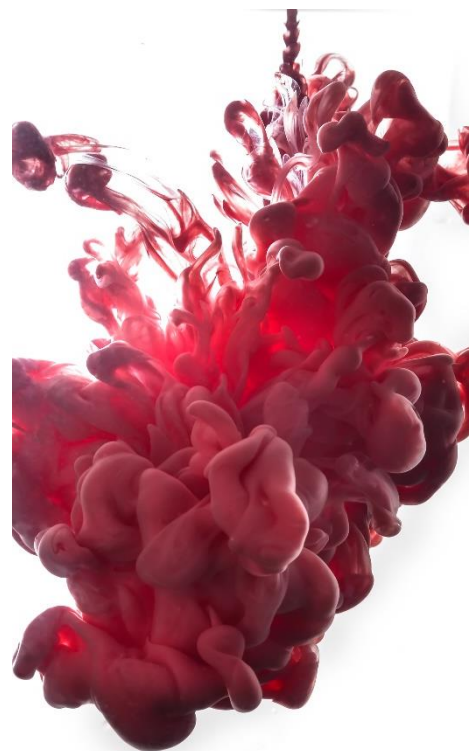




Estudo da aplicação de proteínas de origem vegetal como alternativa à albumina de ovo em vinhos tintos

Joana Henrique de Barros

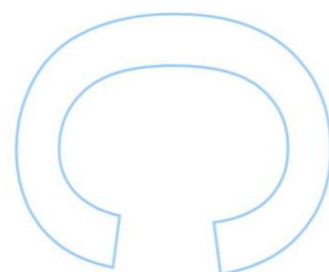
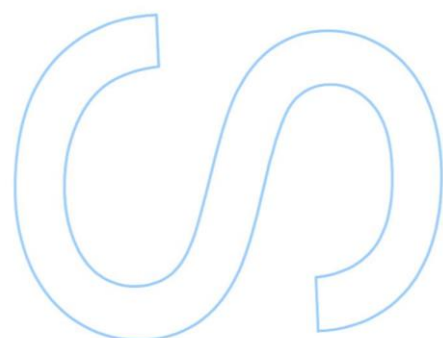
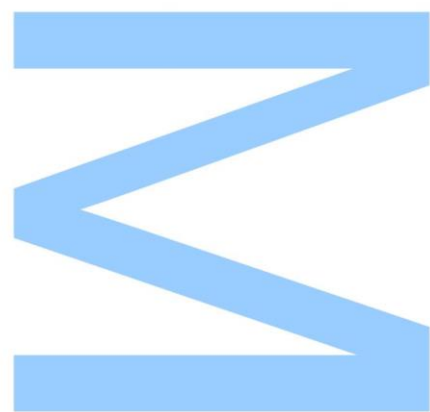
Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição
2018

Orientador

Fernanda Cosme Martins, Professora Auxiliar, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Coorientador

Luís Cunha, Professor Associado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Agradecimentos

Está concluída mais uma importante e desafiante etapa académica, a qual me permitiu adquirir novas capacidades e conhecimento. Nada disto teria sido possível sem o suporte, a colaboração e a disponibilidade de alguns intervenientes. Em primeiro lugar quero agradecer à família: aos meus pais, irmã, avós e tios que me deram um apoio incondicional e motivação sem os quais não seria possível concretizar este objetivo.

Ao João, a pessoa preponderante neste que foi o meu maior desafio a nível pessoal e profissional, o seu apoio a todos os níveis, a sua preocupação e motivação foram o motor deste projeto.

À Professora Fernanda Cosme pela forma como me recebeu na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, com toda a sua disponibilidade e dedicação, agradeço-lhe por todo o conhecimento, orientação e colaboração concedidos, sem eles a realização deste projeto não tinha sido possível.

Ao Professor Luís Cunha, pela abertura com a qual recebeu este projeto em colaboração com a Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela orientação e disponibilidade dadas.

Ao Professor Fernando Nunes (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro) um agradecimento pela sua disponibilidade e conhecimento concedido.

À Professora Alice Vilela (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro), um agradecimento pelos conhecimentos dados, disponibilidade e colaboração concedida para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Química e Enologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela sua colaboração, conhecimentos e disponibilidade concedida ao longo de todo o trabalho prático deste projeto.

À Adega Cooperativa de Vila Real pela cedência de amostras.

Índice

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
1. Compostos fenólicos	11
1.1. Antocianinas	12
1.2. Taninos	13
2. A adstringência no vinho	15
2.1. Origem da perceção	16
2.2. Análise sensorial da perceção da adstringência	18
3. Colas proteicas	20
3.1. Alergeinidade de produtos de colagem do vinho	21
3.2. Colas proteicas de origem vegetal	23
Objetivo	26
4. Material e Métodos	27
4.1.1. Vinho	27
4.1.2. Colas proteicas	27
4.1.3. Determinação do perfil das colas por SDS – PAGE	27
4.1. Delineamento experimental do ensaio de colagem	28
4.2. Intensidade e tonalidade corante	28
4.3. Determinação das características cromáticas pelo método CIElab	29
4.4. Índice de polifenóis totais	29
4.5. Antocianinas totais e coradas, pigmentos totais e poliméricos	30
4.6. Fenóis totais, flavonóides e não-flavonóides,	30
4.7. Antocianinas monoméricas e ácidos fenólicos determinados por HPLC	30
4.8. Índice de HCl	31
4.9. Índice de Etanol	31
4.10. Análise sensorial	31
4.11. Análise estatística	32
5. Resultados e Discussão	33
5.1. Caracterização das colas proteicas	33
5.2. Influência da colagem com proteínas de origem vegetal e animal na cor dos vinhos – intensidade e tonalidade corante, antocianinas coradas e totais	34

5.3. Influência da colagem com proteínas de origem vegetal e animal nas características cromáticas, pigmentos totais e poliméricos.....	37
5.4. Efeito da colagem proteica na composição fenólica do vinho tinto.....	38
5.4.1. Índice de fenóis totais, compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides.....	38
5.4.2. Perfil das antocianinas monoméricas.....	40
5.4.3. Perfil dos ácidos fenólicos e flavonóides	43
5.5. Efeito da colagem proteica na caracterização sensorial do vinho tinto	46
5.5.1. Perfil sensorial do vinho tinto.....	46
Conclusão	48
Referências Bibliográficas.....	50

Índice de Ilustrações

Figura 1 – Estrutura básica do composto fenólico.....	11
Figura 2 – Estrutura básica das antocianinas mais frequentes nos vinhos tintos	12
Figura 3 - Estrutura das unidades monoméricas de flavan-3-ol	14
Figura 4 - Esquema representativo das etapas que ocorrem na agregação e precipitação de polifenóis pelas proteínas salivares ricas em prolina: A) formação de uma ligação irreversível entre o composto fenólico e a proteína salivar, sendo o complexo formado ainda solúvel; B) pela contínua adição de compostos fenólicos, dois péptidos ligam-se de forma cruzada e o complexo torna-se insolúvel; C) a agregação adicional dos complexos insolúveis é determinada pela carga da superfície. 17	
Figura 5 – Prova sensorial no laboratório de análise sensorial da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro	32
Figura 6 – Eletroforese das colas proteicas de patatina A e B (bandas 1 e 2 respetivamente), proteína de ervilha A, B e C (bandas 4, 5 e 6 respetivamente) e albumina de ovo (banda 7). O padrão do peso molecular é dado na banda do meio onde estão assinalados os pesos moleculares. Do lado esquerdo a concentração é de 100 µg e do lado direito é de 200 µg.	34
Figura 7 – Antocianinas totais do vinho controlo e dos vinho após colagem com colas proteínas.....	36
Figura 8 – Intensidade e tonalidade corante do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteínas.....	36
Figura 9 – Não – Flavonóides, flavonóides e compostos fenóis totais (CFT*) do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteínas.	40
Figura 10 – Concentração relativa das antocianinas monoméricas detetadas e quantificadas no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas.....	41
Figura 11 – Concentração relativa dos ácidos fenólicos e flavonóides detectados e quantificados no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas.....	43
Figura 12 – Perfil sensorial dos 7 vinhos colados com diferentes colas proteicas e comparados com o vinho sem tratamento (vinho controlo). Vinho Controlo (Controlo); patatina (PA, PB); proteína de ervilha (PPA, PPB, PPC) e albumina de ovo (AL).....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Percentagem relativa das antocianinas monoméricas normalmente identificadas em castas tintas	13
Tabela 1.1 - Composição fenólica bruta estimada em mg de equivalentes de ácido gálico/L para vinhos de mesa típicos com origem em castas da espécie <i>Vitis Vinifera</i> . (^a – A = ambiente/tanoaria; U = uvas; D = decomposição do produto).	15
Tabela 2 - Definições suplementares dos termos descritores da adstringência no vinho tinto.....	19
Tabela 4 - Colas proteicas, e respetivos códigos, utilizadas neste estudo	27
Tabela 5 - Tonalidade e intensidade corante, antocianinas totais e coradas do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas	34
Tabela 5.1 – Pigmentos totais e pigmentos poliméricos das amostras de vinho após os ensaios de colagem (média ± desvio padrão)	38
Tabela 5.2 – Características cromáticas do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas (média ± desvio padrão)	38
Tabela 5.3 – Índice de polifenóis totais, compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas (Média ± Desvio padrão).	39
Tabela 5.4 – Antocianinas monoméricas detetadas no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas e respetivos tempo de retenção padrão (tempo de retenção ± desvio padrão).	40
Tabela 5.5 – Antocianinas monoméricas detectadas, identificadas e quantificadas no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas (média ± desvio padrão)	42
Tabela 5.6 – Ácidos fenólicos e flavonóides detetados no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas e respetivo tempo de retenção (tempo de retenção ± desvio padrão).....	43
Tabela 5.7 - Ácidos fenólicos e flavonóides detectados, identificados e quantificadas no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas (média ± desvio padrão)	45

