

A TOXICIDADE DO DIÓXIDO DE ENXOFRE PARA A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

(REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

P. J. CAMEIRA-DOS-SANTOS

Estação Vitivinícola Nacional. Dois Portos, 2575 Runa

RESUMO

É abordada a componente antisséptica do SO_2 , tendo como referência a necessidade de reduzir significativamente as doses deste aditivo a utilizar em vinificação, por forma a que os vinhos a comercializar para consumo humano directo possuam baixos teores em dióxido de enxofre total.

Na revisão bibliográfica efectuada, foram destacados os efeitos do SO_2 sobre leveduras, particularmente *S. cerevisiae*. A grande diversidade dos efeitos fisiológicos do dióxido de enxofre sobre a estrutura e metabolismo celular referidos na bibliografia, não significa que haja já uma perfeita compreensão desses fenómenos e da sua importância relativa. Sabe-se que a acção do SO_2 sobre leveduras depende da componente molecular presente no meio (a qual, por sua vez, depende fortemente do pH). Por outro lado, é a acumulação intracelular dos iões HSO_3^- e SO_3^{--} a causa dos danos mais graves registados. Assim, a transposição da membrana plasmática pela molécula do SO_2 , que se realiza por difusão simples, surge como um passo decisivo entre os fenómenos que constituem a sua toxicidade para as leveduras. São discutidos alguns factores susceptíveis de influenciar a resistência das leveduras ao SO_2 .

INTRODUÇÃO

A acção antimicrobiana do dióxido de enxofre é uma das suas propriedades com aplicação generalizada em vinificação. Pode dizer-se que o SO_2 afecta todos os microrganismos presentes em mostos e vinhos, sendo particularmente útil a sua actividade contra bactérias e leveduras nocivas. É de referir o interesse enológico da sua acção selectiva sobre leveduras, dado que em geral as mais aptas para a fermentação alcoólica são também as mais resistentes ao SO_2 . Assim, este composto inibe

o crescimento de leveduras nocivas, bactérias lácticas e acéticas, permitindo que as leveduras desejáveis (essencialmente estirpes de *S. cerevisiae*) dominem a fermentação.

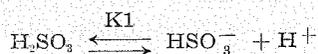
No entanto, o emprego do dióxido de enxofre em enologia levanta problemas de diversa ordem que importa não menosprezar. Para além da sua toxicidade para o ser humano, existem aspectos jurídicos e legislativos que aqui abordaremos sumariamente. Com o objectivo de aproximar progressivamente a legislação portuguesa às regras comunitárias tem sido publicada anualmente (desde 1987), legislação reduzindo os limites para os teores em «anidrido sulfuroso total» em vinhos portugueses. Assim, para a campanha vitivinícola de 1989/90, com início em 1 de Setembro de 1989, entrarão em vigor os limites fixados pela Portaria n.º 445/89 de 16 de Junho (Anónimo, 1989). É que o Artigo 335.º dos Actos de Adesão da República Portuguesa às Comunidades Económicas Europeias (Anónimo, 1985), permitindo embora durante a primeira etapa da Adesão, a manutenção dos limites aplicados na matéria sob o regime nacional anterior, obriga no decorrer desta a que o teor do «anidrido sulfuroso total» baixe progressivamente para os níveis comunitários, a fim de estes serem integralmente cumpridos a partir de 1 de Janeiro de 1991, início da segunda etapa. Estes níveis comunitários atrás referidos são os estabelecidos pelo Regulamento (CEE) n.º 822/87 do Conselho de 16 de Março de 1987 (Anónimo, 1987) que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola. O Artigo 65.º deste Regulamento fala explicitamente em limites para o «teor total em anidrido sulfuroso dos vinhos (...) no momento da sua colocação no mercado para consumo humano directo».

Neste trabalho abordar-se-á a acção antimicrobiana do dióxido de enxofre, em particular os fenómenos referidos na bibliografia observados genericamente em leveduras e também especificamente em *Saccharomyces cerevisiae*.

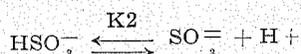
AS ESPÉCIES QUÍMICAS EM SOLUÇÃO AQUOSA DE SO₂

O dióxido de enxofre (seja no estado gasoso, seja sob a forma de solução aquosa de SO₂, ou ainda de sais como o metabissulfito de potássio K₂S₂O₅), quando em solução aquosa (ou hidroalcoólica) gera as seguintes espécies químicas: H₂SO₃

(ácido sulfuroso não dissociado, dióxido de enxofre molecular), e os produtos da sua dissociação, HSO_3^- (hidrogenossulfito), e SO_3^{2-} (sulfito), segundo os equilíbrios:



e



As constantes de equilíbrio K1 e K2 estão dependentes da temperatura, do teor alcoólico do meio e da sua força iónica (Usseglio-Tomasset e Bosia, 1984).

