



# Avaliar a estabilidade proteica nas condições enológicas reais

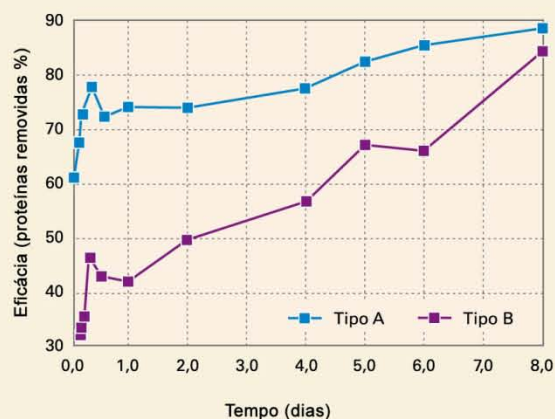
“APESAR DA SUA VALIDADE PRÁTICA, TODOS OS TESTES DISPONÍVEIS PARA A AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PROTEICA, SÃO REALIZADOS EM CONDIÇÕES ARTIFICIAIS: PROBLEMA ELIMINADO COM ESTE NOVO TESTE”

Roberto Ferrarini\*, Massimo Valbusa\*\*, Enrico D'Andrea\*\*\*

Na determinação da dose ótima de bentonite a adicionar ao vinho, para torná-lo estável do ponto de vista proteico, intervêm diversas variáveis; é natural que uma delas seja o perfil proteico do vinho, mas, também, algum aspeto tecnológico, como a natureza da bentonite utilizada, o tempo de hidratação e o tempo de contacto. Os testes prévios laboratoriais são importantes, para assegurar a eficácia do tratamento de desproteínização. A ação da bentonite é



### ■ Poder desproteinizante das bentonites



Graf. 1 - Variação no tempo do poder desproteinizante de algumas bentonites

bem conhecida, e é identificada como sendo um material que retira ao vinho alguma qualidade organolética, por isso, é de absoluta importância, a pesquisa de testes fiáveis, que não sobrestimem a quantidade necessária para chegar à estabilidade proteica. É importante lembrar, que no mercado existem bentonites de qualidade muito diferente. As principais diferenças, são atribuídas aos catiões que saturam as cargas negativas (cálcio, potássio, sódio, metais pesados...) e os parâmetros tecnológicos, como o poder de desproteinação e o índice de rehidratação.

Para melhor esclarecer os elementos colaterais ao sucesso do teste, temos que recordar um aspeto, ao qual não é dada muita importância; o poder desproteinizante de uma bentonite, aumenta, no tempo, durante a sua hidratação em água (Graf. 1). Prestar atenção aos testes laboratoriais.



### ■ Avaliação da estabilidade proteica com turbidímetro



Fig. 1 – Esquema de trabalho para o teste de estabilidade proteica com turbidímetro

Se usarmos uma bentonite que, por casualidade, permaneceu na proveta 10-15 dias, irá obter-se um material com poder desproteinizante muito elevado, seguramente diferente daquele que o produto terá no momento da utilização na adega. Desta forma o teste de laboratório irá indicar uma dose de bentonite mais baixa, daquela que na realidade é necessária. Isto é o erro mais comum praticado nas adegas; o tratamento sobre o vinho não será seguramente suficiente e terá de ser repetido.

### Os procedimentos

Todos os testes de utilização comum, são considerados orientativos, porque causam de forma indiscriminada uma alteração da componente coloidal, que tem como efeito o aparecimento de uma turvação. A avaliação é normalmente do tipo comparativo em relação a uma amostra de vinho não tratado. Se não houver uma turvação apreciável à vista, pode concluir-se que o vinho sujeito à análise encontra-se estável do ponto de vista proteico. Com a utilização de um instrumento para a medição da turbidez, introduz-se um elemento inequívoco na determinação (Fig.1). Quando se dispõe no laboratório de um turbidímetro, é sempre aconselhável a sua utilização, quer para avaliar de forma objetiva a turbidez expressa em NTU, tornando assim o teste repetível, quer para desvincular a necessidade de preparar uma amostra de vinho tal qual, para fazer um teste de comparação. Através destes métodos, existe também a possibilidade de conhecer a quantidade de bentonite necessária para a estabilização do vinho. Para esse efeito preparam-se amostras de vinhos tratados com doses crescentes de bentonite (10-20-30g/hl); uma vez clarificado

■ Sensibilidade dos métodos				
Doses de bentonite gr/hL	Teste a quente	Teste do ácido tricloroacético	Bentotest®	Teste do sulfato de amónio
6	+	+++	++	+
12	=	+	+	=
18	-	=	+	-
24	-	-	=	-

Tab.1 – Avaliação da dose de bentonite necessária: sensibilidade dos diferentes métodos em comparação.  
Fonte: Toland et al., 1996.

