

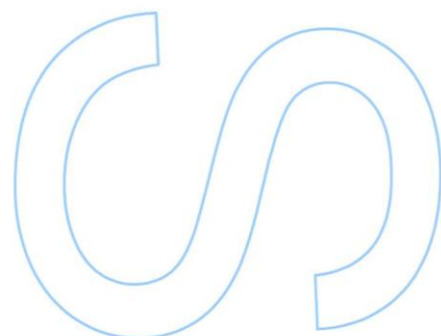
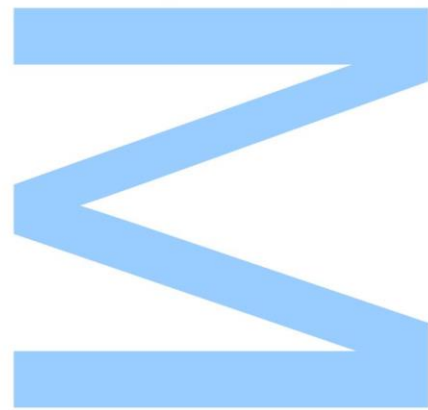


Caraterização físico-química de taninos para uso enológico – Propriedades antioxidantes e efeito na copigmentação

David Emanuel Maia de Carvalho
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento de Química e Bioquímica
2021

Orientador

Victor Freitas, Professor Catedrático, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

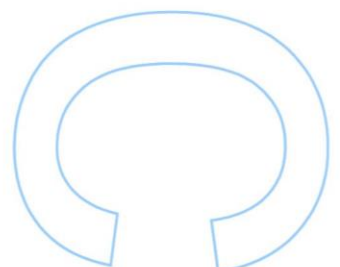
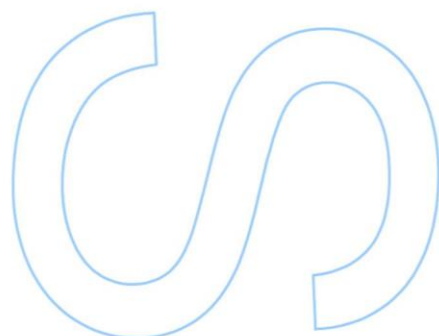
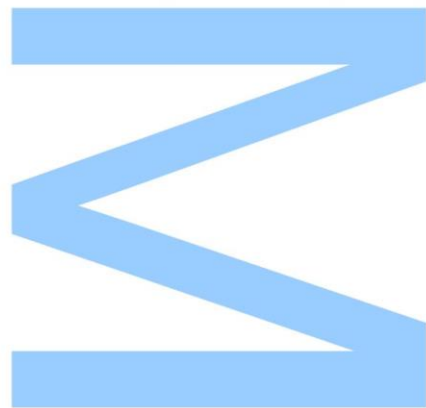




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Primeiramente, quero deixar um agradecimento geral à empresa SAI, uma vez que, me possibilitou e conferiu todas as condições para a realização do meu estágio curricular. Deixo um agradecimento particular ao Doutor Filipe Ribeiro, por me ter orientado ao longo destes 9 meses de estágio e por me ter ajudado nas mais variadas dúvidas e conselhos que me foi dando, transmitindo-me bastantes conhecimentos. Um obrigado também ao Nuno do laboratório que se mostrou sempre bastante prestável, auxiliando-me e aconselhando-me variadas vezes. Gostava ainda de deixar um agradecimento aos restantes colaboradores, uma vez que, foram sempre muito prestáveis.

De seguida, deixo um agradecimento também ao professor Victor Freitas por ter aceitado ser meu orientador da FCUP e estar disponível sempre que preciso.

Ao meu núcleo de amigos, um enorme obrigado tanto pelo muito apoio e motivação que me deram, como por todas as extraordinárias aventuras e momentos vivenciados. Sem dúvida que me ajudaram a ter a força necessária para esta fase tão importante que foi a vida académica.

Um obrigado muito especial à minha namorada, não só por todos os momentos incríveis vividos ao longo deste período, mas também pelas inúmeras vezes que me ajudou e apoiou quando precisava mais, nunca deixando de me dar uma palavra de carinho, de força e de motivação.

À minha irmã, um especial e enorme obrigado, porque sem dúvida foi uma peça chave ao longo de todo o meu percurso. Tenho a agradecer todas as memórias incríveis do dia a dia, todos os seus conselhos importantíssimos e ainda todas as palavras certas nos momentos certos.

Aos meus pais, deixo um agradecimento sem fim, por tudo aquilo que me proporcionam no dia a dia, por todos os momentos passados juntos e por todas as palavras de apoio, incentivo, força e motivação que foram dadas sempre nos momentos certos.

À minha querida avó, agradeço-lhe por todos os momentos e ensinamentos, por todo o apoio, amor e carinho que sempre me deu e que foram fundamentais.

Não podia deixar de agradecer, de uma forma muito especial, a toda a minha restante família por todos os momentos de reunião e de alegria, pelos muitos conselhos e palavras de apoio ao longo de todo o meu percurso.

Resumo

O presente trabalho tinha como principais propósitos a implementação interna do método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose e a caraterização físico-química de taninos para uso enológico. Desta forma, para o método de precipitação de taninos condensados obtiveram-se a curva de calibração de (-)-epicatequina, os limiares analíticos, a repetibilidade do método e ainda as taxas de recuperação. Quanto à caraterização dos taninos, determinou-se o índice de polifenóis total e determinaram-se as atividades antioxidantes de 12 taninos diferentes a partir de dois métodos (método ABTS, método de captura de radicais hidroxilo). Para o método ABTS, uma vez que se expressa em equivalentes de Trolox, obteve-se uma curva de calibração do Trolox. Determinaram-se ainda as caraterísticas cromáticas apresentadas pelos vinhos tintos, aquando da adição individual de cada 1 dos 4 taninos definidos. Esta determinação possibilita assim, avaliar a influência que os taninos apresentam sobre a cor dos vinhos tintos. As caraterísticas cromáticas foram avaliadas com base em dois métodos, o método de Boulton e o método oficial para avaliação cromática dos vinhos (CIELab). De acordo com os resultados obtidos nos trabalhos, verificou-se que os taninos gálicos consistentemente apresentam uma atividade antioxidante superior aos taninos elágicos e aos taninos condensados. Resultados preliminares sobre o impacto de diferentes taninos sobre as caraterísticas cromáticas de vinhos tintos indicam que os taninos condensados afetam mais as caraterísticas cromáticas dos vinhos.

Palavras-chave: Taninos enológicos; atividade antioxidante; caraterísticas cromáticas; vinhos tintos.

Abstract

The present work had as main purposes the internal implementation of the methylcellulose precipitable condensed tannins assay and the physicochemical characterization of tannins for oenological use. Thus, for the methylcellulose precipitable condensed tannins assay, the calibration curve of (-)-epicatechin, the analytical thresholds, the method repeatability, and the recovery rates were obtained. As for the characterization of tannins, the total polyphenol index was determined and the antioxidant activities of 12 different tannins were determined using two methods (ABTS method, hydroxyl radical scavenging method). For the ABTS method, since it is expressed in Trolox equivalents, a Trolox calibration curve was obtained. The chromatic characteristics presented by the red wines, when each one of the 4 defined tannins was added individually, were also determined. This determination makes it possible to evaluate the influence that tannins have on the color of red wines. The chromatic characteristics were evaluated based on two methods, the Boulton method and the official method for the chromatic evaluation of wines (CIELab). According to the results obtained in the work, it was found that gallic tannins consistently show higher antioxidant activity than ellagic tannins and condensed tannins. Preliminary results on the impact of different tannins on the chromatic characteristics of red wines indicate that condensed tannins affect the chromatic characteristics of wines the most.

Keywords: Oenological tannins; antioxidant activity; chromatic characteristics; red wines.

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice.....	VI
Lista de tabelas.....	IX
Lista de figuras	X
Lista de abreviaturas.....	XII
I. Introdução.....	13
1. Vinho – breve definição.....	13
2. Composição fenólica do vinho.....	13
2.1. Classificação de polifenóis.....	14
2.1.1. Flavonóides.....	15
2.1.2. Não-flavonóides	15
2.1.3. Taninos	17
2.1.3.1. Taninos condensados.....	18
2.1.3.2. Taninos hidrolisáveis	21
2.1.3.3. Taninos complexos.....	24
2.1.3.4. Florotaninos.....	25
2.2. Propriedades químicas dos taninos	26
2.2.1. Capacidade antioxidante.....	27
2.2.2. Capacidade antioxidásica (anti-lacase)	27
2.3. Propriedades organoléticas dos taninos	28
2.3.1. Adstringência	29
2.3.2. Amargor	29
2.3.3. Cor	30
3. Taninos enológicos	31
3.1. Fontes autorizadas	31
3.2. Extração	32

3.3. Aplicações	32
II. Parte experimental.....	33
1. Materiais e métodos.....	33
a. Reagentes e instrumentação.....	33
b. Taninos enológicos	33
2. Vinho sintético.....	34
3. Validação interna do método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose	34
a. Curva de calibração	35
b. Limite de deteção e quantificação	35
c. Repetibilidade	35
d. Taxas de recuperação.....	36
4. Determinação do Índice de Polifenóis Total (IPT).....	36
5. Determinação da atividade antioxidante.....	36
a. Método ABTS.....	36
b. Método de captura de radicais hidroxilo	37
6. Caraterísticas cromáticas	37
a. Método de Boulton	38
b. CIELab	38
7. Análise estatística	40
III. Resultados e discussão	41
1. Método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose	41
2. Determinação do Índice de Polifenóis Total (IPT).....	43
3. Determinação da atividade antioxidante.....	44
a. Método ABTS.....	44
b. Método de captura de radicais hidroxilo	46
4. Caraterísticas cromáticas	49
a. Método de Boulton	50
b. CIELab	53

• Luminosidade, L^*	58
• Cor verde/vermelho, a^*	60
• Cor azul/amarelo, b^*	61
• Saturação, C^*	62
• Tonalidade, h°	64
• Diferença total entre duas cores, ΔE	65
IV. Conclusões	68
V. Referências bibliográficas	71

Lista de tabelas

Tabela 1. Gama de concentrações de estilbenos e ácidos fenólicos nos vinhos.	17
Tabela 2. Diastereoisómeros e seus respetivos oligómeros e polímeros.....	18
Tabela 3. Lista e codificação dos taninos enológicos utilizados.....	33
Tabela 4. Fórmulas de cálculo relativas a cada parâmetro do método de Boulton.	38
Tabela 5. Fórmulas de cálculo relativas a cada parâmetro do sistema CIELab.	39
Tabela 6. Listagem do índice de polifenóis total correspondente a cada tanino.....	43
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos caraterísticos dos vinhos tintos utilizados.....	50
Tabela 8. Listagem dos parâmetros do método de Boulton relativos às diferentes adições de taninos aos vinhos.	51
Tabela 9. Listagem dos vários parâmetros obtidos pelo sistema CIELab e pelo método de Glories relativos às diferentes adições de taninos aos diferentes vinhos.	55

Lista de figuras

Figura 1. Exemplos de compostos com estruturas químicas flavonóides (Antocianinas, Favan-3-ol) e não-flavonóides (Estilbenos, Ácido gálico).....	14
Figura 2. Estruturas químicas dos flavonóides: Flavona e Flavonol (R_1 e $R_2 = H, OH$) e Antocianinas (R_1 e $R_2 = H, OH, OCH_3$).	15
Figura 3. Estruturas químicas de compostos não-flavonóides: Ácidos fenólicos e Estilbenos.	16
Figura 4. Estruturas químicas base de taninos condensados (proantocianidinas).....	18
Figura 5. Estruturas químicas de procianidinas diméricas do tipo A e do tipo B.	19
Figura 6. Padrões de hidroxilação das proantocianidinas do tipo B.....	20
Figura 7. Estrutura química de um tetrâmero de procianidina coroa.	21
Figura 8. Estruturas químicas base dos taninos hidrolisáveis.	22
Figura 9. Descrição geral da formação de precursores dos taninos hidrolisáveis, adaptado a partir de de “Jourdes, M.; Pouységu, L.; Deffieux, D.; Teissedre, P.-L.; Quideau, S. Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins. In Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes” ⁽⁴¹⁾ . ..	23
Figura 10. Estrutura química de um exemplo de um tanino complexo.	25
Figura 11. Estrutura química base dos florotaninos.....	25
Figura 12. Exemplo de protótipo do complexo da copigmentação, adaptado a partir de Trouillas et al. (2016).	30
Figura 13. Sistema de cor CIELab. As coordenadas, L^* = preto (0) / branco (100); a^* = verde (-) / vermelho (+); b^* = azul (-) / amarelo (+).....	39
Figura 14. Esquema representativo da reta de calibração da (-)-epicatequina.	41
Figura 15. Esquema representativo das taxas de recuperação em V.S. e em vinho tinto (V10).....	42
Figura 16. Gráfico representativo da atividade antioxidante de cada tanino pelo método ABTS. Taninos com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$).	44
Figura 17. Gráfico representativo da relação entre IPT e atividade antioxidante dos taninos.	46
Figura 18. Gráfico representativo da capacidade de inibição, em percentagem, de cada tanino pelo método de captura de radicais hidroxilo. Tratamento com EDTA. Taninos com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$).	47
Figura 19. Gráfico representativo da capacidade de inibição, em percentagem, de cada tanino pelo método de captura de radicais hidroxilo. Tratamento sem EDTA. Taninos	

com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$).	48
Figura 20. Gráficos representativos da influência da aplicação dos taninos na cor total dos vinhos, V20, V21, V10.....	52
Figura 21. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos no pico máximo das absorvâncias obtidas para os vinhos, V20, V21, V10.	53
Figura 22. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos no parâmetro da luminosidade, L^* , nos vinhos V20, V21 e V10.....	58
Figura 23. Gráficos representativos da relação entre L^* e IC para o vinho V21.....	60
Figura 24. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na cor verde(-) / vermelho(+), a^* , nos vinhos V20, V21 e V10.	60
Figura 25. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na cor azul(-) / amarelo(+), b^* , nos vinhos V20, V21 e V10.....	62
Figura 26. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na saturação da cor, C^* , nos vinhos V20, V21 e V10.....	63
Figura 27. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na tonalidade da cor, h° , nos vinhos V20, V21 e V10.	64
Figura 28. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na diferença total entre duas cores dos vinhos sem e com taninos, ΔE , nos vinhos V20, V21 e V10.	66

Lista de abreviaturas

LDL – Low Density Lipoprotein

OIV – International Organisation of Vine and Wine

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Trolox – 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid

CUPRAC – Cupric-reducing antioxidant capacity

Eq. – Equivalentes

mM TE – mmol/L em equivalentes de Trolox

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

TBA – 2-Thiobarbituric acid

TCA – Trichloroacetic acid

V.S. – Vinho Sintético

IPT – Índice dos Polifenóis Total

CIE – International Commission on Illumination

L.D. – Limite de Detecção

L.Q. – Limite de Quantificação

IC – Intensidade de Cor

T – Tonalidade

L* – Luminosidade

a* – Cor verde/vermelho

b* – Cor azul/amarelo

C* – Saturação

h° – Tonalidade

ΔE – Diferença total entre duas cores

I. Introdução

1. Vinho – breve definição

O vinho é uma bebida alcoólica resultante da fermentação de sumo de uva fresco e que apresenta uma constituição muito complexa e dependente, em grande parte, da variedade das uvas e “terroir” envolvente, processo de vinificação e tipo de estágio e envelhecimento. A complexidade da matriz dos vinhos reflete-se por isso na elevada variedade aromática e de sabor e no nível de qualidade dos mesmos. Para a variabilidade das matrizes contribuem os constituintes base das mesmas, como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos, terpenos e fenóis¹. Estes compostos base, para além de conferirem diferentes caraterísticas ao “bouquet” dos vinhos, são obtidos em diferentes fases do processo da vinificação uma vez que, alguns são obtidos a partir das castas utilizadas na sua produção (aromas primários), outros a partir do processo de fermentação (aromas secundários) e por fim compostos obtidos durante o processo de envelhecimento dos vinhos (aromas terciários).

2. Composição fenólica do vinho

Os fenóis apresentam como estrutura base um anel benzénico e uma ou mais substituições por grupos hidroxilo, sendo estes últimos designados por polifenóis². Os polifenóis são conhecidos como produtos provenientes do metabolismo secundário das plantas³. Estes compostos representam um papel importantíssimo quanto às caraterísticas organoléticas dos vinhos² e são por isso considerados uma classe de compostos chave para a qualidade dos mesmos. Assim, afirma-se que a diferença entre os vinhos brancos e tintos, seja na cor ou no sabor, está associada às diferenças no teor de compostos fenólicos nas suas matrizes^{4,5}. A concentração destes compostos nas uvas e posteriormente nos vinhos sofre variações ao longo do tempo, seja devido às diferenças entre castas, entre porta-enxertos ou ainda diferenças na fermentação durante o processo de vinificação^{6,2}. Tal como é conhecido, os compostos fenólicos são compostos instáveis e por isso, assim que é iniciado o esmagamento, estes começam a reagir com os compostos de aroma influenciando o produto final¹. Sabe-se ainda que estes compostos, para além de terem influência sobre os aromas, a adstringência e o amargor dos vinhos, apresentam caraterísticas que são benéficas para a saúde como propriedades antioxidantes, bactericidas e vitamínicas^{4,6}. Estas caraterísticas benéficas passaram, posteriormente, a ser associadas ao consumo de vinho rico nestes compostos, devido à aparente redução da incidência de doença cardiovascular nestes

consumidores, ficando assim conhecido como o “paradoxo Francês”⁴. As propriedades referidas anteriormente provêm da capacidade que os polifenóis têm para interagir com outros compostos tais como carboidratos, ácidos orgânicos, metais e proteínas^{7,8,6}.

2.1. Classificação de polifenóis

Os polifenóis podem ser classificados e diferenciados de acordo com as estruturas das cadeias de carbonos destes compostos. Assumindo essa classificação, os polifenóis podem basear-se numa estrutura química de um flavonóide (ex. antocianinas, flavonóis, flavan-3-óis) ou numa estrutura não-flavonóide (ex. estilbenos, ácidos fenólicos)^{9,2}, **Figura 1**.

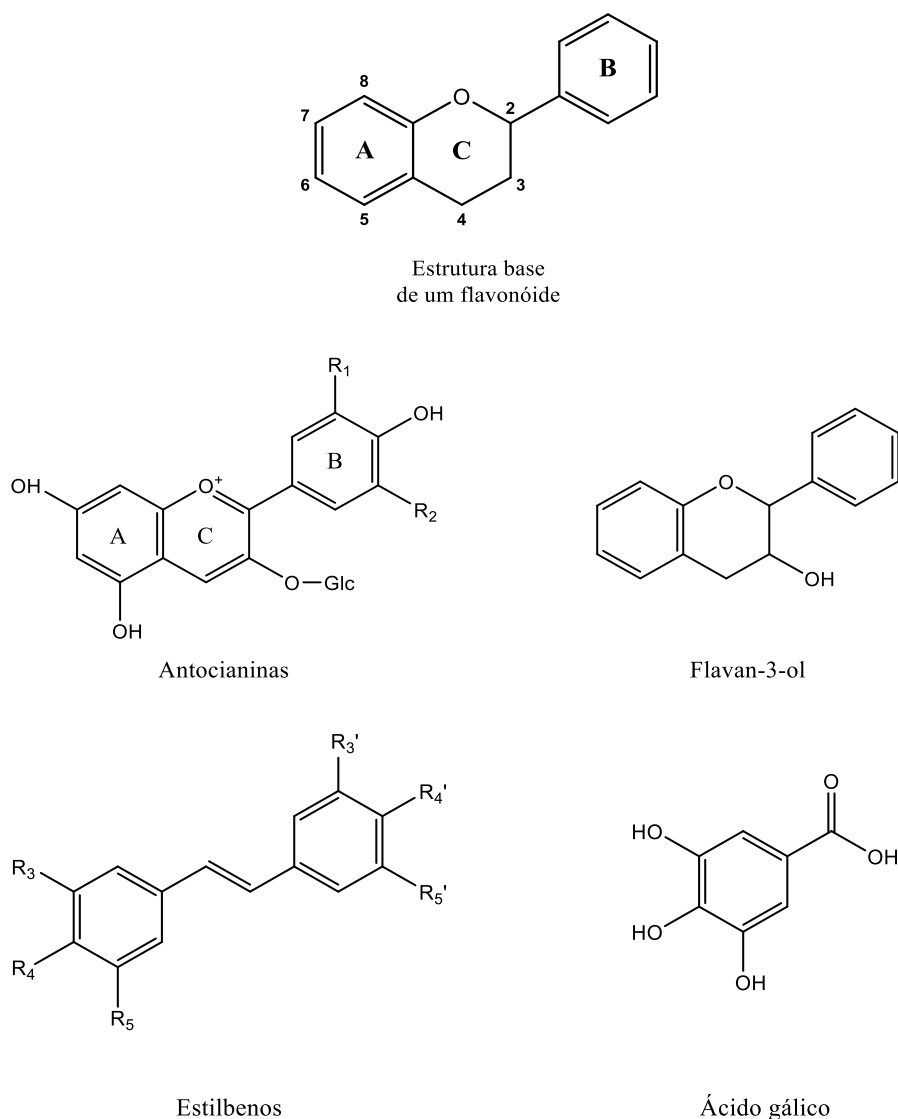


Figura 1. Exemplos de compostos com estruturas químicas flavonóides (Antocianinas, Favan-3-ol) e não-flavonóides (Estilbenos, Ácido gálico).

Um tipo de polifenóis que tem especial importância no setor dos vinhos e que apresenta elevada variedade quanto às suas estruturas é o dos taninos. Este é um tipo

de compostos que apresenta tanto estruturas de base flavonóide (taninos condensados) como também estruturas não-flavonóides (taninos hidrolisáveis).

2.1.1. Flavonóides

Os polifenóis que pertencem à classe dos flavonóides são caracterizados por ter uma estrutura química flavonóide, assumindo assim um esqueleto de carbonos com a sequência C6-C3-C6. Tal como é possível verificar a partir da **Figura 2**, estes compostos possuem três anéis (A, B, C), sendo o A e B formados por seis carbonos com funções fenólicas e o C formado por 3 carbonos. Este último anel diferencia-se dos restantes, uma vez que é o mesmo a potenciar a subdivisão dos flavonóides em diversos tipos de compostos, como é o caso das antocianinas, flavonas, flavan-3-óis, flavanonas e flavonóis¹⁰. Vários destes compostos estão distribuídos pelas películas das uvas e representam um importante papel relativamente à cor dos vinhos. Compostos como as flavonas e flavonóis contribuem para a pigmentação amarela e antocianinas contribuem para a pigmentação vermelha dos vinhos tintos^{6,4}.

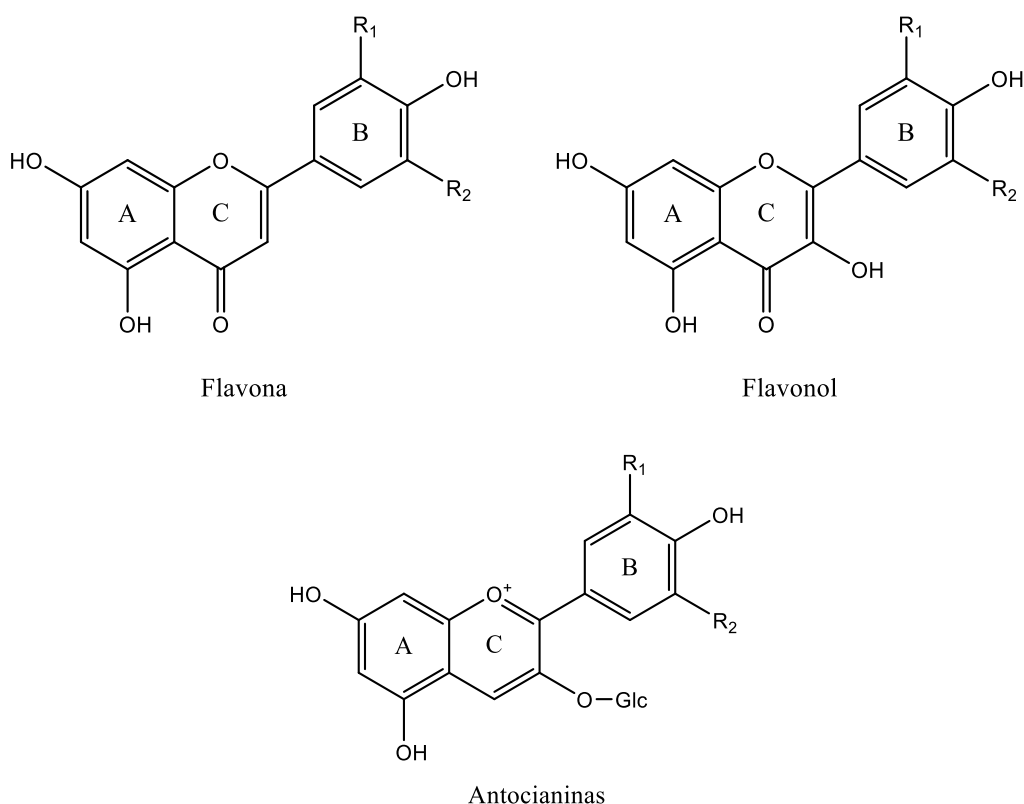


Figura 2. Estruturas químicas dos flavonóides: Flavona e Flavonol (R₁ e R₂ = H, OH) e Antocianinas (R₁ e R₂ = H, OH, OCH₃).