O MODO DE ACÇÃO DO SO_2

Estes equilíbrios são regulados pela equação de Henderson-Hasselbalch $\text{pH} = \text{pK}_a - \log[\text{ácido fraco}]/[\text{base conjugada}]$, pelo que a proporção das diferentes espécies químicas está fortemente dependente do pH do meio. Está provado que a espécie com maior actividade antimicrobiana é a forma molecular, H_2SO_3 (Usseglio-Tomasset *et al.*, 1981; Vas e Ingram, 1949). O poder antisséptico do SO_2 molecular sobre leveduras é cerca de 500 vezes maior que o das outras formas do SO_2 livre (Schopfer e Aerny, 1985; Usseglio-Tomasset *et al.*, 1981). Assim se compreende que a acção antimicrobiana do SO_2 esteja fortemente dependente do pH do meio:

- quanto mais baixo for o pH, maior será a concentração de H_2SO_3 no meio, para igual dose de SO_2 livre;
- a pH's baixos, é provável que a célula microbiana, encontrando-se num ambiente hostil, fique mais sensível à acção de agentes tóxicos.

O SO_2 afecta o metabolismo celular a diversos níveis antes e depois da sua migração para o interior da célula, e também ao nível da membrana plasmática (Beech e Thomas, 1985; Hammond e Carr, 1976):

- no meio extracelular, combinando-se com numerosos compostos, torna-os indisponíveis como nutrientes para a célula; é também de destacar a redução do oxigénio, essencial à multiplicação das leveduras;
- ao nível da membrana plasmática, dão-se interacções com proteínas funcionais. O efeito mais nocivo citado na bibliografia é o da diminuição rápida da concentração intracelular de ATP observada em *Saccharomyces cerevisiae*, por Schimz e Holzer (1979). Posteriormente, Schimz (1980) refere que este fenómeno poderá ser explicado por uma interacção do SO_2 com a ATPase membranar. Esta enzima sob o efeito do SO_2 , provocaria uma hidrólise acelerada do ATP intracelular, com a consequente diminuição das reservas globais da célula em ATP e, por fim, a perda da viabilidade celular.

A bibliografia refere também o efeito da interacção com receptores de membrana para o SO_2 . Anacleto e van Uden (1982), verificaram que a morte de *Saccharomyces cerevisiae* é induzida na presença de metabissulfito de potássio (5 a 150 mg/l, a $\text{pH} = 3.40$), a temperaturas às quais a morte térmica celular não é detectável na ausência da droga. Após examinarem as energias de activação da morte provocada pelo dióxido de enxofre, propõem um mecanismo pelo qual este interage com dois receptores da membrana, um deles directamente relacionado com o processo de morte da célula pelo SO_2 (de elevada afinidade para o SO_2), denominado «sítio de morte provocada pelo SO_2 » («SDD site») e o outro que regularia a entropia de activação do primeiro («EM site»). Formulam a hipótese de o «SDD site» ser uma proteína membranar parcialmente exposta à superfície exterior da membrana.

Anacleto (1986), refere que a permeabilidade da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* não é afectada pela presença de SO_2 , sendo no entanto de admitir que alguns fenómenos de membrana (nomeadamente o seu estado de energização), sejam afectados. Referindo-se a resultados obtidos em estudos sobre o transporte de glucose e maltose em *Saccharomyces cerevisiae*, na presença da $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, conclui que esta droga poderá afectar o gradiente electroquímico de protões.

—efeitos intracelulares; as várias acções intracelulares do SO_2 descritas na bibliografia devem-se fundamentalmente aos iões HSO_3^- e SO_3^{2-} que se acumulam no interior da célula. Beech e Thomas (1985), dividem-nas nas seguintes categorias:

- a) inibição de vias metabólicas: combinando-se com diversos intermediários de vias metabólicas, há diminuição da produção de ATP. Por exemplo, o SO_2 combinando-se com o aldeído acético e o ácido pirúvico, impede a produção de etanol e a regeneração do NAD^+ a partir do NADH , inibindo assim a via de Embden-Meyerhof-Parnas, e estimulando a produção de glicerol e outros produtos secundários pela via da fermentação glicero-pirúvica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977).

