p.m.	50 %	100
Iprodiona	p.m.	50 %	75
Testemunha			

— Número de repetições — 4 (12 videiras cada uma)

— Casta utilizada — Alicante Branco.

— Esquema de tratamento:

- 1.º — Fim floração-alimpa.
- 2.º — Antes do fecho dos cachos.
- 3.º — Pintor.
- 4.º — 3 semanas antes da vindima.

— Condições meteorológicas — chuva intensa após o último tratamento, especialmente nos 3 dias que antecederam a vindima e no próprio dia.

— Quantidade de uva por cada modalidade — 20 kg.

— Volume de mosto recolhido após homogeneização — 1 litro (separado em duas fracções de 500 ml em frascos de fermentação, portanto cada modalidade foi feita em duplicado).

— Determinação do açúcar e grau provável dos mostos por refractometria.

— Condições de fermentação — flora indígena e em estufa a 25° C.

— Controle diário de fermentação por pesagem dos frascos.

— Isolamento de leveduras e bactérias no dia da vindima e aos 1.º, 2.º, 3.º, 5.º e 9.º dias de fermentação.

— Foi efectuado o estudo em uva não tratada, da mesma zona da vinha e seguindo-se procedimento semelhante ao seguido com a uva tratada.

— Terminada a fermentação os vinhos foram analisados e provados.

— Análises efectuadas:

- Densidade
- Grau Álcool
- Acidez total
- Acidez volátil

Não foi possível fazer a determinação dos açúcares redutores.

Das leveduras isoladas foram escolhidas representantes de cada tipo e estudadas do ponto de vista morfológico (colónia e célula), enológico e capacidade de fermentação.

As bactérias foram estudadas no sentido de verificar se se tratava de bactérias lácticas ou acéticas, não tendo sido feita a sua classificação taxonómica.

## RESULTADOS

### 1. Fermentação dos mostos

No gráfico 1 são apresentadas as curvas de fermentação obtidas ao longo da fermentação dos mostos de uvas tratadas pelos vários produtos em estudo e também da testemunha.

Da observação desse gráfico pode verificar-se que não houve atrasos evidentes no arranque da fermentação, apenas se verificou um ligeiro atraso de cerca de um dia, relativamente à testemunha, não sendo visível qualquer diferença sensível entre os vários produtos. Notam-se contudo algumas diferenças no desenrolar da fermentação, a partir do 5.º dia, diferenças possivelmente devidas ao diferente grau de maturação das uvas (Quadro I). De assinalar o facto de serem os mostos tratados com procimidona, os que apresentam comportamento mais semelhante ao dos mostos testemunhas.

### 2. Prova de vinhos

As qualidades organolépticas dos diferentes vinhos obtidos, não foram em nenhum caso apreciáveis. Tal facto não é de estranhar dado o reduzido volume de ensaio, acrescido de se tratar de fermentações conduzidas sem qualquer introdução de SO<sub>2</sub>, não tendo portanto havido qualquer selecção da flora microbiana. Nota-se contudo que os vinhos provenientes de uvas tratadas pela diclofluanida e iprodiona, especialmente os primeiros, apresentam aromas e sabores estranhos e desagradáveis.

### 3. Flora microbiana

#### a) Leveduras

Apartir do estudo morfológico e enológico efectuado, foram as leveduras presentes nas diferentes amostras, divididas em 2 grandes grupos. Destes, um deles, apresenta-se com boas características de fermentação. O outro pelo contrário, é formado

