

ESTUDO DE VINHOS PELA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ¹

AMARO HENRIQUE DE SOUZA ²

SINOPSE.— Para dirimir uma questão de direito ao uso da denominação “verde” em seus vinhos, suscitada por uma firma de Caxias do Sul, o autor reproduziu parte da legislação portuguesa sobre os vinhos verdes, próprios e característicos da região agrícola demarcada do Minho.

Através dum método cromatográfico em camada delgada, estabelecido e estudado pelo autor, empregando a “Sílica gel G” (Merck) como adsorvente e butanol-água-ácido fórmico (20:20:2,17), como solvente móvel, encerrando verde-bromo-cresol como indicador, foram cromatografados vinhos portugueses brancos e tintos, verdes e maduros, e vinhos nacionais (Caxias do Sul, S. Roque e Andradás).

Do estudo comparativo, visando à natureza dos ácidos orgânicos fixos, constatou o autor que os efeitos da fermentação maloláctica foram normais na maioria dos vinhos portugueses e nacionais ensaiados, não se verificando, porém, esse efeito (degradação de ácido málico em ácido láctico) num verde branco português, certamente por excesso de SO₂, que inibe a fermentação maloláctica, de primordial importância na elaboração dos vinhos, dando-lhes finura e suavidade.

Dada a singeleza do método cromatográfico estudado, podendo ser executado em qualquer laboratório, verifica-se, através do mesmo, com facilidade e rapidez, o processamento da fermentação maloláctica nos vinhos, durante sua elaboração nas cantinas.

INTRODUÇÃO

Em 1966, fomos solicitado a emitir parecer sobre um processo oriundo de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, referente ao uso indevido, por uma organização vinícola, da denominação “verde” em um dos seus vinhos tintos, qualificação até agora privativa dos vinhos da região agrícola do Minho (Portugal).

Providenciada a coleta de várias amostras dos vinhos tintos nos depósitos da firma envolvida, foram as mesmas submetidas à análise sumária na Seção de Análises Comerciais (SAC), passando depois à Seção de Química (SQ), com vistas à caracterização dos ácidos orgânicos fixos e a um pronunciamento sobre a questão em foco.

Cuidadosamente e empregando método cromatográfico em camada delgada, perfeitamente estabelecido na SQ e apresentado ao IV Simpósio Brasileiro de Cromatografia (Curitiba, set. 1968), fizemos prolongados (e repetidos, por inúmeras vezes) estudos comparativos entre os vinhos tintos nacionais e os vinhos “verdes” de origem portuguesa, tintos e brancos, caracterizando os ácidos orgânicos fixos.

Legislação portuguesa

Pelo Decreto-Lei n.º 16.684, de 22 de março de 1929, ficou regulamentada a produção e comércio dos vinhos “verdes” e demarcada sua região agrícola (Minho), formada pelos distritos administrativos de Viana do

Castelo e Braga; pelos concelhos de Ribeiras de Pena e Mondim de Basto, do distrito de Vila Real; de Santo Tirso, Vila do Conde, Póvoa de Varzim, Maia, Matosinhos, Gondomar, Valongo, Paredes, Paços de Ferreira, Louzada, Felgueiras, Penafiel, Amarante, Marco de Canavezes e Baião, do distrito do Pôrto; de Castelo de Paiva, Vale de Cambra e Arouca, do distrito de Aveiro; de Sinfães e Resende, do distrito de Viseu, com exceção, porém, da freguesia de Barró, deste último concelho.

Pela Portaria n.º 8.596, de 15 de janeiro de 1937, ao abrigo do disposto no parágrafo 2.º do artigo 12 do Decreto-Lei n.º 27.002, de 12 de setembro de 1936, o Governo da República Portuguesa, através do Ministro do Comércio e Indústria, fixou as características para os vinhos provenientes das regiões demarcadas, características essas que foram reunidas no Quadro I.

Revisão bibliográfica

Na consulta à bibliografia sobre os vinhos verdes, encontramos as monografias de Lima (1938) e Galhano (1949), porém, o “Chemical Abstracts” (1967-1969) não registrou nada nesse período.