A glucose, a di-hidroxicetona-fosfato e o ácido 3-fosfoglicérico são eliminados de forma semelhante. Toda a actividade do ciclo de Krebs é diminuída, dado que o SO_2 se combina com ácidos que o compõem (α -cetoglutarato e oxaloacetato). Devido à já citada diminuição das reservas da célula em ATP, processos dependentes do ATP sofrem inibição. Dado que o SO_2 quebra as ligações dissulfídricas das proteínas, muitos sistemas enzimáticos são inibidos (fenómeno para o qual também colabora a destruição de coenzimas). Hinze e Holzer (1986), ao registarem um rápido decréscimo nos níveis de ATP em células de mutantes deficientes respiratórios de *S. cerevisiae*, após incubação com sulfito ou nitrito, concluem ser este fenómeno uma consequência da inibição da síntese de ATP ligada à degradação da glucose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas. Sugerem a inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase como causa para o fenómeno.

- b) danos estruturais: são referidos como deformação das proteínas estruturais, peroxidação dos lípidos, transformação dos ácidos nucleicos e mutagénese. Guerra *et al.* (1981) observaram em *S. cerevisiae* que o SO_2 induz com elevada frequência: mutantes deficientes respiratórios, mutantes com o metabolismo da metionina alterado e mutantes resistentes ao SO_2 .

- c) inibição do metabolismo do enxofre: segundo Hammond e Carr (1976), o SO_2 interfere na sequência metabólica estabelecida na célula da levedura para a síntese de aminoácidos sulfurados, inibindo-a. Estes autores descrevem também dois mecanismos a que as células recorrem para se libertarem do SO_2 : a oxidação em SO_4^- pelo complexo enzimático sulfito-oxidase; e a redução em S^- pelo complexo sulfito-redutase.
- d) destruição de vitaminas: a vitamina B_1 (tiamina), sob a acção do SO_2 é cindida em dois fragmentos sem qualquer actividade vitamínica. Idênticos processos são descritos na bibliografia para outras moléculas biológicas com actividade vitamínica.

TRANSPORTE DO SO_2 NA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A transposição da membrana plasmática é um passo importante nos fenómenos que constituem a toxicidade do dióxido de enxofre para os microrganismos. Recentemente surgiram duas teorias explicativas para o transporte do SO_2 na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em meios de pH baixo (inferior a 4.0). Ambas partem dos seguintes pressupostos:

- ser o ácido sulfuroso não dissociado (H_2SO_3) a única espécie química transportada para o interior da célula;
- a observação generalizada de que a eficácia do SO_2 contra esta levedura, aumenta com o abaixamento de pH, deve-se ao aumento da concentração de H_2SO_3 no meio extracelular e no conseqüente aumento da velocidade de transporte.

Macris e Markakis (1974) defendem que o transporte do SO_2 é mediado por uma proteína membranar e, dado que se regista acumulação intracelular, tratar-se-ia de transporte activo.

Stratford e Rose (1986) discordam destes autores, defendendo que o SO_2 , na forma molecular, atravessa a membrana plasmática por difusão simples (através da bicamada lipídica). Estes últimos adiantam ainda uma explicação para o facto de se registar acumulação intracelular sem haver transporte activo: é que o H_2SO_3 , após atravessar a membrana plasmática, encon-

tra um pH intracelular mais elevado (próximo da neutralidade), pelo que se converte em HSO_3^- e SO_3^{--} por perda de prótons. Este facto faz baixar novamente a concentração intracelular de H_2SO_3 , permitindo a continuação da difusão até se estabelecer o equilíbrio (o HSO_3^- e o SO_3^{--} não podem atravessar a bicamada lipídica por serem iões e portanto fracamente lipossolúveis). A dimensão da acumulação está assim também dependente do pH intracelular (variável com a espécie de levedura).

A ACÇÃO ANTISSEPTICA DO SO_2 MOLECULAR SOBRE LEVEDURAS

Schopfer e Aerny (1985), referem que a maioria das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* por eles estudadas toleram até 4 mg/l de SO_2 molecular. A partir de 8 mg/l a sua multiplicação é totalmente inibida e para a sua destruição completa seria necessária uma concentração de 50 mg/l de SO_2 molecular. Usseglio-Tomasset *et al.* (1981), referem que doses de 0.3 mg/l a 1.9 mg/l são capazes de retardar por 24 horas o início de uma fermentação, por estirpes da mesma levedura. É também de referir o trabalho de Sudraud e Chauvet (1985), que após estudos efectuados em adegas e laboratório, afirmam que para assegurar uma paragem de fermentação pelo SO_2 (para a obtenção de vinhos brancos com açúcar residual), foram necessários 1.50 mg/l de SO_2 molecular, e para evitar a sua refermentação, bastou a dose de 1.20 mg/l.

RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS AO SO_2

Pouco se sabe sobre as bases fisiológicas da resistência de leveduras ao dióxido de enxofre. Stratford *et al.* (1987), afirmam que as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* se contam entre as leveduras mais resistentes a este aditivo. Alguma resistência é atribuível à produção pela levedura de compostos combinantes do SO_2 (o acetaldeído, o 2-oxoglutarato e o piruvato) quando as leveduras crescem na presença de SO_2 (Weeks, 1969). Stratford *et al.* (1987) admitem também que diferenças na resistência ao SO_2 das leveduras sejam em parte devidas a diferenças nas suas taxas de transporte através da membrana plasmática. Assim, discutem a hipótese de um eventual papel determinante

da composição da bicamada lipídica em ácidos gordos na resistência de uma dada estirpe de levedura ao SO_2 . Dado que o aumento do teor em resíduos de ácidos gordos insaturados nos fosfolípidos das membranas aumenta a sua flexibilidade, Stratford *et al.* (1987), após registarem maiores velocidades iniciais de entrada do SO_2 em *Saccharomyces ludwigii* que em *Saccharomyces cerevisiae*, e servindo-se de dados que apontam para uma maior riqueza de resíduos de ácidos gordos em $\text{C}_{18:1}$ nos fosfolípidos de membrana de *S. ludwigii* que de *S. cerevisiae*, formulam a hipótese de que uma maior flexibilidade membranar pode acelerar a difusão do SO_2 através da membrana plasmática. Assim, leveduras com maiores teores de resíduos de ácidos gordos insaturados nos fosfolípidos das suas membranas plasmáticas, teriam uma membrana com maior fluidez o que induziria uma maior velocidade de difusão do SO_2 .

Num estudo realizado em Adegas Cooperativas da região do Ribatejo-Oeste (Portugal) por San-Romão *et al.* (1982), verificou-se existir uma relação directa entre a frequência de leveduras mais resistentes ao SO_2 e as doses deste aditivo usadas em cada Adega no momento da vinificação. Assim, segundo estes autores, elevadas doses de SO_2 usadas habitualmente na vinificação conduziriam a uma adaptação progressiva da microflora levuriana, adquirindo esta maior resistência ao dióxido de enxofre.

CONCLUSÕES

O mecanismo de acção do SO_2 sobre leveduras (que se sabe depender do nível de SO_2 molecular presente no meio), está ainda pouco esclarecido. A levedura mais estudada tem sido *Saccharomyces cerevisiae* sem dúvida pela importância económica e industrial das fermentações alcoólicas. Os danos intracelulares, resultantes da acumulação dos iões HSO_3^- e SO_3^{2-} serão porventura os mais graves pelo que o transporte do SO_2 será um passo decisivo na toxicidade deste antisséptico para leveduras. O pH do meio assume também papel relevante na eficácia do SO_2 contra leveduras, concluindo-se que este é quase completamente ineficaz quando o pH do meio é superior a 4.00. São também de referir os conhecimentos recentes sobre a influência da composição lipídica da membrana plasmática na resistência das leveduras ao SO_2 .

RÉSUMÉ

La toxicité du dioxyde de soufre pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* — mise au point bibliographique

L'action antimicrobienne du dioxyde de soufre est analysée, ayant comme référence la nécessité de réduire les quantités de ce additif à utiliser en vinification, de façon à obtenir vins avec des faibles doses de SO₂ total.

Parmi les auteurs, c'est pacifique l'affirmation de que c'est le SO₂ moléculaire l'espèce toxique pour les levures, dû à l'accumulation intracellulaire de HSO₃⁻ et de SO₃²⁻ qu'elle amène. La molécule de SO₂ pénètre la cellule de *S. cerevisiae* par diffusion simple, et les ions bissulfite et sulfite formés dans le cytoplasma, sont empêchés de sortir à cause de leurs faibles taux de diffusion a travers de la membrane cytoplasmique.

Quelques facteurs susceptibles d'influencer la résistance des levures au SO₂ sont discutés.

SUMMARY

Sulphur dioxide toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* — a review

Sulphur dioxide is commonly used in wine-making; this compound selectively inhibits the growth of acetic and lactic acid bacteria, allowing desirable yeast strains (*S. cerevisiae* and related species) to dominate the fermentation. In this paper, we discuss its effects against yeasts in light of the need to minimize its employment in wine-making, in order to obtain wines with less SO₂. We have done a review about the transport and toxicity of sulphur dioxide in *S. cerevisiae*. Since molecular sulphur dioxide is the only form of SO₂ with activity against yeasts, it is inferred from the bibliography that SO₂, after crossing the plasma membrane (by simple diffusion), is largely converted into HSO₃⁻ and SO₃²⁻ ions (forms that cause intracelular damages). This fact makes the intracelular concentration of SO₂ lower, allowing further diffusion into organisms until the concentration of SO₂ is equal on both sides of the plasma membrane.