2.1.2. Não-flavonóides

Os compostos polifenólicos que não fazem parte da classe dos flavonóides, não apresentam uma configuração base flavonóide, ao contrário da **secção 2.1.1**, sendo

apenas possível definir as suas estruturas como não-flavonóides e posteriormente subdividi-las. Desta família fazem parte, maioritariamente, compostos como estilbenos e ácidos fenólicos, mais concretamente ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos².

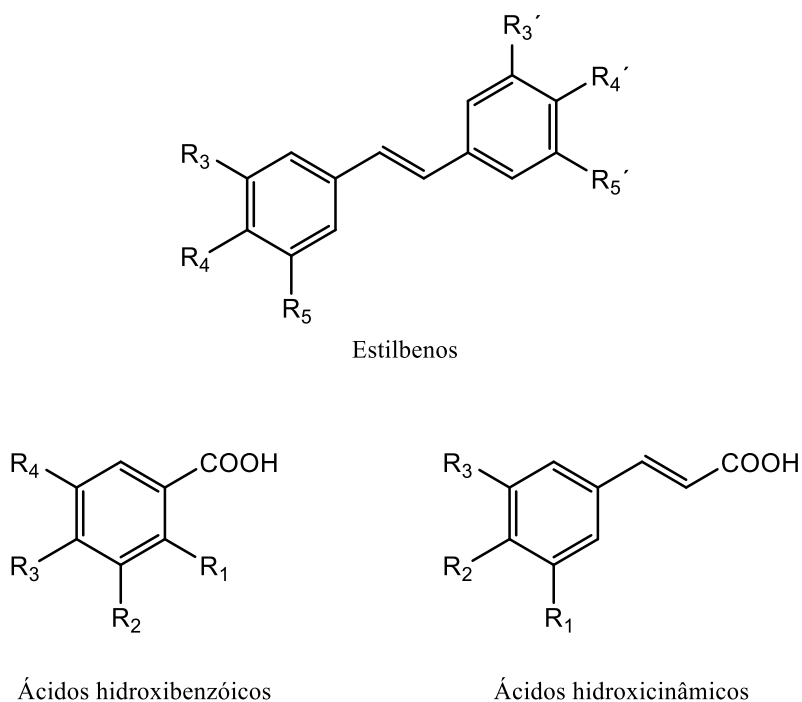


Figura 3. Estruturas químicas de compostos não-flavonóides: Ácidos fenólicos e Estilbenos.

Os estilbenos e mais especificamente o resveratrol que se encontra nas películas⁴, são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes. Uma vez que estes apresentam um conhecido e elevado teor nos vinhos tintos e as propriedades referidas, suspeita-se que possam contribuir assim para o “paradoxo Francês”. Esta reputação do vinho tinto pode dever-se em parte ao resveratrol, estilbeno que apresenta melhores propriedades biológicas, uma vez que aparentemente exibe, a par com outros compostos fenólicos, a capacidade de impedir a oxidação das LDL (lipoproteínas de baixa densidade)^{11,12}.

Os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos apresentam na sua constituição um anel benzénico que os caracteriza, C6-C1 e C6-C3 respetivamente, diferenciando-os também a partir das substituições existentes no anel⁴. Estes compostos provêm principalmente da polpa e estão associados à degradação de antocianinas e açúcares, uma vez que, geralmente, os ácidos fenólicos estão sob a forma combinada com glicósidos ou ésteres⁴.

O teor destas subclasses maioritárias, referidas anteriormente, de compostos não-flavonóides, difere dos vinhos tintos para os vinhos brancos. Assim, os vinhos brancos são conhecidos por apresentarem um teor baixo deste tipo de compostos

fenólicos quando comparado diretamente com a quantidade presente destes compostos nos vinhos tintos, tal como sugere a seguinte Tabela 1^{13,4}.

Tabela 1. Gama de concentrações de estilbenos e ácidos fenólicos nos vinhos.

<i>Vinho</i>	<i>Estilbenos (mg/L)</i>	<i>Ácidos fenólicos (mg/L)</i>
<i>Tinto</i>	[20 – 80]	[100 – 200]
<i>Branco</i>	[0,5 – 1]	[10 – 20]

2.1.3. Taninos

Os taninos são uma classe de polifenóis que, por definição, têm a capacidade de interagir e de se combinar, de forma estável, com alcalóides, gelatinas e outras proteínas^{14,15} e ainda com outros polímeros como polissacáridos⁴. Estas interações potenciam a precipitação dos taninos. Desta propriedade resultam a inibição enzimática, a colagem, a transformação de peles de animais em couro e ainda a adstringência⁴. Os taninos apresentam um peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton e são por isso consideradas moléculas de peso molecular relativamente elevado¹⁶. Assumindo esta condição, as interações com as proteínas serão estáveis uma vez que apresentam o tamanho adequado para o acesso dos taninos ao centro ativo das proteínas⁴.

Os taninos podem ser classificados, com base nas suas estruturas químicas, em quatro categorias, os taninos condensados, os taninos hidrolisáveis, os taninos complexos e ainda os florotaninos¹⁷.

Ao longo dos anos a presença destes compostos, como metabolitos secundários nas plantas, tem sido alvo de muitos estudos, seja na totalidade dos taninos ou nas suas classes individuais, com o intuito de se fazer uma caraterização dos mesmos tanto qualitativamente como quantitativamente. Assim, vários métodos têm surgido possibilitando a sua quantificação^{15,18}. Neste trabalho, o tipo de métodos aos quais se pretende recorrer são métodos expeditos e rápidos. Assim, o método a destacar e que será utilizado no trabalho para quantificação de taninos condensados é o método de precipitação por metilcelulose. O princípio pelo qual se fundamenta este método é o da interação e combinação dos taninos com polissacáridos, mais concretamente com a metilcelulose, promovendo a precipitação dos mesmos¹⁹. Por conseguinte, a quantificação é possível uma vez mensurada a absorvância das amostras antes e depois da precipitação provocada.

2.1.3.1. Taninos condensados

Os taninos condensados, igualmente designados por proantocianidinas, são oligómeros ou polímeros de polihidroxi flavanos. Para a constituição destes contribuem uma série de monómeros, sendo os mais comuns a (+)-catequina, a (–)-epicatequina entre outros discriminados de seguida na Figura 4¹⁷.

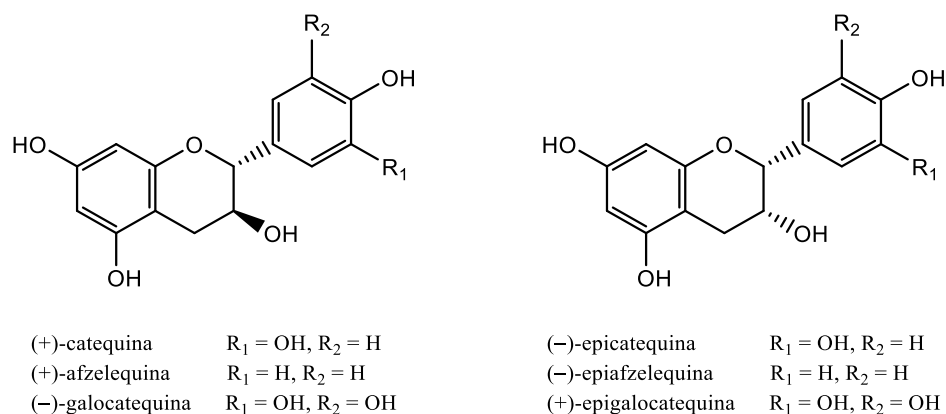


Figura 4. Estruturas químicas base de taninos condensados (proantocianidinas).

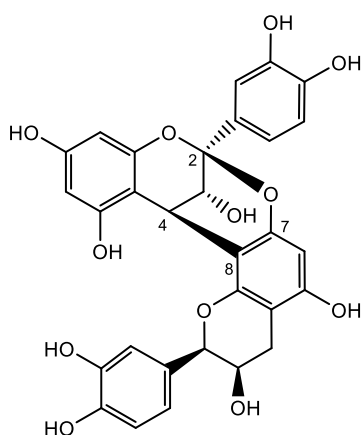
Algumas das unidades monoméricas mais comuns dos taninos condensados estão apresentadas de seguida e são designadas por diastereoisómeros, uma vez que apresentam uma relação de isomeria entre elas.

Tabela 2. Diastereoisómeros e seus respetivos oligómeros e polímeros.

<i>Diastereoisómeros</i>	<i>Oligómeros e Polímeros</i>
(+)-catequina / (–)-epicatequina	Procianidinas
(+)-afzelequina / (–)-epiafzelequina	Propelargonidinas
(–)-galocatequina / (+)-epigalocatequina	Prodelfinidinas

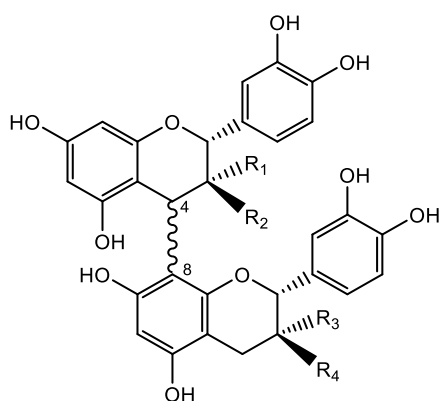
As ligações inter-flavonóides dos taninos condensados estão divididas em dois tipos de ligações, A e B. Da mesma forma que há uma divisão dos tipos de ligação, as proantocianidinas são também consideradas do tipo A e B. Frequentemente, às proantocianidinas do tipo B estão associadas as ligações C-C entre os carbonos C4 de um dos monómeros e o C8 de outro, podendo, porém, ocorrer mais ocasionalmente ligações entre os carbonos C4 e C6^{20,17}. As proantocianidinas do tipo A, para além das ligações de tipo B, aduzem uma ligação de função éter, entre C2-O-C7 dos monómeros^{20,21}. Determinadas proantocianidinas do tipo A e B, apresentadas na Figura

5, foram identificadas como as mais usualmente presentes nos vinhos⁴.



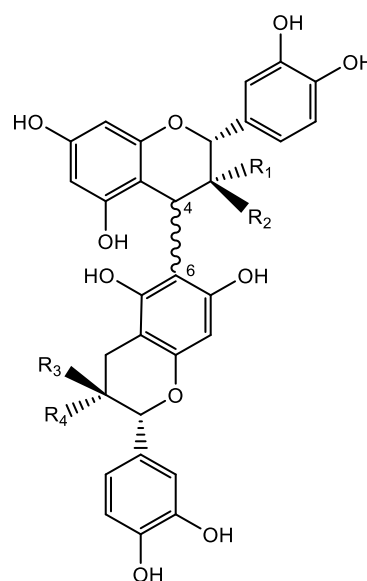
Procianidina do tipo A

$\underline{A}_1$: Epicatequina-(2 β →O→7, 4 β →8)-catequina



Procianidinas do tipo B

- $\underline{B}_1$: Epicatequina-(4 β →8)-catequina
- $\underline{B}_2$: Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina
- $\underline{B}_3$: Catequina-(4 α →8)-catequina
- $\underline{B}_4$: Catequina-(4 α →8)-epicatequina
- $\underline{B}_5$: Epicatequina-(4 β →6)-epicatequina
- $\underline{B}_6$: Catequina-(4 α →6)-catequina
- $\underline{B}_7$: Epicatequina-(4 β →6)-catequina
- $\underline{B}_8$: Catequina-(4 α →6)-epicatequina



- $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OH}$
- $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OH}$
- $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OH}$
- $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$
- $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$
- $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OH}$
- $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OH}$
- $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$

Figura 5. Estruturas químicas de procianidinas diméricas do tipo A e do tipo B.

Assumindo os diferentes padrões de hidroxilação das unidades monoméricas como forma de categorização das proantocianidinas do tipo B, torna-se possível classificá-las por procianidinas (3,5,7,3',4'-Pentahidroxilação), prodelfinidinas (3,5,7,3',4',5'-Hexahidroxilação), properlagonidinas (3,5,7,4'-Tetrahidroxilação), profisetinidinas (3,7,3',4'-Tetrahidroxilação), prorobinetinidinas (3,7,3',4',5'-Pentahidroxilação), proteracacinidinas (3,7,8,4'-Tetrahidroxilação), promelacacinidinas

(3,7,8,3',4'-Pentahidroilação), procassinidinas (7,4'-Dihidroilação) e probutinidinas (7,3',4'-Trihidroilação)^{17,22}.

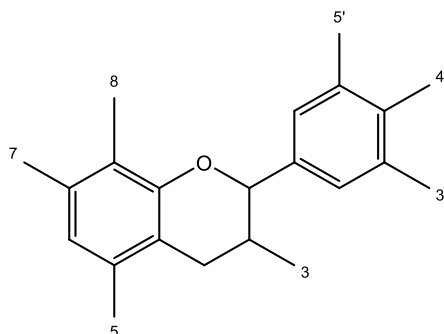


Figura 6. Padrões de hidroxilação das proantocianidinas do tipo B.

Os taninos condensados, por serem polímeros, apresentam, ao longo da sua variedade, diferentes graus de polimerização. Todavia, a despolimerização dos mesmos pode ser provocada recorrendo a um tratamento térmico e a uma utilização de um meio ácido^{23,24}.

No que diz respeito à presença destes polímeros nas diferentes partes das uvas, estes existem e distribuem-se pelos vários constituintes sólidos, como é o caso do engaço, das grainhas e das películas⁴. Contudo, para além dos constituintes anteriores, vestígios foram já encontrados na polpa das uvas²⁵. As partes sólidas das uvas, mais especificamente, as grainhas e as películas, apresentam diferenças entre os taninos quanto aos seus graus de polimerização e à presença das subunidades de epigallocatequina²⁶. As proantocianidinas presentes nas grainhas, quando comparadas com as das películas, possuem um grau médio de polimerização menor^{26,27}. Quanto às subunidades de epigallocatequina, está descrito que estas apenas estão presentes nos taninos das películas^{28,29}. Após o término do processo de vinificação, este tipo de taninos manifesta-se em diferentes concentrações nos vinhos tintos e nos vinhos brancos, respetivamente, com valores compreendidos entre 1 a 4 g/L e com valores de 100 mg/L a 300 mg/L⁴.

Atualmente é conhecida uma nova subfamília de proantocianidinas, que difere das anteriores, do tipo A e do tipo B, por apresentar uma estrutura cíclica tendo sido denominadas por proantocianidinas coroa³⁰. Na seguinte figura, **Figura 7**, está exibida a primeira procianidina coroa caracterizada estruturalmente, que pertence a esta nova classe. Aparentemente, este exemplo referido, de um tetrâmero de procianidina coroa, está presente apenas nas películas das uvas e não nas restantes partes sólidas tal como as procianidinas poliméricas³¹.

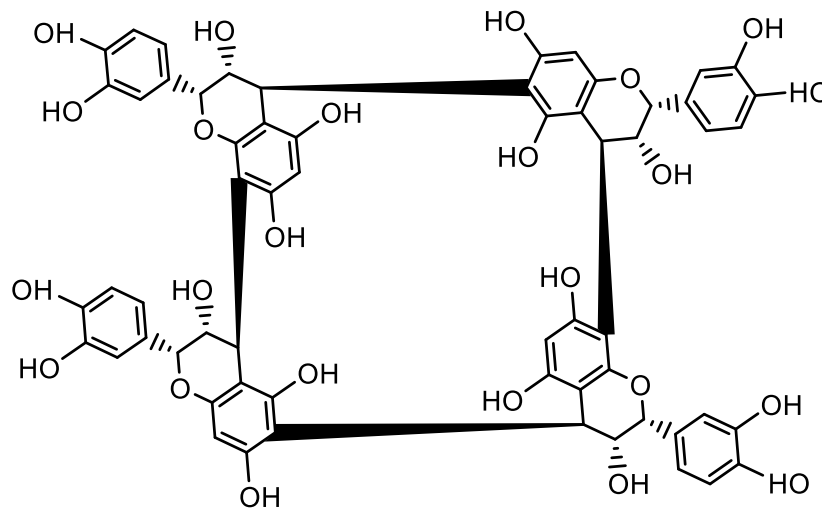


Figura 7. Estrutura química de um tetrâmero de procianidina coroa.

Posteriormente às descobertas supracitadas, tem predominado o interesse no estudo destes compostos em diversas castas. Longo *et al.* (2019) avaliou a presença deste tipo de compostos cíclicos em várias castas de uvas, tintas e brancas, chegando à conclusão da existência de procianidinas pentaméricas e hexaméricas cíclicas em diversas castas³². No estudo referido, verificou ainda que os vinhos tintos menos oxidados exibiam uma maior quantidade de procianidinas coroa comparativamente às procianidinas não cíclicas, sugerindo a hipótese de que são potenciadores de qualidade nos vinhos³². Num outro estudo, Longo *et al.* (2019), identificou parcialmente em vinho tinto, novos tetrâmeros e pentâmeros de procianidinas e prodelfinidinas coroa³³.

Com vista na quantificação dos taninos condensados, alguns métodos colorimétricos têm vindo a ser utilizados. Como exemplo desses métodos são os métodos da vanilina, do butanol-HCl¹⁸. Um outro método relevante e que possibilita, de forma aproximada, a determinação dos taninos condensados, é o método da precipitação por metilcelulose^{18,19,34}.

2.1.3.2. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são constituintes importantes dos metabolitos secundários das plantas, tornando-se relevante conhecer as suas fontes. Assim, sabendo que estes estão presentes seja em plantas ou em árvores, este tipo de compostos localiza-se mais concretamente na madeira, na casca, nas folhas e nos galhos^{35,36}.

Este tipo de compostos são ésteres de ácido gálico com um carboidrato central, tipicamente a D-glucose, podendo apresentar outros açúcares como frutose, xilose e

sacarose³⁵. Com base nas suas estruturas químicas, os taninos hidrolisáveis estão subdivididos em duas classes, os galotaninos e os elagitaninos^{17,35}. A génese do termo “hidrolisáveis” reflete a suscetibilidade deste grupo de taninos para a sua hidrólise, o que desencadeia a libertação dos respetivos ácidos. Os monómeros ácidos que fazem parte destes taninos determinam a classe dos mesmos. Assim, na condição do monómero ser o ácido gálico está-se perante o caso dos galotaninos, se for o ácido gálico e o ácido hexahidroxidifénico denominam-se elagitaninos^{17,35}.

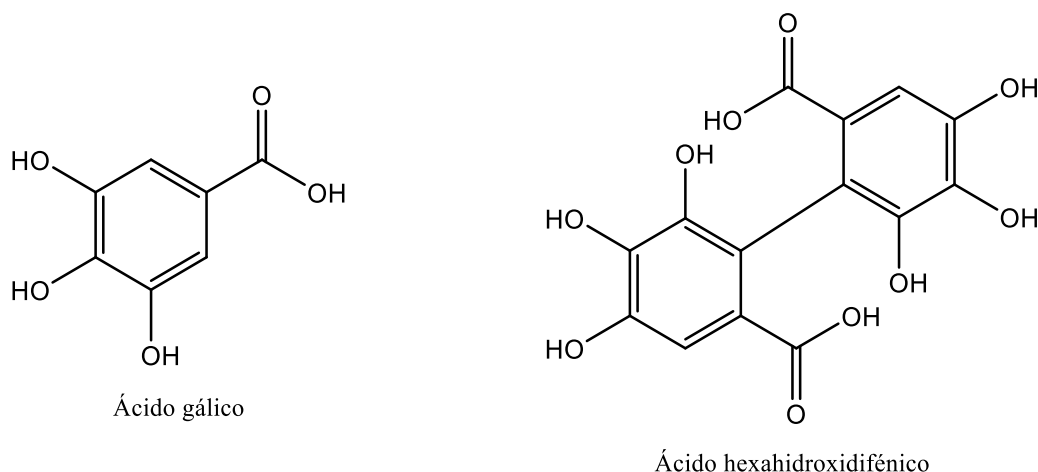


Figura 8. Estruturas químicas base dos taninos hidrolisáveis.

A formação dos taninos hidrolisáveis, tal como demonstrada na **Figura 9**, tem por base uma unidade monomérica de ácido gálico. Inicialmente, a partir de uma transgaloilação enzimática, ocorre uma esterificação entre o carboidrato e o monómero de ácido gálico, formando o primeiro e mais simples precursor, denominado por β -glucogalina. Posteriormente, após consecutivos processos de transgaloilação enzimática, ocorre a formação do penta-O-galoil- β -D-glucose, molécula precursora quer dos galotaninos quer dos elagitaninos³⁷. Os precursores finais de galotaninos (Hexagaloilglucose) são obtidos após esterificação de um dos fenóis dos grupos galoil por ácido gálico e os dos elagitaninos (Telimagrandina e Geranina) obtidos pela desidrogenação oxidativa seguida de um acoplamento entre dois grupos galoil adjacentes^{35,38}.

Quanto à presença desta classe de taninos nos vinhos, uma vez que não surgem naturalmente, a fonte mais habitual destes é as madeiras, mais concretamente, as barricas de carvalho onde os vinhos tintos são armazenados e envelhecidos³⁹. Contudo, a composição volátil inerente aos vários tipos de barricas varia, de acordo com as várias origens e espécies das mesmas. As espécies mais conhecidas e utilizadas na formação das barricas são a *Quercus alba*, habitualmente denominada por carvalho branco americano, e as duas espécies europeias *Quercus robur* e *Quercus petraea*⁴⁰. De uma

forma geral, no que diz respeito à quantidade de elagitaninos, as barricas produzidas a

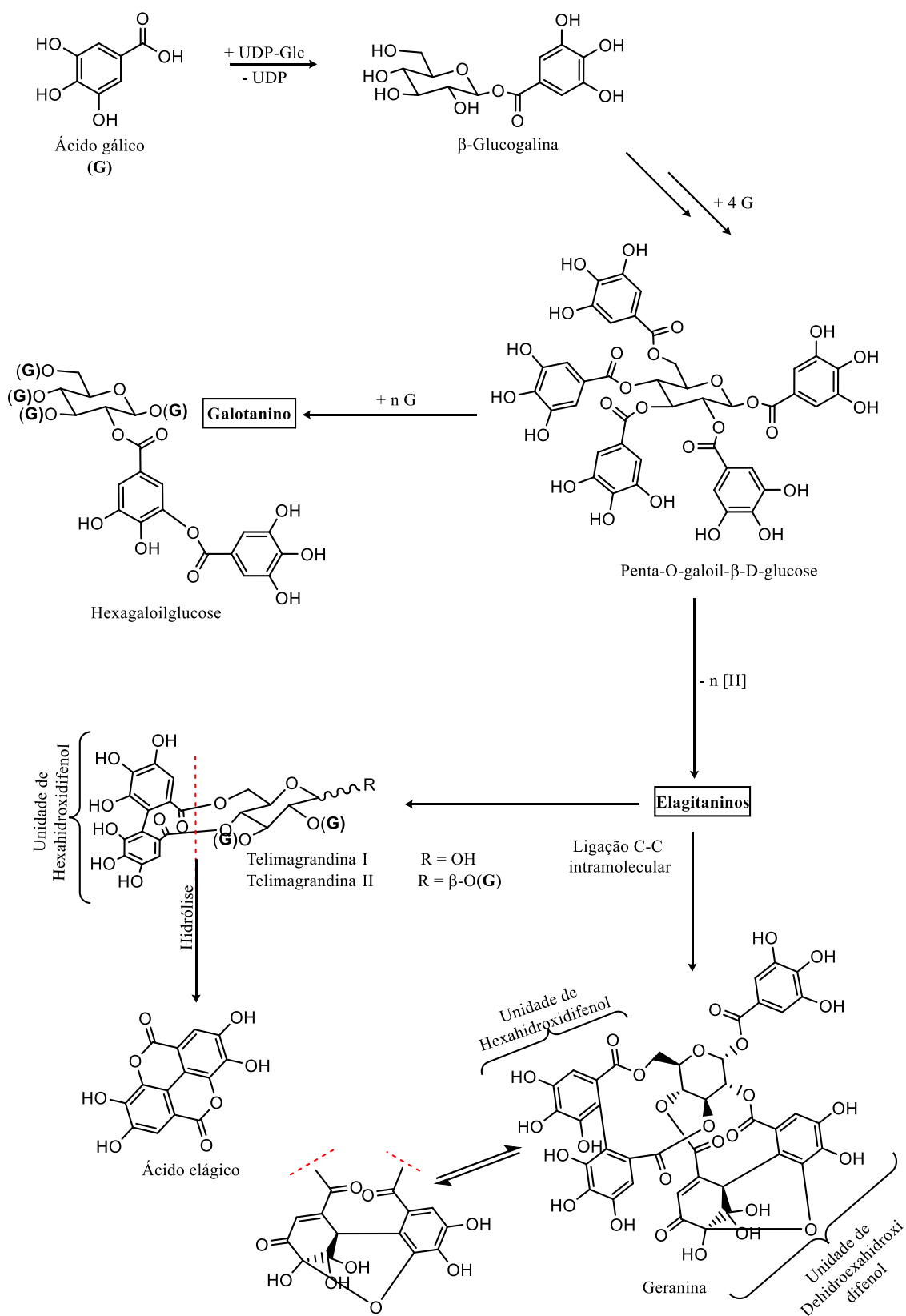


Figura 9. Descrição geral da formação de precursoros dos taninos hidrolisáveis, adaptado a partir de de "Jourdes, M.; Pouységu, L.; Deffieux, D.; Teissedre, P.-L.; Quideau, S. Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins. In Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes" ⁽⁴¹⁾.

partir de madeira de espécies europeias apresentam um maior teor, quando comparadas com as produzidas a partir de carvalho branco americano⁴⁰. De entre os vários elagitaninos extraídos e identificados durante o envelhecimento em barricas, a vescalagina acompanhada da castalagina destacam-se por serem os principais^{4,35}.

