

## «DETERMINAÇÃO DA FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA EM VINHOS PELA CROMATOGRÁFIA EM PAPEL»

Carlos Eugenio Daudt (\*)

### I — INTRODUÇÃO

A fermentação malolática é a transformação de um ácido bibásico (ácido málico) em um ácido monobásico (ácido láctico) fermentação esta de grande importância em Enologia, uma vez que o teor de acidez fixa dos vinhos é reduzido quando esta se processa.

Após a estocagem de vinhos recentemente fermentados é comum a diminuição do teor de acidez, ora por precipitação do ácido tartárico em bitartarato, ora pelo aparecimento de bactérias que produzem uma segunda fermentação chamada malolática (5).

Entretanto RAMUNNI (12) lembra que durante o envelhecimento dos vinhos pode ocorrer a diminuição do ácido málico até completo desaparecimento o que nos afirma que a acidez fixa também diminui neste caso.

RADLER (11) estudando a fermentação malolática em vinhos conclui que a bactéria responsável por este tipo de fermentação pode produzir um importante componente aromático, conhecido como diacetil, o qual é proveniente da oxidação da acetona.

No presente trabalho determinamos a fermentação malolática em vinhos através da cromatografia em papel, com a finalidade de oferecermos aos vinicultores um processo de fácil execução e de baixo custo, que lhes permita verificar este tipo de fermentação ainda na fase anterior ao engarrafamento, a fim de impedir que esta se processe posteriormente quando o vinho já estiver nas garrafas.

Assim sendo, não nos preocupamos com o bioquimismo bacteriano, bem como com o controle da fermentação, aspec-

---

(\*) Professor do Departamento de Tecnologia Alimentar,  
Chefe do Departamento: Prof. Tit. Dr. Cyro Melo Schmitz  
— Orientador.

tos estes que foram muito bem estudados por CHAVVET (3), KUNKEE (5), PEYNAUD (8) e RADLER (11).

Com relação aos métodos usados para a determinação e controle da fermentação malolática, existem inúmeros trabalhos, entretanto usamos a técnica apregoada por KUNKEE (5) por apresentar resultados comparáveis aos da literatura e ser de fácil execução.

Podemos citar ainda o método usado por PIFFERI (9) que usa a cromatografia em camada delgada de sílica-gel e determina todos os ácidos orgânicos em vinhos.

CHAVVET et alii (3) descrevem um método de maceração por dióxido de carbono, para o desenvolvimento dos ácidos málicos e láctico durante a vinificação.

REBELEIN (13) dosa colorimetricamente o ácido málico juntamente com os ácidos tartárico e láctico em cidra e vinhos.

BETHENCOURT (1) apresenta uma modificação no método titométrico para a determinação do ácido málico em vinhos e mostos.

MUENZ (7) determina os ácidos D-tartárico e L-málico em mostos e vinhos tratados com carbonato de cálcio e após submetidos ao exame microscópico.

BRUNELLE et alii (2) usam a técnica do trimetilsilicato (TMS) para a determinação dos ácidos fixos em vinhos, dosando-os quantitativamente através da cromatografia gas-liquida.

PROCÓPIO et alii (10) utiliza o método Versene para a determinação indireta do ácido láctico durante a hidrólise e fermentação.

KAIN et alii (4) fazem uma determinação rápida de ácido láctico em vinhos comerciais usando trocas de cations, salientando que o método não é muito seguro para determinar o ácido láctico em vinhos derivados de uvas tintas nobres, em face da grande quantidade de ácido glucônico presente.

PEYNAUD et alii (8) em exaustivo trabalho comparam vários métodos empregados na quantificação do ácido L-málico em vinhos. Caracterizam serem os métodos cromatográfico e enzimático os mais indicados quando da realização de um grande número de provas.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1. Material** — Os vinhos analisados foram adquiridos no comércio local e na Estação Experimental de Vitivinicultura de Bento Golçalves (RS). Os mostos que utilizamos no presente trabalho foram adquiridos em diversas cantinas também de Bento Gonçalves (RS).

Analisamos trinta amostras de vinhos, sendo 12 amostras de vinhos tintos, 6 de vinhos rosados e 12 de vinhos brancos, enquanto que para a análise do mosto usamos nove amostras, sendo 6 destinadas à fabricação de vinho tinto e três (3) à fabricação de vinhos brancos.