Tabela 5.8 – Avaliação sensorial do vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas (média $\pm$ desvio padrão)	47
--	----

Resumo

A adstringência, atributo sensorial característico do vinho tinto que provoca no consumidor uma sensação de constrição e de secura, provém de um tipo específico de compostos fenólicos, os taninos, os quais interagem com as proteínas salivares, precipitando-as. Com o intuito de melhorar a adstringência excessiva de determinados vinhos, recorre-se à aplicação de colas proteicas, as quais são, por norma, proteínas de origem animal, tais como a albumina de ovo e a gelatina, que atuam por remoção de compostos fenólicos responsáveis pela sensação de adstringência. No entanto, existe um carácter alergénico associado a algumas destas proteínas, o que constitui um risco para os indivíduos alérgicos ou sensíveis. Assim foi objetivo deste estudo testar proteínas alternativas de origem vegetal de modo a fornecer uma opção de vinhos a este tipo de consumidor. Foram testadas algumas proteínas de origem vegetal que, até à data, não demonstraram indício de alergeinidade, e por isso, também não requerem a sua rotulagem nas garrafas de vinho, tais como a patatina – proveniente de resíduos de processamento de batata – bem como proteínas de ervilha. Este trabalho teve como objetivo estudar a aplicação de proteínas de origem vegetal como agentes de colagem alternativos à albumina de ovo em vinhos tintos da Região Demarcada Douro e o seu impacto nas características fenólicas, cromáticas e sensoriais do vinho tinto. Os resultados obtidos mostraram que a colagem com patatina obteve valores semelhantes aos da colagem com albumina de ovo tanto ao nível dos parâmetros físico-químico, como ao nível das características sensoriais dos vinhos, podemos desta forma, ser uma possível alternativa de colagem à albumina de ovo na colagem de vinhos tintos.

Palavras-Chave: colas proteicas; vinho tinto; alergénios; compostos fenólicos; características cromáticas, perfil sensorial; adstringência

Abstract

The astringency, which is a red wine characteristic sensory attribute, that induces a constriction and dryness sensation on the consumer, comes from a specific type of phenolic compound, the tannins, which interact with the salivary proteins, by precipitating them. In order to improve the excessive astringency in certain wines, the industry uses the application of fining agents which are usually animal proteins, such as egg albumin and gelatine, which act by removing the phenolic compounds that are responsible for the astringency sensation. However, some of these proteins have an allergenic potential, which turns them into a health risk for allergic or intolerant individuals. For this reason, the main goal of this study was to test alternative proteins (plant origin) in order to provide a different option of wines to this type of consumer. Some proteins of plant origin, like patatin – from potato processing waste – as well as pea proteins, have been tested which, to date, have not shown any evidence of allergenicity, and, because of that, don't require their labelling on the wine bottles. This work had as the main goal the study of the application of plant origin proteins as fining agents, as an alternative to egg albumin, on Douro red wines, and its impact on the phenolic, chromatic and sensory characteristics of the wine. The results obtained showed that fining with patatin obtained values similar to those obtained by fining with egg albumine, both in terms of physicochemical parameters and in terms of the sensory characteristics of the red wines, thus it could be a possible alternative for egg albumine fining in red wine.

Keywords: fining agents; red wine; allergens; phenolic compounds; chromatic characteristics, sensory profile; astringency

Introdução

A cultura e plantação da vinha têm origens já milenares (o que é comprovado por vários registos e descobertas arqueológicas). A sua difusão no continente europeu foi maioritariamente realizada pelo povo romano, o qual, por exemplo, iniciou a categorização e divisão por casta (Fortes & Pais, 2016; Jackson, 2008). O produto resultante da fermentação do mosto das uvas, o vinho, veio a ganhar com o tempo um carácter de tradição e autenticidade, o que contribui para o aumento do seu valor e importância comercial à escala mundial: no ano de 2015 a área de vinha cultivada mundialmente rondava os 7,5 milhões de hectares, na qual Portugal ocupa o 9º lugar, com 217 mil hectares, no top dos 17 países com maior percentagem de área de vinha cultivada. No que toca à produção efetiva de vinho, no ano de 2015 Portugal obteve um total de, aproximadamente, 7 milhões de hectolitros para valores de consumo que rondaram os 5 milhões de hectolitros e 2,8 de milhões de hectolitros de vinho exportado, dando ao país o rótulo de um dos maiores exportadores de vinho (Geana et al., 2016; OIV, 2016).

A qualidade de um vinho pode ser avaliada por vários parâmetros: a aceitação por parte do consumidor, a qual é caracterizada por uma avaliação subjetiva no ato do consumo, a avaliação de especialistas, a qual já é influenciada pela origem geográfica e varietal e também pela reputação associada ao vinho em causa. A um vinho de boa qualidade está associada a presença de complementaridade entre a sensação olfativa e de paladar, ou seja, simetria, bem como a persistência do aroma no decorrer da prova. Fatores como estes que indicam atributos como equilíbrio, harmonia, subtilidade e complexidade, vão marcar a memória do consumidor o que os torna determinantes de extrema relevância para a avaliação da qualidade do vinho (Jackson, 2008). De entre os processos responsáveis por aumentar a qualidade sensorial do vinho, em particular no vinho tinto, destaca-se a colagem proteica, processo através do qual é possível reduzir o sabor amargo e a sensação de adstringência caso estejam presentes em excesso. No entanto, as colas proteicas mais tradicionalmente disponíveis para a indústria enológica são proteínas de origem animal, como por exemplo a caseína/caseinato de potássio e a albumina de ovo. Estas proteínas apresentam um carácter alergénico, sendo até consideradas como alergénios ocultos, isto é, são substâncias capazes de desencadear uma reação alérgica e não são esperados ou reconhecidos pelo consumidor sensível, intolerante ou alérgico. Estes factos levam a que o vinho que é submetido a colagem proteica com proteínas de origem animal com carácter alergénico, partir de 2012 quer pelo OIV quer pela comunidade europeia seja obrigatória a rotulagem dos vinhos que estejam em contacto com estas proteínas de origem animal desde que o resíduo possa ser superior

a 0,25 g/L (Barros & Cosme, 2013; Deckwart et al., 2014 a; 2014 b; Mills et al., 2007; Mills & Breiteneder, 2005; Weber et al., 2007) Desta problemática surge a necessidade de substituir as proteínas de origem animal por proteínas de origem vegetal na colagem do vinho, dado que estas até à data, não demonstraram indício de alergeinidade, não sendo assim necessário rotular o vinho e, conseqüentemente este vinho poderá ser consumido pelos indivíduos portadores de alergias ou intolerâncias a proteínas de origem animal. Pelo que foi referido acima foram definidos como objetivos deste trabalho os seguintes pontos: verificar a viabilidade da aplicação de proteínas de origem vegetal em vinho tinto da região demarcada do Douro como alternativa às proteínas de origem animal; caracterizar o perfil proteico das diferentes proteínas vegetais e avaliar do seu impacto na composição fenólica e cromática bem como nas características sensoriais do vinho tinto comparativamente aos vinhos colados com albumina de ovo, sendo, portanto, o objetivo geral deste trabalho a avaliar a possibilidade de efetuar o processo de colagem do vinho tinto para redução de adstringência sem o recurso de proteínas de origem animal.

1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são constituintes do vinho, responsáveis em parte pela qualidade sensorial do mesmo (aroma, *mouth feel*, intensidade e tonalidade corante), nomeadamente no vinho tinto, onde se encontram em concentrações superiores. Estes compostos têm ainda propriedades bactericidas e antioxidantes. Estes podem ter origem tanto na uva (grainha e película), extraídos durante o processo de vinificação, como também da madeira onde o vinho é envelhecido e conservado (Faria, 2000; Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006). A estrutura geral destes compostos é composta por um anel de benzeno ao qual podem estar associados de forma direta um ou mais grupos hidroxilo tal como representado na figura 1.

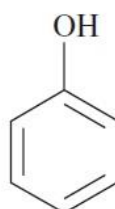
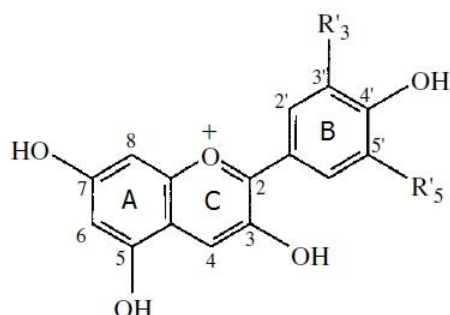


Figura 1 – Estrutura básica do composto fenólico (Kennedy et al., 2006)

Os compostos fenólicos totais dividem-se em compostos flavonóides e não flavonóides, do primeiro grupo fazem parte: as antocianinas, os flavonóis, as flavonas, chalconas, catequinas e ainda as proantocianidinas. As moléculas que se distinguem por conferirem ao vinho tinto seus atributos sensoriais são as antocianinas, as proantocianidinas ou taninos condensados e ainda os flavonóis; já do segundo grupo fazem parte os ácidos fenólicos – ácidos benzóicos e cinâmicos – e os estibenos (Faria, 2000; Jackson, 2008; Póvoas, 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

1.1. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos de cor vermelha, azul e roxo das uvas, e que se encontram em maiores concentrações na película da uva, podendo ser ainda detetadas ao nível da polpa das uvas no caso das castas tintureiras, onde permanecem em simultâneo com outros compostos fenólicos, os quais influenciam a sua cor, em conjunto com o pH. São, portanto, os compostos responsáveis pela tonalidade e intensidade corante dos vinhos (Esau, 1969; Faria, 2000; Jackson, 2008; Póvoas, 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006). A distribuição e proporção de antocianinas em cada vinho não depende apenas da casta, mas também de fatores como o tempo de maceração durante o processo da vinificação, o perfil da evolução dos compostos fenólicos durante a maturação das uvas e a localização da vinha (Cristino et al., 2013; Mateus et al., 2002). A sua estrutura pode ser apresentada sob duas formas: a glicosídica e a aglícica - dependendo da posição onde se ligam os grupos hidroxilo e metoxilo – na natureza, no caso na espécie *Vitis vinífera* encontram-se as que possuem a estrutura mais estável, isto é, a glicosídica, ou seja a espécie *Vitis vinífera* só sintetiza antocianinas monoglicosídicas, cuja estrutura básica está representada na figura 2.