O teor de elagitaninos extraídos a partir de espécies de *Quercus petraea* e *Quercus robur* pode abranger valores entre 4 e 120 mg/g de madeira seca⁴². Para além das barricas, existem outras fontes de taninos hidrolisáveis sendo autorizada a comercialização de taninos enológicos como aditivos para os vinhos. Segundo o OIV, todos os taninos exógenos devem ser especificamente extraídos a partir de tipos de madeira que apresentem alto teor de taninos, seja a noz de galha, carvalho, castanheiro ou madeira exótica. Os diferentes tipos de madeira apresentam quantidades distintas dos dois tipos de taninos hidrolisáveis. Assim, as fontes maioritárias dos galotaninos são a madeira de tara e a noz de galha. No que concerne aos elagitaninos, as fontes mais representativas desta subclasse são as madeiras de castanheiro, carvalho e mirobálano³⁹.

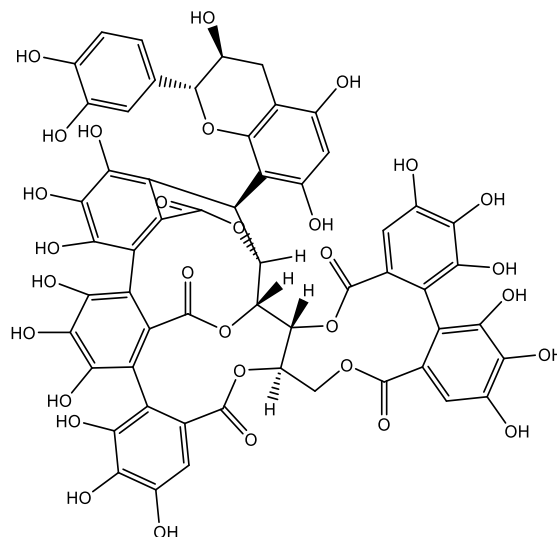
Atualmente, uma vez que as barricas apresentam desvantagens como o preço, existem novos desenvolvimentos quanto aos modos que possibilitam a extração de taninos hidrolisáveis desde as madeiras até aos vinhos. As tiras e as aparas de carvalho são exemplo disso já que mostram um tratamento dos vinhos mais rápido e a possibilidade de ocorrer uma extração maior de polifenóis⁴⁰. Assim, a utilização de “chips” ou aparas de carvalho, cubos, tem vindo a tornar-se numa prática cada vez mais usual. Contudo estas apresentam também desvantagens, pois embora apresentem um menor custo, a complexidade do envelhecimento dos vinhos com esta metodologia depende bastante do tamanho das tiras e das aparas e do tempo de contacto com os vinhos⁴⁰. Uma outra metodologia que permite o tratamento com madeira em substituição das barricas é a utilização de pó de madeira, precisando ainda de muitos estudos para que seja possível um tratamento adequado a este nível^{43,44}.

Um dos métodos colorimétricos que permite a quantificação, embora com limitações, dos taninos hidrolisáveis, recorre à utilização de iodato de potássio¹⁸.

2.1.3.3. Taninos complexos

As estruturas dos taninos presentes nesta classe exibem uma maior complexidade, devendo-se ao facto de estarem presentes elementos estruturais de diferentes grupos¹⁷. Assim, para a constituição dos taninos complexos contribuem, uma

unidade de um galotanino ou elagitanino, que migram das barricas, que estabelece uma ligação glicosídica com uma outra unidade monomérica (flavonóide), habitualmente um monómero de catequina presente no vinho em estágio^{35,45,46}. Com o intuito de se avaliar a presença de alguns destes compostos nos vinhos após o seu envelhecimento, vários estudos têm vindo a ser realizados, atestando a presença frequente de, por exemplo, a Acutissimina A nos vinhos^{47,48}.

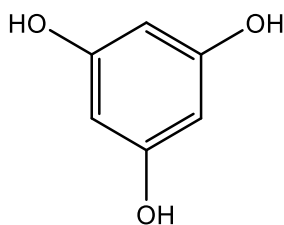


Acutissimina A

Figura 10. Estrutura química de um exemplo de um tanino complexo.

2.1.3.4. Florotaninos

Na classe dos florotaninos, os compostos caracterizam-se por serem oligómeros ou polímeros de unidades de 1,3,5-trihidroxibenzeno, mais comumente designado por floroglucinol⁴⁵.



Floroglucinol

Figura 11. Estrutura química base dos florotaninos.

Os florotaninos são compostos polifenólicos dos quais apenas se verificou a sua presença em algas marinhas castanhas^{17,49}. Atualmente, com base na estrutura das ligações que possibilitam a formação dos polímeros, existe uma subclassificação em 3

categorias para diferenciar estes compostos, ou seja, os fucóis, os florotóis e os fucoflorotóis⁴⁵.

2.2. Propriedades químicas dos taninos

Os compostos polifenólicos, particularizando, a classe dos taninos, apresentam várias propriedades químicas com importantes impactos aquando do seu uso a nível enológico⁵⁰. Apesar dos taninos apresentarem diferenças entre si quanto à sua origem, aos graus de polimerização, aos processos de extração e purificação, os taninos contam com diversas propriedades em comum³⁹. A interação com proteínas, o impacto no oxigénio/metais e ainda os efeitos bacteriostáticos representam as mais relevantes propriedades químicas dos taninos no universo da enologia⁵¹. No que diz respeito ao primeiro ponto, este reflete a capacidade que os taninos têm de interagir com as proteínas potenciando a sua precipitação parcial no caso de excesso de material proteico. Assim, demonstra que a utilização dos taninos tem a finalidade de coadjuvar na clarificação dos vinhos novos e na colagem nos vinhos brancos⁴. Quanto ao segundo tópico, este representa, de uma forma geral, a capacidade antioxidante e a antioxidásica dos taninos. A estas propriedades, estão ligadas diretamente, a capacidade de capturar os radicais superóxido, o potencial destes compostos para formar quelatos com ferro, a capacidade de intervenção de forma direta no consumo de oxigénio dissolvido e ainda a de auxiliarem na prevenção de oxidação proveniente de reações de base Fenton⁵¹. Relativamente aos efeitos bacteriostáticos dos taninos, estes têm sido alvo de vários estudos com o intuito de compreender o seu impacto sobre os microrganismos. Contudo, ao longo dos anos, alguns estudos já realizados apresentam conclusões por vezes contraditórias no que diz respeito a este efeito e por isso mais estudos serão necessários⁵². Apesar destas contradições, projeta-se que os polifenóis na sua generalidade apresentam uma capacidade inibitória no crescimento de determinados microrganismos, contrastando com uma capacidade potenciadora no crescimento dos microrganismos por parte de certos ácidos gálicos^{52,53,54}.

Tendo em conta o tipo de métodos, expeditos e de rápida execução, que se pretendem utilizar, com foco nos taninos enológicos, avaliaram-se alguns que permitiam comparar as capacidades antioxidantes, propriedades estas que são das mais relevantes para o uso enológico. Para esta finalidade existem variados métodos, contudo, irá ser dado apenas destaque aos de maior interesse para o trabalho.

2.2.1. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos taninos enológicos é um dos atributos de maior interesse associado a estes compostos. Esta característica apresenta tal relevância, uma vez que, os taninos são compostos usualmente utilizados com vista a impedir a oxidação dos vinhos e consequentemente o seu acastanhamento³⁹.

Atualmente, existem diversos métodos que foram desenvolvidos com o objetivo de se determinar e comparar a capacidade antioxidante de entre os diferentes taninos. Os métodos mais conhecidos para esta finalidade são o ABTS, a captura do radical hidroxilo, o DPPH, entre outros^{51,55,56}. Uma vez que são vários os métodos existentes baseados no princípio de captura de radicais livres, é de interesse para o trabalho, a realização de dois dos métodos permitindo uma comparação entre eles. Assim, irão ser abordados o método ABTS e do radical hidroxilo.

O método ABTS tira partido da utilização do radical livre (ABTS^{•+}), uma vez que este tem a capacidade de interagir com agentes antioxidantes, como é o caso dos taninos. Como resultado desta interação, aquando da adição de um antioxidante (taninos), é potenciada a inibição e estabilização do radical e consequentemente uma redução de absorvância, possibilitando, com recurso a uma leitura espectralométrica a 734 nm, realizar a determinação da capacidade antioxidante destes compostos polifenólicos⁵⁷. Deste modo, é possível, por comparação com o Trolox, avaliar a atividade antioxidante dos taninos. No que diz respeito ao método de captura do radical hidroxilo, este pretende avaliar, através da atividade antioxidante de cada tanino, o grau de inibição que cada tanino apresenta para com a degradação da desoxirribose na presença ou ausência de um complexo de ferro. Esta avaliação é obtida a partir do mesmo recurso que o método anterior. Assim, para a avaliação desse grau de inibição, recorre-se a leituras espectralométricas a 532 nm, que na presença de um antioxidante, tendem a retardar o aparecimento de cor, refletindo-se numa diminuição da absorvância a 532 nm⁵⁷. Comparativamente ao método do ABTS, este método, apresenta uma maior complexidade na sua execução⁵⁷.

2.2.2. Capacidade antioxidásica (anti-lacase)

Aludindo aos mostos e vinhos, a capacidade antioxidásica define-se, de um modo geral, pela aptidão de um determinado composto para impedir o desenvolvimento de atividade microbológica, mais concretamente a atividade da lacase.

Uma vez em condições climáticas amenas e húmidas, as vinhas padecem geralmente do desenvolvimento do fungo *Botrytis cinerea* associado à doença da podridão nas uvas⁵⁸. Como consequência do desenvolvimento deste fungo, os bagos sofrerão uma infeção que posteriormente passará também para o sumo de uva⁵⁹. A ocorrência desta infeção provoca a excreção de vários tipos de compostos como enzimas (lacases, tirosinases, pectinases e proteases) e alguns metabolitos fúngicos (glicerol, ácido glucónico e β -glucanos)⁶⁰. Aliada à secreção da lacase, enzima catalisadora da oxidação de compostos polifenólicos, está a formação de quinonas, que uma vez polimerizadas, dão origem a compostos castanhos, provocando assim a degradação da cor e o acastanhamento dos vinhos⁵⁹.

Os taninos, para além da atividade antioxidante, apresentam uma capacidade particular que é a capacidade antioxidásica. Esta classe de polifenóis apresenta um efeito inibitório sobre a atividade da enzima lacase, contudo este padece de uma medição, uma vez que, diferentes tipos de taninos exibem diferentes intensidades de capacidade antioxidásica⁵⁰. Deste modo, a determinação desta capacidade para os taninos é possível com recurso a métodos colorimétricos já conhecidos para este efeito, tais como o criado por Dubernet (1974) e o criado por Grassin e Dubourdieu (1984)⁶¹. O método de Grassin e Dubourdieu é o mais conhecido para esta finalidade. Este é baseado na utilização do composto cromogénico siringaldazina, que uma vez na presença da lacase, se oxida e forma um composto de cor roxa⁶². O objeto de análise deste método é a medição da absorvância, a 530 nm, da taxa de formação deste composto que, por consequência, permitirá avaliar a capacidade antioxidásica dos taninos⁶⁰.

2.3. Propriedades organoléticas dos taninos

A utilização de taninos nos vinhos tem também o propósito de lhes conferir determinadas características de qualidade. Uma vez que estão inter-relacionadas, aliadas às propriedades químicas deste conjunto de compostos, estão as propriedades organoléticas que estes conferem aos vinhos. Estes compostos polifenólicos, têm um elevado impacto sobre o aroma/sabor dos vinhos, sobre a sensação na boca dos mesmos e ainda sobre a estabilidade da sua cor, podendo assim, conferir características valiosas para o produto final⁵¹. Assim, a qualidade dos vinhos é fomentada, também, mas não só, por um bom equilíbrio entre o amargor e a adstringência, harmonia essa que pode ser adquirida a partir de uma correta aplicação de taninos.

2.3.1. Adstringência

A adstringência é uma sensação que é percebida como secura, aspereza e enrugamento na boca. Os taninos, quando associados aos vinhos, de uma forma geral são conhecidos pela sensação tátil de adstringência que estes provocam. Esta sensação é resultado da precipitação das proteínas salivares consequente da capacidade dos taninos de interagir com as mesmas. Como resultado desta interação, as proteínas salivares perdem a capacidade de lubrificar a cavidade bucal promovendo este fenómeno ao qual se designa por adstringência (a adstringência é uma sensação tátil e não um sabor sendo frequentemente associada ao sabor amargo) ⁶³.

Nos vinhos tintos, onde a sensação equilibrada de adstringência é um atributo de qualidade, os taninos condensados, seja oligómeros ou polímeros, são os principais impulsionadores desta sensação no produto final⁶⁴. Contudo, a percepção da adstringência conferida pelos taninos condensados pode variar, dado que é influenciada pelo grau de polimerização médio e a percentagem de galoilação destes⁶⁵. Assim, os taninos condensados que ostentam maior grau médio de polimerização, conferem uma sensação de adstringência mais forte⁶⁶. Alguns fatores externos foram já descritos como influenciadores da sensação de adstringência, uma vez que, condicionam a interação e consequente precipitação dos taninos com as proteínas. Deste modo, valores maiores de pH, de açúcares (frutose) e até de etanol implicam uma menor sensação de adstringência⁶⁷.

2.3.2. Amargor

Apesar de ser por vezes confundido com a sensação de adstringência, o amargor representa, não uma sensação, mas um dos cinco sabores elementares. O amargor é por isso percebido a partir dos recetores gustativos dos quais dispomos na língua. Atualmente, sabe-se que o amargor presente em vinhos e que é despoletado por compostos polifenólicos, é primeiramente despoletado por polímeros de flavan-3-óis, apesar de outros compostos como flavonóis e derivados de ácidos fenólicos também promoverem este sabor⁶⁸. Assim, aquando da presença de compostos polifenólicos como é o caso dos taninos, ocorre a ativação dos recetores do sabor específico amargo, pertencentes à família de genes TAS2Rs⁶⁴.

2.3.3. Cor

Um dos atributos mais importantes nos vinhos é a cor, uma vez que é possível deduzir a partir dela, alguma informação sobre outros atributos. Com base na cor apresentada, pode ser possível estimar a intensidade do sabor, a idade do vinho e até o tempo de contacto com as películas. Assim, é de esperar que a cor seja, impreterivelmente, considerada um atributo de qualidade dos vinhos. No que concerne aos vinhos tintos, a qualidade, pode ser parcialmente identificada a partir tanto da densidade da cor como da sua tonalidade⁶⁴.

Partindo do conhecimento de que as antocianinas são o principal pigmento dos vinhos tintos e, sabendo que os taninos e estas se podem combinar, os taninos são detentores das características necessárias para assumirem a condição de copigmentos, representando assim um papel importante sobre o atributo da cor. As características mais relevantes para apresentarem esta condição e que, tanto os taninos condensados como os taninos hidrolisáveis têm, são a presença de sistemas conjugados e de grupos dadores/aceitadores como é o caso dos grupos -OH e C=O⁶⁹. Assim, ao fenómeno que ocorre a partir das interações entre os taninos e as antocianinas, dá-se o nome de copigmentação. Para a ocorrência deste fenómeno, as interações referidas anteriormente são estabelecidas a partir de ligações não covalentes, potenciando a formação dos complexos apresentados na Figura 12.

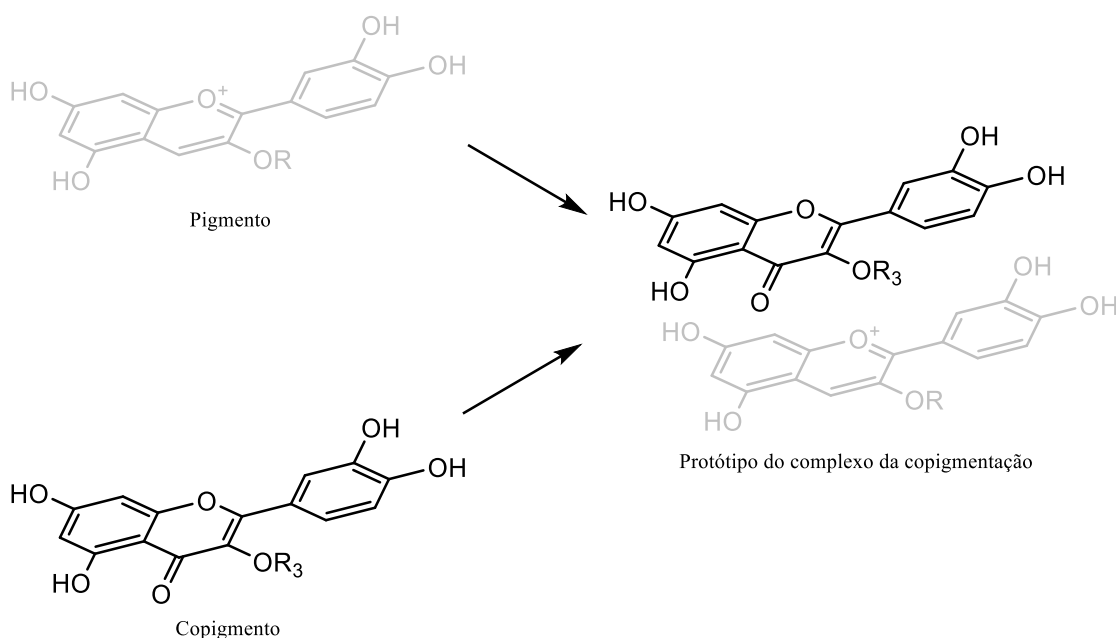


Figura 12. Exemplo de protótipo do complexo da copigmentação, adaptado a partir de Trouillas *et al.* (2016).

Uma vez a ocorrência deste fenómeno, os taninos podem promover uma melhoria e um aumento da estabilidade da cor e ainda promover a formação de novos

pigmentos^{39,51}. Há, contudo, vários fatores que oferecem um impacto direto sobre o fenómeno da copigmentação, tais como, as diferentes condições da matriz (pH, etanol, temperatura), a concentração do pigmento e do copigmento, a razão pigmento/copigmento e ainda a natureza dos mesmos⁷⁰.

A avaliação das caraterísticas cromáticas dos vinhos pode ser obtida recorrendo a mais do que um método, potenciando uma maior amplitude de parâmetros obtidos. Um primeiro método a referir é o de Boulton que, para além de permitir uma avaliação da cor total dos vinhos, pretende também possibilitar uma avaliação da cor promovida pelas antocianinas, promovida pelos pigmentos resistentes ao SO₂ e promovida pela copigmentação⁷¹. Um segundo recurso importante, reconhecido universalmente como o sistema de referência colorimétrico para a quantificação da cor, é o sistema CIELab. Este sistema visa simular, sob a forma numérica, a perceção da cor observada por um analisador na vida real. A partir deste sistema é possível avaliar vários parâmetros associados à cor total dos vinhos.

Assim, com recurso a estes dois métodos, torna-se viável avaliar as caraterísticas cromáticas dos vinhos influenciadas quer pela ausência ou pela presença de taninos adicionados, potenciando uma comparação entre as diferenças dos vários parâmetros da cor, relativos às várias amostras.

3. Taninos enológicos

Da grande variedade de compostos que a classe geral dos taninos engloba, apenas alguns deles são autorizados, pelo OIV, a ser aplicados nos vinhos para além dos que estão presentes naturalmente. Este conjunto autorizado de taninos enológicos apresenta uma grande variabilidade no que diz respeito aos vários tipos de estruturas químicas, às diferentes origens botânicas e aos seus processos de extração. Assim, assumindo esta variabilidade existente e as várias propriedades que estes apresentam, os taninos podem ser aplicados nos vinhos com diferentes finalidades.

3.1. Fontes autorizadas

De acordo com o OIV, para além dos taninos existentes de forma natural nos vinhos, taninos exógenos podem ser adicionados, uma vez respeitadas as origens botânicas. Desta forma, segundo o OIV (COEI-1-TANINS : 2017), as origens botânicas dos taninos enológicos a extrair devem ser, as próprias uvas (películas e grainhas), a madeira exótica, noz de galha, os carvalhos, os castanheiros, a tara e os quebrachos. Com as

diversas aplicações que os taninos enológicos possuem, torna-se relevante distinguir as diferentes origens dos taninos. Assim, sabendo que estes apresentam propriedades tecnológicas distintas, é imperativo ser bem conhecida a finalidade para uma boa aplicação. Um fator que contribui para o conhecimento destas origens é o controlo efetuado com base em marcadores moleculares, como é o caso do quercitol para madeira de carvalho, do pinitol para noz de galha, do muco-inositol para madeira de castanheiro e do arabitol para madeira de quebracho³⁹. Outro método para a mesma finalidade é o método do OIV. Este baseia-se na determinação da concentração total de flavonois e permite a discriminação entre as diferentes origens (Método OIV, International Oenological Codex).

3.2. Extração

O processo de extração dos taninos tem como princípio a imersão da matéria portadora dos taninos em água ou álcool (solvente orgânico), por exemplo madeira de carvalho desfiada para aumentar a área de contacto. Assim que fica imersa, a madeira é deixada a macerar, de modo que haja uma migração natural desde a madeira para a água circundante. Finda a libertação deste tipo de compostos, a solução obtida é arrefecida à temperatura ambiente de modo a precipitar eventuais impurezas e substâncias insolúveis. Assim, esta solução obtida é já um extrato natural de taninos, disponível a ser utilizada sobre o estado líquido. De seguida, a partir de uma desidratação desta solução pode-se obter os taninos sob a forma de pó, no sentido de facilitar tanto o transporte como o armazenamento dos taninos e a sua posterior aplicação.

3.3. Aplicações

Devido às várias propriedades que os taninos enológicos possuem, estes são adicionados aos vinhos com várias finalidades. Assim, de acordo com o *International Code of Oenological Practices* (OENO 613-2019), os objetivos destas adições são as seguintes: para facilitar a estabilização dos vinhos a partir da precipitação parcial do excesso de material proteico; para coadjuvar a colagem dos vinhos; para promover a proteção dos vinhos contra oxidação através das propriedades antioxidantes e antioxidásicas dos taninos; para potenciarem a qualidade da cor dos vinhos tintos a par de contribuírem para a sua estabilização e preservação⁷².