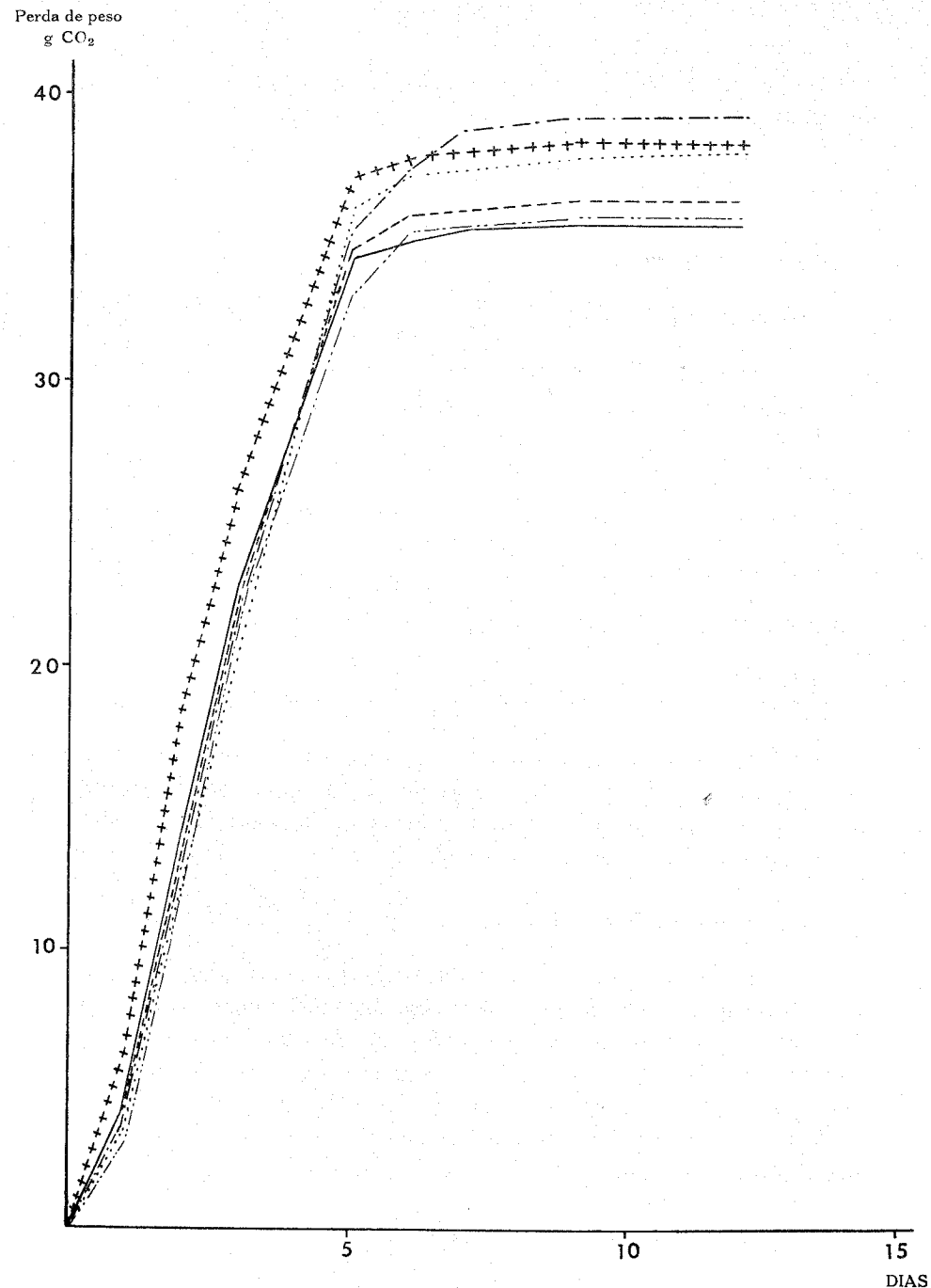


Gráfico 1 — Curvas de fermentação dos mostos tratados com:  
..... Procimidona; - - - Vinclozolina; — Benomil; - . . . Diclofluanida;  
- - - - - Iprodiona e +++ Testemunha.

por leveduras de baixo poder de fermentação. Não se efectuou, em qualquer caso a identificação das leveduras.

QUADRO I

Resultados analíticos dos mostos e vinhos

Substância activa	Mostos		Vinhos			
	Açúcares (g/l)	Álcool provável	Densidade	Álcool	Ac. total (g/l)	Ac. vol. (g/l)
PROCIMIDONA	162,9	9,6	996,7	9,2	6,83	0,61
VINCLOZOLINA	156,8	9,2	977,7	8,7	7,71	0,61
BENOMIL	159,9	9,4	998,0	8,8	7,56	0,62
DICLOFLUANIDA	172,1	10,1	997,3	9,5	7,47	0,58
IPIODIONA	153,6	9,0	997,6	8,6	8,07	0,50
TESTEMUNHA	171,9	10,1	998,5	9,4	7,99	0,61