R ₃	R ₅	Antocianinas
OH	H	Cianidina
OH	OH	Delfinidina
OCH ₃	OH	Petudidina
OCH ₃	H	Peonidina
OCH ₃	OCH ₃	Malvidina

Figura 2 – Estrutura básica das antocianinas mais frequentes nos vinhos tintos (Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006)

As antocianinas podem ser distinguidas por 5 classes: cianidinas, peonidinas, delfinidinas, petunidinas e malvidinas, sendo a última a mais vermelha e em maior concentração em todas as castas tintas (Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Na maioria das castas tintas, existe uma porção de antocianinas que são acetiladas, ligadas ao ácido cafeico, ácido acético e ácido *p*-cumárico. As antocianinas mais comuns nas castas tintas estão representadas na tabela 1.1:

Tabela 1 – Percentagem relativa das antocianinas monoméricas normalmente identificadas em castas tintas (Jackson, , 2008)

Antocianinas	Percentagem relativa
Delfinifina - 3 - monoglucósido	3,4%
Petunidina - 3 - monoglucósido	5,0 %
Malvidina - 3 – monoglucósido	41,2%
Cianidina - 3 – monoglucósido	
Peonidina - 3 – monoglucósido	10,1%
Delfinidina - 3 – acetilglucósido	Desconhecida
Petunidina -3 – acetilglucósido	
Malvidina - 3 – acetilglucósido	
Cianidina - 3 – acetilglucósido	
Peonidina - 3 – acetilglucósido	
Delfinidina - 3 – cumaroilglucósido	26,5%
Petunidina - 3 – cumaroilglucósido	
Malvidina - 3 – cumaroilglucósido	
Cianidina - 3 – cumaroilglucósido	
Peonidina - 3 – cumaroilglucósido	
Delfinidina - 3 – cafeoilglucósido	13,6%
Petunidina - 3 – cafeoilglucósido	
Malvidina - 3 – cafeoilglucósido	
Cianidina - 3 – cafeoilglucósido	
Peonidina - 3 – cafeoilglucósido	

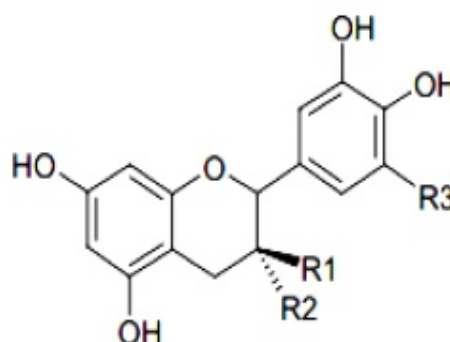
1.2. Taninos

São compostos fenólicos que resultam da polimerização de monómeros (estão distribuídos pelas grainhas, película e engaço) apresentando a propriedade de formar complexos insolúveis com proteínas ou polissacarídeos, precipitando-os, o que lhes confere a sensação de adstringência. Podem ser divididos em 2 grupos: taninos hidrolisáveis e

não hidrolisáveis. Do primeiro grupo fazem parte os taninos que são constituídos, normalmente, por uma molécula de glucose, à qual se ligam outros compostos fenólicos como o ácido gálico ou elágico, dando origem aos taninos gálicos e elágicos, respetivamente. Este tipo de taninos desempenha um papel importante no envelhecimento de vinhos tintos e brancos em barris de carvalho (os quais são normalmente o seu local de origem, não sendo normalmente detetados nas uvas), o que é devido à sua capacidade oxidativa e propriedades sensoriais; os taninos hidrolisáveis são legalmente autorizados como taninos comerciais para serem adicionados aos vinhos (Esau, 1969; Faria, 2000; Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

O outro grupo de taninos que é constituído pelos taninos condensados ou proantocianidinas, são polímeros com a estrutura do flavan-3-ol; os polímeros podem ser classificados de acordo com o tipo de monómero, representado na figura 3, de que são constituídos: (+) - catequina, (–) -epicatequina, designadas por procianidinas, (+) - galhocatequina, e (–) – epigalhocatequina, designadas por prodelfinidinas. Estes taninos podem ser encontrados na película, grainhas e engaço das uvas, variando a sua concentração no vinho entre 1 e 4 g/L, dependendo das castas e da tecnologia de vinificação (Esau, 1969; Faria, 2000; Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

R1	R2	Polímero
OH	H	(+) - catequina
H	OH	(–) -epicatequina



R1	R2	Polímero
OH	H	(+) - galhocatequina
H	OH	(–) - epigalhocatequina

Figura 3 – Estrutura das unidades monoméricas de flavan-3-ol (Jackson, R. S., 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006)

1.2.1. Flavonóides e taninos condensados

Os flavonóides são constituídos por 2 anéis aromáticos ligados através de 3 átomos de carbono. Podem ser divididos em 6 subcategorias: as flavonas, as chalconas, os flavonóis, as antocianinas, as catequinas e as procianidinas (Faria, 2000; Jackson, 2002; Póvoas, 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Alguns estudos mostram que a composição fenólica de vinhos tintos jovens é caracterizada por um teor maior de flavonóides, nomeadamente sob a forma de dímeros e de trímeros e que com o envelhecimento do vinho, ocorreram polimerizações dos taninos, aumentando assim o grau de polimerização dos taninos, tornaram-se estes menos solúveis. Este processo de polimerização pode levar a que hajam grupos fenol-hidroxilo que não foram combinados, algo que permite que os taninos possuam a propriedade de ligarem a proteínas, bem como a concluir que os vinhos tintos mais jovens sejam considerados mais adstringentes em relação aos vinhos tintos mais velhos (Bajec & Pickering, 2008; Jackson, 2008; Póvoas, 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Soares et al., 2017).

Tabela 1.1 - Composição fenólica bruta estimada em mg de equivalentes de ácido gálico/L para vinhos de mesa típicos com origem em castas da espécie *Vitis Vinifera*. (^a – A = ambiente/tanoaria; U = uvas; D = decomposição do produto). Adaptado (Jackson, 2008)

Vinho Tinto				
	Classe de Fenóis	Fonte ^a	Jovem	Envelhecido
Não flavonóides	Taninos hidrolisáveis	A	235	240-500
Complexos macromoleculares	“Proteínas – Taninos”	U, D, A	5	10
	Catequinas	U	200	150
Flavonóides totais	Flavonóis	U, D	50	10
	Antocianinas	U	200	20

2. A adstringência no vinho

Existem dois tipos de recetores químicos na boca que produzem percepções gerais. A primeira diz respeito às sensações mais básicas provocadas pelos alimentos, são elas o sabor doce, amargo, azedo, salgado e *umami*. A segunda percepção, o *mouth-feel* constitui todas as outras sensações de carácter táctil: adstringência, viscosidade, corpo, entre outras. A combinação destas sensações com as olfativas produz o chamado *flavor*

(Jackson, 2002; Jackson, 2008). Ora no caso de um produto alimentar como o vinho, a análise da percepção destes atributos sensoriais é essencial para a avaliação da qualidade do mesmo. De todos as percepções sensoriais avaliadas em vinhos tintos, como as visuais – intensidade e tonalidade corante, turbidez, viscosidade – as olfativas, e as relativas ao palato, destacamos a adstringência, a qual, apesar de não constituir um atributo desejável, a sua copresença com outros compostos químicos confere textura ao vinho e, por isso, contribui para uma melhoria na complexidade e na duração do palato de vinhos tintos, algo que está no interesse do setor de enologia (Gawel et al., 2001; Jackson, 2002; Jackson, 2008; Kennedy et al., 2006).

A adstringência é, de uma forma geral, definida como um termo sensorial caracterizado por sensações tácteis de secura, constrição e enrugamento da cavidade oral. Esta sensação tem origem na ingestão de produtos alimentares que possuam um elevado teor de taninos (tal como o vinho tinto), o que leva a uma perda de lubrificação da boca, provocada pela precipitação de proteínas salivares por parte dos taninos (Jackson, 2008; Ma et al., 2014; Póvoas, 2006; Soares et al., 2017; Vidal et al., 2004).