II. Parte experimental

1. Materiais e métodos

a. Reagentes e instrumentação

Na realização dos vários métodos recorreu-se a múltiplos reagentes. Esses reagentes foram o sulfato de amónio (Merck), metilcelulose (Alfa Aesar, 1600cP), epicatequina (TCI), Trolox (Merck), ABTS (Sigma-Aldrich), persulfato de potássio (Merck), etanol (PanReac, 96%), acetato de sódio (Merck), ácido acético (Sigma-Aldrich), desoxirribose (Sigma), cloreto de ferro (II) (Merck), ácido ascórbico (Merck), peróxido de hidrogénio (Sigma-Aldrich), fosfato de sódio monidratado monobásico (Merck), EDTA (Chem-Lab), ácido tricloroacético (LabKem), ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich), acetaldeído (Fluka), solução de sulfuroso a 6% e bitartarato de potássio.

No que diz respeito ao equipamento, foram três os espectrofotómetros UV/VIS aos quais se recorreram para a realização dos vários métodos. Para os ensaios do método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose e IPT utilizou-se um Thermo Scientific™ GENESYS™ 10, para os métodos de avaliação da atividade antioxidante dos taninos um Thermo Scientific™ GENESYS™ 50 e o LLG-Uni SPEC 2 para os métodos de avaliação das características cromáticas (a partir do sistema CIELab e método de Boulton).

b. Taninos enológicos

No que concerne aos taninos utilizados, para a totalidade do trabalho, tiveram-se em consideração 12 taninos de uso enológico fornecidos pela empresa SAI (Segurança Alimentar Integrada).

Tabela 3. Lista e codificação dos taninos enológicos utilizados.

Taninos	Origem
T1	Condensado (uva)
T2	Gálico
T4	Gálico
T5	Mix (gálico, elágico, catequínico)
T6	Elágico
T7	Elágico
T8	Condensado (quebracho)
T10	Mix (condensados, elágicos, gálicos)
T11	Condensado (grainha)
T12	Condensado (película)
T13	Condensado (grainha)
GT1	Gálico

2. Vinho sintético

Na realização de alguns dos ensaios recorreu-se a uma solução de vinho sintético de modo a reproduzir-se algumas das condições que se encontram geralmente nos vinhos. Assim, esta solução apresentava os seguintes critérios, pH de aproximadamente 3,6, percentagem de etanol de 12% v/v e uma concentração de aproximadamente 5,0 g/L de ácido tartárico.

3. Validação interna do método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose

O método de precipitação por metilcelulose, permite, de forma aproximada, a determinação do teor de taninos condensados nos vinhos tintos. O fundamento deste método são as interações que se estabelecem entre o tipo de taninos em questão e a metilcelulose, que, formando um complexo insolúvel, provocam a sua precipitação.

O procedimento assumido para a realização deste método foi conforme o descrito por Mercurio *et al.* (2007)¹⁹, uma adaptação do método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose, com vista na execução e validação interna deste método.

Para a sua execução prepararam-se as seguintes soluções, a solução de metilcelulose a 0,04% e a solução saturada de sulfato de amónio, preparadas de novo sempre que necessário. O comprimento de onda utilizado para as leituras espectrofotométricas realizadas foi o de 280 nm.

Inerente à realização de cada ensaio está a necessidade de, para cada amostra, utilizar-se uma amostra de controlo e uma amostra tratada com metilcelulose, que possibilita, posteriormente, estimar o teor de taninos condensados a partir da diferença entre ambas, equações (1) e (2).

$$Abs_{280\text{ nm}}(\text{taninos}) = Abs_{280\text{ nm}}(\text{controlo}) - Abs_{280\text{ nm}}(\text{tratada}) \quad (1)$$

$$C_{\text{Taninos (eq.epicatequina, mg/L)}} = \frac{Abs_{280\text{ nm}}(\text{taninos}) - a}{b} \times F \quad (2)$$

Onde, **b** – declive, **a** – ordenada na origem, **F** – fator de diluição.

a. Curva de calibração

O modo de expressar a concentração de taninos condensados, tal como apresentado na equação (2), é em equivalentes de epicatequina. Esta representação torna-se possível uma vez estabelecida a reta da curva de calibração da (-)-epicatequina, que segue o exemplo da equação (3), para uma gama de concentrações de 10 a 100 mg/L de 6 soluções aquosas (10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L).

$$Abs_{280\text{ nm}} = b C_{\text{epicatequina (mg/L)}} + a \quad (3)$$

No que diz respeito ao método, o cálculo do seu desvio padrão (S_m) e do coeficiente de variação (CV_m) realizou-se com base nas seguintes equações (4) e (5).

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (4)$$

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (5)$$

Onde, b – declive, $S_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva de calibração, $\bar{x}$ – média dos valores de concentração dos padrões.

b. Limite de deteção e quantificação

Os limites analíticos, L.D. e L.Q., limite de deteção e limite de quantificação, respetivamente, foram calculados a partir das seguintes equações (6) e (7), tal como sugerido no Guia Relacre, Guia 13, para o caso de utilização de uma calibração linear.

$$L.D. = \frac{[3,3 \times S_{y/x}]}{b} \quad (6)$$

$$L.Q. = \frac{[10 \times S_{y/x}]}{b} \quad (7)$$

Onde, b – declive, $S_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva de calibração.

c. Repetibilidade

A repetibilidade do método obteve-se com recurso à realização de 10 ensaios relativos a uma mesma amostra de vinho tinto e com realização do procedimento mencionado acima. Assim, os parâmetros relacionados com a repetibilidade obtiveram-se a partir das equações (8) e (9).

$$CV_{ri} = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (8)$$

$$r = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2} \quad (9)$$

Onde, CV_{ri} – coeficiente de variação da repetibilidade, S_{ri} – desvio padrão de repetibilidade, S_{ri}^2 – variância de repetibilidade, r – limite de repetibilidade.

d. Taxas de recuperação

As taxas de recuperação determinaram-se a partir da adição do tanino T12, em diferentes concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 g/L), a soluções de vinho sintético e também a um vinho. Para as taxas de recuperação realizaram-se ensaios em triplicado.

4. Determinação do Índice de Polifenóis Total (IPT)

O índice de polifenóis total (IPT), relativo a soluções de taninos enológicos preparadas em V.S. (2 g/L), obteve-se com recurso a uma diluição prévia das amostras de 1:100. De seguida, realizaram-se leituras espectrofotométricas, a 280 nm, e multiplicaram-se as absorvâncias registadas pelo fator de diluição (100) de modo a obter os valores finais de IPT⁵¹.

5. Determinação da atividade antioxidante

A avaliação e determinação da atividade antioxidante dos vários taninos supramencionados teve em consideração dois métodos, o método ABTS e o método de captura de radicais hidroxilo.

a. Método ABTS

O método ABTS, utilizado para a quantificação da atividade antioxidante, teve em consideração o procedimento sugerido por Machado *et al.* (2013)⁷³. Inicialmente, a realização do método requer a preparação da solução que contém o radical ABTS^{••}. A formação deste radical provém da mistura, de volumes iguais, de soluções aquosas de ABTS (7 mM) e de persulfato de potássio (2,45 mM). Após 16h de reação no escuro, recorreu-se a uma solução tampão acetato de sódio (20 mM) para a diluição da solução do radical ABTS^{••} para obtenção de uma absorvância de 0,700, medida a 734 nm. Uma vez que o método, tal como sugerido, implica que a atividade antioxidante seja expressa em equivalentes de Trolox, obteve-se uma curva de calibração da inibição do radical

ABTS^{•+} em função da concentração de Trolox, que compreende uma gama de concentrações de 0 a 0,30 mM de Trolox. De modo a quantificar a atividade antioxidante dos taninos, estes foram diluídos individualmente em vinho sintético e posteriormente misturaram-se 200 µL dessas amostras em 2 mL da solução do radical ABTS^{•+}. Após 15 minutos de reação, mediram-se as absorvâncias das soluções finais.

b. Método de captura de radicais hidroxilo

O procedimento utilizado, e que possibilita avaliar a capacidade de captura do radical hidroxilo dos taninos, assentou no apresentado por Taghouthi *et al.* (2018)⁷⁴. Este método apresenta uma caraterística distinta do anterior uma vez que este tem em consideração a presença ou não do ferro, usando, deste modo, o EDTA como forma de complexar o ferro. Assim, o método subdivide-se em dois tipos de condições, uma designada por “site specific assay” na qual o EDTA não está presente e outra “non site specific assay” que indica a presença do EDTA. No que diz respeito ao procedimento, a 0,5 mL de cada uma das soluções aquosas de taninos adicionou-se 400 µL de uma solução tampão fosfato (20 mM, pH 7,4). Posteriormente, acrescentou-se 100 µL de cada uma das seguintes soluções, de desoxirribose (20 mM), de cloreto de ferro (II) (1 mM), de ácido ascórbico (1 mM), de peróxido de hidrogénio (10 mM) e de EDTA (1 mM). De seguida, sujeitaram-se as misturas anteriores a um período de incubação de 1h a 37 °C e subsequente adição de 1,5 mL de uma solução de TBA a 0,5% (preparada em TCA a 10%). Aqueceram-se as misturas durante 15 minutos a 100 °C e mediram-se as absorvâncias a 532 nm. O procedimento é o mesmo para ambas as condições referidas acima, com a diferença da adição do EDTA apenas no caso da segunda condição. De modo a permitir a determinação da percentagem de inibição provocada pelos taninos, usaram-se brancos de referência para se obter uma forma de controlo, sem a presença destes compostos polifenólicos.

A equação seguinte **(10)**, permite o cálculo da inibição (%) provocada pelos compostos fenólicos em questão,

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100 \quad (10)$$

6. Caraterísticas cromáticas

A avaliação das caraterísticas cromáticas dos vinhos, na ausência e na presença de taninos, realizou-se com a utilização dos dois recursos explorados de seguida. O

primeiro remete ao método de Boulton, que permite avaliar diferentes parâmetros relativos à copigmentação e o segundo recurso usado, com vista a avaliar as influências sobre vários parâmetros da cor dos vinhos, na presença de taninos, é o sistema CIELab. Para a realização destes ensaios tiveram-se em consideração três vinhos tintos, descritos na Tabela 7, e definiram-se quatro taninos. Desta forma, avaliou-se o impacto da aplicação dos diferentes taninos sobre diferentes concentrações.

a. Método de Boulton

O método de Boulton que visa principalmente avaliar a copigmentação, baseou-se no procedimento mencionado de seguida, adaptado a partir de Versari *et al.* (2007)⁷¹. Inicialmente, para avaliar a cor total das amostras, filtrou-se os vinhos a partir de um de um filtro Minisart® Syringe Filter de 0,45 µm da Sartorius, procedeu-se a um ajuste de pH para aproximadamente 3,6 e realizaram-se leituras espectrofotométricas a 520 nm. De seguida, visando a cor promovida pelas antocianinas, a 1,5 mL de amostra adicionou-se 15 µL de uma solução de acetaldeído a 10% deixando em repouso e à temperatura ambiente durante 45 min e posterior medição das absorvâncias a 520 nm. Com vista na pigmentação resistente ao SO₂, a 1,5 mL de amostra adicionou-se 120 µL de SO₂ a 5% e permitiu-se um repouso à temperatura ambiente por um período de 10 min com subseqüentes leituras espectrofotométricas a 520 nm. Finalmente, para o caso da copigmentação, realizou-se uma diluição da amostra, com uma razão de 1:20, em solução tampão de etanol a 12%, preparada em bitartarato de potássio a pH 3,6. Seguido de um repouso de 10 min, procedeu-se à obtenção das absorvâncias a 520 nm.

Tabela 4. Fórmulas de cálculo relativas a cada parâmetro do método de Boulton.

Parâmetro	Fórmula
Cor antocianinas	$A = (Abs_{Copigmentação} \times 20) - Abs_{Pigmentação\ resistente\ ao\ SO_2}$
Pigmentação resistente ao SO ₂	$P = Abs_{Pigmentação\ resistente\ ao\ SO_2}$
Copigmentação	$C = Abs_{Antocianinas} - (Abs_{Copigmentação} \times 20)$

b. CIELab

Na designação deste sistema está implícito o nome da comissão CIE, que o publicou em 1976. O nome sugere ainda a presença do sistema tridimensional no qual se divide sob a forma de três coordenadas, L*, a* e b*, cada uma assumindo a sua posição num

de três eixos. Às coordenadas L^* , a^* e b^* estão associadas, respetivamente, a luminosidade, a cor verde/vermelho e a cor azul/amarelo.

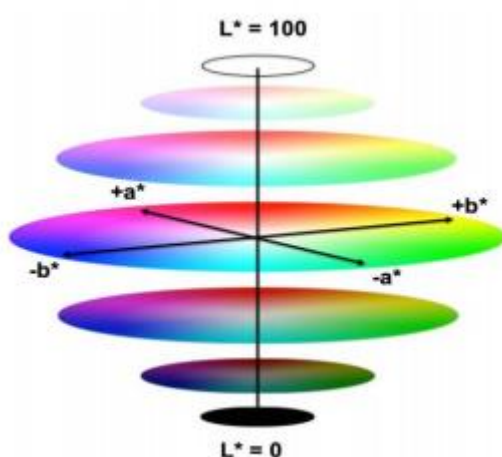


Figura 13. Sistema de cor CIE Lab. As coordenadas, L^* = preto (0) / branco (100); a^* = verde (-) / vermelho (+); b^* = azul (-) / amarelo (+).

Fonte: “Sappi – Defining and Communicating Color: The CIELAB System”

Deste sistema fazem ainda parte outros parâmetros com um significado igualmente importante, tais como, C^* , h° e ΔE^* que refletem, respetivamente, a saturação da cor, a tonalidade da cor e a diferença total entre duas cores, o que potencia a comparação entre amostras. As fórmulas de cálculo para cada parâmetro estão apresentadas na tabela seguinte, **Tabela 5**⁷⁵.

Tabela 5. Fórmulas de cálculo relativas a cada parâmetro do sistema CIE Lab.

Parâmetro	Fórmula
L^*	$L^* = 116 f(Y/Y_n) - 16$
a^*	$a^* = 500 (f(X/X_n) - f(Y/Y_n))$
b^*	$b^* = 200 (f(Y/Y_n) - f(Z/Z_n))$
C^*	$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$
h°	$h^\circ = \tan^{-1} (b^*/a^*)$
ΔE^*	$\Delta E = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2}$

No que diz respeito a todas as amostras analisadas com recurso ao sistema CIELab, utilizou-se uma amplitude espectral desde os 380 nm até aos 780 nm.

Apesar de não estar diretamente relacionado com o sistema CIELab, existe um outro método mais convencional, método descrito por Glories (1984), que permite avaliar mais dois parâmetros que podem ser interessantes discutir e relacionar com os do sistema CIELab. Este método, com recurso às absorvâncias medidas a 420, 520 e 620 nm, permite avaliar a intensidade da cor (IC) dos vinhos e ainda a sua tonalidade (T), a partir das seguintes equações **(11)** e **(12)**, respetivamente⁷⁵.

$$IC = Abs_{420\text{ nm}} + Abs_{520\text{ nm}} + Abs_{620\text{ nm}} \quad (11)$$

$$T = \frac{Abs_{420\text{ nm}}}{Abs_{520\text{ nm}}} \quad (12)$$

7. Análise estatística

A análise estatística realizada teve como recurso o programa IBM SPSS Statistics utilizando, para comparação de valores e avaliação das diferenças significativas, o ANOVA de um fator, tendo em consideração o teste de Tukey para comparação de médias, para um intervalo de confiança de 95%.

III. Resultados e discussão

1. Método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose

O método utilizado, que visava a precipitação de taninos condensados com recurso à metilcelulose, teve em consideração o uso da (-)-epicatequina como padrão para a obtenção da reta de calibração. Assim, e considerando o procedimento já enunciado anteriormente, para uma gama de concentrações de 10 a 100 mg/L, a curva de calibração obtida está apresentada na seguinte equação **(11)** e **Figura 14**.

$$Abs_{280\text{ nm}} = 0,0112 C_{epicatequina\text{ (mg/L)}} - 0,0025 \quad (11)$$

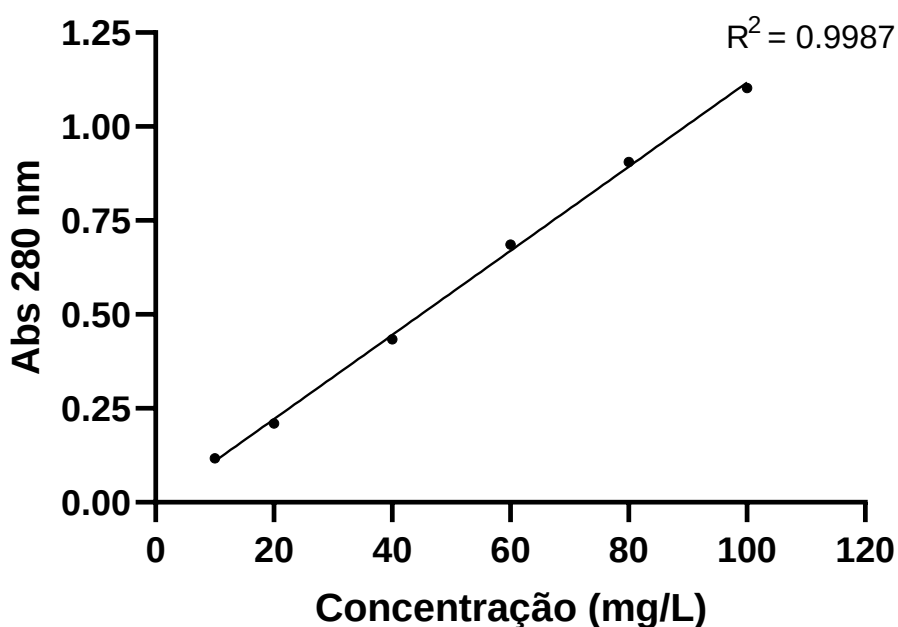


Figura 14. Esquema representativo da reta de calibração da (-)-epicatequina.

No que diz respeito à curva de calibração obtida, esta apresenta um valor de R^2 de 0,9987. Uma vez que apresenta um R^2 próximo da unidade, tal como se observa, é uma linha de tendência bem ajustada que se aproxima bastante dos pontos das várias concentrações, podendo-se induzir que o método dos mínimos quadrados realizado apresenta uma excelente linearidade.

Com vista na avaliação do método, de forma geral, e conforme executado, obtiveram-se alguns parâmetros importantes, mais concretamente, parâmetros como o limite de deteção, o limite de quantificação, o desvio padrão do método e ainda o coeficiente de variação do mesmo. O limiar analítico obtido, correspondente ao limite

de deteção, é de 4,56 mg/L, representando o valor mais baixo a partir do qual se torna possível avaliar a presença do analito. Quanto ao limite de quantificação obtido, que visa representar o valor mínimo a partir do qual é possível quantificar o analito, corresponde a um valor de 13,83 mg/L. Este valor do limite de quantificação permite estimar o teor de taninos condensados nos vinhos tintos, uma vez que esse mesmo teor supera frequentemente o LQ. Dois parâmetros de igual importância e que auxiliam na avaliação do método são o desvio padrão do método e o coeficiente de variação do mesmo. Deste modo, e avaliando os valores obtidos de 1,38 e de 2,68 %, respetivamente, induz-se que este método apresenta um coeficiente de variação bastante bom, uma vez que, segundo a IUPAC, os valores de CV (%) não devem exceder os 10%.

Com recurso a um ensaio de repetibilidade, verificou-se que o CV (%) obtido, no valor de 15,1 %, excede o valor máximo aceite pela IUPAC. No que diz respeito ao limite de repetibilidade obtido, este apresenta um valor 0,92 g/L. Uma possível justificação para este coeficiente de variação e limite de repetibilidade apresentarem valores tão elevados é o facto de os ensaios de repetibilidade terem sido um dos ensaios iniciais deste método, ensaios ainda de aprendizagem e otimização, promovendo possivelmente alguns desvios originados pelo analista.

Quanto às taxas de recuperação obtidas, utilizaram-se dois tipos de matrizes, uma de V.S. e outra de um vinho tinto (V10), com o objetivo de comparação da resposta do método. Ambas as matrizes refletem a adição de sete níveis distintos do tanino T12 e apresentam taxas de recuperação distintas quando comparadas, tal como demonstrado na Figura 15.

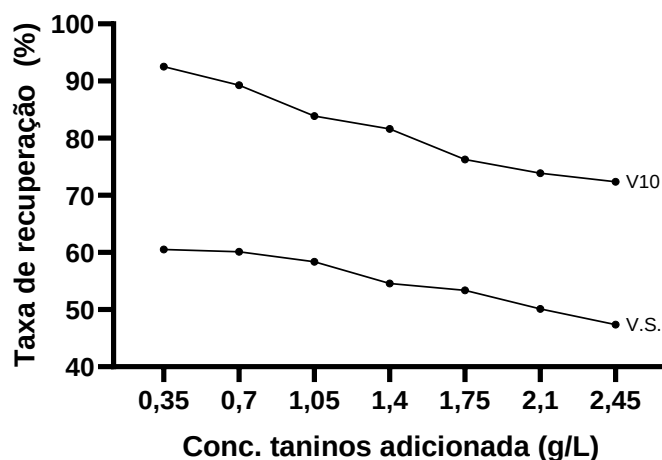


Figura 15. Esquema representativo das taxas de recuperação em V.S. e em vinho tinto (V10).

As taxas de recuperação realizadas em V.S., apesar de não apresentarem valores altos, demonstram uma tendência decrescente à medida que a concentração de tanino adicionada aumenta, variações aproximadamente de 60% até 47%. Com o objetivo de avaliar se ocorreria o mesmo efeito na matriz de um vinho, Vinho 10, para os mesmos sete níveis de tanino adicionado, confirmou-se um mesmo resultado no que diz respeito à tendência decrescente. Apesar deste efeito ser idêntico para as duas matrizes, apurou-se ainda que as taxas de recuperação relativas à matriz de um vinho são bastante mais elevadas variando desde aproximadamente 92% até 72%, tal como sugere a **Figura 15**. O facto de se tratar de um método pouco específico, e também a dificuldade de avaliação da pureza dos taninos utilizados, faz com que o método apresente taxas de recuperação abaixo do que seria desejável (variações de 95% a 105%), apresentando, no entanto, resposta às quantidades crescentes aplicadas, sendo um método útil para se ter uma ideia global ou aproximada do teor de taninos condensados entre diferentes vinhos.

2. Determinação do Índice de Polifenóis Total (IPT)

O índice de polifenóis total foi determinado para todos os taninos de modo a obter-se uma melhor caracterização dos mesmos. Na **Tabela 6**, estão expressos os valores de IPT médios para cada tanino e os respetivos desvios padrão obtidos por duplicados.

Tabela 6. Listagem do índice de polifenóis total correspondente a cada tanino.

Taninos	IPT
T1	23,4 ± 1,3 a
T2	84,1 ± 0,8 f
T4	49,3 ± 1,8 d
T5	56,7 ± 2,1 e
T6	32,3 ± 3,0 bc
T7	23,4 ± 0,4 a
T8	29,9 ± 0,4 ab
T10	38,3 ± 3,5 c
T11	25,5 ± 2,1 ab
T12	25,9 ± 0,2 ab
T13	25,5 ± 0,6 ab
GT1	87,5 ± 1,8 f

Taninos com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$).

A partir da tabela acima apresentada, constata-se que os vários taninos exibem valores de IPT com uma grande variedade desde os 23,4% até aos 87,5%. Os taninos que apresentaram os valores mais elevados, sem diferenças significativas, foram os taninos T2 e GT1 (taninos hidrolisáveis gálicos). De seguida, ainda fazendo parte dos que apresentam um maior valor de IPT, foi o tanino T5 (mix), contudo, apresentando diferenças significativas relativamente aos dois anteriores. Imediatamente após, surgem o tanino T4 (tanino hidrolisável gálico) e o tanino T10 (mix), ambos com diferenças significativas entre eles e com valores superiores aos restantes taninos T6 e T7 (taninos hidrolisáveis elágicos) e T1, T8, T11, T12 e T13 (taninos condensados). Destes últimos, tal como se pode inferir a partir da tabela acima, apenas os hidrolisáveis elágicos apresentam diferenças entre si. Assim, é possível concluir-se que existem diferenças significativas entre as diferentes famílias, sendo que os taninos hidrolisáveis gálicos superam os taninos mix, seguidos, por ordem decrescente, dos taninos hidrolisáveis elágicos e dos taninos condensados.

3. Determinação da atividade antioxidante

a. Método ABTS

As atividades antioxidantes dos vários taninos utilizados, representativos de várias origens, condensados, hidrolisáveis (gálicos e elágicos) e dois mix, descritos na Tabela 3, apresentam diferenças entre si. Desta forma, verifica-se que estes têm diferentes capacidades de estabilização do radical ABTS^{•+}.