No Quadro II apresentam-se as percentagens dos dois tipos de leveduras ao longo da fermentação dos mostos provenientes de uvas tratadas pelos vários produtos em ensaio. Da observação desse quadro podemos verificar:

— Leveduras fermentativas

Apresentam diferenças relativamente à testemunha, os mostos tratados com procimidona e muito especialmente com diclofluanida que, além de ter percentagem inferior, se apresenta apenas com leveduras fermentativas a partir do 5.º dia de fermentação. Os tratados com vinclozolina, benomil e iprodiona apresentam percentagens iguais ou superiores às da testemunha, distribuindo-se a partir do 1.º dia de fermentação.

— Leveduras fracamente fermentativas

Os mostos que se apresentam com percentagens mais elevadas que as da testemunha são os provenientes de tratamento com diclofluanida, apresentando ainda ao 3.º dia de fermenta-

QUADRO II

Percentagem dos diferentes tipos de leveduras ao longo da fermentação dos mostos tratados pelos vários produtos

Substância activa	Dia isolamento	Leveduras fermentativas	Leveduras fracamente fermentativas
PROCIMIDONA	VINDIMA	0	100
	1.º Dia Ferm.	8,1	91,9
	2.º » »	—	—
	3.º » »	45	55
	5.º » »	50	50
	9.º » »	100	0
VINCLOZOLINA	VINDIMA	0	100
	1.º Dia Ferm.	57,4	42,6
	2.º » »	29,6	70,4
	3.º » »	48,5	51,5
	5.º » »	65	35,0
	9.º » »	100	0
BENOMIL	VINDIMA	0	100
	1.º Dia Ferm.	26,4	73,6
	2.º » »	10,8	89,2
	3.º » »	63,9	36,1
	5.º » »	72,6	27,4
	9.º » »	98,3	1,7
DICLOFLUANIDA	VINDIMA	0	100
	1.º Dia Ferm.	0	100
	2.º » »	0	100
	3.º » »	0	100
	5.º » »	50,3	49,7
	9.º » »	57,2	42,8
IPIODIONA	VINDIMA	0	100
	1.º Dia Ferm.	79,8	20,2
	2.º » »	—	—
	3.º » »	63	37,0
	5.º » »	37,7	62,3
	9.º » »	92,8	7,2
TESTEMUNHA	VINDIMA	0	100
	1.º Dia Ferm.	88,8	11,2
	2.º » »	—	—
	3.º » »	45,9	54,1
	5.º » »	80,7	19,3
	9.º » »	—	—

ção 100 % de leveduras fracamente fermentativas e 42,8 % ao 9.º dia.

b) Bactérias

Apresentam-se no Quadro III os números de bactérias presentes ao longo da fermentação dos mostos. No Quadro IV, apresenta-se o número de colónias isoladas por produto e, dentro dessas, a percentagem de lácticas presentes.

QUADRO III

Total de colónias de bactérias presentes ao longo da fermentação

Dias	Procimidona	Vinclozolina	Benomil	Diclofluanida	Iprodiona	Testemunha
1	$88 \times 10^3$	$148 \times 10^3$	$230 \times 10^3$	$532 \times 10^3$	$513 \times 10^3$	$205 \times 10^3$
2	$443 \times 10^3$	$650 \times 10^3$	$185 \times 10^3$	$1120 \times 10^3$	$555 \times 10^3$	$26 \times 10^3$
3	$515 \times 10^3$	$40 \times 10^3$	$40 \times 10^3$	$160 \times 10^3$	$98 \times 10^3$	$25 \times 10^3$
5	$1035 \times 10^3$	$51 \times 10^3$	$76 \times 10^3$	$33 \times 10^3$	$70 \times 10^3$	$11 \times 10^3$

QUADRO IV

Número total de colónias isoladas por produto e percentagem de bactérias lácticas presentes

	Procimidona	Vinclozolina	Benomil	Diclofluanida	Iprodiona	Testemunha
Colónias isoladas	36	32	32	40	38	32
% Bactérias lácticas	8,4	6,3	6,3	12,5	13,2	25

Da observação do Quadro III, verifica-se que:

— Ao longo da fermentação, nos mostos testemunha e como seria de esperar, o número de bactérias diminui progressivamente. Quanto aos outros mostos, os tratados por vinclozolina apresentam um comportamento semelhante aos testemunha, apenas com número ligeiramente superior especialmente a partir do 2.º dia de fermentação, o mesmo se passando com os tratados com benomil.