2.1. Origem da percepção

Atualmente os mecanismos pelos quais o ser humano sente a adstringência não estão bem definidos ou conhecidos, no entanto existem já alguns modelos nos quais já se consegue observar a base de ação deste atributo sensorial. Portanto, a percepção da adstringência está fortemente associada a uma interação entre compostos fenólicos e determinada classe de proteínas salivares. Desta interação resulta a formação de complexos insolúveis e solúveis, os quais precipitam e podem causar uma diminuição da lubrificação da cavidade oral, pela fricção originada pelo precipitado (Hagerman & Butler, 1981; Ma et al., 2014; Póvoas, 2006; Quijada-Morin et al., 2012). Através da técnica de cromatografia líquida (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), foram analisadas amostras de proteínas salivares antes e após a prova de uma solução adstringente; os cromatogramas da saliva pós-prova apresentavam um novo pico o qual se pensa ser representativo dos complexos formados entre os taninos e as proteínas salivares. Estudos e análises têm vindo a comprovar que os compostos fenólicos mais envolvidos na adstringência serão as proantocianidinas ou taninos condensados; estes compostos fenólicos possuem elevada especificidade de ligação com as proteínas salivares ricas em prolina (Hagerman & Butler, 1981; Ma et al., 2014). Foi apresentado um

modelo, por Charlton et al. (2002), representativo do tipo de ligação e posterior complexação entre as proantocianidinas e as proteínas ricas em prolina; neste modelo são representadas ligações por associação hidrofóbica entre a superfície planar dos anéis aromáticos constituintes dos taninos e as zonas hidrofóbicas das proteínas, para além disto são formadas ligações de hidrogénio entre os grupos amina e carbonilo das proteínas e o grupo hidroxilo dos taninos; este tipo de ligações permite a formação de complexos estáveis proteína – tanino. De seguida, os vários complexos formados agregam-se por ligações de hidrogénio mais estáveis; estes agregados tomam, por fim, uma dimensão passível de formar um sedimento insolúvel. É importante referir que as afinidades de ligação entre os taninos e as proteínas são influenciadas pela conformação das proteínas e pelo grau médio de polimerização dos taninos: quanto maior for o grau médio de polimerização dos taninos maior será a afinidade com as proteínas, e, quanto mais abertas forem as conformações das proteínas salivares maior será a facilidade com que se irão formar as ligações de hidrogénio entre estas e os taninos condensados. Para além disto, a concentração de proteínas salivares vai influenciar a forma pela qual se forma o complexo, tanino-proteína, isto é, sendo a concentração de proteínas baixa os compostos fenólicos ligar-se-ão às proteínas através de um ou mais locais ativos na superfície da proteína, formando uma camada, no entanto, se a concentração de proteínas for elevada os compostos fenólicos vão comportar-se como ligandos polidentados, permitindo a formação de ligações cruzadas entre as proteínas ricas em prolina (Figura 4) (Faria, 2000; Hagerman & Butler, 1981; Ma et al., 2014; Póvoas, 2006).

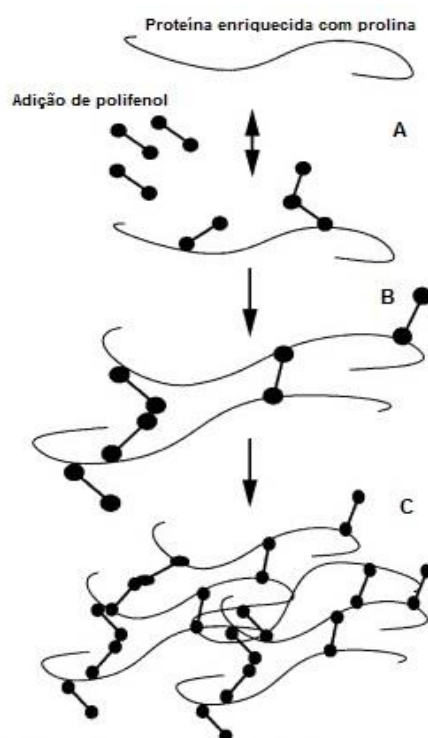


Figura 4 - Esquema representativo das etapas que ocorrem na agregação e precipitação de polifenóis pelas proteínas salivares ricas em prolina: A) formação de uma ligação irreversível entre o composto fenólico e a proteína salivar, sendo o complexo formado ainda solúvel; B) pela contínua adição de compostos fenólicos, dois péptidos ligam-se de forma cruzada e o complexo torna-se insolúvel; C) a agregação adicional dos complexos insolúveis é determinada pela carga da superfície. Adaptado de Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006.

Existem fatores externos que condicionam a percepção de adstringência no vinho tinto tais como o grau médio de polimerização dos taninos, o envelhecimento do vinho, o pH, o teor em álcool, e a temperatura.

2.1.1. Grau médio de polimerização dos taninos

À medida que o bago de uva vai amadurecendo, o grau de polimerização dos taninos aumenta, fazendo com que haja uma menor solubilidade dos polímeros com uma consequente precipitação dos mesmos, diminuindo a adstringência (Bajec & Pickering, 2008; Póvoas, 2006).

2.1.2. Envelhecimento do vinho

Reações de oxidação, agregação e polimerização que ocorrem durante o processo de envelhecimento do vinho levam a que se formem compostos fenólicos com uma estrutura mais complexa e com pouca solubilidade, precipitando mais facilmente, diminuindo a adstringência do vinho. Quanto ao processo de envelhecimento do vinho, este pode ocorrer em garrafa, chamando-se de envelhecimento redutor, neste tipo de envelhecimento dá-se uma menor polimerização dos compostos fenólicos do que no envelhecimento oxidativo que ocorre nas barricas de madeira, afetando diretamente a adstringência do vinho (Bajec & Pickering, 2008; Póvoas, 2006).

2.1.3. pH

A concentração de H^+ afeta a hidratação da proteína, bem como a ionização da proteína e dos compostos fenólicos, por exemplo, em vinhos mais ácidos, isto é, com valores de pH baixos podem induzir uma maior precipitação das proteínas salivares, aumentando a sensação de adstringência. O pH do vinho encontra-se entre 2 e 4, nesta gama de pH há um aumento na rapidez de formação e precipitação dos complexos tanino – proteína; no caso dos vinhos tintos isto acontece principalmente para valores de pH compreendidos entre 3,4 e 3,9 (Jackson, 2002; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

2.2. Análise sensorial da percepção da adstringência

A adstringência é uma sensação algo complexa, uma vez que envolve diversas sensações em simultâneo e é percecionada de forma lenta chegando mesmo a ser a última das sensações sápidas a ser notada. Desta forma, a caracterização e avaliação da adstringência dos vinhos é feita recorrendo à análise sensorial descritiva, onde todas as

amostras são sujeitas a testes sensoriais de prova por um painel de provadores treinados. Por isto surgiu a necessidade de se reunir um vocabulário estandardizado, não redundante nem ambíguo, o que facilita a comunicação entre técnicos e provadores, de forma a realizarem uma análise sensorial mais exata, evitando alguma subjetividade associada (Gawel et al., 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Vidal. et al., 2015). O “*Mouth-Feel Wheel*” (Gawel et al., 2000) é uma representação hierárquica de termos descritores dos atributos de “*mouth-feel*” do vinho tinto; englobando de 50 termos para descrever as características sensoriais relativas ao *mouth-feel* do vinho tinto, onde 33 se destinam apenas à sensação de adstringência e que têm como objetivo atingir um melhor entendimento ao nível da descrição e análise sensorial dos vinhos tintos (Gawel et al., 2000; Vidal. et al., 2015)

Tabela 2.1 - Definições suplementares dos termos descritores da adstringência no vinho tinto – Adaptado de Gawel, 1998)

Descritor	Definição
<i>Pucker</i>	Uma ação reflexa das superfícies da boca para se juntarem e libertarem com a finalidade de tentar lubrificar a superfície bucal inteira.
<i>Chewy</i>	Dá a sensação de que os movimentos da boca (mastigação) podem deslocar a sensação de adstringência
<i>Grippy</i>	Distinta falta de lubrificação entre as superfícies bucais resultando na inabilidade de mover as superfícies bucais entre si
Adesivo	A sensação de que as superfícies bucais se colam ou aderem uma na outra, no entanto podem ser separadas se for aplicada alguma pressão
Áspero	Efeito combinado do sabor amargo e da adstringência
Agressivo	Termo de equilíbrio que indica a adstringência excessiva.
Abrasivo	Excessiva adstringência de uma natureza fortemente áspera.
Macio	Uma adstringência leve e finamente texturizada.
Flexível	Termo de equilíbrio que indica baixa a moderada adstringência com o nível apropriado de acidez e concentração de <i>flavour</i>
Rico	Concentração elevada de <i>flavour</i> com adstringência equilibrada
Carnudo	Concentração alta de sabor com flexibilidade
<i>Mouthcoat</i>	Dá a impressão da adesão de um filme de revestimento às superfícies bucais, e que sai das mesmas com o passar do tempo
<i>Parching</i>	Secura com um fundo de calor do álcool
Verde	Efeito combinado de elevada acidez e adstringência
Viçoso	Adstringência com elevado carácter ácido e algo amargo. Faz lembrar o mastigar de um caule verde.
Resinoso	Adstringência descrita como se mastigasse um pedaço de madeira.

Por exemplo, um vinho com elevado teor em taninos e ácidos fenólicos em relação ao teor de açúcar, levam a que o vinho se torne mais adstringente, o qual sensorialmente,

e de acordo com a *Red Wine Mouth Feel Wheel* pode ser considerado como “áspero”, “não maduro” ou “unripe” (Póvoas, 2006).

