



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
Departamento de Fitotecnia

CADERNOS DE ENOLOGIA

A FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA

Maria João Cabrita

Universidade de Évora, 2024

ÍNDICE

Introdução.....	1
As bactéria lácticas	1
O metabolismo das bactérias lácticas.....	1
1 - O metabolismo dos ácidos orgânicos.....	2
2 – O metabolismo dos açucares.....	3
3 – Outras transformações.....	5
O efeito da FML nas características dos vinhos.....	6
Os fatores que afetam a FML.....	8
Inoculação de BL	11
O controlo da FML.....	12
Outras considerações sobre a FML	14
Bibliografia.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – a equação da FML	1
Figura 2 – o metabolismo do ácido cítrico pelas BL	2
Figura 3 – o metabolismo homofermentativo da glucose pelas BL.....	3
Figura 4 – o metabolismo heterofermentativo da glucose pelas BL	4
Figura 5– o metabolismo do glicerol pelas BL	5
Figura 6 – esquema de uma cromatografia em papel	13
Figura 7 - Micro Miura	14

Introdução

A fermentação malolática é na realidade não uma fermentação na verdadeira acepção da palavra, mas uma descarboxilação enzimática do ácido dicarboxílico L-málico no ácido carboxílico L-lático, realizada por bactérias lácticas (BL) (figura 1). É usual fazer-se em vinhos tintos mas muito opcional em vinhos brancos.



Figura 1 – a equação da FML

As bactérias lácticas

São bactérias Gram-positivo e micro-aerófilas pertencentes aos géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Já foram identificadas várias espécies: *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*.....; *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*..... e *Oenococcus oeni*. Serem Gram-positivo é o que as distingue de bactérias acéticas e o que permite a utilização da lisozima para a sua inativação quando, por exemplo, não se pretende realizar a FML. As bactérias lácticas responsáveis pela FML são pertencentes ao género *Oenococcus* e *Lactobacilos*. A *Oenococcus oeni* é considerada a BL melhor adaptada às condições existentes no vinho, ou seja, alto teor alcoólico, baixo pH e presença de SO₂. As BL do género *Pediococcus* são consideradas bactérias de contaminação.

O metabolismo das bactérias lácticas

Quando se pretende fazer uma FML a um vinho, a transformação que mais interessa é de facto a transformação do ácido málico em ácido láctico. Mas as BL, durante o seu processo de multiplicação e crescimento, usam como fonte de energia, não só o ácido málico mas outros ácidos orgânicos, açúcares ou ainda outros constituintes dos vinhos.

1 – o metabolismo dos ácidos orgânicos

A via mais usada pelas BL para a degradação do ácido málico, é a sua transformação em ácido láctico e CO_2 com a intervenção de uma enzima (enzima malolática) e tendo como co-factores o NAD^+ e o Mn^{2+} .

O ácido cítrico é um dos ácidos orgânicos existentes nos vinhos que as BL podem degradar. Numa série de reações com intervenção de um grande conjunto de enzimas, as BL degradam o ácido cítrico em ácido acético e ácido oxaloacético, e este último é descarboxilado a ácido pirúvico. O ácido pirúvico vai dar origem ao ácido α -acetolático, que é muito instável, e por isso rapidamente é descarboxilado em acetoína que por sua vez é reduzida a 2,3 butanediol. A acetoína também pode provir do diacetilo que por sua vez vêm da descarboxilação oxidativa do ácido α -acetolático. Esta degradação do ácido cítrico pelas BL (figura 2) vai originar vários compostos com impacto na composição do vinho após a FML e com impacto nas características sensoriais: o ácido acético, o diacetilo e a acetoína são os mais importantes, embora o diacetilo seja sensorialmente o que mais impacta os vinhos.