Foram feitos 3 cromatogramas para cada amostra.

### 2.2 — Método de Kunkee

A amostra (5mm<sup>3</sup>) é transferida para o ponto de partida no papel de cromatografia, sendo após, secada com corrente de ar aquecido, operação esta que é repetida seis vezes para um mesmo ponto. Logo após o papel é levado para a câmara de cromatografia a qual já possui solvente. Depois de seis horas o papel é removido e deixado secar à temperatura ambiente, o que é evidenciado pelo aparecimento de um fundo colorido em azul, operação esta que varia de três a quatro horas. Determina-se o R<sub>f</sub> e compara-se os cromatogramas padrões, os quais apresentam os seguintes R<sub>f</sub>:

Ácido tartárico = 0,30

Ácido málico = 0,57

Ácido Láctico = 0,77

#### 2.2.1. — Reagentes e Material usados

- Papel de cromatografia: Whatman nº 1. O papel é cortado em retângulos de 10x30 cm, e o ponto de partida foi marcado 2,5 cm de distância da margem inferior do papel.
- Solvente: Consta de uma mistura de n-butanol (100 ml), água (100 ml), ácido fórmico concentrado (10,7 ml) e bromocresol verde (15 ml de solução 1%)
- Micropipetas: capacidade 5 mm<sup>3</sup>
- Cuba de cromatografia: conforme fig. nº 1.

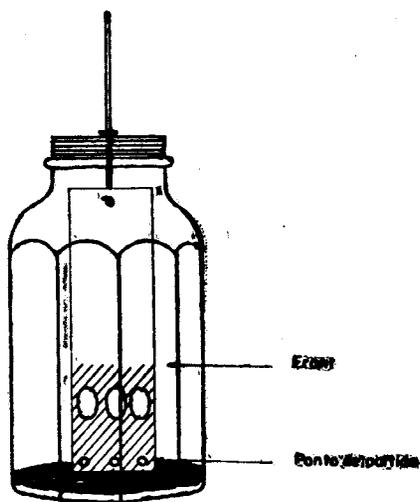


FIG. 2.

### III — RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 1 e 2. Para facilitar a verificação da presença do ácido málico e láctico, nas amostras analisadas, em termos de percentagem, elaboramos a tabela nº 3.

TABELA Nº 1

## Resultados das Determinações Efetuadas em Vinhos

| Número da Amostra | Tipo de vinho | Variedade da Uva | Procedência   | Safra | Presença do Ácido Málico | Presença do Ácido Lático |
|-------------------|---------------|------------------|---------------|-------|--------------------------|--------------------------|
| 01                | Tinto Sêco    | Viniferas        | B. Gonçalves  | 1970  | +                        | +                        |
| 02                | " "           | Bonarda          | " "           | 1970  | -                        | +                        |
| 03                | " "           | Canaiollo        | " "           | 1970  | +                        | +                        |
| 04                | " "           | Viniferas        | Veranópolis   | 1969  | -                        | +                        |
| 05                | " "           | Desconh.         | Caxias do Sul | 1970  | +                        | +                        |
| 06                | " "           | Viniferas        | " "           | 1970  | +                        | +                        |
| 07                | " "           | Sangiovese       | B. Gonçalves  | 1970  | +                        | +                        |
| 08                | " "           | Canaiollo        | " "           | 1970  | +                        | +                        |
| 09                | " "           | Chianti          | Caxias do Sul | 1969  | -                        | +                        |
| 10                | " "           | Desconh.         | A. Grande     | 1970  | +                        | +                        |
| 11                | " "           | Viniferas        | B. Gonçalves  | 1970  | -                        | +                        |
| 12                | " "           | Desconh.         | Farroupilha   | 1970  | -                        | +                        |
| 13                | " "           | "                | Fl. da Cunha  | 1970  | -                        | +                        |
| 14                | Branco Sêco   | Claite Die       | B. Gonçalves  | 1970  | -                        | +                        |
| 15                | " "           | Desconh.         | Jaguari       | 1969  | -                        | +                        |
| 16                | " "           | Moscato          | B. Gonçalves  | 1970  | -                        | +                        |
| 17                | " "           | Desconh.         | " "           | 1969  | -                        | +                        |
| 18                | " "           | "                | Caxias do Sul | 1970  | -                        | +                        |
| 19                | " "           | "                | " " "         | 1969  | -                        | +                        |
| 20                | " "           | "                | F. da Cunha   | 1969  | -                        | +                        |
| 21                | " "           | "                | Jaguari       | 1970  | -                        | +                        |
| 22                | " "           | "                | Farroupilha   | 1969  | -                        | +                        |
| 23                | " "           | "                | B. Gonçalves  | 1970  | +                        | +                        |
| 24                | " "           | "                | " "           | 1969  | -                        | +                        |
| 25                | " "           | "                | Garibaldi     | 1969  | -                        | +                        |
| 26                | ROsé Doce     | "                | Caxias do Sul | 1969  | -                        | +                        |
| 27                | " "           | "                | " " "         | 1970  | +                        | -                        |
| 28                | Rosé Sêco     | Gamay            | B. Gonçalves  | 1970  | +                        | +                        |
| 29                | " "           | Desconh.         | " "           | 1970  | -                        | +                        |
| 30                | " "           | "                | Caxias do Sul | 1969  | -                        | +                        |
|                   | " "           | "                | Garibaldi     | 1970  | -                        | +                        |