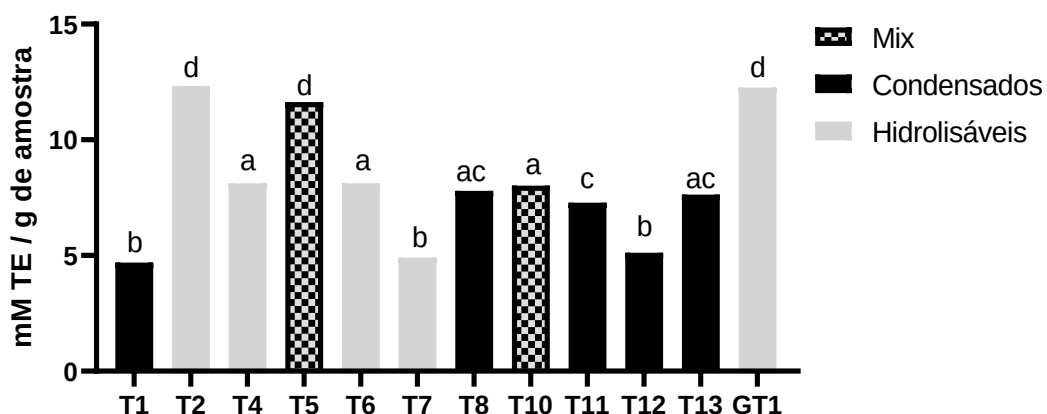


Figura 16. Gráfico representativo da atividade antioxidante de cada tanino pelo método ABTS. Taninos com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$).

A partir dos resultados obtidos, descritos na **Figura 16**, de uma forma geral, verificou-se que os diferentes taninos utilizados, embora representem vários níveis distintos de atividade antioxidante, apresentam todos alguma atividade, no que diz respeito à capacidade direta de estabilizar o radical ABTS. Visando de uma forma mais concreta cada uma das famílias de taninos, verifica-se que os efeitos medidos a partir deste método, apresentam pequenas diferenças, contudo algumas diferenças significativas.

Os taninos condensados apresentam de certa forma, uma atividade antioxidante constante entre eles, uma vez que, os dois seguintes grupos de taninos condensados não apresentam diferenças significativas intra grupo, (T1, T12) e (T8, T11, T13); inter grupo apresentam diferenças significativas, contudo pequenas variações. Já no caso dos taninos hidrolisáveis e dividindo-os sob 2 grupos, gálicos (T2, T4 e GT1) e elágicos (T6 e T7), apesar do T4 e T6 não apresentarem diferenças significativas, verificou-se que, de uma forma geral, os gálicos em comparação com os elágicos, apresentam uma maior atividade antioxidante. No que diz respeito ao caso dos dois mix estudados, estes apresentam uma atividade antioxidante interessante. O mix T10 (condensados, elágicos e gálicos), de uma forma geral, apresenta uma atividade antioxidante bastante similar à dos condensados. Já o T5, mix (gálico, elágico, catequínico), está a par do T2 e do GT1 (taninos hidrolisáveis gálicos), uma vez que não apresentam diferenças significativas. Assim, o T2 (gálico), o T5 (mix) e o GT1 (gálico) foram os taninos que exibiram as maiores atividades antioxidantes pelo método ABTS.

Com base nos dados obtidos e nos taninos utilizados, conclui-se então que, os taninos hidrolisáveis (gálicos) dispõem de uma atividade antioxidante superior quando comparados com os taninos condensados. Esta conclusão é importante, já que está de acordo com outros estudos efetuados também neste âmbito^{51,55}. Contudo, esses estudos, no que diz respeito às atividades antioxidantes estudadas, dependendo do método usado para as avaliar, apresentam por vezes resultados contraditórios nos quais a atividade antioxidante dos condensados supera a dos hidrolisáveis.

Um possível fator que pode ter influência sobre os dados obtidos é o facto dos taninos apresentarem diferentes IPT. Nesta circunstância, embora se aplique uma mesma quantidade de taninos, devido a possíveis impurezas, as quantidades reais aplicadas destes compostos polifenólicos são diferentes, potenciando diferenças nas atividades antioxidantes. Assim, pode haver uma relação entre os IPT e as atividades antioxidantes medidas, uma vez que os taninos que apresentaram um IPT superior foram também os taninos que verificaram as atividades antioxidantes maiores.

Com vista a verificar a existência desta relação, também já evidenciada noutros estudos^{76,77}, estabeleceu-se, na Figura 17, a relação entre o IPT dos taninos e as suas respetivas atividades antioxidantes.

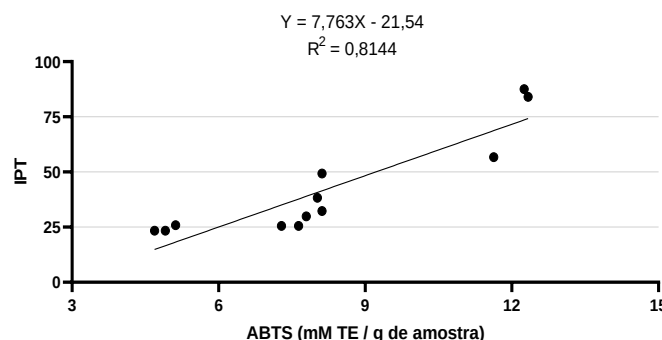


Figura 17. Gráfico representativo da relação entre IPT e atividade antioxidante dos taninos.

Tal como nos estudos mencionados acima, a partir da Figura 17, verifica-se também que a relação entre as duas variáveis é uma relação positiva e significativa, para uma confiança de 95% (gl=10; $\alpha=0,05$), na qual, um IPT maior está associado, geralmente, a uma maior atividade antioxidante.

Num cenário ideal, utilizar-se-iam taninos das diferentes famílias com valores de IPT significativamente iguais, de modo que esta variável não pudesse eventualmente ter influência sob as medições das atividades antioxidantes.

b. Método de captura de radicais hidroxilo

O método de captura de radicais hidroxilo teve em consideração as duas diferentes condições, “non site specific assay” e “site specific assay” apresentando variações interessantes aquando da presença ou ausência de EDTA.

Na primeira condição representada, Figura 18, de “non site specific assay”, ou seja, na presença de EDTA, é potenciada a formação de quelatos entre o EDTA e os iões de Fe^{2+} , sendo formados em solução, por consequência, os radicais hidroxilo⁷⁸. Neste caso, a inibição apresentada pelos taninos representa a eficiência destes em competir com a desoxirribose pelos radicais hidroxilo.

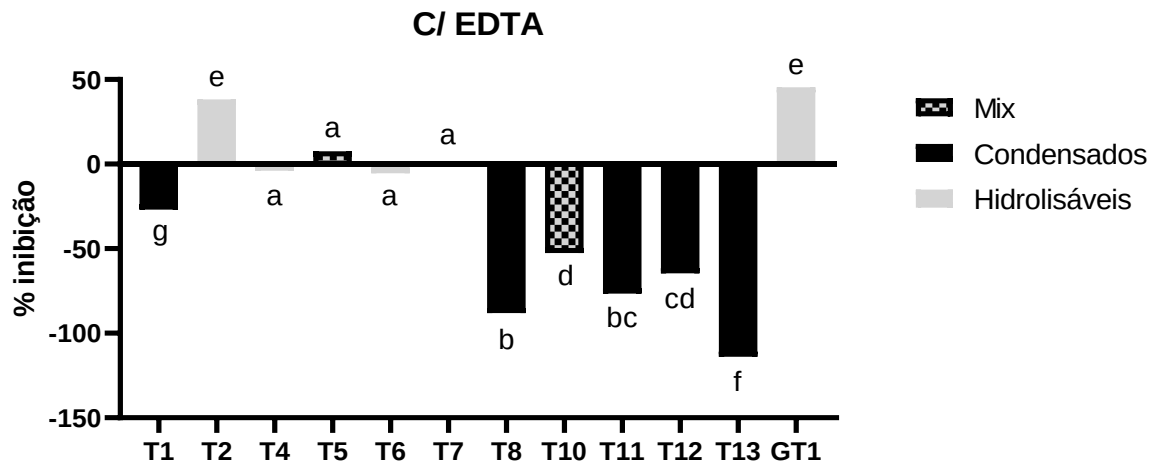


Figura 18. Gráfico representativo da capacidade de inibição, em percentagem, de cada tanino pelo método de captura de radicais hidroxilo. Tratamento com EDTA. Taninos com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$).

A partir da análise dos resultados, verifica-se que tendenciosamente os taninos hidrolisáveis gálicos T2 e GT1 e o mix T5 apresentam uma capacidade inibitória bastante superior à dos taninos hidrolisáveis elágicos, condensados e do mix T10. Ao contrário dos taninos T2, GT1 e T5, os restantes apresentam uma tendência de atividade pro-oxidante bastante acentuada, contrastando com o que se esperaria a nível de atividade antioxidante por parte dos taninos de uma forma geral. Para além disso, dado que a inibição obtida representa a competição destes com a desoxirribose pela captura dos radicais hidroxilo, pode-se inferir que a razão pela qual os taninos hidrolisáveis gálicos (T2 e GT1) apresentam uma inibição bastante superior quando comparada com os restantes hidrolisáveis, condensados e mix, deve-se à eficácia que estes apresentam nessa competição, sendo os únicos em estudo, aparentemente, capazes de o fazer.

Apesar de se constatar a tendência já referida, relacionada com as famílias de taninos, mesmo entre elas há evidência de diferenças significativas. No que diz respeito aos taninos hidrolisáveis e contando com a sua subdivisão em gálicos e elágicos, evidencia-se que há diferenças significativas entre hidrolisáveis gálicos (T2 e GT1) e os restantes hidrolisáveis (T4, T6 e T7). Assim, os taninos T2 e GT1 representam a família de taninos hidrolisáveis gálicos como sendo a que tem maior capacidade inibitória no estudo. No caso dos hidrolisáveis T4, T6 e T7, embora estes apresentem atividade pro-oxidante, apresentam também alguma neutralidade, não tendo nem capacidade para competir com a desoxirribose, nem grande atividade pro-oxidante.

Aludindo aos taninos condensados e ao tanino mix T10, estes apresentam também diferenças significativas entre eles, contudo, de acordo com o estudo, todos evidenciam uma atividade pro-oxidante bastante elevada.

Agora, para a condição de “site specific assay”, ou seja, na ausência de EDTA, a produção dos radicais hidroxilo é potenciada pela ligação de Fe^{3+} à desoxirribose⁷⁸. No caso desta condição, a inibição associada a cada tanino pode ser representativa de dois panoramas. Primeiramente, pode estar relacionada com a capacidade dos taninos para formar quelatos com os iões ferro, o que provocaria a inibição da formação dos radicais hidroxilo, ou pode apresentar uma relação com a captura de radicais hidroxilo.

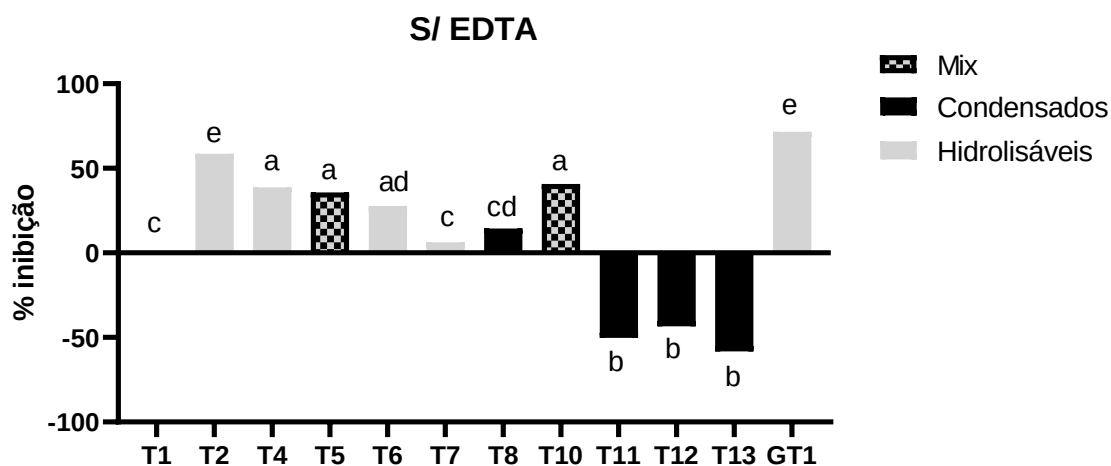


Figura 19. Gráfico representativo da capacidade de inibição, em percentagem, de cada tanino pelo método de captura de radicais hidroxilo. Tratamento sem EDTA. Taninos com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tal como registada anteriormente, a tendência da capacidade inibitória ser superior nos taninos hidrolisáveis comparativamente às outras famílias repete-se, contudo, com variações distintas, agora com a ausência do EDTA.

Com base nos resultados apresentados na Figura 19, verifica-se que os taninos hidrolisáveis, os taninos mix e ainda o tanino condensado (T8) possuem uma determinada atividade antioxidante/capacidade inibitória. Esta atividade/capacidade apresentada por eles pode dever-se principalmente às suas capacidades quelantes, uma vez que, não há evidência à exceção do T2, do GT1 e do T5, de que os restantes apresentem qualquer tipo de capacidade para capturar radicais hidroxilo, tendo em consideração o ensaio tratado com EDTA. Contrastando com os anteriores, os taninos da família dos condensados (T11, T12 e T13) foram os únicos que apresentaram uma

atividade pro-oxidante em ambas as condições do método e, portanto, são os que apresentam uma pior performance a nível antioxidante. Estes últimos, contrariamente a todos os outros, aparentemente não apresentaram nem capacidade de formar quelatos com os iões ferro, nem de capturarem os radicais hidroxilo.

Quanto às diferenças significativas, verificou-se que os taninos hidrolisáveis gálicos (T2, GT1) evidenciam diferenças significativas entre os restantes hidrolisáveis (T4, T6) e (T7). A par com as inibições obtidas pelos taninos hidrolisáveis (T4, T6) estão os dois taninos mix (T5, T10) que não têm diferenças significativas entre si. Os taninos condensados (T1, T8) e o tanino hidrolisável elágico (T7) não apresentam diferenças entre si, tal como se sucede com os taninos condensados (T11, T12, T13).

Tendo em consideração os dados obtidos para ambas as condições, relativos a todos os taninos utilizados, conclui-se então que, os taninos hidrolisáveis gálicos, de uma forma geral, dispõem de uma atividade antioxidante superior quando comparados com os taninos hidrolisáveis elágicos e condensados, dado que, os primeiros aparentam capacidades quelantes e ainda capacidade de competir com a desoxirribose pela captura dos radicais hidroxilo. Estes resultados, tal como no caso dos obtidos no método ABTS, estão de acordo com a bibliografia^{51,55}.

4. Caraterísticas cromáticas

A avaliação das caraterísticas cromáticas realizou-se com base nos dois recursos seguintes, no método de Boulton e no sistema CIELab. Para tal, e como referido anteriormente, utilizaram-se três vinhos tintos de modo a poder avaliar as variações, a nível das caraterísticas cromáticas, provocadas pelos taninos. Os parâmetros físico-químicos de cada vinho utilizado estão indicados na **Tabela 7**. No que diz respeito aos taninos utilizados, para avaliar os seus impactos a nível cromático, definiram-se quatro taninos com base nas diferentes famílias, dois taninos hidrolisáveis e dois taninos condensados, T2 e GT1, T11 e T12, respetivamente.

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos caraterísticos dos vinhos tintos utilizados.

Amostras (Vinhos tintos)	20	21	10
Teor alcoólico (% v/v)	12,28	14,78	12,83
Massa volúmica (g/cm ³)	0,9942	0,9921	0,9932
Ac. total (g/dm ³ de ácido tartárico)	6,72	5,98	5,82
Ac. volátil (g/dm ³ de ácido acético)	0,54	0,47	0,61
pH	3,39	3,54	3,59
SO ₂ livre (mg SO ₂ /dm ³)	29	33	20
Açúcares redutores (g/dm ³)	3,0	1,5	3,6
Ácido málico (g/dm ³)	0,00	0,00	0,00

a. Método de Boulton

Um dos importantes pontos a ter em consideração, quando se fala da adição de taninos aos vinhos, é o impacto que estes podem representar sobre as caraterísticas cromáticas dos mesmos. Com base nisso, o objetivo da aplicação deste método é o de avaliar as possíveis alterações provocadas pelos taninos sobre a cor total dos vinhos, as cores provenientes das antocianinas e avaliar ainda o fenómeno da copigmentação. Os registos que se obtiveram para os vários ensaios de adição dos diferentes taninos, estão representados de seguida na **Tabela 8**. Nesta, com base em ensaios duplicados, estão apresentados os valores médios, os desvios padrões e ainda as diferenças significativas entre os taninos, quando comparados entre eles e com o ensaio que serve de controlo de cada vinho (sem adição de taninos, concentração igual a 0).

A partir dos resultados obtidos, verifica-se imediatamente que de todos os parâmetros avaliados, o primeiro, referente à cor total, é o que assinala maioritariamente diferenças significativas.

Tabela 8. Listagem dos parâmetros do método de Boulton relativos às diferentes adições de taninos aos vinhos.

	Tani no	Concen tração (g/L)	Cor total	Cor antocianinas	Pigmentação resistente ao SO ₂	Copigmen tação
Vinho 20	-	-	14,54 ± 0,66 abc	8,31 ± 0,85	3,94 ± 0,09	2,24 ± 0,37
	T2	0,10	14,09 ± 0,49 ab	7,44 ± 0,81	3,97 ± 0,01	3,51 ± 0,87
		0,20	14,44 ± 0,17 a	8,71 ± 0,59	3,97 ± 0,07	2,53 ± 0,76
		0,40	14,68 ± 0,07 abcd	9,42 ± 1,76	3,92 ± 0,07	1,91 ± 1,65
	GT1	0,10	15,04 ± 0,19 abcd	8,65 ± 1,29	3,88 ± 0,04	2,88 ± 1,26
		0,20	15,17 ± 0,08 abcd	9,56 ± 0,38	3,91 ± 0,05	2,01 ± 0,25
		0,40	15,44 ± 0,07 bcd	8,54 ± 0,13	3,96 ± 0,03	3,17 ± 0,02
	T11	0,10	15,17 ± 0,18 abcd	8,59 ± 0,94	3,88 ± 0,15	2,84 ± 0,93
		0,20	15,22 ± 0,08 bcd	10,01 ± 0,11	3,91 ± 0,03	1,49 ± 0,04
		0,40	14,76 ± 0,04 abcd	9,86 ± 0,91	3,94 ± 0,08	1,57 ± 0,77
	T12	0,10	15,33 ± 0,43 bcd	8,21 ± 0,58	3,86 ± 0,05	2,93 ± 1,13
		0,20	15,63 ± 0,06 cd	8,94 ± 0,06	3,90 ± 0,03	2,53 ± 0,07
		0,40	15,66 ± 0,06 d	8,56 ± 1,73	3,96 ± 0,01	3,02 ± 1,73
Vinho 21	-	-	8,20 ± 0,32 a	5,47 ± 0,12 ab	3,00 ± 0,02 a	1,01 ± 0,13
	T2	0,10	8,76 ± 0,09 bc	4,04 ± 0,37 a	3,07 ± 0,03 bc	2,74 ± 0,35
		0,20	8,62 ± 0,03 b	4,96 ± 0,14 ab	3,08 ± 0,01 bc	1,96 ± 0,13
		0,40	8,69 ± 0,01 bc	5,53 ± 0,70 ab	3,10 ± 0,01 bc	1,50 ± 0,78
	GT1	0,10	8,73 ± 0,05 bc	4,60 ± 0,54 ab	3,06 ± 0,00 b	2,35 ± 0,36
		0,20	8,89 ± 0,03 bc	6,09 ± 0,47 ab	3,11 ± 0,00 bc	1,03 ± 0,49
		0,40	8,99 ± 0,01 bc	6,08 ± 0,19 ab	3,11 ± 0,00 c	1,11 ± 0,19
	T11	0,10	8,77 ± 0,11 bc	5,63 ± 0,12 ab	3,07 ± 0,01 bc	1,30 ± 0,02
		0,20	8,92 ± 0,06 bc	6,17 ± 1,31 b	3,11 ± 0,01 c	0,82 ± 1,34
		0,40	8,68 ± 0,03 bc	5,08 ± 0,32 ab	3,10 ± 0,00 bc	1,96 ± 0,26
	T12	0,10	8,97 ± 0,10 bc	5,36 ± 0,57 ab	3,07 ± 0,03 bc	1,73 ± 0,53
		0,20	9,08 ± 0,04 c	5,86 ± 0,13 ab	3,12 ± 0,01 c	1,27 ± 0,13
		0,40	8,99 ± 0,03 bc	5,54 ± 0,48 ab	3,12 ± 0,00 c	1,65 ± 0,50
Vinho 10	-	-	12,20 ± 0,19 a	5,60 ± 0,46 a	3,44 ± 0,02 ab	3,24 ± 0,47 a
	T2	0,10	12,69 ± 0,04 def	5,90 ± 0,47 ab	3,45 ± 0,01 ab	3,08 ± 0,46 a
		0,20	12,16 ± 0,03 a	6,19 ± 0,10 ab	3,43 ± 0,01 ab	2,63 ± 0,09 ab
		0,40	12,14 ± 0,05 a	7,25 ± 0,60 b	3,42 ± 0,00 ab	1,50 ± 0,63 b
	GT1	0,10	12,53 ± 0,14 bcd	5,79 ± 0,00 ab	3,35 ± 0,08 a	3,25 ± 0,04 a
		0,20	12,33 ± 0,00 abc	6,29 ± 0,27 ab	3,39 ± 0,01 ab	2,50 ± 0,29 ab
		0,40	12,67 ± 0,08 def	6,56 ± 0,68 ab	3,45 ± 0,01 ab	2,42 ± 0,71 ab
	T11	0,10	12,64 ± 0,04 cde	6,21 ± 0,14 ab	3,42 ± 0,04 ab	2,63 ± 0,24 ab
		0,20	12,75 ± 0,06 defg	6,40 ± 0,47 ab	3,46 ± 0,01 b	2,52 ± 0,44 ab
		0,40	12,28 ± 0,02 ab	6,40 ± 0,03 ab	3,46 ± 0,00 ab	2,51 ± 0,02 ab
	T12	0,10	12,97 ± 0,05 fg	6,95 ± 0,09 ab	3,43 ± 0,01 ab	2,03 ± 0,10 ab
		0,20	12,88 ± 0,07 efg	6,63 ± 0,01 ab	3,48 ± 0,03 b	2,38 ± 0,04 ab
		0,40	13,05 ± 0,06 g	6,04 ± 0,50 ab	3,48 ± 0,00 b	3,09 ± 0,51 a

Valores com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$). Valores sem presença de letras indicam a não existência de diferenças significativas entre o grupo analisado.

No geral, uma vez que há evidência de várias diferenças significativas na cor total aquando da adição dos taninos, é possível concluir-se que existe um impacto destes sobre este parâmetro.

No que diz respeito aos restantes parâmetros avaliados, seria de esperar que a possível ocorrência do fenómeno da copigmentação, potenciase a existência de maiores diferenças significativas, entre os vinhos com adição de taninos e o controlo. Apesar dessa possibilidade, não se verificaram maioritariamente diferenças significativas nesse âmbito. Uma possível razão para a não evidência deste fenómeno, poderá ser uma questão de tempo insuficiente para que a reação, entre os taninos e as antocianinas, ocorresse na totalidade, uma vez que os ensaios foram analisados no próprio dia em que foram preparados.

Desta forma, focando essencialmente no parâmetro da cor total e refletindo sobre os efeitos dos taninos neste parâmetro, verificaram-se variações interessantes, visualizáveis a partir dos gráficos seguintes, **Figura 20**.