## Estágio sobre borra fina e teste de estabilidade proteica

O estágio sobre borra fina tende em enriquecer os vinhos em componentes coloidais que respondem positivamente aos testes de estabilidade proteica, mas que na realidade não têm qualquer risco de precipitação.

Entre outros, alguns polissacarídeos como:

- Manoproteínas (MPs)
- Arabinogalactana-proteínas (AGPs)
- Ramno-galacturonanos (RG II)
- Arabinanos

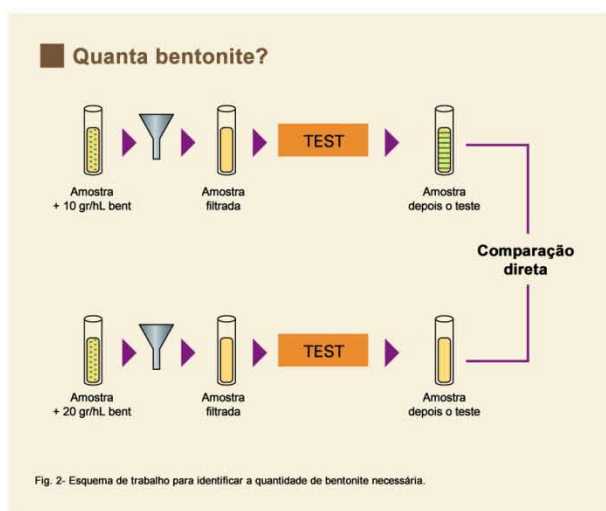


Fig. 2- Esquema de trabalho para identificar a quantidade de bentonite necessária.

(através de centrifugação ou filtração), estas amostras podem ser submetidas aos testes. A primeira amostra é aquela que corresponde à dosagem necessária de bentonite (Fig. 2).

### A comparação de diferentes testes.

Já no passado foram publicados dados de comparação entre diferentes testes de avaliação da estabilidade proteica nos vinhos. Comparando o teste a quente (sem tanino), o Teste do ácido tricloroacético (TCA), o Bentotest® e o Teste com sulfato de amónio, ficou evidenciado como o Bentotest® é o teste mais severo, manifestando uma turbidez perceptível com baixo conteúdo de proteínas residuais depois da clarificação (elevadas dosagens de bentonite tab. 1).

Estas características do Bentotest® podem ser consideradas positivas, pela segurança dos resultados e, aplicáveis, com certeza, sobre vinhos simples e pouco complexos. No caso

Adição do reativo na amostra.



■ Bentotest® e Teste do Tanino a quente		
Amostra	Bentotest®	Teste do Tanino a quente
Tal qual	270	17
+ 25 g/hL di Plusgran® V	111	14
+ 50 g/hL di Plusgran® V	33	7
+ 100 g/hL di Plusgran® V	9	5
+ 200 g/hL di Plusgran® V	1	1
+ 250 g/hL di Plusgran® V	1	1

Tab.2 – Comparação sobre vinho branco entre Bentotest® e Tanino a quente (valores em ΔNTU).

de vinhos mais importantes, as indicações fornecidas através do Bentotest® são geralmente muito rigorosas, com necessidades de bentonite muito elevadas. De facto o desenvolvimento das técnicas de vinificação que preveem estágio sobre borras finas, tendem enriquecer os vinhos em componentes coloidais, que respondem de maneira positiva aos testes de estabilidade proteica. Estas macromoléculas são polissacarídeos e manoproteínas, que não representam risco de precipitações como as proteínas instáveis do vinho, antes, pelo contrário, têm um papel de colóide protetor. Os resultados do Bentotest® representam um instrumento relevante para o enólogo; trata-se de um teste prático e muito rápido, que permite uma avaliação da estabilidade proteica. É importante interpretar o valor obtido também com base no conhecimento do próprio vinho, não como valor absoluto, mas sempre como um valor orientativo. Os resultados que se obtêm com

## Execução do Proteotest

### A) Preparação do reativo

- Rehidratar uma proveta de reativo com 10 ml de solução tampão;
- Agitar até completa dissolução;
- Filtrar o reativo pouco antes da sua utilização.

A solução é suficiente para 8 determinações

### B) Método:

- Filtrar e/ou centrifugar 50 ml de vinho;
- Acrescentar 1,25 ml de reativo;
- Agitar.

Se passados 3 minutos é perceptível uma turbidez, a amostra tem que ser considerada instável.