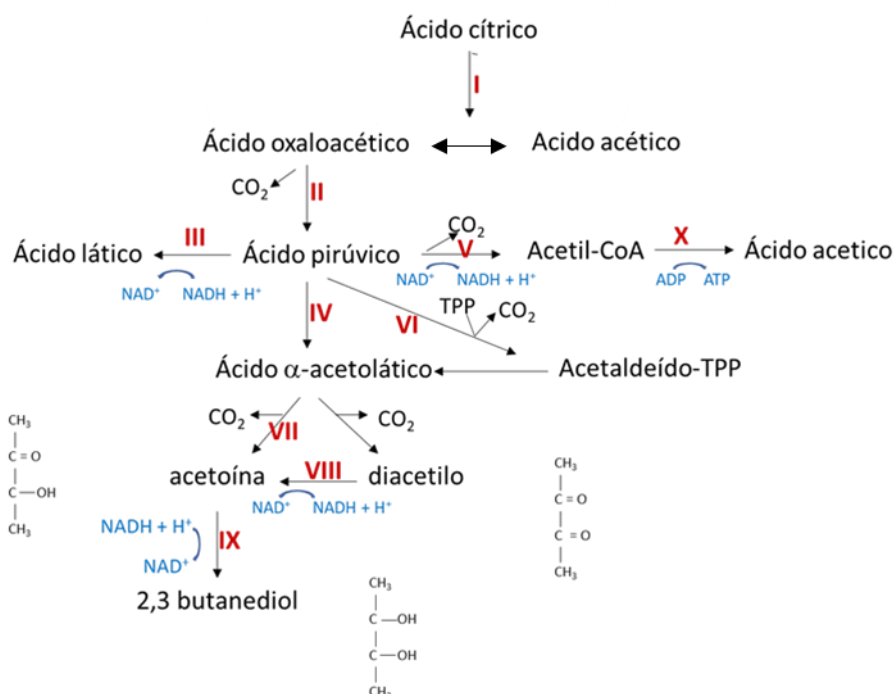


Figura 2 – o metabolismo do ácido cítrico pelas BL

I – citrato liase; II – oxaloacetato descarboxilase; III – lactato desidrogenase; IV – α -acetolactato sintase; V – piruvato desidrogenase; VI – piruvato descarboxilase; VII α -acetolactato descarboxilase; VIII – diacetil redutase; IX – acetoína redutase; X – acetato kinase; TPP – tiamina-pirofosfato

O metabolismo do ácido cítrico é mais lento que o metabolismo do ácido málico, razão pela qual o ácido cítrico é metabolizado mais para o final da FML.

Convém ainda referir que algumas estirpes de *Lactobacilos plantarum* não possuem citrato liase, razão pela qual numa FML realizada por estas BL a acidez volátil não sobe no final da FML pela degradação do ácido cítrico.

2 – o metabolismo dos açúcares

As BL podem metabolizar a glucose através de duas vias metabólicas diferentes, mas para as pentoses existe apenas uma via metabólica. O metabolismo das pentoses é mais simples e os produtos resultantes do metabolismo das pentoses são o ácido láctico, o ácido acético e o CO₂. Este metabolismo das pentoses com formação de ácido acético é a razão pela qual a acidez volátil de um vinho sobe sempre com a FML (0.1 a 0.2 g/L).

Em relação ao metabolismo das hexoses, ele pode acontecer pela via da glicólise ou pela via das pentoses fosfato, o que nos permite distinguir as BL em homofermentativas ou heterofermentativas.

- BL homofermentativas – transformam o ácido láctico em ácido pirúvico pela via da glicólise e depois o ácido pirúvico é reduzido a ácido láctico. Uma mole de glucose origina duas moles de ácido láctico. As BL do género *pediococcus* usam esta via. Esta via homofermentativa encontra-se esquematizada na figura 3.

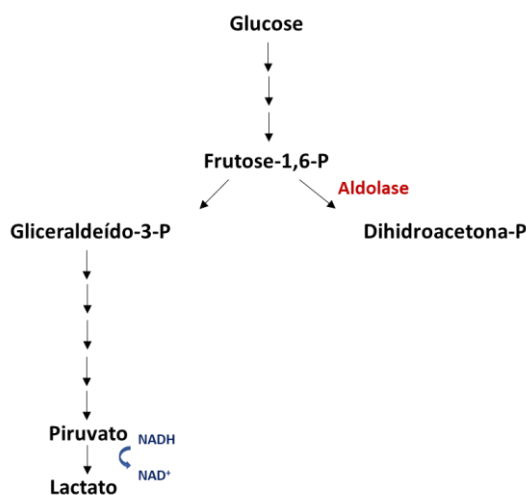


Figura 3 – o metabolismo homofermentativo da glucose pelas BL

- BL heterofermentativas – transformam a glucose em ácido láctico e CO₂, originando ainda etanol e ácido acético. As BL do género *Leuconostoc*, algumas

espécies de lactobacilos e a *O.oeni* utilizam esta via, e são consideradas heterofermentativas obrigatórias. Algumas espécies de lactobacilos, *L. plantarum* e *L. casei* são heterofermentativas facultativas. Esta via heterofermentativa encontra-se esquematizada na figura 4.