Factors affecting the resistance of yeast strains to sulphur dioxide are discussed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anacleto, J.

1986 Acções do SO₂ em *Saccharomyces cerevisiae*. *Boletim de Biotecnologia*, n.º 29 (Outubro).

Anacleto, J. e N. van Uden

1982 Kinetics and Activation Energetics of Death in *Saccharomyces cerevisiae* Induced by Sulfur Dioxide. *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 2477-2486.

Anônimo

- 1985 Tratado de Adesão da República Portuguesa às Comunidades Económicas Europeias. Lisboa, 12 de Junho de 1985.
- 1987 Regulamento (CEE) n.º 822/87 do Conselho, de 16 de Março de 1987, que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, n.º L 84, de 1987/03/27, pág. 1.
- 1989 Portaria n.º 445/89 de 16 de Junho. (Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação). *Diário da República*, I Série, n.º 136 de 1989/06/16, pág. 2349-2350.
- Beech, F. W. e S. Thomas
- 1985 Action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. *Bull. OIV*, 58 (652-653): 564-581.
- Guerra, D.; P. Romano e C. Zambonelli
- 1981 Mutagenic effects of sulfur dioxide on *Saccharomyces cerevisiae* diploid strains. *Experientia*, 37: 691-693.
- Hammond, S. M. e J. G. Carr
- 1976 The Antimicrobial Activity of SO₂ — with Particular Reference to Fermented and Non-fermented Fruit Juices: Em: *Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes*. Ed. por F. A. Skinner and W. B. Hugo. Academic Press, London: 89-110.
- Hinze, H. e H. Holzer
- 1986 Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch. Microbiol.*, 145: 27-31.
- Macris, B. J. e P. Markakis
- 1974 Transport and Toxicity of Sulphur Dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *J. Sci. Fd. Agric.*, 25: 21-29.
- Ribéreau-Gayon, J.; E. Peynaud; P. Ribéreau-Gayon e P. Sudraud
- 1977 *Sciences et Techniques du vin — IV Clarification et Stabilization; Matériels et installations*. Dunod, Paris.
- San-Romão, M. V.; A. P. Belchior e L. C. Carneiro
- 1982 Alguns elementos para a caracterização enológica da microflora levuriana da região do Oeste. Influência da levedura na qualidade dos vinhos. *Ciênc. Téc. Vitiv.*, 1 (2): 83-100.
- Schimz, K. L.
- 1980 The Effect of Sulfite on the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 125: 89-95.
- Schimz, K. L. e H. Holzer
- 1979 Rapid Decrease of ATP Content in Intact Cells of *Saccharomyces cerevisiae* After Incubation with Low Concentrations of Sulphite. *Arch. Microbiol.*, 121: 225-229.
- Schopfer, J. F. e J. Aerny
- 1985 Le rôle de l'anhydride sulfureux en vinification. *Bull. OIV*, 58 (652-653): 515-542.
- Stratford, M. e A. H. Rose
- 1986 Transport of Sulphur Dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 1-6.

- Stratford, M.; P. Morgan e A. H. Rose
1987 Sulphur Dioxide Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ludwigii*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 2173-2179.
- Sudraud, P. e S. Chauvet
1985 Activité antilevure de l'anhydride sulfureux moleculaire. *Conn. Vigne Vin*, **19** (1): 31-40.
- Usseglio-Tomasset, L.; G. Ciolfi e A. Pagliara
1981 Valutazione della resistenza all'anidride solforosa da parte dei lieviti. I. Azione ritardatrice sull'inizio della fermentazione. *Vini d'Italia*, **23** (131): 78-91.
- Usseglio-Tomasset, L. e P. D. Bosia
1984 La Prima Costante di Dissociazione dell'Acido Solforoso. *Vini d'Italia*, **26** (5): 7.
- Vas, K. e M. Ingram
1949 Preservation of Fruit Juices with less SO₂. *Fd. Mf*, **24**: 414-416.
- Weeks, C.
1969 Production of sulphur dioxide-binding compounds and of sulphur dioxide by two *Saccharomyces* yeast. *Am. J. Enol. Vitic.*, **20**: 32-39.