A descrição e análise sensorial crítica do vinho tem de ser caracterizada pelo uso de uma linguagem clara e precisa. É observada uma tendência na preferência do uso de determinados termos na análise sensorial de um vinho quando estamos perante uma comparação entre os descritores utilizados por provadores ou consumidores experientes de vinho e provadores ou consumidores não habituais de qualquer bebida alcoólica. No caso da percepção da adstringência foi efetuado um estudo que permitiu verificar a existência da diferença entre os termos usados por provadores experientes e os provadores que não têm por hábito o consumo de álcool, e, através dele pode-se concluir que: termos como “amargo” ou “pungente” são normalmente utilizados pelos provadores não experientes, enquanto que os provadores mais experientes tendem a usar descritores como “gosto posterior perdurante” ou “vinho com carácter” (Jackson, 2002; Lesschaeve & Noble, 2005). A percepção da adstringência pelo consumidor inexperiente está, portanto, bastante associada às suas preferências e a uma vertente psicológica, no entanto, o seu entendimento e estudo pode trazer bastantes vantagens ao setor de enologia no âmbito de novas estratégias de marketing, o que se prova ter influência positiva na expectativa da intenção de compra por exemplo (Vidal et al., 2015)

3. Colas proteicas

A colagem proteica é um processo que consiste na adição de substâncias (proteínas) ao vinho que floculam e sedimentam de forma a induzir ou a acelerar a sua estabilização. A colagem permite também conferir o equilíbrio das características sensoriais do vinho, nomeadamente a redução da adstringência, aumentando assim, a qualidade e consequentemente a aceitação do vinho produzido por parte dos consumidores (Jackson, 2008; Noriega-Domínguez et al., 2010; Ribéreau-Gayon et al., 2006). As colas proteicas existentes no mercado são frequentemente constituídas por proteínas de origem animal, não modificadas ou extraídas a partir de tecido animal. As proteínas mais utilizadas são a caseína (sob a forma de caseinato de potássio) proveniente de produtos lácteos, a gelatina e a albumina de ovo. Ensaio de aplicação de colas proteicas em vinho tinto, revelaram que as características físico-químicas destas proteínas como o peso molecular, o ponto isoelétrico e a densidade de carga superficial, bem como o perfil dos compostos fenólicos do vinho influenciam o resultado da colagem do vinho (Cosme et al., 2007; Karamanidou et al., 2011). O desempenho destas proteínas baseia-se na interação com os compostos fenólicos do vinho, reação idêntica à que os compostos

fenólicos têm com as proteínas salivares (responsável pela adstringência conferida pelo vinho) melhorando a limpidez e as características sensoriais ao produzir um efeito de diminuição do carácter adstringente em excesso no vinho (Cosme et al., 2007; Deckwart et al., 2014 a; 2014 b; Jauregi et al., 2016; Karamanidou et al., 2011). No que toca ao vinho tinto as três últimas colas anteriormente mencionadas são as mais adequadas para este procedimento. A albumina de ovo é o agente de colagem mais antigo e recomendado no que toca à colagem de vinhos tintos de elevada qualidade e elevado teor em taninos, providenciando uma maior “suavidade” à bebida sem que sejam alteradas as suas restantes características sensoriais, pois recorre à adsorção para remover compostos fenólicos (Deckwart et al., 2014 a; 2014 b; Jackson, 2008; Karamanidou et al., 2011; Uberti et al., 2014) e está disponível na sua forma pura e solúvel. A albumina de ovo estabelece ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo dos taninos, possui um peso molecular de 45kDa, um ponto isoeletrico de 4.6, o seu teor em azoto é aproximadamente 13,5%; sendo a sua carga elétrica superficial ao pH do vinho positiva, logo a albumina de ovo vai interagir com as moléculas carregadas negativamente ao pH do vinho, como os taninos, formando agregados que posteriormente se depositam (Cosme et al., 2007; Deckwart et al., 2014 a, 2014 b; Jackson, 2008; Restani et al., 2014; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Uberti et al., 2014). A gelatina, é outro agente de colagem proteico, que é basicamente uma proteína solúvel resultante de uma fervura prolongada de tecidos animais como, pele, ossos e tendões e pode ser dividida por 3 categorias de acordo com o seu peso molecular e densidade de carga elétrica: as gelatinas solúveis no quente - até 50% da sua totalidade tem peso molecular elevado com uma ordem de grandeza superior a 10^5 e carga elétrica elevada; as gelatinas líquidas, as quais têm pesos moleculares médios, e alguns péptidos com carga elétrica elevada; e, por fim, as gelatinas solúveis no frio, as quais possuem pesos moleculares baixos, de uma ordem de grandeza inferior a 10^5 (Ribéreau-Gayon et al., 2006). No geral, possui um ponto isoeletrico que varia entre 4,7 e 9,5. Para vinhos com um conteúdo fenólico mais pobre, ou seja para vinhos menos robustos, é mais adequada a colagem com gelatinas com uma carga elétrica baixa a média, pois desta forma só vai reagir com os taninos mais carregados e reativos (Cosme et al., 2007; Jackson, 2008; Ribéreau-Gayon et al., 2006)

3.1. Alergeinidade dos produtos de colagem do vinho

As proteínas mencionadas anteriormente, utilizadas como colas proteicas no tratamento de vinhos, possuem um carácter alergénico podendo mesmo ser consideradas alergénios ocultos, ou seja, são substâncias que têm a capacidade de desencadear uma rea-

ção alérgica e que não são esperadas ou reconhecidas pelo consumidor sensível, intolerante ou alérgico (Barros & Cosme, 2013; Deckwart et al., 2014 a, 2014 b; Mills. et al., 2007; Mills. & Breiteneder, 2005; Weber et al., 2007). A boa prática do uso de colas proteicas inclui que se utilize a quantidade mínima de proteínas e que o processo de decantação, centrifugação e filtração sejam eficazes ao ponto de não serem detetados resíduos das mesmas, pois caso contrário, é necessária a declaração da sua presença no rótulo da garrafa do vinho em questão (diretiva europeia); porém através de estudos e ensaios levados a cabo a ausência destes resíduos não pode ser assegurada com uma certeza absoluta, isto porque se tem verificado que os alergénios, por exemplo, do ovo, mantêm a sua estabilidade e potencial alergénico durante os processos enológicos realizados após a colagem. A partir daqui surge a necessidade de serem criados ou utilizados métodos de deteção e/ou quantificação de alergénios que possuem uma sensibilidade e precisão bastante elevadas, bem como reprodutibilidade, fiabilidade e ainda viabilidade comercial. Até agora tem sido mais frequente o recurso aos ensaios tipo *ELISA* (*enzyme – linked immunosorbent assay*) – método criado para detetar e quantificar substâncias tais como péptidos, hormonas, anticorpos e proteínas, o qual possui elevada sensibilidade uma vez que a deteção de substâncias é feita através da interação antígeno – anticorpo - no entanto, vários estudos apontam uma desvantagem considerável na utilização desta técnica pois é suscetível a uma interferência de outros compostos presentes na amostra. Por este motivo, outras técnicas têm sido utilizadas no âmbito de executar uma análise e deteção de alergénios em produtos alimentares (neste caso, do vinho) com uma mínima taxa de interferência dos outros constituintes da amostra: como o *western blotting* (WB) – técnica que consiste em identificar e separar proteínas através de uma eletroforese em gel, na qual uma mistura de proteínas é separada pelo seu peso molecular, e consequentemente pelo seu tipo – e também como a espectrometria de massa (EM) – método que tem como objetivo a identificação e quantificação de moléculas em misturas simples ou complexas, através da medição da relação entre a massa e carga de iões – a qual se tem revelado como a técnica mais adequada para a deteção de alergénios em produtos alimentares como o vinho, uma vez que possui a maior sensibilidade e representa o método de deteção mais direto. Trabalhos feitos ao nível da deteção e quantificação de alergénios em vinhos que sofreram tratamento de colagem proteica, utilizaram a técnica de EM em simultâneo com os métodos *ELISA* e WB demonstraram que havia uma diferença na deteção de alergénios, nomeadamente da albumina de ovo (aplicada na sua dose mínima – 5g/hL), sendo o método *ELISA* o único a revelar essa mesma presença. Outros estudos foram levados a cabo na investigação da presença de resíduos alergénicos provenientes do tratamento de colagem

proteica em vinhos, utilizando cada um dos métodos referidos e revelam resultados conflitantes, deixando perceptível a não exclusão de risco de saúde para os consumidores alérgicos e sensíveis (Barros & Cosme, 2013; Deckwart et al., 2014 a; 2014 b; Kirschner et al., 2009; Koestel et al., 2016; Mahmood & Yang, 2012; Meyer & Zanetti, 2015; Restani et al., 2014; Tolin et al., 2012a; Tolin et al., 2012b; Uberti et al., 2014; Weber et al., 2007). Para que fosse garantida a proteção de consumidores alérgicos e intolerantes, o parlamento europeu desenvolveu através da implementação de normas - 2000/13/EC e 2003/89/EC - que regulamentavam a menção obrigatória de alergénios presentes, como ingredientes de produtos alimentares, as quais continham uma lista de substâncias alergénicas onde estavam incluídas a albumina de ovo e proteínas lácteas; no entanto até ao dia 31 de Junho de 2012, a rotulagem de vinhos estava fora do alcance desta norma, sendo que a partir desta data foi obrigatória a menção de alergénios em rótulos de vinhos, com o objetivo de se realizarem mais estudos acerca do impacto e da segurança dos consumidores alérgicos de vinho, o que veio causar um determinado tipo de polémica entre os produtores de vinho pelo facto de a indicação de ingredientes de origem animal e de carácter alérgico produzir uma incerteza entre os consumidores (alérgicos ou não), bem como de alguma influência na imagem do produto (Deckwart et al., 2014 a; 2014 b; Uberti et al., 2014).

3.2. Colas proteicas de origem vegetal

Dado o risco alérgico que as proteínas de origem animal das colas utilizadas no tratamento de vinhos proporcionam aos consumidores alérgicos e sensíveis, e devido à deteção de produtos provenientes de bovinos também utilizados como agentes de cola - como a gelatina de origem bovina - contaminados pela doença de *Creutzfeld – Jacob (Encefalopatia Espongiforme)*, levou a uma crescente procura de alternativas às colagens proteicas de origem animal, tornando o foco da investigação para as proteínas de origem vegetal, as quais já marcam presença na composição de alguns bens alimentares de categorias diversas com objetivos variados como o aumento do teor em proteína, por exemplo. Os primeiros trabalhos e estudos relativos à investigação e validação de proteínas vegetais consistiram numa primeira seriação de proteínas de acordo com algumas normas: a proteína tem que ser apresentada sob a forma de pó, tem que possuir teor de proteína de acordo com os limites estipulados e, por fim, estar em conformidade com o códex dos Organismos Geneticamente Modificados. A seleção de proteínas resultante destas normas e de ensaios em vinhos foi apresentada ao OIV (Organização

Internacional do Vinho e da Vinha), no qual foi avaliada a viabilidade e interesse da aplicação de colas proteicas vegetais no tratamento dos vinhos. Os principais pontos de avaliação para validar as proteínas vegetais consistiram no seguinte: comparação da eficácia deste tipo de proteínas com as proteínas de origem animal no decurso do processo de colagem; comparação da aplicação de proteínas de origem vegetal com as técnicas de clarificação, filtração ou centrifugação; análise do efeito das proteínas vegetais nos componentes analíticos básicos e propriedades sensoriais e ainda a verificação da suscetibilidade das proteínas vegetais poderem produzir substâncias que possam alterar a qualidade do produto e a segurança para o consumidor (Cosme et al., 2012; Lefebvre S. et al., 2005).