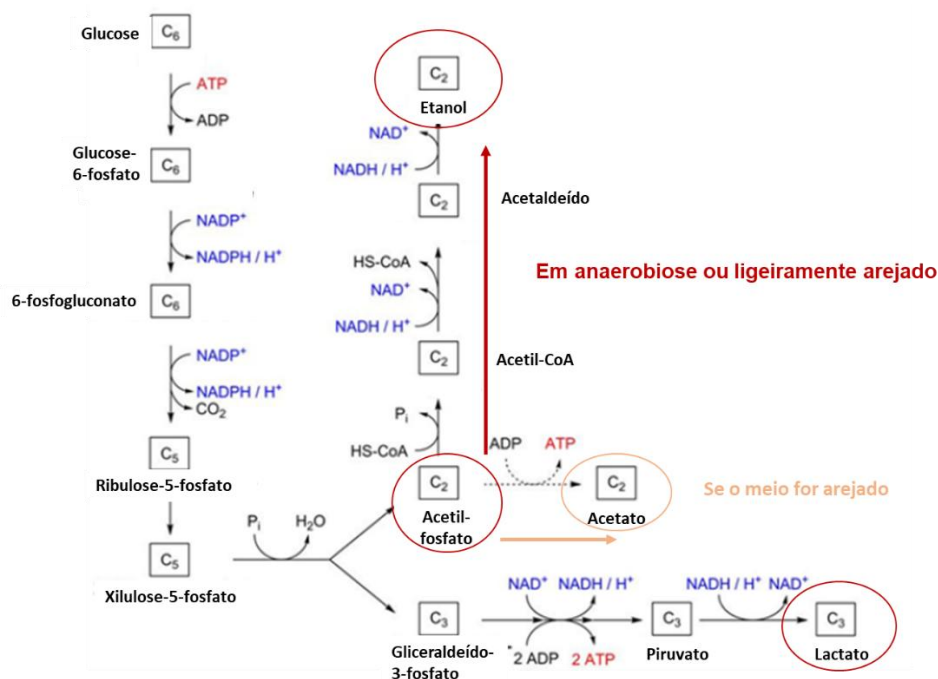


Figura 4 – o metabolismo heterofermentativo da glucose pelas BL

A partir do acetil-fosfato duas vias podem ser seguidas, dependendo das condições do meio. O aceti-fosfato pode ser reduzida a etanol e a etanol ou ser reduzida a acetato. As BL *Leuconostoc* dão origem a lactato e etanol se o meio for ligeiramente arejado e dão origem a acetato e lactato se o meio for mais arejado. Assim, se o meio for mais anaerobiotico a glucose dá preferencialmente lactato e etanol, em presença de oxigénio resulta um aumento de acetato, e consequentemente, um aumento da acidez volátil. Ainda relativamente ao metabolismo dos açúcares, as BL podem degradar pentoses, resultando desta degradação ácido láctico e ácido acético. O ácido acético formado por esta via é o principal responsável pelo normal aumento de acidez volátil, (0.1 a 0.2 g/L) que sempre se observa numa FML. Esta via metabólica implica a transformação das pentoses (ribose, xilose, arabinose) em xilulose-5-P que depois (tal como se vê na figura 4) é transformada em lactato e acetato. Esta via metabólica existe independentemente de as BL serem homo ou heterofermentativas.

3 – Outras transformações

- A degradação do glicerol

O glicerol é um constituinte importante dos vinhos, que existe em concentrações de cerca de 5 a 8 g/L e que contribui para o sabor dos vinhos. O glicerol é formado pelas leveduras no início da FA. A sua degradação é prejudicial à qualidade dos vinhos quer pela diminuição da sua concentração quer pelos produtos formados, e as suas consequências em termos sensoriais. As BL usam o glicerol para dar origem a um precursor da acroleína (3-HPA) que depois se forma durante o envelhecimento. Esta via acontece quando as BL trabalham em meios mais redutores. A combinação da acroleína com os compostos fenólicos confere aos vinhos um sabor amargo.

A degradação do glicerol pode também dar origem a ácido láctico com aumento da acidez total, e esta é uma via de oxidação. O metabolismo do glicerol pelas BL encontra-se esquematizado na figura 5.

