

Utilização de Técnicas Imunológicas no Estudo da Proveniência das Proteínas dos Vinhos

Sara A. Monteiro¹, Maria A. Piçarra-Pereira^{1,2}, Maria C. Tanganho¹, Virgílio B. Loureiro¹, Artur R. Teixeira¹ e Ricardo B. Ferreira¹

¹Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, 1399 Lisboa Codex.

²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, 6001 Castelo Branco Codex.

O presente trabalho teve como objectivo o estudo das proteínas de um vinho branco produzido a partir de uvas da casta Assario Branco, aplicando técnicas imunológicas e ensaios de imunodeteccção, para tentar determinar a proveniência das proteínas dos vinhos.

Numa primeira fase procedeu-se ao isolamento das proteínas presentes no vinho, e, posteriormente, à produção de anticorpos policlonais anti-proteínas específicas do vinho. Nesta etapa obtiveram-se seis fracções proteicas maioritárias presentes no Assario e com massas moleculares que variam entre os 20 e 30 kDa. Os anticorpos foram obtidos a partir de três proteínas distintas.

Numa segunda fase utilizaram-se os anticorpos policlonais anti-proteínas do vinho em ensaios de imunodeteccção para determinar a origem das proteínas presentes no vinho.

A fracção proteica do vinho, presente no residuo seco obtido após dessalinização e liofilização, foi fraccionada por FPLC, utilizando uma coluna de troca catiónica (Mono S HR 5/5) e um gradiente salino [0/1 M de NaCl para a obtenção da proteína total e linear (0 a 1 M de NaCl) para a purificação das diversas proteínas do vinho].

Ensaio para a determinação de polissacáridos e de proteínas e também SDS-PAGE revelaram a presença de polissacáridos no pico 1 e de proteína no pico 2 do primeiro cromatograma.

No segundo cromatograma os picos assinalados com os números 4, 5, 6, 9, 11 e 12 correspondem às principais fracções proteicas eluidas, e são as proteínas com que se trabalhou nas subseqüentes análises efectuadas.

Os anticorpos foram produzidos contra a proteína total, o polipéptido 4 e o polipéptido 5 em coelhos fêmeas (Nova-Zelândia).

Investigou-se se cada um dos anticorpos produzidos reconhece especificamente apenas o seu antígeno ou se por outro lado reconhece todas as outras proteínas do vinho. Também as proteínas extraídas das folhas de *Lemna minor* foram usadas na avaliação da especificidade destes anticorpos.

Nenhum dos três anticorpos testados produziu qualquer sinal com as proteínas da *Lemna minor*, apesar da enorme variedade de estruturas (i.e. polipéptidos) presentes e da abundância de algumas delas, o que prova que os anticorpos produzidos contra as proteínas do vinho têm alta especificidade.

O anticorpo contra a fracção proteica total apresenta, como era de esperar, um forte sinal com todas as proteínas testadas.

Da interação de cada anticorpo com as diversas proteínas do Assario falaremos na comunicação seguinte.

Para determinar a proveniência das proteínas do vinho Assario foram extraídas as proteínas da película, polpa, grainhas, engaço e folhas de um cacho de uvas desta casta. Testou-se, também, a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, estirpe Fermol Bouquet) inoculada para melhorar o processo fermentativo que conduz do mosto ao vinho.

A concentração de proteína presente em cada um destes materiais biológicos foi determinada.

Como era de esperar as células de levedura são as mais ricas em proteína, seguidas das das grainhas e das das folhas. A polpa e os engaços apresentam um baixo teor proteico enquanto a película só contém quantidades diminutas destes polímeros.

Por SDS-PAGE verifica-se que a levedura apresenta uma enorme variedade de proteínas de massas moleculares diferentes. A polpa tem um número limitado de cadeias polipeptídicas. A grainha apresenta uma proteína principal e tanto as proteínas dos engaços como as das folhas apresentam uma má resolução, talvez devido à enorme dificuldade em extrair proteínas destes tecidos, apesar da optimização da metodologia utilizada.

O resultado dos “immunoblots” mostra que os três anticorpos reconhecem as proteínas da polpa mas não as da levedura, grainhas, folhas ou engaços indicando que as proteínas do vinho Assario têm origem na polpa das uvas. Os sinais produzidos quando as proteínas da polpa são testadas com os três anticorpos são idênticos aos produzidos quando a fracção proteica total do vinho é testada com os anticorpos, mas diferentes do padrão da proteína total da polpa. Este facto, não só sugere que todas as proteínas do vinho Assario estão presentes na polpa, mas que a polpa também contém outras proteínas que não estão presentes no vinho.