TABELA Nº 2

Resultados das Determinações efetuadas em Mostos

| Número da Amostra | Tipo de Mosto | Variedades da Uva  | Procedência  | Safra | Presença do Acido Málico | Presença do Acido Láctico |
|-------------------|---------------|--------------------|--------------|-------|--------------------------|---------------------------|
| 01                | Tinto         | Barbera Bordenarda | B. Gonçalves | 1.971 | +                        | -                         |
| 02                | Tinto         | Peverella          | "            | 1.971 | +                        | -                         |
| 03                | Tinto         | Trebianos-Moscato  | "            | 1.971 | +                        | -                         |
| 04                | Tinto         | Isabel-Hebermont   | "            | 1.971 | +                        | -                         |
| 05                | Tinto         | Trebianos          | "            | 1.971 | +                        | -                         |
| 06                | Tinto         | Isabel             | "            | 1.971 | +                        | -                         |
| 07                | Branco        | Hebermont          | "            | 1.971 | +                        | -                         |
| 08                | Branco        | Jacques            | "            | 1.971 | +                        | -                         |
| 09                | Branco        | Seibel             | "            | 1.971 | +                        | -                         |

TABELA Nº 3

Percentagem das presenças de ácido málico e láctico em Mostos e Vinhos

|                           | V I N H O |        |      | M O S T O |          |
|---------------------------|-----------|--------|------|-----------|----------|
|                           | Tinto     | Branco | Rosé | Branco    | Tinto    |
| Presença do Ácido Málico  | 50%       | 8,3%   | 66%  | 100%      | 100%     |
| Presença do Ácido Láctico | 100%      | 100%   | 83%  | 0 (zero)  | 0 (zero) |

#### IV — DISCUSSÃO

Conforme afirma Kunkee (5), verificamos que o método apregoadado apresenta as características que justificam nosso trabalho ainda que a ausência da mancha característica do ácido málico é evidência segura de que a fermentação malolática já ocorreu.

As manchas que evidenciam a presença dos ácidos orgânicos apresentam uma coloração amarela no fundo azul do cromatograma. (fig. nº 2)

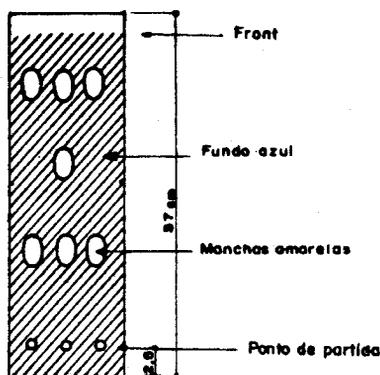


FIG. 2

Verificando nossos resultados constatamos que em vinhos tintos (tabela nº 1), do total de doze (12) amostras analisadas encontramos em seis (6) delas a presença de ácido málico e ácido láctico e nas outras seis (6) a presença de ácido láctico somente, o que nos dá observando a tabela nº 3, uma percentagem de 50% e 100% respectivamente para a ocorrência do ácido málico e láctico. Significam nossos resultados que 50% das amostras já tinham sofrido a fermentação malolática, e que os outros 50% estavam na presença desta fermentação no momento da análise.