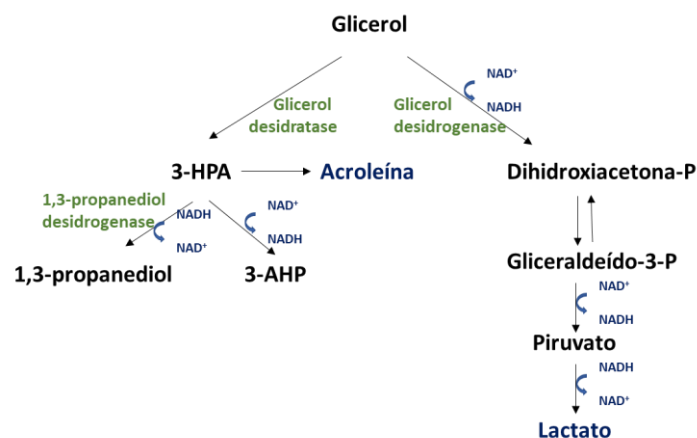


Figura 5— o metabolismo do glicerol pelas BL

- A formação de aminas biogénicas

As aminas biogénicas são produto da descarboxilação enzimática dos correspondentes aminoácidos. Os vinhos no final da FML têm um teor em aminas biogénicas superior. A histidina dá origem à histamina, a tirosina dá origem à tiramina. A arginina, um dos aminoácidos quantitativamente mais representativos, é rapidamente consumida no início da FA e depois libertada durante a autólise das leveduras. A arginina dá origem à citrulina que é precursor do carbamato de etilo. Este especto não é preocupante, mas convém não deixar as bactérias actuarem após a FML estar concluída.

Em resumo:

A evolução das BL no vinho durante o decurso da FML é caracterizada por 3 fases bem diferenciadas metabolicamente:

- Crescimento celular – esta fase é caracterizada pelo crescimento celular e as BL obtêm energia a partir dos açúcares. Nesta fase não há catabolismo nem do ácido málico nem do ácido cítrico.
- Fase estacionária I – nesta fase não há utilização do açúcar por parte das BL e o ácido málico transforma-se em ácido láctico. Não há degradação de ácido cítrico, nem produção de ácido acético.
- Fase estacionária II - não existe degradação de açúcar, nem há catabolismo do ácido málico, mas as BL aproveitam o ácido cítrico, produzindo ácido acético e diacetilo em excesso. Esta é a fase em que importa dar a FML por terminada, quer através da adição de SO₂ ou eventualmente de lisozima.

O efeito da FML nas características dos vinhos

Efeito na acidez total: um dos efeitos importantes da FML nas características do vinho é uma diminuição da acidez total causada pelo desaparecimento (quase) total do ácido málico e pelo aparecimento do ácido láctico. Esta desacidificação biológica resulta desta transformação de um ácido dicarboxílico num ácido monocarboxílico. Sensorialmente os vinhos resultantes ficam mais macios e com menor sensação de adstringência. Outro fenómeno que contribui para a desacidificação tem a ver com o equilíbrio em que o ácido málico e os seus sais se encontram no vinho. A FML diminui o teor em ácido málico livre e isto leva a que o ácido málico salificado se liberte dos catiões aos quais estava ligado. Estes catiões ligam-se ao ácido tartárico precipitando-o sob a forma de bitartarato de K ou tartarato de Ca. A presença de ácido málico no vinho aumenta a solubilidade do bitartarato de K. Ao diminuir o ácido málico, aumenta a insolubilização do bitartarato e assim diminui a acidez do vinho.

Efeito na acidez volátil: como consequência da FML há sempre um aumento ligeiro da acidez volátil, 0,1 a 0,2 g/L. Fundamentalmente o ácido acético provém do metabolismo dos açúcares (pentoses principalmente) e do metabolismo do ácido cítrico na parte final

da FML. Este efeito pode ser preocupante se a acidez volátil subir mais do que o normal, mas não sendo esse o caso, é um efeito normal.

Efeito na cor dos vinhos: a desacidificação provocada pela FML implica uma alteração no pH e consequentemente uma alteração no equilíbrio das antocianinas e uma diminuição da intensidade da cor, que, porém, não tem dimensão suficiente para ser prejudicial aos vinhos. Por outro lado, as BL podem conter sistemas enzimáticos que libertem as agliconas, tornando as antocianinas mais instáveis.