A maioria de resultados primeiramente obtidos para as colas vegetais foi favorável em relação às proteínas do trigo, da soja, do tremçoço, entre outras. No entanto, verificaram-se duas desvantagens de importância considerável na sua aplicação: a transferência de sabores que diminuiriam a qualidade geral do vinho e a sua ligação com a doença celíaca (pela presença de glúten) e riscos alérgicos. Por estas razões, a investigação pelas melhores alternativas às colagens de origem animal prosseguiu, encontrando resultados cada vez mais satisfatórios na proteína da batata, a patatina – proveniente de resíduos de processamento de batata, e nas proteínas de ervilha, uma vez que eram das poucas a demonstrar ausência de risco alérgico para os consumidores (Gambutti et al., 2012; Schmidt et al., 2018; Tschiersch et al., 2010). A patatina é uma glicoproteína, a que possui maior peso molecular na batata – aproximadamente entre 35 – 45 kDa – que constitui uma boa alternativa às proteínas de origem animal por vários fatores: possui uma massa molecular da mesma ordem de grandeza da albumina de ovo, bem como uma baixa solubilidade em meio ácido ($\text{pH} < 5$, característico de vinho); a técnica de eletroforese permitiu verificar que uma das bandas de peso molecular da patatina (15 kDa) também era observada no padrão das proteínas salivares, o que significa que, tal como as proteínas salivares que reagem com os taninos do vinho, é altamente provável que a patatina possua um elevado teor em prolina, o que lhe permite ter uma boa afinidade com os polifenóis presentes no vinho e portanto, reduzir a adstringência do vinho de forma muito eficaz; Ensaios realizados demonstraram uma diminuição na concentração de fenóis totais e antocianinas após a aplicação de patatina, sem serem detetadas depleções das características cromáticas do vinho (Gambutti et al., 2012). No que toca às proteínas de ervilha, elas constituem entre 23,1% a 39,9% do teor proteico deste alimento, o qual é considerado um organismo que não é geneticamente modificado. Dos vários ensaios de colagem realizados com estas proteínas verificou-se que estas dimi-

nuem a percentagem total de polifenóis totais, flavonóides e não flavonóides, e em comparação com as colas de origem animal têm um desempenho geral considerado superior (Boye et al., 2010; Reinkensmeier et al., 2015; Tschiersch et al., 2010). Para além destas proteínas vegetais, recentemente tem-se vindo a considerar e a testar as proteínas de arroz, uma vez que têm carácter hipoalergénico. Estas proteínas estão classificadas segundo a sua solubilidade: solúveis em água, sal, meio ácido e alcalino e ainda solúveis em álcool; dependendo da sua solubilidade varia o seu peso molecular. Embora sejam necessários estudos mais detalhados e em maior número para avaliar o impacto e viabilidade destas proteínas vegetais como colas proteicas para tratamento de vinhos tintos, conseguiu-se estabelecer que as quantidades recomendadas das colas vegetais mencionadas são equivalentes às colas proteicas tradicionais (origem animal) – entre 2 e 5 g/hL. Foi também possível concluir que estas colas vegetais permitem uma baixa turbidez do vinho durante o processo de vinificação; não afetam a estabilização tartárica, nem a estabilidade proteica; a partir da sua aplicação resultam percentagens muito baixas de resíduos; não produzem efeitos sensoriais desagradáveis, tendo também a capacidade de melhorar os atributos sensoriais do sabor do vinho; respeitam a intensidade e tonalidade corantes aceitáveis, e por vezes melhoram-na; o teor em azoto destas proteínas não vai aumentar o teor de azoto total do vinho após a colagem, isto é, não vão aumentar o teor proteico da bebida (Amagliani et al., 2017; Lefebvre S. et al., 2005).

Objetivo

O processo de colagem com colas proteicas de origem animal no vinho tinto é reconhecido como podendo ter um carácter alergénico derivado de algumas colas proteicas com alergeinidade, pelo que o uso deste tipo de colas obriga que no rótulo da garrafa de vinho seja mencionado o uso da cola proteica de origem animal (albumina de ovo e caseína/caseinato de potássio). Desta forma, foi definido como objetivo principal deste trabalho avaliar a eficiência das colas de proteínas de origem vegetal comparativamente à eficiência das proteínas de origem animal, nomeadamente da albumina de ovo, proteína de origem animal tradicionalmente utilizada no processo de colagem de vinho tinto. Têm sido levados a cabo, pela comunidade científica, estudos com o objetivo de se averiguar, de uma forma mais exata, o risco alergénico associado ao tratamento enológico da colagem proteica com proteínas de origem animal ; estes estudos revelam que a quantidade utilizada, por estar em quantidades quase vestigiais após o processo de colagem, é pouco provável o desencadear de uma reação alérgica grave e intensa nos consumidores, no entanto, não é descartada a hipótese de os consumidores desenvolverem reações alérgicas de escala ligeira ou grave. Neste âmbito surge a necessidade da substituição dos tradicionais agentes de colagem por outros com um carácter alergénico mínimo ou até nulo. Foram realizados ensaios de colagem num vinho tinto da Região Demarcada do Douro com proteínas de origem vegetal, destacando-se a patatina e a proteína de ervilha e uma de origem animal (albumina), – a mais utilizada em vinho tinto. Com o intuito de avaliar a ação das colas vegetais comparativamente à albumina de ovo na qualidade do vinho tinto foram efetuadas análises físico-químicas, nomeadamente aos compostos fenólicos totais, flavonóides, não flavonóides, antocianinas totais, perfil dos ácidos fenólicos e das antocianinas monoméricas e caracterização cromática dos vinhos e ainda a avaliação das características sensoriais do vinho.

4. Material e Métodos

4.1.1. Vinho

Neste estudo foi utilizado um vinho tinto da colheita de 2017 de lote, produzido com mistura de castas da Região Demarcada do Douro, tais como: *Tinta Barroca*, *Tinta Roriz* (*Aragonez*), *Touriga Nacional*, *Tinto Cão*, *Touriga Franca*.

4.1.2. Colas proteicas

As colas proteicas utilizadas neste trabalho foram as apresentadas na Tabela 4.1: duas patatinas, três proteínas de ervilha, uma de albumina de ovo. Cada uma destas colas foi aplicada ao vinho na concentração máxima permitida, 50 g/hL, de acordo com OENO7/04 do International Code of Oenological Practices (2018).

Tabela 4 - Colas proteicas, e respetivos códigos, utilizadas neste estudo.

Cola Proteica	Código
Patatina	PA
Patatina	PB
Proteína de ervilha	PPA
Proteína de ervilha	PPB
Proteína de ervilha	PPC
Albumina de ovo	PAL

4.1.3. Determinação do perfil das colas por SDS – PAGE

Com o objetivo de caracterizar o peso molecular das proteínas das colas proteicas de origem vegetal e da albumina de ovo, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE). Todas as proteínas utilizadas no estudo foram extraídas com solução tampão Tris-HCl (pH=8.0) a 0,01 mol/L, a qual continha SDS a 1% (m/v) e 1% (m/v) de DTT (ditiotreitól). O sobrenadante foi diluído para uma amostra tampão com SDS a 1% (m/v), glicerol a 20% (v/v), azul de bromofenol a 0,01%

(m/v) e solução tampão Tris-HCl (pH=8.0) a 40% (v/v). Posteriormente as proteínas foram separadas num gel de poliacrilamida de resolução a 12%. Os géis foram corados com azul de Comassie R-250 durante 24h e lavados com água no final desse período.

4.2. Delineamento experimental do ensaio de colagem

O ensaio de colagem envolveu a adição das sete colas proteicas selecionadas para o efeito ao vinho tinto, numa concentração de 50g/L, dose máxima permitida pelo OIV (2018) para as colas proteicas de origem vegetal. A albumina de ovo foi adicionada na dose máxima recomendada pelo fabricante, 50g/L. O vinho foi colocado em provetas de 500mL, ao qual se adicionaram as diferentes colas proteicas, foram misturadas com o vinho de forma vigorosa, de forma a atuar de forma uniforme. A um ensaio não lhe foi adicionado cola sendo considerado o ensaio controlo. O ensaio de colagem permaneceu durante 7 dias, a uma temperatura aproximadamente de 20 °C. Todas as amostras de vinho pós-colagem foram decantadas, centrifugadas e sujeitas às análises físico-químicas e sensoriais. Todos estes procedimentos foram executados em duplicado e as análises também foram efetuadas em duplicado de cada um dos ensaios.