Nos vinhos branco (tabela nº 1) encontramos uma amostra com ácido málico e láctico, mas nas outras onze (11) somente ácido láctico o que nos dá pela tabela nº 3 a percentagem de 8,3% e 100% respectivamente para a presença de ácido málico e láctico.

Nestes vinhos os nossos resultados expressam que 91,7% das amostras possuem ácido láctico somente e que em 8,3% do total analisado estamos em presença da fermentação malolática.

Nos vinhos rosados já ocorreu um problema diferente como constatamos verificando os resultados nas Tabelas n.ºs 1 e 3; das seis (6) amostras analisadas, duas apresentaram ácido málico e as outras quatro (4) acusaram a presença do ácido láctico somente. Nas duas amostras que apresentaram ácido málico, uma somente acusou a presença de ácido láctico, e a outra não indicou sequer um traço deste ácido. Isto significa que:

Em primeiro lugar nas quatro amostras em que apareceu o ácido láctico somente, sabemos que a fermentação malolática já ocorreu.

Em segundo lugar na amostra em que apareceram os dois ácidos, málico e láctico, sabemos que estamos em presença da fermentação malolática.

Finalmente em terceiro lugar, na amostra em que constatamos a presença do ácido málico somente podemos afirmar que a fermentação malolática não ocorreu ainda.

Dos resultados acima expostos, podemos afirmar, que muitos dos vinhos por nós analisados foram engarrafados sem terem ainda sofrido a fermentação malolática o que prova a insuficiente observação de muitos produtores ou a carença de métodos simples que lhes possibilitem evitar tais erros, com prejuízos sensíveis no produto engarrafado e com diminuição de crédito no que diz respeito a determinadas marcas de vinhos, perante os consumidores de tal bebida.

Para confirmar ainda nossos resultados, resolvemos fazer a determinação da presença de ácido málico e láctico em mostos a fim de verificarmos se alguns deles aparecia ácido láctico no primeiro dia de fermentação. Sabíamos de antemão que tal fato não deveria existir, o que comprovamos verificando nossos resultados expressos nas tabelas n.ºs. 2 e 3. Observando estes resultados vemos que tanto no caso de mostos tintos, como no caso de mostos brancos tivemos uma presença de 100% para o ácido málico e uma ausência total de ácido láctico.

KUNKEE (5) nos diz ainda que como produto final da fermentação malolática nós temos o ácido láctico, que pode provir tanto do ácido málico, como do açúcar por uma fermentação láctica, bem como também do ácido cítrico.

Além do ácido láctico temos a formação da acetona e seus compostos, todos em pequenas quantidades, sendo porém grandes os seus efeitos organolépticos, como por exemplo o efeito benéfico no aroma exercido por pequenas quantidades de diacetil.

SANNINO (14) acredita que uma acidez total elevada e uma graduação alcoólica alta, são condições favoráveis que impedem a formação do ácido láctico derivado do ácido málico.

Na literatura compulsada não encontramos dados de comparação no que diz respeito aos nossos resultados, uma vez que os trabalhos encontrados tecem comentários da excelência ou não dos métodos empregados para a pesquisa dos ácidos orgânicos (e entre eles o málico e o láctico) como PEYNAUD TE ALII (8) que comparam o método químico, cromatográfico, enzimático, monométrico, e o método que utiliza *Schzosaccharomyces pombe*, e concluem que os melhores são o cromatográfico e o enzimático porque duram menos tempo e possibilitam um maior número de análises.

De um modo geral todos os autores consultados expressam-se quanto a excelência dos métodos utilizados.

O que podemos dizer é que a fermentação malolática pode ser desejada em vinhos de alta acidez cuja diminuição no teor ácido em pouco altera os caracteres organolépticos, mas nunca em vinhos de média e baixa acidez, como é o caso dos vinhos de média e baixa acidez, como é o caso dos vinhos do Rio Grande do Sul conforme afirma SCHWITZ (15), porque então as alterações seriam bem mais profundas principalmente se ocorrem quando os vinhos já estão engarrafados.

## V — CONCLUSÕES

1 — Que o método descrito é eficiente, simples, rápido e econômico, sendo pois de grande utilidade, não só para a pequena como também para a grande indústria vinícola.

2 — Que é um método que possibilita o maior número de análises ao mesmo tempo.