Efeito no aroma:

1. **Compostos carbonilos** – o mais importante é o diacetilo que contribui para notas aromáticas amanteigadas. Como é instável é reduzido a acetoína que por sua vez pode ser reduzida a 2,3 butanediol. A concentração de diacetilo nos vinhos pode ser gerida, nomeadamente pela escolha da BL. O diacetilo liga-se ao SO₂ que genericamente se adiciona aos vinhos no final da FML, mas a reação é reversível, havendo libertação do diacetilo durante o armazenamento dos vinhos.
2. **Esteres** – são um conjunto importante de compostos associados aos aromas frutados dos vinhos. Os dois grandes grupos de ésteres provenientes da FA são os ésteres acetato (formados pela condensação de álcoois superiores com o acetil-CoA) e os ésteres etílicos dos ácidos gordos (formados por esterificação enzimática dos ácidos gordos formados durante a biossíntese lipídica). A FML está associada a um aumento de ésteres etílicos como o lactato de etilo (resultante da esterificação do etanol com o ácido láctico), acetato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo ou succinato de dietilo. A estes ésteres etílicos estão associados descritores aromáticos de frutado.
3. **Compostos voláteis glicosilados** – as uvas possuem compostos do aroma que se encontram glicosilados, maioritariamente terpenos e norisoprenoides, que não contribuem para o aroma dos vinhos, por não serem voláteis, mas que podem ser encarados como uma reserva de compostos voláteis. As BL contêm sistemas enzimáticos capazes de libertar as agliconas e transformar estes compostos em compostos voláteis que efectivamente contribuem para o aroma global dos vinhos. A transformação destes voláteis glicosilados em compostos voláteis livres, pela ação glicosidásica das BL, depende do pH e da temperatura, que

podem afetar esta actividade enzimática, e obviamente da estirpe de BL utilizada.

4. **Compostos sulfurados** – embora sobre estes compostos haja menos informação, a produção de compostos voláteis contendo enxofre é também dependente da estirpe utilizada, sabendo-se que as *O. Oeni* são mais produtoras destes compostos do que os *L. plantarum*. As BL metabolizam a metionina com formação de metanetiol e dimetil dissulfito, que contribuem positivamente para o perfil aromático e complexidade aromática dos vinhos, exceto se as suas concentrações forem demasiado elevadas e nesse caso transmitirão aos vinhos aromas que lembram cebola ou abóbora cozida.
5. **Fenóis voláteis** – algumas BL são capazes de descarboxilar os ácidos fenólicos existentes nos vinhos, nomeadamente o ácido ferúlico e o ácido *p*-coumárico nos correspondentes vinil-fenóis (4 vinil-guaiacol e 4-vinil fenol) que posteriormente podem ser enzimaticamente reduzidos aos fenóis voláteis, 4-etil guaiacol e 4-etil fenol, respetivamente, responsáveis por notas aromáticas de medicinal e suor a cavalo. Por outro lado, também se sabe que as BL conseguem hidrolisar os esteres tartáricos dos ácidos cinâmicos, ácido caftárico e fertárico, libertando os ácidos *p*-coumárico e ferúlico que são, na realidade os precursores dos fenóis voláteis, caso haja uma contaminação com leveduras *Dekkera/bretanomyces*.

Efeito na estabilidade microbiológica dos vinhos: a maior estabilidade microbiológica que se consegue com a FML é um aspeto importante a considerar quando se equaciona fazer ou não uma FML. Na realidade, o empobrecimento em nutrientes, a presença de compostos inibitórios do desenvolvimento de outros microrganismos, provenientes do metabolismo das BL, a eliminação do ácido málico, que é muito instável e o aumento do pH são as razões apontadas para esta maior estabilidade.

Os fatores que afetam a FML

Há vários fatores que afetam o crescimento e as propriedades metabólicas das BL e consequentemente o sucesso de uma FML. Os mais importantes são a temperatura, o pH, o teor em álcool e o teor em SO₂. Devemos ter atenção, que por vezes não é apenas o efeito de um fator que afeta as BL, mas o efeito sinérgico de vários fatores. E estes

fatores afetam não só o crescimento das BL como condicionam as características finais dos vinhos, por afetarem as vias metabólicas que as BL elegem para o metabolismo de alguns compostos existentes no vinho.