Apesar de antigo, o trabalho de Pires de Lima encerra citações interessantes, mormente no que diz respeito ao histórico da fermentação maloláctica, assunto que será abordado adiante. Revelou, também, características analíticas de mostos e vinhos das castas “Vinhão”, “Azal”, “Borraçal” e “Espedeiro”.

Galhano (1949) também abordou os vinhos verdes. O seu trabalho, por ser mais atualizado, como é óbvio, revela-nos melhores informações elucidativas, com farta ilustração fotográfica de cepas seculares, cantinas, características topográficas, solos e subsolos, técnica da cultura e da elaboração dos vinhos, suas características analíticas, produção, etc.

¹ Recebido em 31 jul. 1970, aceito 25 jan. 1971.

Realizado na Seção de Química do Instituto de Tecnologia de Bebidas (ITB), ex-Instituto de Fermentação, e apresentado ao 9.º Congresso Brasileiro de Farmácia e Bioquímica, Curitiba, 25-30 abril 1970.

² Chefe da Seção de Química do ITB, Av. Maracanã 252, Rio de Janeiro, GB, ZC-29, e membro titular da Academia Nacional de Farmácia.

Usando processos extremamente rápidos, econômicos e sensíveis, por nós estudados, verificamos nos cromatogramas essa degradação dos ácidos orgânicos fixos dos vinhos, de acordo com a maior intensidade da fermentação maloláctica, de grande significação na elaboração dos vinhos, como iremos mostrar, sem necessidade duma análise trabalhosa e prolongada como aquela revelada por Calhano (1949).

MATERIAL E MÉTODOS

Atendendo solicitação da SAC, submetemos as amostras de vinhos tintos nacionais aos estudos cromatográficos em camada delgada, usando o método que estabelecemos em trabalho anterior (Souza 1968); êsses estudos foram realizados comparativamente com vinhos "verdes", tintos e brancos, portugueses, e os ditos "maduros" de igual procedência.

No decorrer dos estudos e ensaios cromatografamos, também, vinhos tintos e rosados, elaborados na Subestação de Enologia de São Roque (S. Paulo).

O método cromatográfico que estabelecemos, e através do qual realizamos os ensaios, consiste, em linhas gerais, em fazer as "corridas" em cromatoplas, tendo como suporte lâminas de vidro, das usadas em microscopia, com camada de "Sílica gel C" (Merck), conforme sistema estabelecido por Wasick (1962), podendo ser classificado o método como semi-micro (Fig. 1).

Empregamos o solvente móvel butanol-ácido fórmico-água (20:2,17:20) e o indicador verde-bromo-cresol, recomendado por Amerine (1960) na cromatografia sobre papel para os ácidos orgânicos dos vinhos, seguindo também o sistema ou técnica de Michod, que consiste em adicionar o indicador ao solvente antes das "corridas" dos ácidos orgânicos, evitando-se, com isso, a operação "spray", que é custosa, delicada e exige capela.

Diga-se, de passagem, que a cromatografia em camada delgada é a dominante em todos os laboratórios de química analítica bromatológica, em virtude de sua rapidez, segurança e economia.

RESULTADOS

De acordo com o nosso sistema de trabalho, cuidadosamente fizemos a caracterização dos ácidos orgânicos fixos nas amostras de vinho recebidas, comparativamente com outros vinhos de origem portuguesa, verdes e

maduros, tintos e brancos, cujas amostras são assim identificadas:

- A) Vinho "verde-verde" Raposa, Mosele, colheita 1968;
- B) Vinho "maduro-maduro" Raposa, Mosele, colheita 1968;
- C) Vinho tinto especial Raposa, Mosele, colheita 1967;
- D) Vinho verde tinto "Calmores", Comp. Vinícola do Norte de Portugal;
- E) Vinho verde branco português;
- F) Vinho tinto maduro "Granléve", Vila Nova de Gaia, (Portugal).