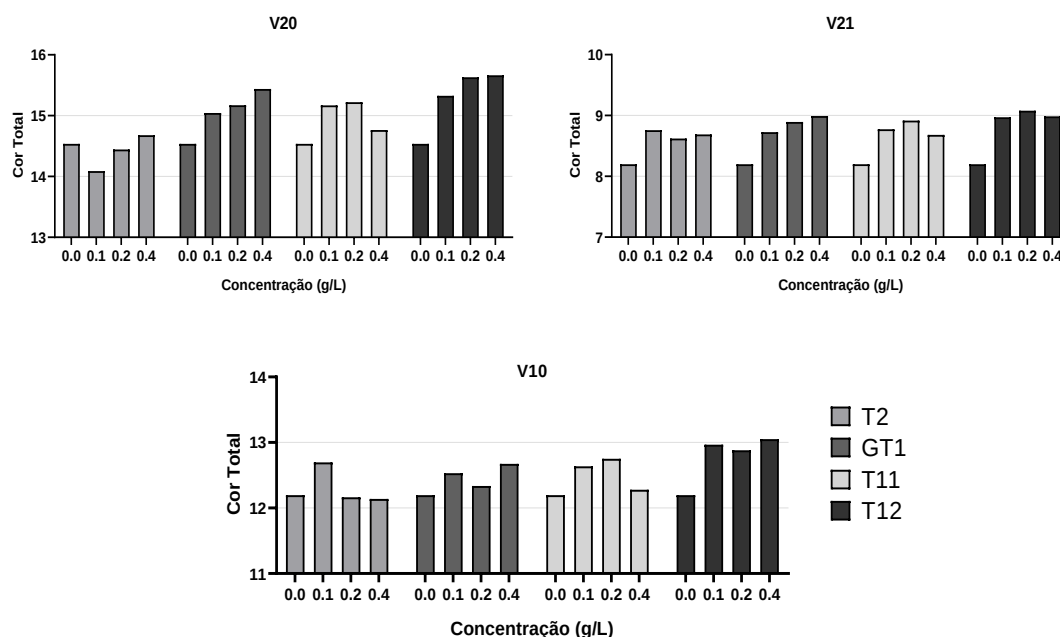


Figura 20. Gráficos representativos da influência da aplicação dos taninos na cor total dos vinhos, V20, V21, V10.

A partir destes gráficos, é possível inferir que há taninos que apresentam diferentes níveis de impacto sobre a cor total. Para os três casos (V20, V21, V10), verifica-se a possibilidade de uma tendência nos impactos causados por alguns taninos. Tendo em consideração os gráficos acima, é possível identificar uma relação entre a concentração de taninos aplicada e a variação verificada. Na generalidade, embora em alguns casos ocorra alguma exceção, o impacto dos taninos GT1 e T12 sobre a cor total

parece ser dependente da concentração adicionada. Quanto ao tanino que frequentemente exibe um impacto superior sobre a cor total, é o tanino T12 (condensado). De seguida, o tanino GT1 (hidrolisável) e T11 (condensado) apresentam valores médios semelhantes quanto às variações provocadas pela aplicação dos mesmos, contudo o GT1 apresenta uma ligeira superioridade nesse âmbito. De uma forma geral, o tanino T2 (hidrolisável) é o que representa o menor impacto de entre os quatro analisados. Assim, focando nos taninos T12 e no T2, embora se possa afirmar que, nestes casos, o tanino condensado (T12) influencia mais a cor total que o tanino hidrolisável (T2), torna-se difícil de especificar e/ou prever o papel das famílias dos taninos sobre o impacto que estes podem provocar, considerando que os efeitos dos restantes taninos, hidrolisável (GT1) e condensado (T11), aparentam ser semelhantes.

b. CIElab

O efeito direto que a aplicação dos taninos teve sobre as variações das absorvâncias também foi avaliado. Para esse efeito, realizou-se uma comparação entre elas, **Figura 21**, para o comprimento de onda ao qual ocorre o pico máximo das absorvâncias. Na figura seguinte estão apresentados os dados para os três vinhos analisados. No caso dos vinhos V20 e V21, o comprimento de onda é aos 530 nm e para o V10 é aos 535 nm, correspondentes ao pico máximo de absorvância exibido.

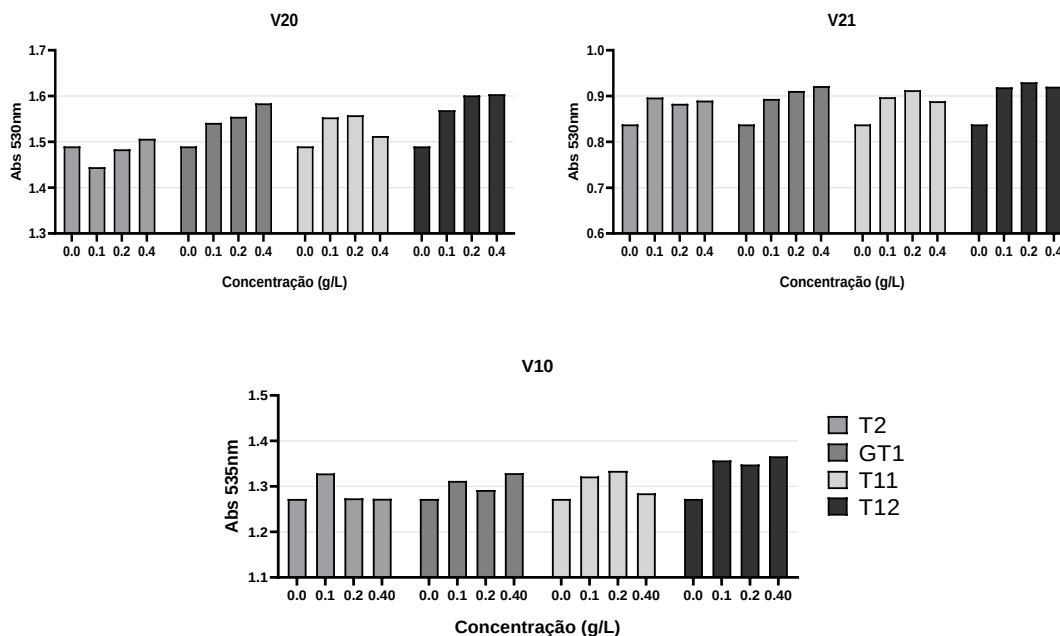


Figura 21. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos no pico máximo das absorvâncias obtidas para os vinhos, V20, V21, V10.

Tendo em conta os taninos e as concentrações estudadas, aquando da adição dos mesmos, na maioria dos casos, verificaram-se aumentos das absorvâncias. A partir dos resultados exibidos, infere-se que o tanino T12 é o que provoca, na generalidade, o maior aumento das absorvâncias, apesar de não variar de forma totalmente uniforme para o aumento das concentrações. O tanino GT1 é o que aparenta responder melhor, com um aumento mais homogéneo da absorvância aquando do aumento da sua concentração, apresentando apenas uma quebra nesta tendência para o caso da concentração 0,20 g/L no V10. Quanto aos restantes dois taninos, o T11, aparenta exibir esta dependência da concentração apenas para as concentrações 0,1 e 0,2 g/L, e o tanino T2 apresenta diferentes variações entre as várias concentrações, não ocorrendo necessariamente uma ordem em função da concentração.

Desta forma, assumindo os ensaios dos três vinhos, parte dos resultados apresentaram uma relação de dependência, embora, não totalmente uniforme, entre o aumento da concentração de taninos e o aumento das absorvâncias. Esta observação está parcialmente a par com os resultados obtidos por Vignault *et al.* (2019)⁷⁹. Nesse estudo, os resultados mostram um aumento uniforme das absorvâncias advindo do aumento da concentração de taninos. Uma das possíveis razões para a ocorrência destas diferenças entre os dois estudos, pode estar relacionada com o *timing* das análises, pelo facto dos resultados de Vignault *et al.* (2019) serem relativos a análises efetuadas uma semana após a aplicação dos taninos. Outra possível razão, será a matriz na qual foram realizados os ensaios, uma vez que no estudo de Vignault *et al.* (2019), a matriz utilizada foi uma solução de vinho sintético com a presença da principal antocianina dos vinhos (*malvidina-3-O-glucosido*), contrastando com a matriz utilizada para este documento, que foram amostras de vinho às quais foram adicionadas taninos.

A partir das variações observadas acima, é de esperar que ocorram diferenças a nível das características cromáticas das amostras. Assim, a partir do sistema CIELab e de todos os parâmetros que este representa, pretende-se avaliar de uma forma mais clara qual o impacto da adição dos taninos sobre os parâmetros em questão. Na tabela seguinte, **Tabela 9**, com base em ensaios duplicados, estão apresentados os valores médios, os desvios padrões e as diferenças significativas entre os ensaios. Na **Tabela 9**, os dados apresentados são relativos a todos os parâmetros do sistema CIELab e dois parâmetros do método de Glories (IC e T).

Tabela 9. Listagem dos vários parâmetros obtidos pelo sistema CIELab e pelo método de Glories relativos às diferentes adições de taninos aos diferentes vinhos.

		Tanino	Conc. (g/L)	L *	a*	b*	C*	h°	ΔE	IC	T
Vinho 20	T2	-	-	1,59 ± 0,61 ac	28,96 ± 0,92 ac	29,95 ± 0,94 ac	41,66 ± 1,32 ac	0.8021 ± 0,0002 ab	”	2,49 ± 0,12 ab	0.521 ± 0,001 abcd
			0,10	2,02 ± 0,39 c	29,64 ± 0,59 c	30,62 ± 0,58 c	42,62 ± 0,83 c	0.8017 ± 0,0004 b	1,05 ± 0,53	2,42 ± 0,08 b	0.521 ± 0,001 abcd
			0,20	2,01 ± 0,11 c	29,64 ± 0,15 c	30,65 ± 0,15 c	42,63 ± 0,21 c	0.8022 ± 0,0001 abc	1,06 ± 1,21	2,47 ± 0,03 ab	0.517 ± 0,001 b
			0,40	1,77 ± 0,05 ac	29,28 ± 0,08 ac	30,30 ± 0,08 ac	42,14 ± 0,11 ac	0.8025 ± 0,0000 acd	1,11 ± 0,72	2,52 ± 0,01 abc	0.524 ± 0,002 ade
	GT1		0,10	1,84 ± 0,14 c	29,43 ± 0,22 c	30,46 ± 0,22 c	42,35 ± 0,31 c	0.8026 ± 0,0001 acd	0,80 ± 1,02	2,57 ± 0,04 abc	0.520 ± 0,002 abcd
			0,20	1,45 ± 0,16 abc	28,80 ± 0,26 abc	29,80 ± 0,27 abc	41,44 ± 0,37 abc	0.8025 ± 0,0001 acd	1,31 ± 0,37	2,60 ± 0,01 abc	0.522 ± 0,002 abcd
			0,40	1,14 ± 0,12 abc	28,30 ± 0,19 abc	29,29 ± 0,20 abc	40,73 ± 0,28 abc	0.8026 ± 0,0000 acd	1,04 ± 1,15	2,64 ± 0,01 ac	0.518 ± 0,001 bc
	T11		0,10	1,70 ± 0,31 ac	29,20 ± 0,50 ac	30,23 ± 0,52 ac	42,02 ± 0,72 ac	0.8027 ± 0,0000 d	0,48 ± 0,51	2,59 ± 0,03 abc	0.520 ± 0,001 abc
			0,20	1,58 ± 0,08 ac	29,01 ± 0,13 ac	30,03 ± 0,13 ac	41,76 ± 0,18 ac	0.8026 ± 0,0000 cd	0,89 ± 0,12	2,61 ± 0,01 ac	0.523 ± 0,001 acd
			0,40	1,81 ± 0,10 ac	29,37 ± 0,16 ac	30,40 ± 0,17 c	42,27 ± 0,23 c	0.8026 ± 0,0000 acd	0,85 ± 0,91	2,54 ± 0,01 abc	0.529 ± 0,001 e
	T12		0,10	1,00 ± 0,48 abc	28,09 ± 0,75 abc	29,06 ± 0,78 abc	40,42 ± 1,08 abc	0.8023 ± 0,0001 acd	1,38 ± 0,27	2,63 ± 0,07 ac	0.525 ± 0,001 de
			0,20	0,74 ± 0,08 ab	27,68 ± 0,13 ab	28,64 ± 0,14 ab	39,83 ± 0,19 ab	0.8024 ± 0,0000 acd	2,02 ± 1,24	2,68 ± 0,01 c	0.524 ± 0,001 ade
			0,40	0,44 ± 0,23 b	27,17 ± 0,37 b	28,12 ± 0,38 b	39,10 ± 0,53 b	0.8026 ± 0,0000 acd	2,81 ± 0,87	2,69 ± 0,01 c	0.528 ± 0,001 e

L* = preto(0) / branco(100); a* = verde(-) / vermelho(+); b* = azul(-) / amarelo(+); C* = saturação da cor; h° = tonalidade da cor; ΔE^* = diferença total entre duas cores. Valores com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$). Valores sem presença de letras indicam a não existência de diferenças significativas entre o grupo analisado.

Tabela 9. (Cont.)

		Tanino	Conc. (g/L)	L *	a*	b*	C*	h°	ΔE	IC	T
Vinho 21	T2		-	9,05 ± 0,6 a	39,84 ± 0,79 a	40,25 ± 0,57 a	56,63 ± 0,96 a	0.7904 ± 0,0028 a	''	1,50 ± 0,06 a	0.628 ± 0,001 abcd
			0,10	7,55 ± 0,14 bc	37,73 ± 0,20 bc	38,40 ± 0,17 bc	53,83 ± 0,26 bc	0.7942 ± 0,0004 bc	3,19 ± 0,84	1,61 ± 0,01 bc	0.628 ± 0,001 abcde
			0,20	7,76 ± 0,07 bc	38,03 ± 0,11 bc	38,66 ± 0,09 bc	54,23 ± 0,14 bc	0.7936 ± 0,0002 ab	2,74 ± 0,97	1,59 ± 0,01 b	0.633 ± 0,001 ef
			0,40	7,69 ± 0,04 bc	37,93 ± 0,07 bc	38,60 ± 0,08 bc	54,11 ± 0,11 bc	0.7941 ± 0,0001 bc	2,87 ± 1,25	1,60 ± 0,00 bc	0.632 ± 0,001 def
		GT1	0,10	7,84 ± 0,06 b	38,18 ± 0,08 b	38,86 ± 0,06 b	54,48 ± 0,10 b	0.7942 ± 0,0003 bc	2,48 ± 1,02	1,60 ± 0,01 bc	0.629 ± 0,000 abcde
			0,20	7,51 ± 0,15 bc	37,72 ± 0,22 bc	38,47 ± 0,20 bc	53,87 ± 0,30 bc	0.7952 ± 0,0003 bc	3,17 ± 0,81	1,63 ± 0,01 bc	0.627 ± 0,002 abc
			0,40	7,29 ± 0,03 bc	37,38 ± 0,05 bc	38,15 ± 0,06 bc	53,40 ± 0,07 bc	0.7956 ± 0,0001 bc	3,69 ± 1,21	1,65 ± 0,00 bc	0.624 ± 0,000 a
		T11	0,10	7,71 ± 0,18 bc	38,00 ± 0,24 bc	38,71 ± 0,19 b	54,24 ± 0,31 bc	0.7947 ± 0,0007 bc	2,75 ± 0,78	1,61 ± 0,02 bc	0.630 ± 0,000 cde
			0,20	7,56 ± 0,11 bc	37,81 ± 0,16 bc	38,59 ± 0,14 bc	54,03 ± 0,21 bc	0.7957 ± 0,0003 bc	3,01 ± 0,90	1,64 ± 0,01 bc	0.629 ± 0,001 bcde
			0,40	7,81 ± 0,03 b	38,15 ± 0,04 b	38,86 ± 0,03 b	54,45 ± 0,05 b	0.7946 ± 0,0001 bc	2,52 ± 1,07	1,60 ± 0,01 bc	0.636 ± 0,001 fg
		T12	0,10	7,46 ± 0,26 bc	37,64 ± 0,38 bc	38,42 ± 0,33 bc	53,78 ± 0,50 bc	0.7956 ± 0,0007 bc	3,28 ± 0,57	1,64 ± 0,02 bc	0.625 ± 0,001 ab
			0,20	7,16 ± 0,09 bc	37,20 ± 0,13 bc	38,06 ± 0,12 bc	53,22 ± 0,17 bc	0.7968 ± 0,0002 bc	3,92 ± 0,94	1,67 ± 0,01 c	0.630 ± 0,000 cde
			0,40	6,99 ± 0,15 c	36,92 ± 0,24 c	37,79 ± 0,23 c	52,83 ± 0,33 c	0.7970 ± 0,0001 c	4,34 ± 0,77	1,66 ± 0,01 bc	0.639 ± 0,000 g

L* = preto(0) / branco(100); a* = verde(-) / vermelho(+); b* = azul(-) / amarelo(+); C* = saturação da cor; h° = tonalidade da cor; ΔE* = diferença total entre duas cores. Valores com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas (p < 0,05). Valores sem presença de letras indicam a não existência de diferenças significativas entre o grupo analisado.

Tabela 9. (Cont.)

Tanino	Conc. (g/L)	L *	a*	b*	C*	h°	ΔE	IC	T
-	-	2,46 ± 0,16 ae	30,35 ± 0,24 ae	31,10 ± 0,24 ae	43,45 ± 0,34 ae	0.7977 ± 0,0002 ac	"	2,17 ± 0,03 a	0.558 ± 0,003 a
Vinho 10	T2	0,10	2,26 ± 0,02 acd	30,05 ± 0,03 acd	30,83 ± 0,02 acde	43,05 ± 0,04 acd	0.7983 ± 0,0001 de a	0,45 ± 0,33 a	2,24 ± 0,01 bcde b
		0,20	2,54 ± 0,03 e	30,48 ± 0,04 e	31,21 ± 0,04 e	43,63 ± 0,05 e ab	0.7972 ± 0,0001 a	0,23 ± 0,27 a	2,16 ± 0,01 a ad
		0,40	2,36 ± 0,05 ade	30,19 ± 0,07 ade	30,90 ± 0,07 acde	43,20 ± 0,10 acde b	0.7969 ± 0,0001 a	0,28 ± 0,26 a	2,16 ± 0,01 a a
	GT1	0,10	2,48 ± 0,12 ae	30,39 ± 0,18 ae	31,16 ± 0,17 e	43,53 ± 0,25 ae cd	0.7980 ± 0,0003 a	0,08 ± 0,09 a	2,21 ± 0,02 abc b
		0,20	2,25 ± 0,01 acd	30,05 ± 0,02 acd	30,76 ± 0,02 acd	43,00 ± 0,02 acd ab	0.7972 ± 0,0000 a	0,50 ± 0,35 a	2,19 ± 0,00 ab ad
		0,40	2,09 ± 0,00 c	29,79 ± 0,00 c	30,54 ± 0,01 c	42,66 ± 0,00 c cd	0.7979 ± 0,0001 ab	0,88 ± 0,38 ab	2,24 ± 0,01 bcde bc
	T11	0,10	2,47 ± 0,01 ae	30,40 ± 0,01 ae	31,19 ± 0,00 e	43,56 ± 0,01 ae def	0.7983 ± 0,0001 a	0,26 ± 0,14 a	2,23 ± 0,01 bcd bc
		0,20	2,38 ± 0,01 ade	30,27 ± 0,02 ade	31,07 ± 0,01 ade	43,38 ± 0,02 ade efg	0.7985 ± 0,0002 a	0,26 ± 0,14 a	2,25 ± 0,01 cde bc
		0,40	2,84 ± 0,03 f	30,97 ± 0,05 f	31,76 ± 0,04 f	44,35 ± 0,06 f cde	0.7980 ± 0,0001 ab	0,98 ± 0,30 ab	2,17 ± 0,00 a ad
	T12	0,10	2,13 ± 0,07 cd	29,88 ± 0,12 cd	30,69 ± 0,12 cd	42,84 ± 0,17 cd fg	0.7988 ± 0,0001 ab	0,70 ± 0,56 ab	2,28 ± 0,01 ef b
		0,20	2,07 ± 0,07 c	29,77 ± 0,10 c	30,58 ± 0,10 c	42,68 ± 0,14 c gh	0.7989 ± 0,0001 ab	0,87 ± 0,22 ab	2,28 ± 0,01 def cd
		0,40	1,72 ± 0,05 b	28,21 ± 0,08 b	30,04 ± 0,07 b	41,90 ± 0,11 b h	0.7994 ± 0,0001 b	1,72 ± 0,26 b	2,31 ± 0,01 f ad

L* = preto(0) / branco(100); a* = verde(-) / vermelho(+); b* = azul(-) / amarelo(+); C* = saturação da cor; h° = tonalidade da cor; ΔE* = diferença total entre duas cores. Valores com a mesma letra indicam que não há diferenças significativas entre eles, letras diferentes há diferenças significativas ($p < 0,05$). Valores sem presença de letras indicam a não existência de diferenças significativas entre o grupo analisado.

Partindo de uma análise mais generalista dos dados, é possível verificar, que a aplicação dos vários taninos influencia de forma significativa os diferentes parâmetros. Assim, a partir da Tabela 9, de uma forma geral, é possível constatar que entre os vários ensaios ocorrem variações tanto nos parâmetros qualitativos relativos à luminosidade, aos vermelhos e aos amarelos como nos parâmetros quantitativos relativos à saturação da cor e à tonalidade. Contudo, a utilização de diferentes taninos confere diferentes tipos de variações. De seguida, de modo a auxiliar a discussão sobre os dados, estes serão apresentados também sob a forma de gráficos.

• Luminosidade, L^*

No parâmetro da luminosidade, L^* , quando comparados os ensaios de controlo (vinhos sem adição de taninos, $C = 0,0$ g/L) com os ensaios com adição de taninos nas várias concentrações, verificaram-se algumas variações que promoveram nuns casos, o aumento da luminosidade e noutros a diminuição da mesma.

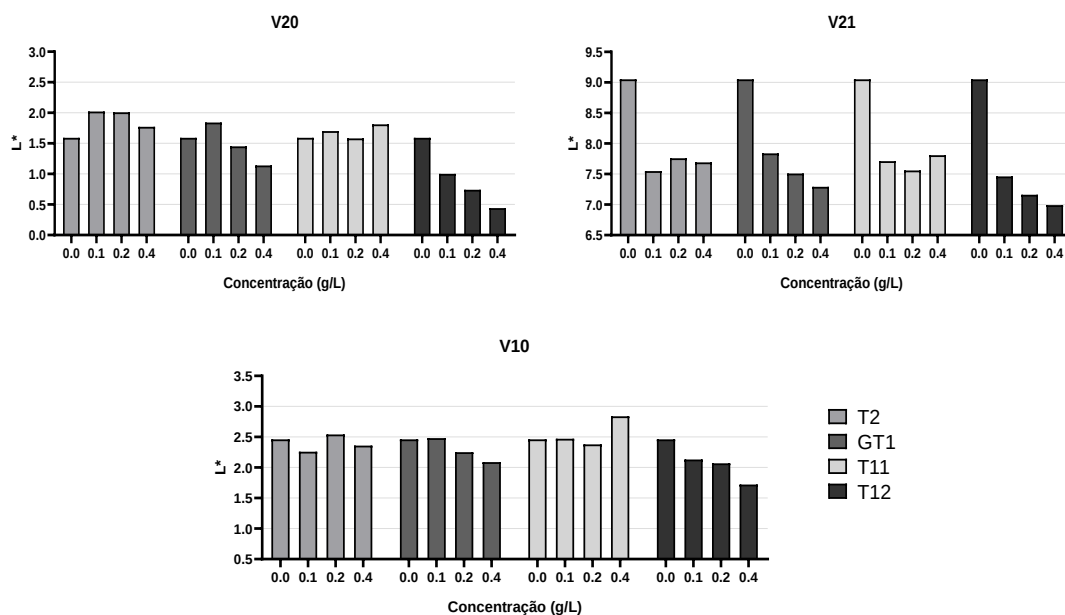


Figura 22. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos no parâmetro da luminosidade, L^* , nos vinhos V20, V21 e V10.

Recorrendo aos gráficos presentes na Figura 22, verifica-se que após a adição dos taninos, a luminosidade dos três vinhos é afetada de maneira distinta, dependendo de qual o tanino e concentrações aplicadas.

Em análise dos dados, para os vinhos V20 e V10, constata-se que a adição de diferentes taninos nas várias concentrações provoca diferentes variações. Conforme se evidencia pelos gráficos, o impacto da adição dos taninos T12 e GT1, aparenta ser

dependente e proporcional à concentração adicionada, resultando num maior impacto quanto maior a sua concentração. Na maioria dos casos, estes dois taninos promovem a diminuição da luminosidade. Já os taninos T2 e T11, apresentam impactos com menores variações e não apresentam nenhuma dependência relativamente às concentrações. Destes dois últimos, o T2, apresenta em alguns dos casos, um aumento da luminosidade, contudo ocorrendo exceções verificáveis a partir do gráfico. O T11, geralmente, promove também um ligeiro aumento da luminosidade.

Frequentemente, dos quatro taninos em estudo, o tanino que impõe uma maior variação da luminosidade é o tanino T12. Os taninos que aparentam promover menores variações da luminosidade aquando da sua adição são o tanino T2 e o T11. As diferenças significativas registadas na Tabela 9, estão a par destas afirmações, uma vez que o T12 é, geralmente, o que apresenta maiores diferenças significativas, contrastando com os outros dois, T2 e T11, taninos em que acontece o oposto.