4.3. Intensidade e tonalidade corante

A intensidade corante do vinho foi efetuada pela soma de absorvâncias aos 420 nm, 520 nm e 620 nm. A medição foi feita numa célula de percurso ótico com uma espessura de 1 mm de acordo com o OIV (2013). Todas as medições foram executadas em duplicado. Os valores da intensidade corante foram calculados a partir da seguinte expressão:

$$IC = [ABS (420nm) + ABS (520 nm) + ABS (620nm)] * 10$$

A tonalidade corante foi realizada pela determinação das absorvências das amostras de vinho nos comprimentos de 420 nm e 520 nm, recorrendo a uma célula de percurso ótico de 1 mm. Todas as determinações foram realizadas em duplicado. Os valores da tonalidade corante foram calculados a partir da seguinte fórmula:

$$TC = \frac{Abs (420 nm)}{Abs (520 nm)}$$

4.4. Determinação das características cromáticas pelo método CIElab

Para a caracterização cromática dos vinhos foi registado o espectro de absorção de cada uma das amostras utilizando um espectrofotómetro num intervalo de comprimento de onda compreendido entre 380 nm e 780nm, utilizando uma célula de quartzo de percurso ótico de 1 mm de espessura. Os dados recolhidos foram utilizados para calcular as coordenadas de L^* – luminosidade –, a^* – componente vermelha/verde – e b^* – componente azul/amarelo, coordenadas referentes ao método CIElab, de acordo com a OIV (2017). Foi ainda determinado o Chroma, C^* ($C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$) e o ângulo da tonalidade, h° ($h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$).

De forma a determinar a diferença de cor das amostras de vinho tinto relativamente ao vinho sem tratamento recorreu-se à expressão que calcula a diferença de cor:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

A perceção visual média das diferenças de cores entre duas soluções, pelo olho humano vai ser assumida como um valor de ΔE superior a 1 (Gonnet, 1998). Todas as medições foram feitas em duplicado.

4.5. Índice de polifenóis totais

Para a determinação do índice de polifenóis totais, de acordo com o método descrito em Harbertson e Spayd, 2006, as amostras de vinho tinto foram diluídas de 1:100. Foi efetuada a leitura a 280 nm das amostras, recorrendo a uma célula de quartzo de percurso ótico de 1 cm. As análises foram efetuadas em duplicado. O cálculo deste índice foi feito através da seguinte expressão:

$$IPT = \text{Abs (280 nm)} \times \text{fator de diluição}$$

4.6. Antocianinas totais e coradas, pigmentos totais e poliméricos

As antocianinas totais e coradas, pigmentos totais e poliméricos foram efetuados pelo método de Somers e Evans (1977). Este método baseia-se na capacidade de as antocianinas reagirem de forma fácil com o anião bissulfito criando um aduto (resultado da união direta de duas moléculas sem sofrer alterações estruturais) incolor. Todas as análises foram executadas em duplicado.

4.7. Fenóis totais, flavonóides e não-flavonóides

A quantificação destes compostos foi efetuada de acordo com o método descrito por Kramling e Singleton (1969). Os resultados são apresentados em equivalentes de ácido gálico, através de uma curva de calibração standard do ácido gálico. Todas as medições foram realizadas em duplicado.

4.8. Antocianinas monoméricas e ácidos fenólicos determinados por HPLC

A análise das antocianinas monoméricas e dos ácidos fenólicos foi efetuada por HPLC (*Dionex UltiMate 3000*) equipado com um detetor UV-Vis por injeção direta de 50µL de amostra, numa coluna de fase reversa C18 (250 x 4,5 mm de diâmetro). O eluente foi constituído por 5% de ácido fórmico aquoso (solvente A) e por metanol (solvente B). O fluxo foi de 1mL/min. Os cromatogramas foram obtidos num comprimento de onda compreendido entre os 200 e os 650 nm. A identificação dos compostos foi feita considerando os seus tempos de retenção e espectro UV. Os cromatogramas foram recolhidos aos 280, 325 e 525 nm (Guise et al. 2014). A quantificação das antocianinas monoméricas identificadas foi realizada através das curvas de calibração dos monoglucósidos de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina; para as antocianinas acetil e coumarilglucósidos a quantificação dos seus resultados foi realizada a partir dos seus equivalentes monoglucósidos. No caso dos ácidos fenólicos e flavonóides a quantificação foi feita utilizando curvas de calibração dos padrões de ácido gálico, catequina, (-) galhocatequina, (-) epigalhocatequina, ácido *p*-coustárico, ácido cafeico e ácido ferúlico. O ácido *trans*-caftárico, éter etílico do ácido cafeico e o éter etílico do ácido cumárico

foram expressos como equivalentes de ácido cafeico e equivalente do ácido *p*-coutárico (Filipe-Ribeiro et al., 2017). Todas as análises foram efetuadas em duplicado.

4.9. Índice de HCl

O índice de HCl relaciona-se diretamente com a instabilidade das procianidinas, em meio concentrado de HCl, no qual a velocidade de precipitação das mesmas depende do seu grau de polimerização (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Este parâmetro de análise traduz o grau de polimerização dos taninos, o que por sua vez está dependente do estado de envelhecimento do vinho (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Foi efetuado de acordo com o método descrito por (Ribéreau-Gayon et al., 2006) e todas as análises foram efetuadas em duplicado.

4.10. Índice de etanol

O índice de etanol foi efetuado de acordo com o método descrito por (Ribéreau-Gayon et al., 2006) e todas as análises foram efetuadas em duplicado.

4.11. Análise sensorial

A análise sensorial dos vinhos colados com as diferentes colas proteicas que estiveram armazenados em condições de luz e de temperatura (20°C) adequadas, foi realizada por um painel de 7 provadores que não foram submetidos a treino no âmbito deste estudo (ISO 6658, 1985). Para a prova foram utilizados copos de prova normalizados (ISO 3591, 1977) e a análise sensorial decorreu das 10h às 12 horas, de acordo com a norma (ISO 8589, 2007), como é possível verificar pela figura 5 abaixo. Para a avaliação das amostras foram selecionados 21 atributos, recorrendo a uma ficha de prova adaptada baseada no que é recomendado pelo OIV: no descritor do aspeto visual foram selecionados 2 atributos (cor e limpidez), em relação aos descritores do aroma foram selecionados 9 atributos (intensidade, floral, frutado, frutos secos, frutos citrinos, especiarias, madeira, oxidado e vegetal) e por fim no descritor do sabor e *flavor* foram selecionados 10 atributos (doçura, amargor, acidez, adstringência, corpo, intensidade, floral, frutado, vegetal e persistência). Estes atributos foram quantificados utilizando uma escala de

intensidade que variou entre 1 e 5 (ISO 4121, 2003), tendo como extremos os termos “menos intenso” e “mais intenso”, respetivamente, podendo os provadores só utilizar valores inteiros. As amostras foram apresentadas aos provadores de forma aleatória e codificadas por algarismos de 3 números (ISO 6658, 1985), e constituídas por volumes de 50 mL, de forma a que pudessem ser provados 2 vezes 25 mL da mesma amostra (ISO 3591, 1977).

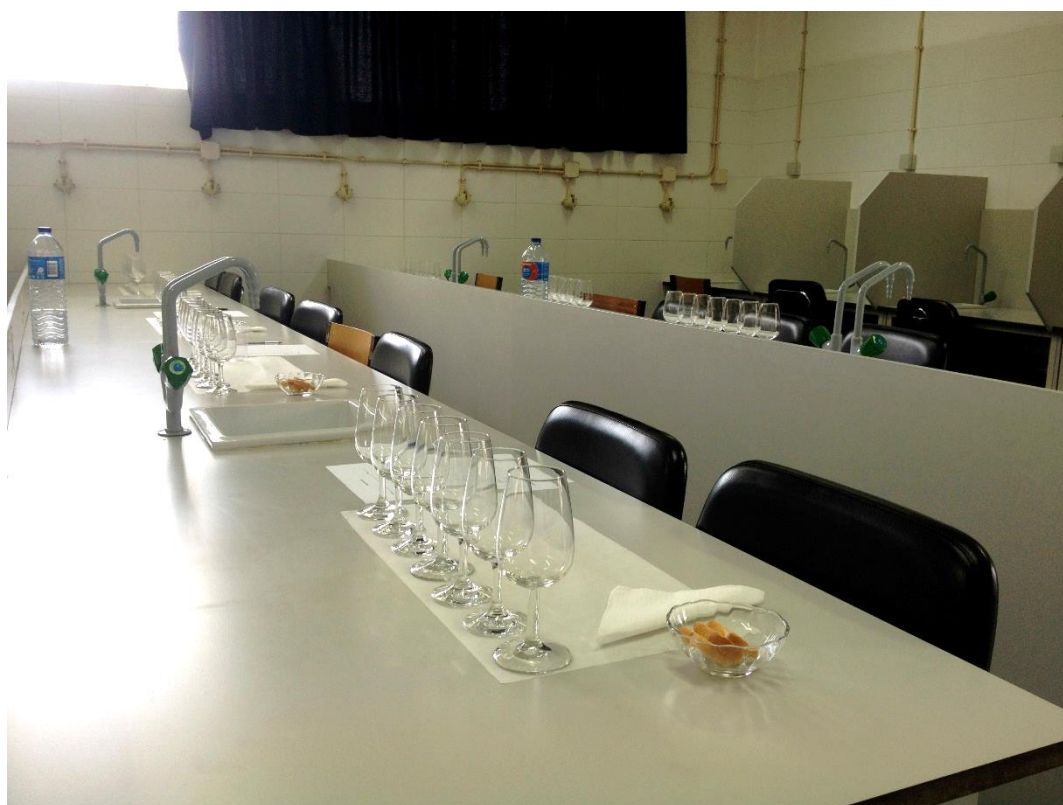


Figura 5 – Prova sensorial no laboratório de análise sensorial da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

4.12. Análise estatística

Os dados relativos aos resultados deste estudo foram expressos em médias aritméticas $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas dos dados físico químicos e sensoriais foram avaliadas através da análise de variância a um fator, ANOVA (diferenças significativas para p -values $< 0,05$), seguida do teste de Tukey e o de Duncan, respetivamente, o qual

foi aplicado para comparação de médias de nível do fator, isto é, comparação das médias das várias amostras de vinho por tipo de colagem aplicada. Para se analisar o perfil sensorial de cada amostra recorreu-se ao gráfico de aranha. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Excel 2016 (Microsoft Office 365 Pro Plus) e IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corp).