- O etanol – sendo o principal metabolito resultante da FA tem papel importante na capacidade das BL sobreviverem e completarem a FML. A sua capacidade de tolerar altos teores alcoólicos depende da estirpe de BL usada e da temperatura. A temperatura ótima de crescimento das BL diminui com o aumento do teor em álcool e temperaturas elevadas diminuem a resistência das BL ao álcool.
- A temperatura – a temperatura afeta a taxa de crescimento das BL bem como a duração da fase *lag* do seu desenvolvimento e o tamanho da população. As *O. Oeni* têm temperaturas ótimas de crescimento entre os 27 e os 30°C, mas por causa do efeito do álcool, as temperaturas ótimas de crescimento no vinho são à volta dos 20°C. Temperaturas baixas atrasam o início da FML e aumentam o tempo de duração. A temperatura ideal para uma FML será entre os 18 e os 22°C.
- SO₂ – O SO₂, sobretudo na forma molecular inibe o crescimento das BL. Os níveis de SO₂ para parar a atividade bacteriana oscilam entre: 0,5 a 0,8 mg/L de SO₂ molecular (10 a 20 mg/L de SO₂ livre) a pH baixo (3,2 a 3,4); 0,8 a 1,6 mg/L de SO₂ molecular (20 a 40 mg/L de SO₂ livre) a pH alto (3,5 a 3,6). Por este motivo quer as adições de SO₂ que se efetuam antes da FA quer a estirpe de levedura que se escolhe para a FA (e porque todas elas originam SO₂ em maior ou menor quantidade) têm influência na FML.
- pH – o pH tem um papel importantíssimo no desenrolar da FML. Comparativamente, vinhos com pH>3,3 são menos problemáticos na FM do que vinhos com pH mais baixos. A pH de 3.5 ou menor as *O. oeni* têm o seu crescimento favorecido, mas se o pH for mais elevado são lactobacilos como por exemplo *L.plantarum* ou *Pediococcus parvulus* que estão mais bem adaptados. O pH inferior a 3,2 inibe o desenvolvimento das *O. oeni*.

Para além destes fatores que podem afetar o desenrolar da FML também os ácidos gordos de cadeia média existentes nos vinhos podem ter um efeito inibitório no crescimento das BL, na sua capacidade para metabolizar o ácido málico e assim prolongar a duração da FML. Estes ácidos gordos de cadeia média (ácidos hexanóico,

octanóico, decanóico e dodecanóico) são produtos da FA e a sua ação inibitória é maior a pH mais baixo. Outro aspeto importante são as necessidades nutricionais das BL. Elas necessitam de aminoácidos, sendo essenciais o ácido glutâmico, a arginina, a valina, leucina, isoleucina e ainda cisteína e tirosina. Quanto aos compostos fenólicos, não se sabe ainda muito, mas uns terão efeito positivo, antocianinas, e outros parecem ter um efeito mais negativo (ácidos fenólicos) no desenvolvimento da FML. Algumas práticas tecnológicas também podem influenciar o crescimento das BL. O grau de clarificação de um mosto tem grande impacto no crescimento das BL porque as leveduras produzem mais ácidos gordos de cadeia média se o mosto for muito clarificado, e o envelhecimento sobre as borras, visto que na autólise das leveduras há libertação de compostos importantes enquanto nutrientes para as BL, são dois exemplos.

Mas é ainda importante considerar a interação entre os microrganismos, responsáveis pela FA e pela FML. Os nutrientes que as leveduras usam e que libertam para o meio, afetam a pool de nutrientes disponíveis para as BL. No início de uma FA as *O. Oeni* são inibidas pelas leveduras *S. cerevisiae* porque estas rapidamente utilizam no seu processo de multiplicação e crescimento os nutrientes disponíveis, esteróis, vitaminas, aminoácidos, o que resulta num empobrecimento do meio em fatores nutritivos, o que faz com que as BL não se consigam desenvolver, enquanto as leveduras realizam a FA. Com a autólise das leveduras, libertam-se nutrientes essenciais ao desenvolvimento das BL, tais como aminoácidos e manoproteínas. Estas últimas têm um papel importante porque adsorvem os ácidos gordos de cadeia média, inibitórios do desenvolvimento das BL. As manoproteínas também podem ser enzimaticamente hidrolisadas pela atividade enzimática das BL, aumentando a disponibilidade de nutrientes e por isso estimulando o crescimento das BL. O metabolismo das leveduras tem um efeito direto na disponibilidade de compostos azotados para as BL. Outro aspeto a considerar é a capacidade das leveduras produzirem mais ou menos metabolitos inibitórios ou estimulantes para as BL. Como referido anteriormente as leveduras originam metabolitos inibitórios ao desenvolvimento das BL como o álcool, SO₂ e ácidos gordos de cadeia média. O enólogo tem atualmente uma larga escolha de leveduras e BL para a realização da FA e da FML, ou pode optar pela realização destas fermentações com os microrganismos que naturalmente existem nas uvas.

Inoculação de BL

Existe hoje em dia a possibilidade de inocular BL, o que significa que a FML é realizada pelo microrganismo escolhido pelo enólogo em vez de se fazer uma FML espontânea. Desta forma reduzem-se os riscos de alterações causadas por bactérias, assegura-se uma FML completa e rápida e contribui-se para um impacto positivo no aroma dos vinhos. A maior parte dos “starters” comerciais são *O.Oeni*, mas começam a ser considerados “starters” de *L. plantarum*.