Os mostos tratados com diclofluanida e iprodiona, apresentando-se semelhantes entre si, apresentam número de colónias superior ao dos dois já referidos e superior também à testemunha.

Com a procimidona o número de bactérias aumenta sempre até ao 5.º dia de fermentação. Este facto não encontra justificação completa quando comparado com o que se passa no decorrer da fermentação alcoólica dos mostos embora seja este um dos produtos que apresenta menos percentagem de leveduras fermentativas.

Da observação do Quadro IV, verifica-se serem os mostos provenientes de uvas tratadas com diclofluanida e iprodiona, os que apresentam maior percentagem de bactérias lácticas dentre as isoladas, sendo os tratados com vinclozolina e benomil os que têm percentagem mais baixa. Em todos os casos, essas percentagens são significativamente inferiores às do mosto testemunha.

Neste ensaio não foi feito controle de fermentação malo-láctica nem observação quanto à conservação dos vinhos, entendendo-se que isso deverá ser feito em ensaios futuros, atendendo aos resultados agora obtidos.

CONCLUSÕES

Nas condições em que decorreu a experiência dada a elevada pluviosidade ocorrida após o último tratamento, as conclusões a tirar terão sempre que ser condicionadas por aquele factor.

No que respeita a perturbações de fermentação e leveduras presentes ao longo daquela, poderá afirmar-se que a procimidona não parece provocar perturbações na fermentação, apresentando contudo relativamente à testemunha, algumas diferenças quanto à ocorrência de leveduras nos primeiros dias de fermentação, normalizando-se a partir do 5.º dia, o que poderá justificar a finalização normal daquela. Vinclozolina, benomil e iprodiona não influenciam marcadamente a ocorrência de leveduras, parecendo, contudo provocar dificuldades de acabamento nas fermentações. No caso da diclofluanida verifica-se influência marcada sobre as leveduras, ao longo de toda a fermentação.

Quanto às qualidades organolépticas dos vinhos, embora elas tenham sido deficientes de uma maneira geral, os provenientes de tratamentos com diclofluanida e iprodiona apresentam defeito nítido, pela ocorrência de sabores e aromas estranhos.

Finalmente quanto à influência dos produtos em estudo sobre as bactérias, pode afirmar-se que o benomil e vinclozolina não parecem ter influência, procimidona, vinclozolina e benomil parecem provocar uma inibição nítida, diclofluanida e iprodiona, parecendo terem também acção inibidora, ela não é tão marcada como a dos outros produtos.

Estes factos parecem-nos importantes dadas as implicações que poderão ter na conservação dos vinhos e ocorrência da FML, nos casos de tratamento com aqueles produtos.

Pensa-se que os ensaios deverão prosseguir em anos futuros, para tentar anular a possível influência das condições meteorológicas. Deverão ainda ser conduzidos de modo a permitirem a observação dos vinhos no que respeita à sua conservação e fermentação maloláctica.

#### RESUMO

Foi estudada a influência de cinco produtos anti-botrytis no desenrolar da fermentação alcoólica de mostos. Foram analisadas as alterações na flora de leveduras e bactérias e nas qualidades organolépticas dos vinhos obtidos.

Nas condições da experiência, pode verificar-se: procimidona parece somente inibir as bactérias lácticas; vinclozoline e benomil, apresentam comportamentos muito semelhantes com perturbações no acabamento das fermentações e inibição das bactérias lácticas; iprodiona e diclofluanida, em especial o último, parecem influir negativamente na fermentação alcoólica e características organolépticas, sendo menos marcada a sua influência sobre as bactérias lácticas.

---

As análises físico-químicas dos mostos e vinhos e a prova dos vinhos foram efectuados, respectivamente, pelos Serviços de Laboratório e Prova Organoléptica da EVN.

#### RESUMÉ

Nous avons étudié l'influence de 5 produits de traitement de la botrytis sur la fermentation alcoolique des moûts de raisins, en étudiant la microflore (levures et bactéries) au cours de la fermentation alcoolique. Les vins ont été aussi observés du point de vue chimique et organoléptique.