Contudo, para o vinho V21, os taninos representam um diferente papel comparativamente aos vinhos V20 e V10, uma vez que promovem, em qualquer uma das situações, a diminuição significativa da luminosidade. Apesar disso, o tipo de comportamento das variações provocadas pela adição de taninos (serem ou não dependentes da concentração) mantém-se. Uma possível justificação para a diferença de resposta após a adição dos taninos pode estar relacionada com o L^* inicial de cada vinho. Assim, tendo em consideração que o vinho V21 apresenta uma luminosidade muito superior ao V20 e V10, parece haver evidência de que a aplicação de taninos em vinhos mais luminosos pode representar um maior impacto e uma maior diminuição da luminosidade.

Uma relação interessante de mencionar, já referenciada por Alamela *et al.* (2010)⁸⁰, é a relação negativa apresentada entre os parâmetros L^* e IC, obtidos, respetivamente, pelo CIELab e pelo método de Glories. A relação negativa significa que, perante um aumento do parâmetro da intensidade da cor (IC), ocorrerá uma diminuição da luminosidade (L^*). Esta relação evidenciou-se também para os dados obtidos neste trabalho.

De seguida, estão apresentados dois gráficos com o objetivo de demonstrar a ocorrência desta relação, usando como exemplo, os dados relativos ao vinho V21.

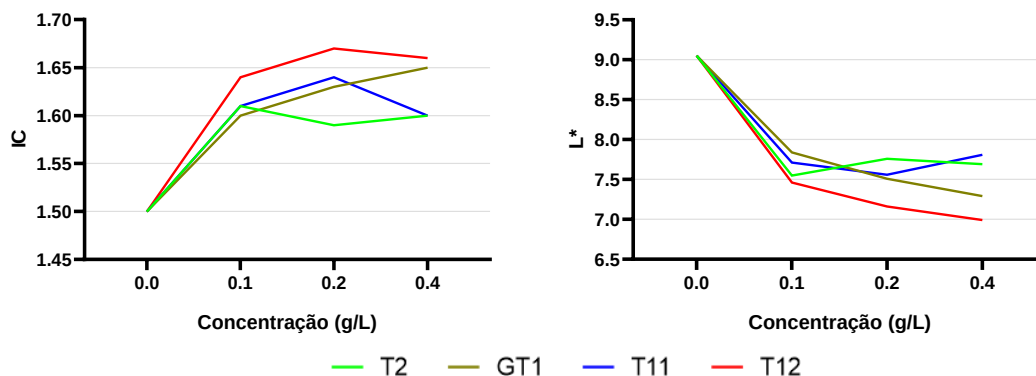


Figura 23. Gráficos representativos da relação entre L* e IC para o vinho V21.

Como é possível constatar pelos gráficos acima, para os mesmos dados, a par do aumento da intensidade da cor, ocorre a diminuição da luminosidade. Esta evidência é bastante relevante, uma vez que, a partir de um método mais simples como é o método de Glories, é possível estimar-se e retirar-se algumas conclusões relativas à luminosidade das amostras.

• Cor verde/vermelho, a*

Quanto ao parâmetro da cor verde/vermelho, a*, aquando da adição dos taninos, a intensidade e o tipo de variações que ocorrem, refletem-se tanto em aumentos como diminuições da cor vermelha, dependendo dos casos.

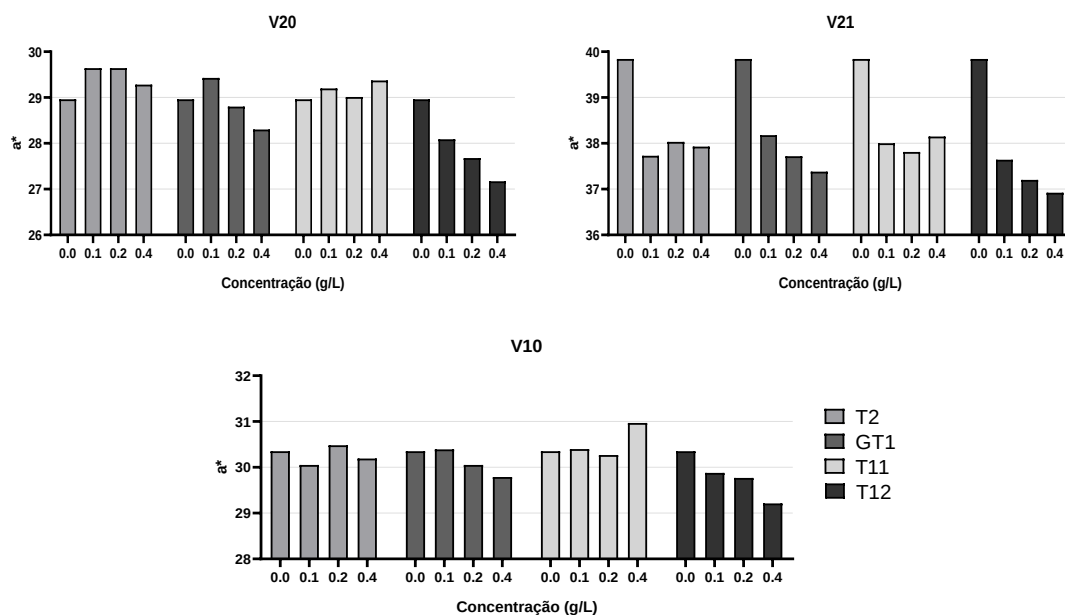


Figura 24. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na cor verde(-) / vermelho(+), a*, nos vinhos V20, V21 e V10.

Primeiramente, a partir dos gráficos figurados acima, infere-se que o efeito da adição dos taninos sobre a cor vermelha, é dependente do tanino utilizado.

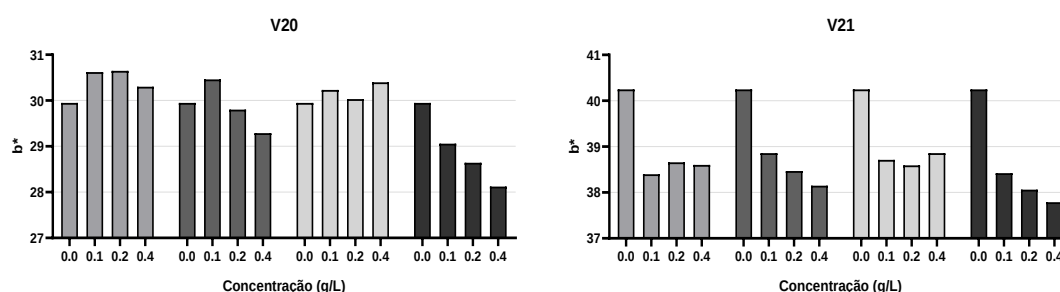
Nos casos dos vinhos V20 e V10, constata-se que, os taninos T12 e GT1, provocam maioritariamente a diminuição da cor vermelha, a partir de impactos uniformes e dependentes da concentração aplicada. Os taninos T2 e T11, no panorama geral, impõem variações menos agressivas e frequentemente não dependentes da concentração. No caso do T2, embora com exceções, este aparenta ter tendência a promover o aumento da cor vermelha. O tanino T11, maioritariamente, promove variações positivas resultando também num aumento da cor vermelha.

Em termos de variações da cor vermelha, tal como para o parâmetro anterior L^* , o tanino que contribui com maiores impactos, em comparação com o ensaio controlo, é o tanino T12. Já os taninos que apresentam o resultado oposto e nos quais a sua utilização promove variações diminutas em relação aos restantes, são o T2 e o T11. A estatística associada a estes resultados permite corroborar estas avaliações, uma vez que o T12 apresenta o maior número de diferenças significativas e o T2 a par com o T11 o menor.

No caso do vinho V21, embora os taninos adicionados provoquem o mesmo tipo de comportamento que para os vinhos V20 e V10, neste vinho, as variações representam, frequentemente, uma perda significativa da cor vermelha.

• Cor azul/amarelo, b^*

Relativamente ao parâmetro b^* , cor azul/amarelo, a intensidade e o tipo de variações que ocorrem, aquando da adição dos taninos, são bastante semelhantes às registadas no parâmetro anterior, a^* .



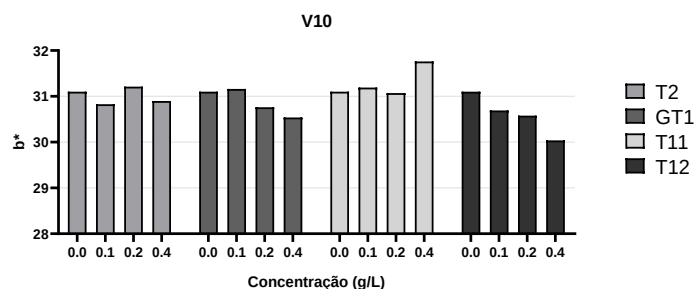


Figura 25. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na cor azul(-) / amarelo(+), b^* , nos vinhos V20, V21 e V10.

Tal como para o parâmetro anterior, aquando da adição dos taninos, verifica-se exatamente o mesmo tipo de variações, contudo, aplicados desta vez à cor amarela.

Nos vinhos V20 e V10, evidencia-se novamente a mesma tendência dos taninos T12 e GT1 provocarem maioritariamente a diminuição da cor do parâmetro em questão, mais concretamente da cor amarela. Verifica-se também, que estes dois taninos apresentam um comportamento uniforme e dependente da concentração aplicada. De uma forma geral, conforme figurado nos gráficos acima, constata-se que os taninos T2 e T11, promovem variações menos agressivas e geralmente não apresentam nenhuma dependência da concentração. Quanto ao tanino T2, aparentemente, este tem uma tendência para potenciar o aumento da cor amarela, sendo, contudo, encontradas exceções. No caso do tanino T11, de uma forma geral, os impactos existentes aquando da sua adição representam um aumento da cor amarela.

Na análise dos dados relativos ao parâmetro b^* , constatou-se que o tanino que impõe um maior número de diferenças, sendo estas significativas em comparação com o ensaio controlo, é o tanino T12. Ao contrário do tanino anterior, os taninos T2 e T11, impõem variações inferiores sobre os ensaios tratados com taninos, refletindo-se assim, de um modo geral, num menor número de diferenças significativas.

Para qualquer um dos ensaios relativos ao vinho V21, apesar de ser possível diferenciar-se os tipos de variações provocadas pelos taninos, e destes manterem as suas tendências anteriores, verificaram-se frequentemente diminuições e diferenças significativas na cor amarela.

• Saturação, C^*

No parâmetro C^* , de uma forma geral, os taninos adicionados assumiram diferentes posições, no que diz respeito ao aumento ou diminuição da saturação da cor das amostras.

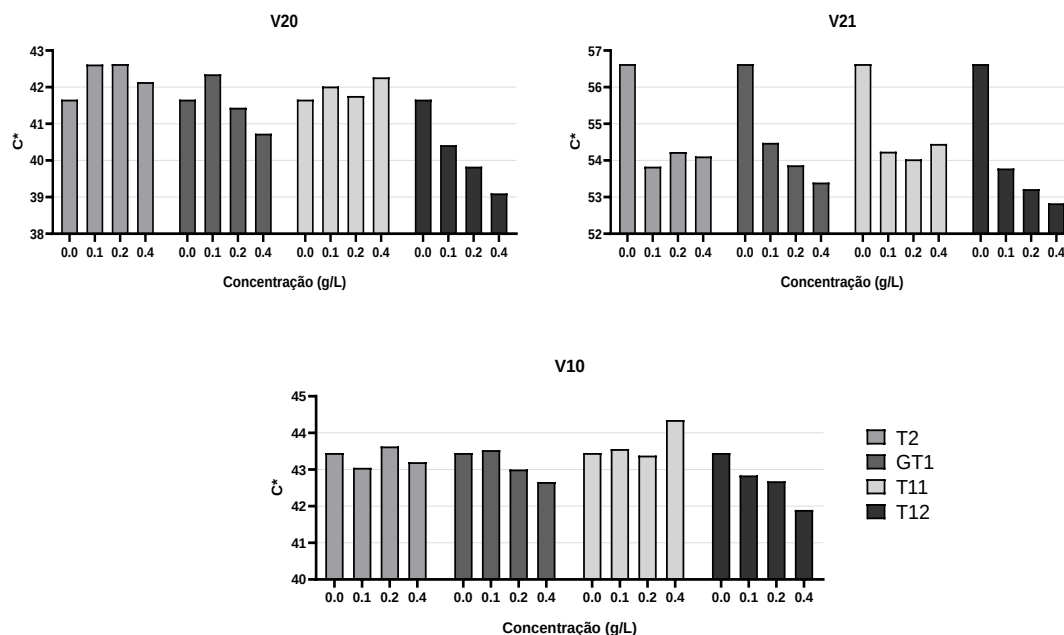


Figura 26. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na saturação da cor, C^* , nos vinhos V20, V21 e V10.

A saturação da cor, C^* , é um parâmetro quantitativo calculado a partir dos parâmetros a^* e b^* . Quando comparadas as variações obtidas nesses dois parâmetros anteriores com o C^* , verifica-se imediatamente, que os tipos de variações ocorrentes neste parâmetro são em tudo similares às verificadas anteriormente.

Desta forma, a avaliação dos dados indica que para os vinhos V20 e V10, os taninos identificados como promotores de maiores variações e de consequentes diminuições da saturação, são o T12 e o GT1. Ambos os taninos continuam a apresentar o mesmo comportamento dependente da concentração, visualizável já em parâmetros anteriores. Da mesma forma, o T2 e o T11, mantém as suas características já demonstradas anteriormente e daí resultam variações não uniformes nem dependentes das concentrações. O tanino T2, representa maioritariamente, embora com exceções evidentes nos gráficos acima, um papel positivo, tal como o tanino T11 promovendo o aumento da saturação da cor.

Quanto aos taninos causadores de maior e de menor impacto sobre a saturação das amostras, verificou-se que o T12 é o que provoca maiores alterações e os que provocam menores impactos sobre as amostras iniciais são o T2 a par do T11. Este resultado é corroborado a partir da estatística exposta na **Tabela 9**, considerando que o T12 é o que apresenta maior número de diferenças significativas ao contrário dos outros dois taninos, T2 e T11.

Tendo em consideração o caso do vinho V21, qualquer um dos taninos potencia uma diminuição acentuada da saturação. Os taninos T12 e GT1 demonstraram uma vez mais o seu comportamento uniforme, verificando-se um aumento do impacto conforme o aumento da concentração.

• Tonalidade, h°

Na Tabela 9, podem ser observados dois parâmetros relativos à tonalidade, o parâmetro h° obtido pelo sistema CIELab e o parâmetro T obtido a partir do método de Glories. A relação entre ambos os resultados, permite inferir por vezes, conclusões aproximadas quanto ao tipo de resposta obtida, embora seja por métodos distintos e não sendo totalmente coincidentes. Contudo, os dados relativos à tonalidade que irão ser discutidos, serão os obtidos pelo sistema CIELab. Este é um parâmetro quantitativo baseado e dependente dos parâmetros de cor a^* e b^* .

De seguida, estão exibidos os dados relativos ao parâmetro h° e que demonstram a influência da adição de taninos sobre a tonalidade.

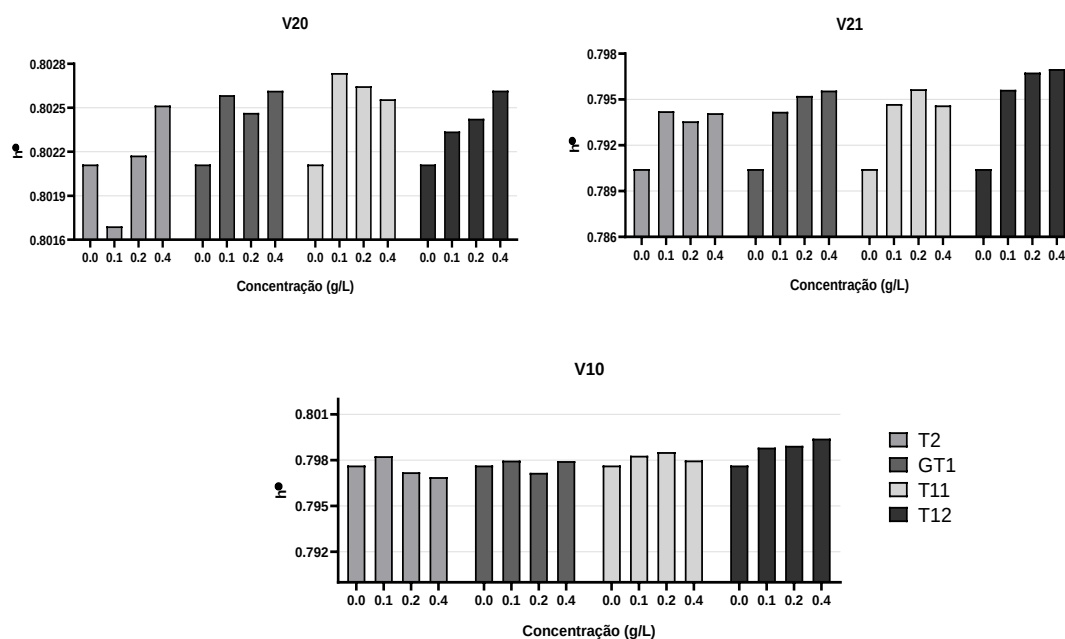


Figura 27. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na tonalidade da cor, h° , nos vinhos V20, V21 e V10.

Com base nos dados acima, é possível verificar, que a aplicação de taninos sobre as amostras de vinho V20, V21 e V10, implicam, em todos os casos, diferenças na tonalidade da cor desses vinhos.

Na generalidade, as diferenças de tonalidade impostas pela adição dos taninos, refletem-se de forma positiva uma vez que promovem o aumento da tonalidade das amostras. Contudo, verificaram-se pequenas exceções no vinho V10 e uma no vinho V20, ensaios que potenciaram uma diminuição da tonalidade.

Na maioria dos casos, não ocorre nenhuma relação entre a concentração dos taninos e o impacto sobre a tonalidade. Este é o caso dos taninos T2, GT1 e T11, que, a partir dos gráficos, subentende-se que apresentam um impacto incerto e não dependente da concentração. Contudo, o tanino T12, neste âmbito, tende a contrastar com os restantes e tem em consideração este fator. Nos três vinhos, há evidência do tanino T12 apresentar um impacto dependente da sua concentração, impondo uma maior variação aquando do aumento da dose aplicada.

Frequentemente, o tanino que potencia uma maior diferença significativa entre o ensaio controlo e o ensaio no qual este é aplicado, a par com outros parâmetros, é novamente o T12.

- Diferença total entre duas cores, ΔE

O parâmetro em questão, possibilita avaliar de forma numérica, a diferença entre duas cores, baseando-se em três parâmetros já analisados anteriormente, L^* , a^* e b^* . De uma forma geral, uma vez que este tem em consideração os parâmetros supramencionados, este aparenta ser o parâmetro que melhor representa as variações provocadas pelos taninos. Isto torna-se relevante, uma vez que, embora nos parâmetros L^* , a^* e b^* se tenham verificado variadas diferenças significativas entre os ensaios, estas não significam obrigatoriamente que sejam perceptíveis ao olho humano.

Assim, Martínez *et al.* (2001)⁸¹, estimou que um valor de ΔE igual ou superior a 3, seja o valor indicativo de que já há uma tolerância aceitável, por parte de um painel de observadores, para que seja possível distinguir a cor entre duas amostras de vinhos tintos, mostrando assim a importância deste parâmetro no âmbito geral.

Relativamente às diferenças de cor apresentadas nos gráficos, é possível verificar-se a existência de diferentes níveis de impacto provocados pelos taninos.

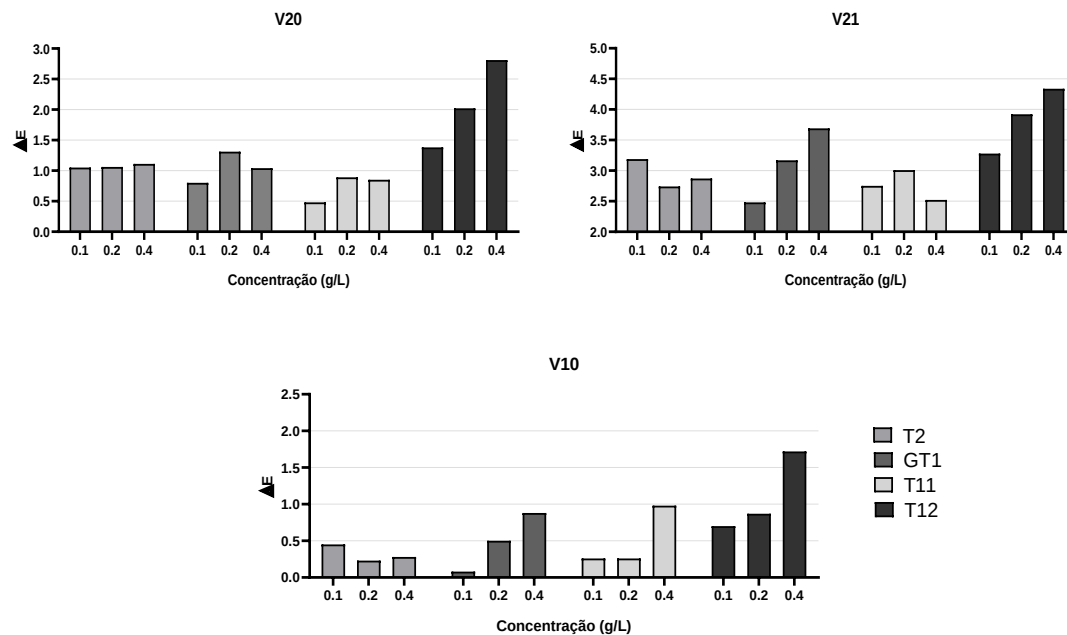


Figura 28. Gráficos representativos da influência da aplicação dos diferentes taninos na diferença total entre duas cores dos vinhos sem e com taninos, ΔE , nos vinhos V20, V21 e V10.

Primeiramente, na generalidade, tal como visualizável a partir dos gráficos acima, é de referir que o impacto provocado pelos taninos varia conforme o vinho no qual é aplicado.

Para as três amostras, V20, V21 e V10, no que diz respeito ao tanino T12, verifica-se que este é o único que, frequentemente, impõe diferenças de cor proporcionais ao aumento da concentração. Quanto maior a concentração aplicada maior o impacto que este impõe. Já o tanino GT1 apresentou também uma tendência semelhante, mas apenas para dois dos casos, para o V21 e V10. Em contraste, os restantes taninos T2 e T11, para os três vinhos, apresentaram um comportamento, de certa forma, classificável como dúbio, uma vez que, não se tornam previsíveis os seus efeitos aquando do aumento da concentração dos mesmos.

Quanto ao tanino que apresenta uma maior influência aquando da sua adição, é o tanino T12. O tanino que representa a menor influência, é o tanino T2 a par com o T11.

Nesta fase de análise dos dados, como ponto de partida, ter-se-á em consideração o valor de ΔE igual a 3, para se identificarem as diferenças visualmente detetáveis entre as cores das várias amostras⁸¹. Assim, apesar de se terem registado tantas diferenças ao longo dos vários parâmetros aquando da adição dos taninos, é possível verificar, que apenas alguns dos ensaios apresentam realmente diferenças detetáveis pelo olho humano. Deste grupo, fazem parte a maioria dos ensaios relativos

ao vinho V21, com os taninos T12 e GT1 em destaque sobre os restantes. Um outro ensaio que possivelmente abrange este grupo, poderá ser o do tanino T12 na sua maior concentração para o vinho V20, uma vez que este apresenta um ΔE próximo de 3.

IV. Conclusões

Relativamente à breve implementação interna do método de precipitação de taninos condensados por metilcelulose, a reta de calibração obtida apresenta uma excelente linearidade para uma gama de trabalho de 10 a 100 mg/L. Os valores determinados relativamente aos limiares analíticos e que correspondem ao LD e LQ, foram, respetivamente, de 4,56 mg/L e 13,83 mg/L. Relativamente aos parâmetros que auxiliam na avaliação do método, o seu desvio padrão e o seu coeficiente de variação, apresentaram valores de 1,38 e de 2,68%, respetivamente, inferindo que apresenta um bom coeficiente de variação do método, uma vez que está abaixo dos 10%, valor definido como aceitável pela IUPAC. Contudo, em termos do ensaio de repetibilidade realizado, o coeficiente de variação da repetibilidade e o limite de repetibilidade obtidos apresentaram valores demasiado altos de 15,1% e 0,92 g/L, respetivamente. Estes valores podem dever-se ao facto de terem sido dos primeiros ensaios realizados neste método, ensaios esses ainda inseridos na janela de aprendizagem e otimização da realização do método por parte do analista. No que concerne às taxas de recuperação realizadas, estas foram obtidas para duas matrizes, vinho sintético e vinho tinto, para evidenciar se as tendências seriam as mesmas. Nas taxas de recuperação realizadas em vinho sintético obtiveram-se tendências decrescentes a variar desde os 60% até aos 47%, e no caso das realizadas em vinho tinto obteve-se uma mesma tendência decrescente, mas de valores mais elevados a variar desde os 92% até aos 72%.