A seleção e caracterização das estirpes de BL que podem ser usadas como starters comerciais é muito importante, porque diferentes estirpes têm diferentes características de crescimento e diferentes capacidades fermentativas. Os critérios de seleção das estirpes passam por: tolerância a pH baixo, tolerância a teores elevados de álcool e SO₂, boas características de crescimento nas características particulares do vinho, compatibilidade com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, pouca produção de aminas biogénicas, pouca produção de compostos “off-flavour”, e um bom contributo para o aroma dos vinhos pela produção de compostos que sensorialmente impactem positivamente o perfil dos vinhos.

Quando inocular?

O sucesso de uma inoculação é influenciado pela altura da inoculação. O enólogo deve escolher um “starter” comercial que se adapte bem às características de um determinado vinho e às condições existentes numa determinada adegas.

Existem 2 hipóteses para a inoculação de BL:

- 1- inoculação simultânea ou co-inoculação de leveduras e BL. Nesta hipótese as BL são adicionadas no início do processo ao mesmo tempo das leveduras, ou melhor ainda, 24 a 48H depois do início da FA quando existe cerca de 3% de álcool e as leveduras já começaram a produzir acetaldeído, que se combina com o SO₂ dando melhores condições às BL. Numa primeira etapa são as leveduras que levam a cabo a FA e depois as BL realizam a FML, mas os riscos associados a este processo são a possibilidade de haver interação entre os microorganismos e o

simultâneo metabolismo de açúcares e ácido cítrico conduzir a maiores teores de ácido acético, no caso da utilização de BL heterofermentativas como a *O. Oeni*. A vantagem apontada é as fermentações serem mais rápidas, mas é preciso ter cuidado na escolha dos microrganismos.

- 2- inoculação após o final da FA (inoculação sequencial). É o mais usual. No final da FA o vinho é separado das massas, e é inoculado com as BL, para que a FML aconteça. A vantagem desta opção é a possibilidade de conhecermos o vinho, nomeadamente saber o seu teor em açúcares residuais, que deve ser baixo, e o seu teor em SO₂, que deve igualmente ser baixo. Paralelamente, esta inoculação sequencial evita a interação entre microrganismos e reduz o risco de produção de ácido acético, porque o teor em açúcares residuais é baixo. A desvantagem pode ser a dificuldade das BL se adaptarem a um meio com álcool, SO₂, baixo pH, presença de fatores inibitórios produzidos pelas leveduras e falta de nutrientes.

De um ponto de vista prático a decisão passa por saber se queremos inocular ou realizar uma FML espontânea. Se se optar por inocular há que ponderar quando inocular e que BL inocular. Porém, antes de tudo há que decidir se queremos ou não que a FML se realize.

O controlo da FML

Enquanto a FML decorre, deve-se ir acompanhando o desaparecimento do ácido málico e/ou o aparecimento do ácido láctico. Isto é importante não só para verificar que a FML esta de facto a acontecer, mas também e sobretudo para saber quando é que a FML se pode considerar concluída, ou seja quando é que o teor em ácido málico é residual (<0.1/L). Como anteriormente referido, o ácido cítrico começa a ser metabolizado preferencialmente no fim da FML e se não actuarmos sobre um vinho, quando o teor em ácido málico for baixo, as BL continuam a trabalhar nomeadamente a degradar o ácido cítrico o que pode conduzir a um aumento maior do que o que se considera normal (0.1 a 0.2 g/L de ácido acético) da acidez volátil.

A evolução destes ácidos pode ser controlada por cromatografia de fase líquida, por cromatografia em papel ou por métodos enzimáticos. A cromatografia de fase líquida,

embora dê os melhores resultados é mais dispendiosa. A cromatografia em papel tem a vantagem de não necessitar de equipamento específico, é fácil de fazer, e visualmente avalia-se a presença destes dois ácidos, mas para valores inferiores a 0,5g/L de ácido málico, a mancha correspondente ao ácido málico já não se vê. Os métodos enzimáticos requerem um espectrofotómetro de UV-Vis e são relativamente fáceis de executar. A melhor alternativa é ir seguindo a FML através da cromatografia em papel até não se conseguir visualizar a mancha correspondente ao ácido málico e depois verificar se o teor de ácido málico já é inferior a 0,1g/L, com um método enzimático.