Dans cet expérience on a observé: la procymidone ne semble influencer que les bactéries lactiques en abaissant leur pourcentage d'occurrence; vinclozoline et benomil, ils se rassemblent beaucoup, les achevement des fermentations n'ont pas été complets et les bactéries lactiques ont été inibées; iprodione et diclofluanide, en spécial le dernier, ils semblent avoir une influence négatif sur la fermentation alcoolique et sur les caractéristiques organoléptiques des vins, dans ce qui concerne les bactéries lactiques leur influence semble moins importante que celle des autres produits.

#### SUMMARY

The influence of five products anti-botrytis during the alcoholic fermentation of musts was observed. It was analysed the alterations in microflora — yeasts and bacteria — and in wine qualities obtained.

From the experiment we can observe that procymidone seems to restrain the effect on lactic bacteria. Vinclozoline and benomil have similar reactions having alterations nearly at the end of fermentation and a restrain effect on lactic bacteria.

Iprodione and particularly diclofluanide seem to have a negative influence on alcoholic fermentation and wine qualities exerting less influence on lactic bacteria.

#### BIBLIOGRAFIA

- BOLAY, A. e CRETENAND, J.  
1972 Les fongicides systémiques dans la lutte contre la pourriture grise des raisins. *Revue Suisse de Vitic. Arbor. Hortic.* Vol. IV-3: 88-95.
- BOLAY, A. e ROCHAIX, M.  
1975 Heurs et malleurs des fongicides systémiques dans la lutte contre la pourriture grise des raisins. *Revue Suisse de Vitic. Arbor. Hortic.* Vol. VII-7: 137-147.

BOLAY, A.; AERNY, J.; CRETTEYAND, J.; GNAEGI, F.; PEZET, R. e SHOPPER, J. F.

1976 Le point sur la lutte chimique contre la pourriture des raisins.  
*Révue Suisse de Vitic. Arbor. Hortic.* Vol. VIII-5: 195-203.

CASSIGNARD, R.

1972 Influence des produits de traitement de la vigne sur la flore microbienne et la fermentation. *Vignes et Vins*, n.º 211: 15.

1975 Influence des produits de traitement de la vigne sur la flore microbienne des fermentations et les caractères organoleptiques des vins. (Rapport de synthèse). *Vignes et Vins*, n.º 245: 8.

1976 Influence des produits de traitement de la vigne sur la flore microbienne des fermentations et les caractères organoleptiques des vins. *Vigne et Vins*, n.º 252: 217.

FOULONNEAU, CH.

1977 L'emploi des pesticides en viticulture: conséquences oenologiques.  
*Vignes et Vins*, n.º 263: 29-39.

KARADIMTCHEVA, B.

1977 Étude de l'influence de quelques fongicides sur la microflore du raisin. *Conn. Vigne Vin*, 11 — n.º 4: 313-323.

SAPIS-DOMERCQ. S.; BERTRAND, A.; MUR, F. et SARRE, C.

1976 Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. *Conn. Vigne Vin*, 10, n.º 4: 369-389.

1977 Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. *Conn. Vigne Vin*, 11, n.º 3: 227-242.

DE VINEA ET VINO PORTUGALLÆ DOCUMENTA

Abrev.: *Vin. Port. Doc.*

TRABALHOS PUBLICADOS:

VOLUME IX

Série II — ENOLOGIA

- 1 . *Belchior, A. P., Clímaco, P. e Franco, J. M. Soares* — Emprego da cromatografia em coluna de Gel de «Sephadex LH 20» na caracterização de aguardentes vnicas envelhecidas.
- 2 . *Garcia, A. S. Curvelo e Ghira, J. J. Carvalho* — Uma causa da presença de ferro em vinhos brancos. A incorporação de terra no mosto.
- 3 . *Garcia, A. S. Curvelo e Ghira, J. J. Carvalho* — O ferro em vinhos brancos. Influência da defecação dos mostos.
- 4 . *Ghira, J. J. Carvalho* — Pesquisa do ácido galacturónico e do ácido glucurónico em vinhos.
- 5 . *Romão, Maria Vitória San e Carneiro, Luiz Cruz* — Primeiras observações sobre a influência de pesticidas na flora microbológica de uvas e mostos.