No caso de utilizar um turbidímetro, o vinho é considerado instável a nível proteico, quando a diferença da turbidez for >15 NTU.

Bentotest®, têm que ser considerados extremamente válidos para vinhos simples e de fraca estrutura. Mas se compararmos com o Teste de Tanino a quente, o Bentotest® revela o seu limite, como demonstrado na tabela 2. Neste caso a comparação foi feita para identificar o tratamento com bentonite mais idóneo para um vinho branco complexo.

Os dois testes em comparação fornecem ao enólogo diferentes dados; o Bentotest® requer uma dose de Plusgran®V (bentonite sódica natural, Enologica Vason) de 100g/hl, para o teste tanino a quente 50g/hl são suficientes.

## Refletir a real evolução do vinho

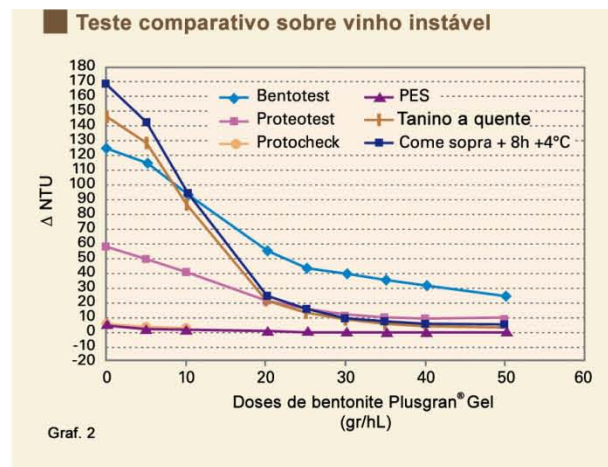
Na realidade todos os métodos para a avaliação da estabilidade proteica, operam um artefato; o teste do tanino a quente opera a 70°C e o Bentotest® altera a acidez e pH da amostra, realizando assim uma alteração arbitrária da estrutura das substâncias proteicas e coloidais (graf.2 e tab.3). Alguns testes apareceram recentemente no mercado e preveem a avaliação das proteínas introduzindo uma forte carga eletronegativa, um processo ao qual o vinho nunca é submetido durante a sua evolução, aliás, o processo é

precisamente inverso ao longo do afinamento.

É importante fazer algumas reflexões: o vinho depois da execução do teste, durante a sua conservação, irá ser submetido a uma repentina alteração da sua acidez? Do seu pH? Chegará a temperaturas de 70°C? Aumentarão as cargas elétricas negativas?

Na realidade, as proteínas são instáveis no vinho, apenas por causa da interação com os taninos, que as rendem hidrófobas, tal como acontece com o calor, provocando a desnaturação da estrutura proteica.

O teste a quente, com tanino, é o mais fiável. No entanto trata-se de um método longo e trabalhoso.



## PROTEOTEST

### O teste nas condições enológicas reais

O Proteotest baseia-se nas considerações acima mencionadas e é executado com taninos extremamente reativos com as proteínas, cuidadosamente controlados na sua composição pelo traçado HPLC e com outros métodos específicos do CQ do Vason Group. Operando sobre o princípio de interação tanino-proteína, não introduz artefatos, é o teste que simula de forma mais real o mecanismo da instabilidade proteica.

## Comparação dos varios testes em diferentes vinhos

	Bianco Igt Lazio	Bianco Campania	Bianco Toscana	Bianco Austria	Rosé Base Spumante Austria	Bianco Veneto	Presecco Base Spumante Veneto	Müller Thurgau Trentino	Nosiola Trentino	Traminer Trentino	Sangiovese Emilia	Amarone Verona
Bentotest	1	66	20	1	42	55	30	1	6	8	0	0
Proteotest	1	62	16	2	49	27	29	6	12	11	0	0
Tanino a quente	1	53	15	4	87	28	37	2	6	8	0	0
Protocheck	0	12	1	0	2	1	1	0	1	1	1	1

O teste é feito à temperatura ambiente e num minuto é possível obterem-se resultados, avaliando a turbidez: se o aumento for <15 NTU, o vinho analisado pode ser considerado estável. É claro que a utilização de um turbidímetro permite uma avaliação objetiva e reproduzível, é, por isso, sempre aconselhável utilizá-lo. O valor de 15 NTU foi escolhido, para permitir a utilização do teste sem instrumentação específica e avaliar a olho nu o aparecimento de turvação ou não. Através da reação tanino-proteína à temperatura ambiente, obtém-se um teste com condições muito próximas daquelas que na realidade o vinho está sujeito. Por este motivo o Proteotest foi apresentado como teste *nas condições enológicas reais*.