Os resultados desses ensaios são apresentados no Quadro 2 e na Fig. 2.

Por ser um fenômeno perfeitamente normal, conforme já foi explanado, a fermentação maloláctica se processou tanto nos vinhos tintos verdes, como nos maduros, sendo praticamente nula no vinho branco verde E.

Tanto no cromatograma I, como no II (Fig. 2), pela natureza e tamanho das manchas correspondentes aos ácidos tartárico, málico e láctico, houve efeito da fermentação maloláctica nos vinhos, com exceção apenas da segunda "corrida" na cromatoplasca II, correspondente ao vinho verde branco português. Neste, houve predominância dos ácidos tartárico e málico e apenas vestígios do láctico, possivelmente por causa do elevado teor, no mosto, do SO_2 , que inibe a fermentação maloláctica.*

Devemos, ainda, assinalar que o cromatograma II, depois de permanecer um ano arquivado pelo sistema que adotamos (proteção da cromatoplasca com microlâmina semelhante, aderida com o auxílio de fita adesiva transparente, vedando assim a entrada de umidade e ar), pouco se modificou em comparação com as fotografias tiradas logo após as "corridas" e também arquivadas em nosso Setor.

Em continuação aos nossos estudos, cromatografamos também vinhos elaborados na Subestação de S. Roque (S. Paulo) e de Andradas (Minas), observando, em algumas amostras de S. Roque, uma fermentação maloláctica bem pronunciada, revelada pelos vestígios dos ácidos tartárico e málico e franca presença do ácido láctico.

Por outro lado, em outras amostras da mesma procedência e também de Andradas, a maloláctica se processou modestamente, talvez pelo teor um tanto elevado de metabissulfito de potássio nos mostos.

* Com o principal intuito de melhor elucidar esta questão, reproduzimos um trecho do trabalho de Calhano (1949): "A regulamentação dos produtos utilizados na enologia é estabelecida pelo Decreto-Lei n.º 35.846, de 2 de setembro de 1946; entre estes produtos, só o anidrido sulfuroso (sob a forma livre ou sob a forma de metabissulfito de potássio) é normalmente e grandemente empregado. As doses são relativamente baixas (de 5 a 10 g por hectolitro) de maneira a garantir uma seleção suficiente das leveduras e não contrariar a fermentação maloláctica posterior".

QUADRO 2. Resultados dos ensaios

Ácidos	Vinhos					
	A	B	C	D	E	F
Láctico	+++	+++	+++	+++	+	+++
Málico	+	+	+	+	++++	+
Tartárico	++	++	++	++	++++	++

* O sinal + indica a concentração semi-quantitativa dos ácidos orgânicos nos vinhos ensaiados. O resultado acima é a confirmação de 5 "corridas", no mínimo, de cada vinho analisado.