3 — Que nos vinhos tintos 50% das amostras nos indicaram estarmos em presença de fermentação malolática.

4 — Que para os vinhos brancos em 8,3% dos casos estudados estamos em presença desta fermentação.

5 — Que em vinhos rosados além de alguns casos estarmos em presença da fermentação malolática, houve uma amostra de exceção em que esta fermentação ainda não tinha ocorrido.

6 — Que os mostos como era de esperar (caso não houvesse outra fonte interferindo) não encontramos nem sequer traços de ácido láctico e sim somente ácido málico.

## VI — RESUMO

O autor ensaia um método fácil e econômico para descobrir a fermentação malolática, destinado principalmente aos produtores de vinhos com limitados recursos para pesquisa. O método descrito revela somente a presença qualitativa do ácido málico, sendo uma combinação de vários métodos simplificados que utilizam o método cromatográfico. A cromatografia é ascendente e o solvente utilizado contém ácido fórmico, butanol, água e bromocresol verde.

## VII — SUMMARY

The author experiments an easy and economic method to find out the malolactic fermentation, aimed mainly to the wine-producers. The method described shows the qualitative presence of malic acid only, being a combination of several simplified methods that use the chromatographic method. He uses the ascendent chromatography and the solvent used contains formic acid, butanol, water and bromocresol green.

## VIII — BIBLIOGRAFIA

- 1 — BETHENCOURT, CLARA DIEZ DE — Improvement of analytical method for malic and in must and wine, *Rev. Agroquim. Technol. Alimentos*, Madrid, 4 (1): 123-128, 1964.
- 2 — BRUNELLE, RICHARD L. ET ALII — Quantitative determination of fixed acids in wines by gas-liquid chromatographic separation of trimethyl silylated derivatives. *Journal of the A.O.A.C.* 50 (2): 330-333, 1967.
- 3 — CHAUVET, ET ALII — Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendage. *Ann. Technol. Agric.*, Paris 12 (4): 237-246, 1963.
- 4 — KAIN, WALTER ET ALII — Rapid Determination of lactic acid in commercial wines. *Mitt Klosterneuburg Ser A. Rebe Wein. Obstgarten*, Viena, 14 (2): 83-87, 1964.
- 5 — KUNKEE, RALPHE E. — Malo-lactic fermentation *Advances in Applied microbiology*, New Jersey, 9: 235-279, 1967.

- 6 — MASLOWSKI, BOHDAN — Versene method for the indirect estimation of lactic acid during hydrolysis and fermentation. *Przenyls FERMENT*, 6 (12): 292-294, 1963.
- 7 — MUENZ, TH. — Microscopic determination of D-Tartaric acid and L-malic acid in wine and must. *Mitt Klosterneuburg Ser A. Viena* 13 (5): 236-238, 1963.
- 8 — PEYNAUD, E. ET ALII — Comparison of some methods of quantitative determination of L-malic acid. *Ann Technol Agr. Paris* 14 (1): 66-61, 1965.
- 9 — PIFFERI, PIERGORGIO — Silica gel Thin-layer chromatography of keto acids and aliphatic dicarboxylic acids. *BOLL LAB. Chim. Provinciale, Bologna*, 17 (3): 445-453, 1966.
- 10 — PROCOPIO, MARIO, ET ALII — Indirect determination of lactic acid in wines. *Vini Ital. Roma* 4 (18): 191-192, 1962.
- 11 — RADLER, FERDINAND — Microbiological principles of acid degradation in wine. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk, Abt. II, Gottingen.*, 120 (3) 237-287, 1966.
- 12 — RAMUNNI, A — Organic acids of grapes and wines of the Campania. *Ann Fac. Sci. Agrar. Univ. Studi Napoli Portici, Napoles* 30: 333-347, 1965.
- 13 — REBELEIN, H. — Colorimetric determination of malic acid in combination with the simultaneous determination of tartaric and lactic acids in cider and wine. *Deut Lebensm, Rundschau*, 60 (5): 140-144, 1964.
- 14 — SANNINO, F.A. — *Tratado de Enologia*, Buenos Aires, Ediciones G. Gili, S.A., 1954 p. 828-830.
- 15 — SCHMITZ, CYRO MELO — Contribuição para o estudo dos vinhos Sul-Riograndenses (Tese). Faculdade de Farmácia e Bioquímica UFSM. Santa Maria, 85 páginas.