### A especificidade da reação

A força do procedimento selecionado para o Proteotest, é a introdução na amostra, de um elemento (tanino) já naturalmente presente na composição original do vinho. A composição deste tanino é estandardizada e foi escolhida pela sua extrema reatividade com as proteínas instáveis presentes no vinho, por isso age em tempos muito rápidos mesmo em pequenas dosagens.



## Proteotest premiado na feira de Estugarda

O Proteotest recebeu o prémio pela inovação na feira Intervitis-Interfructa de Estugarda (Abril 2007)



■ Comparação entre as respostas dos vários métodos de avaliação de estabilidade proteica

Amostra	Tipo	Bentotest	Proteotest	Teste Tanino a quente	Comentários
169A	Tinto	13	22	30	Instável - Teste concordantes
169B	Rosado	1	6	6	Estável - Teste concordantes
162	Branco	0.28	10	0.75	Estável - Teste concordantes
V1	Tinto	33	32	27	Instável - Teste concordantes
145A	Tinto	43	38	58	Instável - Teste concordantes
145B	Tinto	38	38	103	Instável - Teste concordantes
BTB	Branco	0.17	2	4	Estável - Teste concordantes
150	Tinto	60	3	3	Falso positivo Bentotest - Resultado Proteotest como Tanino a quente
147	Branco	0.89	7	4	Estável - Teste concordantes
T5LB	Branco	16	4	9	Falso positivo Bentotest - Resultado Proteotest como Tanino a quente
B3LB	Branco	4	2	6	Estável - Teste concordantes
R	Tinto	1	0.87	0.50	Estável - Teste concordantes
RS	Rosado	0.20	8	5	Estável - Teste concordantes
163	Tinto	5	0.28	0.65	Estável - Teste concordantes
183	Tinto	42	2	1	Falso positivo Bentotest - Resultado Proteotest como Tanino a quente
138B	Tinto	13	18	72	Instável - Teste concordantes
138C	Tinto	1	5	3	Estável - Teste concordantes
146B	Tinto	48	1	2	Falso positivo Bentotest - Resultado Proteotest como Tanino a quente
146C	Tinto	22	2	2	Falso positivo Bentotest - Resultado Proteotest como Tanino a quente
BF	Branco	1	10	5	Estável - Teste concordantes
150	Tinto	68	5	0.57	Falso positivo Bentotest - Resultado Proteotest como Tanino a quente
151	Branco	221	81	169	Instável - Teste concordantes
TD5LB	Branco	43	12	9	Falso positivo Bentotest - Resultado Proteotest como Tanino a quente

Notas: Quando o Bentotest® dá como indicação uma falsa instabilidade, o Proteotest confirma a resposta do Teste do Tanino a quente.

Tab. 4

O tanino adicionado, não age sobre as proteínas por causa da sua carga eletronegativa, que é fraca. Os mecanismos que se desencadeiam são de absorção superficial e de formação de ligações de hidrogénio, com uma baixa ação sobre a carga elétrica.

O primeiro passo é a desidratação da mistura coloidal proteica, que ficará hidrofóbica, capaz de flocular sob ação dos catiões. Daqui resulta a turvação da solução e eventualmente, num segundo tempo a precipitação.

O mecanismo é bastante específico e é idêntico ao que acontecerá no vinho com o envelhecimento; o Proteotest não faz mais do que acelerar essas reações, usando um procedimento com condições reais de pH e temperatura do vinho.

O único fator que se impõe ao vinho, é o aumento da concentração das moléculas reativas com as proteínas (tanino).



Com o Proteotest, é também possível a avaliação das amostras a olho nu.

### Excelentes performances

O Proteotest pode também ser considerado como um ótimo aperfeiçoamento do muito difundido, Teste do Tanino a quente, mas melhorado em:

- Simplicidade do método;
- Velocidade de execução;
- Estandarização do tipo de tanino.

Comparado com o teste Bentotest® e com o Teste de tanino a quente o Proteotest mostrou uma resposta muito próxima do Teste de Tanino a quente, e identificou os falsos positivos do Bentotest®.

Os dados comprovados estão descritos na tabela 4, onde estão reportadas algumas provas de comparação das respostas dos métodos de avaliação da estabilidade proteica.

\*Departamento de Ciência, Tecnologias da videira e do vinho  
Universidade de Verona – Italy

\*\* Depº de Investigação e Desenvolvimento Enologica Vason  
Pedemonte – VR- Italy

\*\*\*Responsável comunicação técnico-científica Enologica Vason  
Pedemonte – VR- Italy