No estudo de algumas propriedades dos taninos, determinaram-se os seguintes parâmetros: o índice de polifenóis total (IPT); atividades antioxidantes por dois métodos (ABTS e método de captura de radicais hidroxilo); e verificou-se ainda a influência dos taninos sobre as caraterísticas cromáticas de diferentes vinhos tintos (método de Boulton e sistema CIELab).

Com a determinação do IPT, verificou-se que os valores de todos os taninos variam desde 23,4% até 87,5%. De entre todos os taninos, concluiu-se que os taninos hidrolisáveis gálicos, T2 e GT1, foram identificados como sendo os que apresentam maiores valores de IPT. Em contraste com os anteriores, os taninos condensados, T1, T8, T11, T12, T13, e o hidrolisável elágico T7, foram os que, de um modo geral, apresentaram os menores valores de IPT. Os taninos, quando organizados por família e por ordem decrescente de IPT, assumem a seguinte ordem, taninos hidrolisáveis gálicos, taninos mix, taninos hidrolisáveis elágicos, taninos condensados.

Na atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS, constatou-se que os taninos que apresentam uma maior atividade antioxidante, são os taninos hidrolisáveis gálicos, T2 e GT1 e o tanino mix (gálico, elágico, catequínico) T5. Os que apresentam menor atividade antioxidante são o tanino hidrolisável elágico T7 e os taninos condensados, T1 e T12. A ordem decrescente da atividade antioxidante dos taninos é a seguinte, taninos hidrolisáveis gálicos, taninos mix, taninos hidrolisáveis elágicos e taninos condensados. Um possível fator influente sobre o facto da atividade antioxidante dos taninos ser diferente, pode dizer respeito à diferença de IPT dos próprios taninos.

A atividade antioxidante avaliada pelo método de captura de radicais hidroxilo, evidenciou, que na presença de EDTA (“non site specific assay”), os únicos taninos a apresentar atividade antioxidante, foram os taninos hidrolisáveis gálicos, T2 e GT1 e o tanino mix (gálico, elágico, catequínico), T5, sendo esta uma consequência das suas capacidades de capturar radicais hidroxilo. Quanto aos restantes taninos, ou apresentam uma espécie de neutralidade ou uma atividade pro-oxidante bastante elevada.

A atividade antioxidante, aquando da ausência de EDTA nos ensaios (“site specific assay”), permite também avaliar a capacidade quelante dos taninos. Nesta situação, verificou-se que os taninos hidrolisáveis gálicos, GT1 e T2, continuam detentores da maior capacidade antioxidante quando comparados com os restantes. Contudo, neste ensaio, constatou-se que os restantes taninos passaram a demonstrar alguma atividade antioxidante, podendo esta dever-se à capacidade quelante dos mesmos. Em contraste, os taninos condensados T11, T12 e T13, quer na presença ou na ausência de EDTA, apresentam atividade pro-oxidante elevada.

Na avaliação da influência dos taninos sobre as caraterísticas cromáticas dos vinhos, estudou-se o efeito de apenas quatro dos taninos iniciais, os hidrolisáveis T2 e GT1 e os condensados T11 e T12.

No método de Boulton, verificou-se que ocorrem apenas diferenças significativas entre as cores totais dos ensaios, não se refletindo nos outros parâmetros. Quanto ao tanino que apresenta maior influência sobre a cor total dos vinhos é o tanino condensado, T12. O que apresenta menor impacto sobre a cor total é o tanino hidrolisável, T2. Relativamente ao tanino condensado, T11, e hidrolisável, GT1, apresentam impactos medianos e semelhantes.

Na avaliação feita a partir do sistema CIELab, verificaram-se imensas diferenças significativas provenientes dos vários taninos sobre os vários parâmetros. Contudo, no panorama geral, consistentemente, o tanino condensado, T12, é o que provoca maiores variações sobre os parâmetros avaliados, apresentando também uma dependência do impacto em função da sua concentração. Os taninos que geralmente apresentam menores impactos são o tanino hidrolisável, T2 e o tanino condensado, T11. Na maioria dos ensaios, aquando da adição dos taninos T12 e GT1, os parâmetros L^* , a^* , b^* e C^* tendem a diminuir e o parâmetro h° tende a aumentar. Para a maioria dos ensaios, aquando da adição dos taninos T2 e T11, os parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h° tendem a aumentar.

V. Referências bibliográficas

- (1) Villamor, R. R.; Ross, C. F. Wine Matrix Compounds Affect Perception of Wine Aromas. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2013**. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182707>.
- (2) Monagas, M.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Updated Knowledge about the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005. <https://doi.org/10.1080/10408690490911710>.
- (3) Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*. 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>.
- (4) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition. In *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition*; 2006; pp 141–203. <https://doi.org/10.1002/0470010398>.
- (5) Timberlake, C. F.; Bridle, P. Anthocyanins: Colour Augmentation with Catechin and Acetaldehyde. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, 28 (6), 539–544. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280611>.
- (6) de Freitas, V. Revisiting Wine Polyphenols Chemistry in Relation to Their Sensory Characteristics. *Recent Advances in Polyphenol Research*. January 25, 2019, pp 263–284. <https://doi.org/doi:10.1002/9781119427896.ch10>.
- (7) Ricardo-da-Silva, J. M.; Cheynier, V.; Souquet, J. -M; Moutounet, M.; Cabanis, J. -C; Bourzeix, M. Interaction of Grape Seed Procyanidins with Various Proteins in Relation to Wine Fining. *J. Sci. Food Agric.* **1991**. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740570113>.
- (8) Jakobek, L. Interactions of Polyphenols with Carbohydrates, Lipids and Proteins. *Food Chem.* **2015**, 175, 556–567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>.
- (9) Vazallo-Valleumbrocio, G.; Medel-Marabolí, M.; Peña-Neira, Á.; López-Solís, R.; Obreque-Slier, E. Commercial Enological Tannins: Characterization and Their Relative Impact on the Phenolic and Sensory Composition of Carménère Wine during Bottle Aging. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.022>.
- (10) Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2010**, 2, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.
- (11) Vişan, L.; Tamba-Berehoiu, R.-M.; Popa, C.; Dănăilă-Guidea, S. Studies on Stilbenes in Red Wine. **2018**, 18, 493–498.
- (12) Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Kinsella, J. E. Inhibition of Human LDL Oxidation by Resveratrol. *Lancet (London, England)*. England April 1993, pp 1103–1104. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92472-6](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92472-6).
- (13) Chira Kleopatra. Structures Moléculaires et Perception Tannique Des Raisins et Des Vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) Du Bordelais; 2009; p 228.
- (14) SWAIN, T.; BATE-SMITH, E. C. CHAPTER 14 - Flavonoid Compounds; Florkin, M., Mason, H. S. B. T.-C. B., Eds.; Academic Press, 1962; pp 755–809. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978->

0-12-395544-9.50025-X.

- (15) Monteiro, J. M.; Albuquerque, U. P. de; Araújo, E. de L.; Amorim, E. L. C. de. Taninos: Uma Abordagem Da Química à Ecologia. *Quim. Nova* **2005**. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000500029>.
- (16) PORTER, L. J. 11 - Tannins. In *Plant Phenolics*; HARBORNE, J. B. B. T.-M. in P. B., Ed.; Academic Press, 1989; Vol. 1, pp 389–419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-461011-8.50017-2>.
- (17) Serrano, J.; Puupponen-Pimiä, R.; Dauer, A.; Aura, A.-M.; Saura-Calixto, F. Tannins: Current Knowledge of Food Sources, Intake, Bioavailability and Biological Effects. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, 53 Suppl 2, S310-29. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>.
- (18) Makkar, H. *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*; 2003. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7>.
- (19) Mercurio, M. D.; Damberg, R. G.; Herderich, M. J.; Smith, P. A. High Throughput Analysis of Red Wine and Grape Phenolics Adaptation and Validation of Methyl Cellulose Precipitable Tannin Assay and Modified Somers Color Assay to a Rapid 96 Well Plate Format. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (12), 4651–4657. <https://doi.org/10.1021/jf063674n>.
- (20) Smeriglio, A.; Barreca, D.; Bellocchio, E.; Trombetta, D. Proanthocyanidins and Hydrolysable Tannins: Occurrence, Dietary Intake and Pharmacological Effects. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, 174 (11), 1244–1262. <https://doi.org/10.1111/bph.13630>.
- (21) Soares, S.; Brandao, E.; Guerreiro, C.; Soares, S.; Mateus, N.; Freitas, V. Tannins in Food: Insights into the Molecular Perception of Astringency and Bitter Taste. *Molecules* **2020**, 25, 2590. <https://doi.org/10.3390/molecules25112590>.
- (22) Ferreira, D.; Bekker, R. Oligomeric Proanthocyanidins: Naturally Occurring O-Heterocycles. *Nat. Prod. Rep.* **1996**. <https://doi.org/10.1039/np9961300411>.
- (23) Liu, H.; Zou, T.; Gao, J. M.; Gu, L. Depolymerization of Cranberry Procyanidins Using (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, and (-)-Epigallocatechin Gallate as Chain Breakers. *Food Chem.* **2013**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.003>.
- (24) Zhang, A.; Li, J.; Zhang, S.; Mu, Y.; Zhang, W.; Li, J. Characterization and Acid-Catalysed Depolymerization of Condensed Tannins Derived from Larch Bark. *RSC Adv.* **2017**. <https://doi.org/10.1039/c7ra03410e>.
- (25) Rousserie, P.; Rabot, A.; Geny-Denis, L. From Flavanols Biosynthesis to Wine Tannins: What Place for Grape Seeds? *J. Agric. Food Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05768>.
- (26) Gawel, R. Red Wine Astringency: A Review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1998**. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1998.tb00137.x>.
- (27) Lisjak, K.; Lelova, Z.; Žigon, U.; Bolta, Š. V.; Teissedre, P. L.; Vanzo, A. Effect of Extraction Time on Content, Composition and Sensory Perception of Proanthocyanidins in Wine-like Medium and during Industrial Fermentation of Cabernet Sauvignon. *J. Sci. Food Agric.* **2020**. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10189>.

- (28) Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins. *Phytochemistry* **1996**. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00301-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00301-9).
- (29) Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds. *Phytochemistry* **1994**. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89817-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89817-9).
- (30) Longo, E.; Merkyte, V.; Rossetti, F.; Teissedre, P. L.; Jourdes, M.; Boselli, E. Relative Abundances of Novel Cyclic Prodelphinidins in Wine Depending on the Grape Variety. *J. Mass Spectrom.* **2018**. <https://doi.org/10.1002/jms.4280>.
- (31) Zeng, L.; Pons-Mercadé, P.; Richard, T.; Krisa, S.; Teissèdre, P. L.; Jourdes, M. Crown Procyanidin Tetramer: A Procyanidin with an Unusual Cyclic Skeleton with a Potent Protective Effect against Amyloid- β -Induced Toxicity. *Molecules* **2019**. <https://doi.org/10.3390/molecules24101915>.
- (32) Longo, E.; Rossetti, F.; Jouin, A.; Teissedre, P. L.; Jourdes, M.; Boselli, E. Distribution of Crown Hexameric Procyanidin and Its Tetrameric and Pentameric Congeners in Red and White Wines. *Food Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125125>.
- (33) Merkytė, V.; Longo, E.; Jourdes, M.; Jouin, A.; Teissedre, P. L.; Boselli, E. High-Performance Liquid Chromatography-Hydrogen/Deuterium Exchange-High-Resolution Mass Spectrometry Partial Identification of a Series of Tetra- And Pentameric Cyclic Procyanidins and Prodelphinidins in Wine Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06195>.
- (34) Sarneckis, C. J.; Dambergs, R. G.; Jones, P.; Mercurio, M.; Herderich, M. J.; Smith, P. A. Quantification of Condensed Tannins by Precipitation with Methyl Cellulose: Development and Validation of an Optimised Tool for Grape and Wine Analysis. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00042.x>.
- (35) Ky, I.; Le Floch, A.; Zeng, L.; Pechamat, L.; Jourdes, M.; Teissedre, P.-L. Tannins; Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F. B. T.-E. of F. and H., Eds.; Academic Press: Oxford, 2016; pp 247–255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8>.
- (36) Mueller-Harvey, I. Analysis of Hydrolysable Tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2001**, 91 (1), 3–20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00227-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00227-9).
- (37) Quideau, S.; Feldman, K. S. Ellagitannin Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, 96 (1), 475–504. <https://doi.org/10.1021/cr940716a>.
- (38) Engström, M. Understanding the Bioactivity of Plant Tannins: Developments in Analysis Methods and Structure-Activity Studies, 2016.
- (39) Versari, A.; du Toit, W.; Parpinello, G. Oenological Tannins: A Review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2013**, 19. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12002>.
- (40) Pérez-Coello, M. S.; Díaz-Maroto, M. C. Volatile Compounds and Wine Aging BT - Wine Chemistry and Biochemistry; Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2009; pp 295–311. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_16.
- (41) Jourdes, M.; Pouységu, L.; Deffieux, D.; Teissedre, P.-L.; Quideau, S. Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K. G., Mérillon, J.-M., Eds.; Springer Berlin

- Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 1975–2010. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_65.
- (42) Prida, A.; Boulet, J.-C.; Ducouso, A.; Nepveu, G.; Puech, J.-L. Effect of Species and Ecological Conditions on Ellagitannin Content in Oak Wood from an Even-Aged and Mixed Stand of *Quercus Robur* L. and *Quercus Petraea* Liebl. <http://dx.doi.org/10.1051/forest:2006021> **2006**, 63. <https://doi.org/10.1051/forest:2006021>.
- (43) du Toit, W. J. 8 - Micro-Oxygenation, Oak Alternatives and Added Tannins and Wine Quality. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*; Reynolds, A. G. B. T.-M. W. Q., Ed.; Woodhead Publishing, 2010; pp 226–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845699987.1.226>.
- (44) Gómez-Plaza, E.; Bautista-Ortín, A. B. Chapter 10 - Emerging Technologies for Aging Wines: Use of Chips and Micro-Oxygenation; Morata, A. B. T.-R. W. T., Ed.; Academic Press, 2019; pp 149–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00010-4>.
- (45) Fraga-Corral, M.; García-Oliveira, P.; Pereira, A. G.; Lourenço-Lopes, C.; Jimenez-Lopez, C.; Prieto, M. A.; Simal-Gandara, J. Technological Application of Tannin-Based Extracts. *Molecules*. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25030614>.
- (46) Khanbabaee, K.; van Ree, T. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18 (6), 641–649. <https://doi.org/10.1039/B101061L>.
- (47) Rasines-Perea, Z.; Jacquet, R.; Jourdes, M.; Quideau, S.; Teissedre, P. L. Ellagitannins and Flavano-Ellagitannins: Red Wines Tendency in Different Areas, Barrel Origin and Ageing Time in Barrel and Bottle. *Biomolecules* **2019**. <https://doi.org/10.3390/biom9080316>.
- (48) Saucier, C.; Jourdes, M.; Glories, Y.; Quideau, S. Extraction, Detection, and Quantification of Flavano-Ellagitannins and Ethylvescalagin in a Bordeaux Red Wine Aged in Oak Barrels. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (19), 7349–7354. <https://doi.org/10.1021/jf061724i>.
- (49) Shibata, T.; Kawaguchi, S.; Hama, Y.; Inagaki, M.; Yamaguchi, K.; Nakamura, T. Local and Chemical Distribution of Phlorotannins in Brown Algae. *J. Appl. Phycol.* **2004**, 16 (4), 291–296. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047781.24993.0a>.
- (50) Vignault, A.; Pascual, O.; Gombau, J.; Jourdes, M.; Moine, V.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Canals, J. M.; Teissedre, P.-L.; Zamora, F. New Insight about the Functionality of Oenological Tannins; Main Results of the Working Group on Oenological Tannins. *BIO Web Conf.* **2019**, 12.
- (51) Vignault, A.; González-Centeno, M. R.; Pascual, O.; Gombau, J.; Jourdes, M.; Moine, V.; Iturmendi, N.; Canals, J. M.; Zamora, F.; Teissedre, P. L. Chemical Characterization, Antioxidant Properties and Oxygen Consumption Rate of 36 Commercial Oenological Tannins in a Model Wine Solution. *Food Chem.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.031>.
- (52) Lempereur, V.; Blateyron-Pic, L.; Labarbe, B.; Saucier, C.; Kelebek, H.; Glories, Y. Groupe National de Travail Sur Les Tanins Oenologiques : Premiers Résultats. *Rev. Fr. d'oenologie* **2002**, 196.
- (53) Buzzini, P.; Arapitsas, P.; Goretti, M.; Branda, E.; Turchetti, B.; Pinelli, P.; Ieri, F.; Romani, A. Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, 8 (12), 1179–1187. <https://doi.org/10.2174/138955708786140990>.

- (54) Chung, K.-T.; Jr, S. E. S.; Lin, W.-F.; Wei, C. I. Growth Inhibition of Selected Food-Borne Bacteria by Tannic Acid, Propyl Gallate and Related Compounds. *Lett. Appl. Microbiol.* **1993**, 17 (1), 29–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01428.x>.
- (55) Magalhaes, L.; Ramos, I.; Segundo, M. Antioxidant Profile of Commercial Oenological Tannins Determined by Multiple Chemical Assays. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, 20. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12058>.
- (56) Silva, A. M.; Martins-Gomes, C.; Souto, E. B.; Schäfer, J.; Santos, J. A.; Bunzel, M.; Nunes, F. M. Thymus Zygis Subsp. Zygis an Endemic Portuguese Plant: Phytochemical Profiling, Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Activities. *Antioxidants* **2020**. <https://doi.org/10.3390/antiox9060482>.
- (57) Curvelo-Garcia, A. S.; Barros, P. *Química Enológica: Métodos Analíticos: Avanços Recentes No Controlo Da Qualidade de Vinhos e Dce Outros Produtos Vitivinícolas*; Agrobook: Porto, 2015.
- (58) Ciliberti, N.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Rossi, V. Environmental Conditions Affect Botrytis Cinerea Infection of Mature Grape Berries More Than the Strain or Transposon Genotype. *Phytopathology®* **2015**, 105 (8), 1090–1096. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-14-0264-R>.
- (59) Vignault, A.; Gombau, J.; Jourdes, M.; Moine, V.; Canals, J. M.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Zamora, F.; Teissedre, P.-L. Oenological Tannins to Prevent Botrytis Cinerea Damage in Grapes and Musts: Kinetics and Electrophoresis Characterization of Laccase. *Food Chem.* **2020**, 316, 126334. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126334>.
- (60) Vignault, A.; Pascual, O.; Jourdes, M.; Moine, V.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Canals, J.-M.; Teissedre, P.-L.; Zamora, F. Impact of Enological Tannins on Laccase Activity. *OENO One* **2019**, 53. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.1.2361>.
- (61) Dubourdieu, D.; Grassin, C.; Deruche, C.; Ribéreau-Gayon, P. Mise Au Point d'une Mesure Rapide de l'activité Laccase Dans Les Moûts et Dans Les Vins Par La Méthode a La Syringaldazine. Application à l'appréciation de l'état Sanitaire Des Vendanges. *OENO One* **1984**, 18 (4 SE-Original research articles), 237–252. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1984.18.4.1743>.
- (62) Claus, H.; Sabel, A.; König, H. Wine Phenols and Laccase: An Ambivalent Relationship; 2014; pp 155–185.
- (63) Goldstein, J. L.; Swain, T. Changes in Tannins in Ripening Fruits. *Phytochemistry* **1963**, 2 (4), 371–383. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84860-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84860-8).
- (64) Jackson, R. S. Chapter 11 - Sensory Perception and Wine Assessment. In *Food Science and Technology*; Jackson, R. S. B. T.-W. S. (Fifth E., Ed.; Academic Press, 2020; pp 883–945. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816118-0.00011-8>.
- (65) Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between Polyphenolic Composition and Some Sensory Properties in Red Wines Using Multiway Analyses. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563 (1), 126–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.082>.
- (66) Huang, R.; Xu, C. An Overview of the Perception and Mitigation of Astringency Associated with Phenolic Compounds. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, 20 (1), 1036–1074.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12679>.

- (67) Rinaldi, A.; Gambuti, A.; Moio, L. Precipitation of Salivary Proteins after the Interaction with Wine: The Effect of Ethanol, PH, Fructose, and Mannoproteins. *J. Food Sci.* **2012**, 77 (4), C485-90. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02639.x>.
- (68) Ma, W.; Guo, A.; Zhang, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Li, H. A Review on Astringency and Bitterness Perception of Tannins in Wine. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 40 (1), 6–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.001>.
- (69) Trouillas, P.; Sancho-García, J. C.; De Freitas, V.; Gierschner, J.; Otyepka, M.; Dangles, O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (9), 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>.
- (70) Boulton, R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, 52 (2), 67 LP – 87.
- (71) Versari, A.; Parpinello, G. P.; Mattioli, A. U. Characterisation of Colour Components and Polymeric Pigments of Commercial Red Wines by Using Selected UV-Vis Spectrophotometric Methods. *South African J. Enol. Vitic.* **2007**, 28, 6–10. <https://doi.org/10.21548/28-1-1453>.
- (72) OIV. *International Code of Enological Practices*; 2020.
- (73) Machado, M.; Felizardo, C.; Fernandes-Silva, A. A.; Nunes, F. M.; Barros, A. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Activity and L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity during Ripening of Olive Cv. “Cobrançosa” under Different Irrigation Regimes. *Food Res. Int.* **2013**, 51 (1), 412–421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.056>.
- (74) Taghouti, M.; Martins-Gomes, C.; Schäfer, J.; Félix, L. M.; Santos, J. A.; Bunzel, M.; Nunes, F. M.; Silva, A. M. Thymus Pulegioides L. as a Rich Source of Antioxidant, Anti-Proliferative and Neuroprotective Phenolic Compounds. *Food Funct.* **2018**, 9 (7), 3617–3629. <https://doi.org/10.1039/C8FO00456K>.
- (75) OIV. Determination of Chromatic Characteristics According to CIELab. *Compend. Int. Anal. Methods* **2006**, No. Chromatic Characteristics.
- (76) Falcão, A. P.; Chaves, E. S.; Kuskoski, E. M.; Fett, R.; Falcão, L. D.; Bordignon-Luiz, M. T. Total Polyphenol Index, Total Anthocyanins and Antioxidant Activity of a Model System of Grape Jelly. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2007**, 27 (3). <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000300032>.
- (77) Nocera, A.; Ricardo-Da-Silva, J. M.; Canas, S. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Wine Spirit Resulting from an Alternative Ageing Technology Using Micro-Oxygenation: A Preliminary Study. *Oeno One* **2020**, 54 (3). <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.3.3114>.
- (78) Luqman, S.; Kumar, R. Importance of Deoxyribose Degradation Assay for Evaluating Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Punica Extract. *Int. J. Food Prop.* **2012**, 15 (5), 942–948. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.511753>.
- (79) Vignault, A.; Gombau, J.; Pascual, O.; Jourdes, M.; Moine, V.; Canals, J. M.; Zamora, F.; Teissedre, P. L. Copigmentation of Malvidin-3-O-Monoglucoside by Oenological Tannins: Incidence on Wine Model Color in Function of Botanical Origin, PH and Ethanol Content. *Molecules* **2019**, 24 (8).

<https://doi.org/10.3390/molecules24081448>.

- (80) Almela, L.; Javaloy, S.; Fernández-López, J. A.; López-Roca, J. M. Comparison between the Tristimulus Measurements Yxy and L*a*b* to Evaluate the Colour of Young Red Wines. *Food Chem.* **1995**, 53 (3). [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)93940-S](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)93940-S).
- (81) Martínez, J.; Melgosa, M.; Pérez Gómez, M. del M.; Hita, E.; Negueruela, A. Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Sci. Technol. Int. - FOOD SCI TECHNOL INT* **2001**, 7, 439–444. <https://doi.org/10.1106/VFAT-5REN-1WK2-5JGQ>.