CROMATOGRAMAS

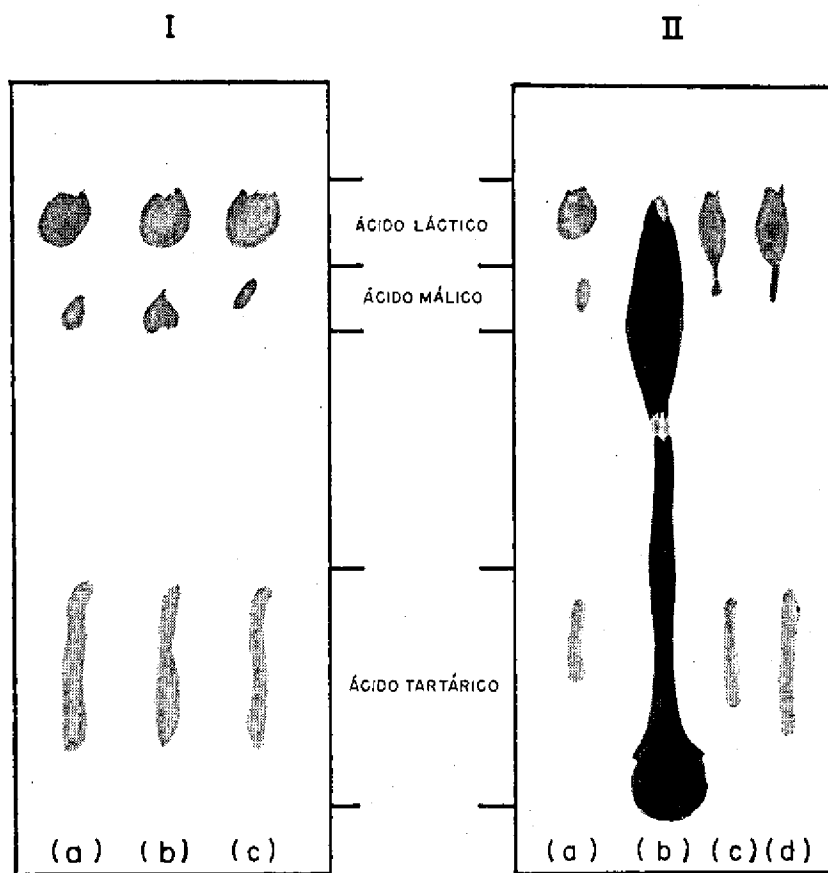


FIG. 2. Cromatografia em camada delgada ("Silica gel G" (Merck). Cromatograma I: representa as "corridas" dos vinhos: a) verde tinto "Calmares", b) "maduro-maduro" Raposa, c) "verde-verde" Raposa. Cromatografia II: a) "maduro-maduro" Raposa, b) verde branco (português), c) tinto maduro "Granlêve", d) "verde-verde" Raposa.

DISCUSSÃO

Certamente por influência da antiga literatura portuguesa, que na época não registrava métodos sensíveis cromatográficos, era pensamento predominante entre alguns colegas do antigo IF que os "vinhos verdes" se caracterizavam, principalmente, pelo elevado teor de ácido málico, o que é incorreto.

Comprovando o que acabamos de afirmar, vejamos o trabalho de Lima (1938).

Através de quadros demonstrativos de análises de mostos e vinhos, provenientes de quatro castas da zona demarcada dos "vinhos verdes", esse autor lusitano, para surpresa nossa, achou predominância franca do ácido málico sobre o láctico, sem mencionar o tempo de elaboração ou envelhecimento.

Teria Lima (1938), processado as determinações analíticas nos vinhos recentemente elaborados, antes da

fermentação maloláctica? Mas esta se inicia logo depois da alcoólica.

Muito embora tenha dado a equação da maloláctica por ação enzimática, em certa parte do seu trabalho afirma:

"Os vinhos verdes contêm notável percentagem de ácido málico" e "em maior ou menor grau, anidrido carbônico", o que é verdadeiramente paradoxal, pois, na degradação do ácido málico em láctico, com desprendimento de CO_2 , a reação é irreversível.

Entretanto, Galhano (1949), em primoroso trabalho, confirmou, através dos estudos realizados em "vinhos verdes", determinando-lhes as características analíticas, antes e depois da fermentação maloláctica, que o teor de ácido málico, nesses e noutros vinhos, tende a cair, dando lugar ao láctico.

Os ensaios por nós realizados, usando a cromatografia em camada fina, comprovaram as características analíticas dos "vinhos verdes".

CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitem concluir que:

1) simplesmente pelo teor e distribuição dos ácidos orgânicos fixos nos vinhos, não se classifica um determinado tipo de vinho ("verde", por exemplo), porém, os efeitos da fermentação maloláctica indicam a normalidade da elaboração dos vinhos e sidras;

2) os vinhos tintos nacionais "verde-verde", "maduro-maduro" e "tinto especial" Raposa, fabricação da Mosele, se comportaram idênticamente quanto ao teor semi-quantitativo, distribuição e natureza dos ácidos orgânicos portugueses, através da cromatografia em camada fina;

3) as análises sumárias realizadas na SAC, também, praticamente, apresentaram as mesmas características analíticas nos vinhos tintos estudados;

4) o método que estudamos e estabelecemos, é extremamente rápido, seguro, econômico, podendo-se fazer mais de 200 cromatogramas diariamente com o consumo de alguns mililitros do solvente, poucos miligramas de indicador e pouquíssimas gramas de "Sílica gel G".