- Cromatografia em papel – técnica em que os compostos são separados com base na sua polaridade, usualmente utilizada nas adegas para monitorizar visualmente o desaparecimento da mancha correspondente ao ácido málico. É fácil e barata. Como inconvenientes podemos enumerar o facto de ser uma técnica não quantitativa, apenas qualitativa, não é muito precisa e não é específica para o ácido L-málico. Na figura 6 apresenta-se um esquema de uma cromatografia em papel

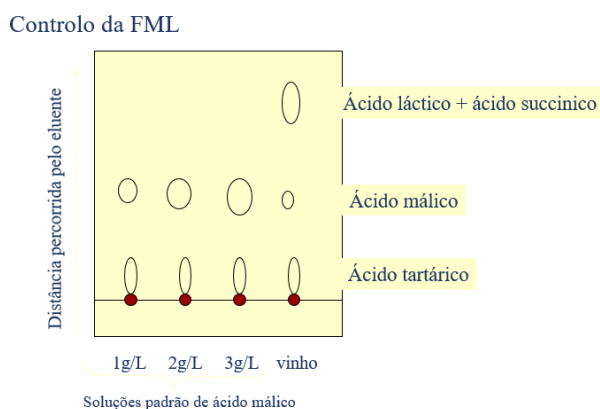


Figura 6 – esquema de uma cromatografia em papel

- Métodos enzimáticos – técnica baseada na reação do ácido málico com enzimas, que pode ser seguida por espectrofotometria de UV-Vis. É um método muito usado, quantitativo, rápido e que quantifica teores muito baixos de ácido málico (200-300mg/L). Requer aquisição dos kits enzimáticos, que têm pouca duração depois de abertos, são necessárias micropipetas e um espectrofotómetro e ainda pode ser necessário uma centrífuga para amostras mais turvas.

Actualmente existem analisadores automáticos, como por exemplo o Miura Micro, que com a utilização de kits de reagentes, fazem uma série de análises, incluindo a análise dos ácidos acético, cítrico, L-láctico e L málico com pequenas quantidades de vinho. A figura 7 mostra este equipamento, existente no Laboratório de Enologia Colaço do Rosário..



• **Figura 7 – Micro Miura**

- Outros métodos: a cromatografia de fase líquida, (HPLC) em que os compostos são separados com base na sua polaridade e interação com a fase estacionária (coluna de cromatografia) é uma técnica muito precisa, muito cara e que requer equipamento caro (cromatógrafo de fase líquida acoplado a um detector). Não é usada em rotina. A eletroforese capilar, uma técnica muito precisa e rápida mas igualmente cara por necessitar de equipamento específico. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), usa os espectros de infravermelho para a quantificação destes compostos, necessita de equipamento caro, mas que por vezes já existe nas adegas, para outras medições, e dá bons resultados desde que as calibrações sejam bem feitas.

Outras considerações sobre a FML

A FML pode ser realizada em depósitos de inox ou em barricas de madeira. Neste último caso há um maior enriquecimento dos vinhos em manoproteínas que transmitem aos vinhos uma maior sensação de volume e reduzem a sensação de adstringência.

A FML ocorre facilmente em grandes depósitos, simplificando o controle do processo. A estrutura básica de um vinho é essencialmente a mesma, independentemente de a FML

ser realizada em tanques e posteriormente envelhecida em barricas ou se ambos os processos, FML e envelhecimento, forem realizados simultaneamente em barricas.

No entanto, estes últimos vinhos passam pela FML mais rapidamente e perdem menos intensidade de cor no processo. Também foi demonstrado que existem variações importantes em alguns compostos voláteis, porque existe maior extração dos compostos da madeira. Os efeitos na cor e nesses compostos voláteis têm um efeito positivo no perfil sensorial dos vinhos produzidos.

Bibliografia:

Flanzy C., (2003) Enologia: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. 2ª Edição, AMV Ediciones; Ediciones Mundi Prensa. Madrid.

International Oenological Code (2015) International Organisation of Vine and Wine. Paris. ISBN 979-10-91799-42-3

International Code of Oenological Practices (2015) International Organisation of Vine and Wine Paris. ISBN: 979-10-91799-35-5

Cardoso, A.D. (2019) O vinho da uva à garrafa. 2ª edição. Quântica Editora, Conteudos Especializados Lda.

Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M. (2010) Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 31, No. 2, 186- 212

Mendes Ferreira A. and Mendes-Faia A. (2020) The Role of Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Metabolism of Organic Acids during Winemaking. Foods,9, 1231; doi:10.3390/foods9091231