AGRADECIMENTOS

Consignamos aqui nosso sincero reconhecimento aos amigos: Grimaldo Fernandes, da firma Carl Zeiss, que fotografou os cromatogramas, com feitura, também, de "slides"; Ary Maciel, que fotografou o conjunto do instrumental de cromatografia em camada fina, e ao desenhista João Szeifert, estes últimos do Instituto de Tecnologia de Óleos, cuja preciosa cooperação muito contribuiu para a ilustração dos nossos estudos.

REFERÊNCIAS

- Amerine, M.A. 1960. Laboratory procedures for enologists. Univ. Califórnia, Davis, p. 73-74.
- Cabral, A. (s.d.). Legislação sobre gêneros alimentícios, vinhos, aguardentes, alcoois, vinhas. Vol. 2. Liv. Bertrand, Lisboa.
- Gandini, A. 1969. Microbiological, chemical and technological aspects of malolactic fermentation. *Vini Ital.* 11(59):125-134; (60):227-233. (Chem. Abstr. 72, n.º 120051)
- Galhano, A.B. 1949. Le vin "verde". Com. Viticult. Região dos Vinhos Verdes, Porto, Portugal.
- Leal, B.I., Bravo, F. & Plasencia, A.M. 1969. Lactic acid bacteria from wine. III. Malolactic fermentation under wine-making conditions. *Revta Agroquím. Tecnol. aliment.* 9(3): 428-436. (Chem. Abstr. 72, n.º 88891b)
- Lafon-Lafourcade, S., Domeroq, S. & Peynaud, E. 1968. Étude de l'ensemencement des vins par les bacteries de la fermentation malolactique. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, n.º 2, France.
- Lima, A.P.P. de 1938. Elementos para o estudo da acidez dos vinhos verdes. V Congr. int. Vinha e Vinho, Lisboa.
- Murolo, G. 1968. Malic acid-lactic acid fermentation the wines of Irpinia. *Atti Accad. ital. Vite Vino*, Siena, 20:233-240. (Chem. Abstr. 72, n.º 77406b)
- Peynaud, M.E. 1968. Mecanisme biochimique de la fermentation malolactique. *C.R. Acad. Sci. Paris* 267:121-122.
- Peynaud, E. 1967. Études récentes sur les bacteries lactiques du vin. 2^me Symposium International d'Onologie, Bordeaux, Coynac, 13-17 juin 1967. (Separata de Fermentações et Vinifications)
- Ribereau-Gayon, J. & Peynaud, E. 1961. *Traité d'oenologie*. Tome 2. Librairie Polytechnique Ch. Béranger, Paris.
- Souza, A.H. 1968. Determinação qualitativa ou semi-quantitativa dos ácidos orgânicos dos vinhos e sucos de frutas pela cromatografia em camada delgada. IV Simp. bras. Cromatografia, set., Curitiba. (Não publicado)
- Wasicky, R. 1962. Thin-layer chromatography on microslides. *Analyt. Chem.*, Washington, 34:1346.

ABSTRACT.- Souza, A.H. de 1972. *Study of wines by thin-layer chromatography*. *Pesq. agropec. bras.*, Sér. Agron., 7:27-31. (Centro Tecnol. Agric. Alimentar, Av. Maracanã 252, Rio de Janeiro, GB, ZC-29, Brazil)

Brazilian and Portuguese wines, named "green" and mature ones, showed similar fixed organic acids as characterized by thin-layer chromatography using butanol-water-formic acid (20:202:17) as solvent, and green bromocresol as indicator on Sílica Gel G (Merck). Malolactic fermentation effects was observed in most wines, except in one "green" white Portuguese wine, probably because of excess SO₂ which inhibits malolactic fermentation.