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização das colas proteicas

Os resultados da eletroforese revelaram que a distribuição dos pesos moleculares das duas patatinas (PA, PB) não apresentam diferenças (Figura 7). Ambas são caracterizadas por duas bandas individuais, uma compreendida no intervalo entre os 100 e 150 kDa, e outra entre os 75 e 100 kDa, uma banda maior individual na zona dos 37 kDa, e também na zona dos 20 kDa. Os resultados obtidos no presente estudo estão em parte de acordo com a distribuição do peso molecular da patatina apresentada por Gambuti et al. (2012): uma banda maior aos 40 kDa, outras ao nível dos 120 kDa, bandas no intervalo compreendido entre os 66,20 kDa e 97,40 kDa e entre os 20 kDa e 30 kDa e, finalmente ao nível dos 15 kDa. No que diz respeito às proteínas de ervilha (PPA, PPB, PPC) também não foram observadas diferenças em relação à distribuição do seu peso molecular; todas elas são caracterizadas por bandas situadas entre os 25 e 37 kDa, e entre os 37 e 50 kDa, aos 50kDa, entre os 50 e 75 kDa e finalmente entre os 75 e os 100 kDa.

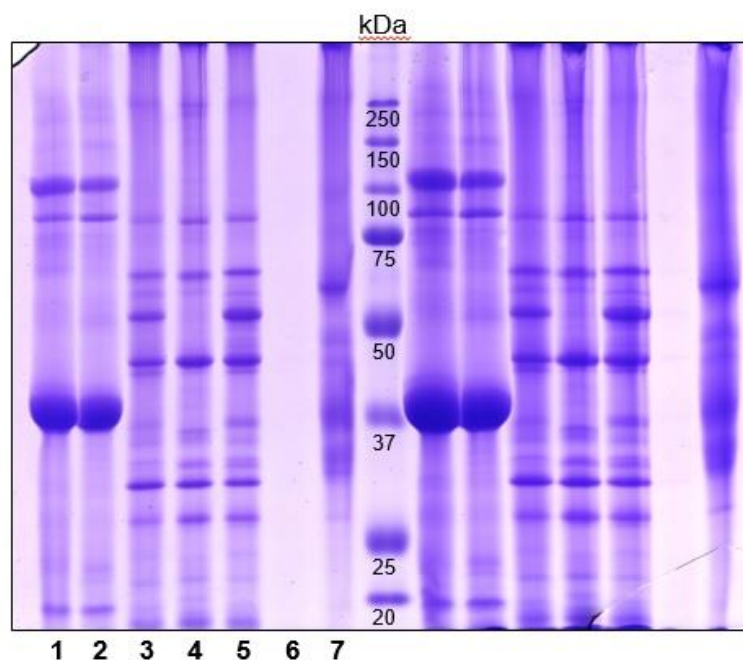


Figura 6 – Eletroforese das colas proteicas de patatina A e B (bandas 1 e 2 respetivamente), proteína de ervilha A, B e C (bandas 3, 4 e 5 respetivamente) e albumina de ovo (banda 7). O padrão do peso molecular é dado na banda do meio onde estão assinalados os pesos moleculares. Do lado esquerdo a concentração é de 100µg e do lado direito é de 200µg.

Em relação à albumina de ovo utilizada (AL) observou-se uma banda entre os 25 e os 75 kDa.

5.2. Influência da colagem com proteínas de origem vegetal e animal na cor dos vinhos – intensidade e tonalidade corante, antocianinas coradas e totais

Os resultados relativos à intensidade e tonalidade corante estão apresentados na Tabela 5.1 e na Fig.8. Em comparação com a amostra controlo sem tratamento observou-se uma diminuição significativa da intensidade corante apenas nas amostras de vinho submetidas a colagem com uma das patatinas (PB -13,5%) e com a albumina de ovo (AL -11,9%). O menor decréscimo da intensidade corante foi observado na amostra que foi colada com patatina (PA-9,6%). Os resultados obtidos estão de acordo com os de Gambuti et al. (2012), onde os ensaios de colagem mostraram que a patatina provoca alterações pouco significativas na intensidade corante do vinho. Karamanidou et al. (2011) também sustenta estes resultados na medida em que nos seus trabalhos se verifica que a colagem com albumina de ovo demonstrava uma fraca diminuição dos valores da intensidade corante em relação às amostras de vinho controlo. Na tonalidade corante observou-se em todas as amostras de vinho coladas em relação à amostra de vinho de controlo uma diminuição que foi maior para as amostras de vinhos coladas com patatina (PA) e com proteínas de ervilha (PPA), como está representado na tabela 5.1,

contudo estas diferenças não foram estatisticamente diferentes relativamente ao vinho controlo.

Tabela 5 - Tonalidade e intensidade corante, antocianinas totais e coradas do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo), u.a – unidades de absorvância.

Amostras	Tonalidade corante	Intensidade corante (u.a.)	Antocianinas totais (mg/L)	Antocianinas coradas (u.a.)
Controlo	0,849 ± 0,01 ^a	6,20 ± 1,12 ^b	72 ± 6 ^b	1,36 ± 0,55 ^a
PA	0,818 ± 0,00 ^a	5,60 ± 0,59 ^{ab}	64 ± 5 ^b	1,12 ± 0,01 ^a
PB	0,807 ± 0,00 ^a	5,36 ± 0,11 ^a	60 ± 2 ^{ab}	1,07 ± 0,09 ^a
PPA	0,827 ± 0,01 ^a	5,26 ± 0,01 ^{ab}	63 ± 5 ^{ab}	1,11 ± 0,04 ^a
PPB	0,822 ± 0,01 ^a	5,39 ± 0,09 ^{ab}	75 ± 1 ^b	0,90 ± 0,39 ^a
PPC	0,827 ± 0,01 ^a	5,42 ± 0,08 ^{ab}	63 ± 4 ^b	1,14 ± 0,12 ^a
AL	0,806 ± 0,00 ^a	5,46 ± 0,06 ^a	73 ± 7 ^b	1,10 ± 0,02 ^a

No que diz respeito às antocianinas totais e, tal como representado na Fig.8, as amostras de vinho que foram submetidas a colagem sofreram, na sua maioria, um decréscimo não significativo relativamente ao vinho controlo, resultados que estão em concordância com a diminuição não significativa da intensidade corante, a cor dos vinhos tintos está dependente da quantidade de antocianinas bem como dos pigmentos resultantes do fenómeno da co-pigmentação (Somers, 1977; Stankovic, 2004). As amostras coladas com albumina de ovo não apresentaram diferenças significativa relativamente ao vinho controlo, sendo que na amostra correspondente à colagem com uma das colas de patatina (PB) apresentou um decréscimo mais acentuado, contudo também não significativo relativamente ao vinho controlo; estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Ghanem et al. (2017). Algumas diferenças observadas entre os diferentes trabalhos podem estar na origem do uso de diferentes concentrações das colas vegetais, uma vez que no presente estudo foi utilizada a dose máxima permitida pelo OIV para as colas de origem vegetal – 50g/hL – e nos ensaios realizados por Ghanem et al. (2017) a concentração máxima utilizada foi a de 15g/hL.

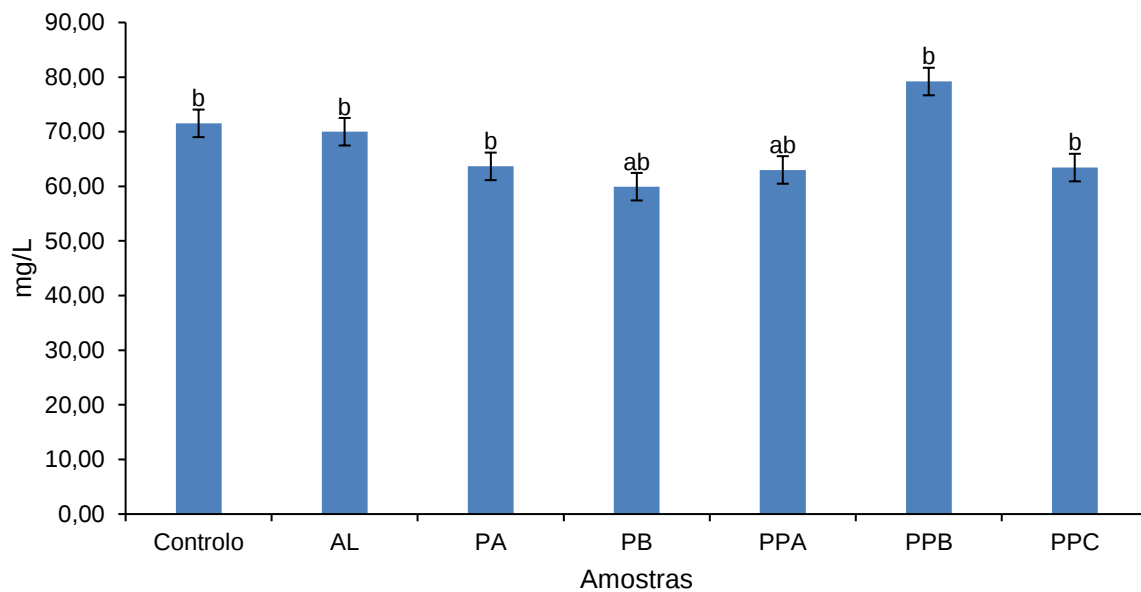


Figura 7 – Antocianinas totais do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas com proteínas. (média ± desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

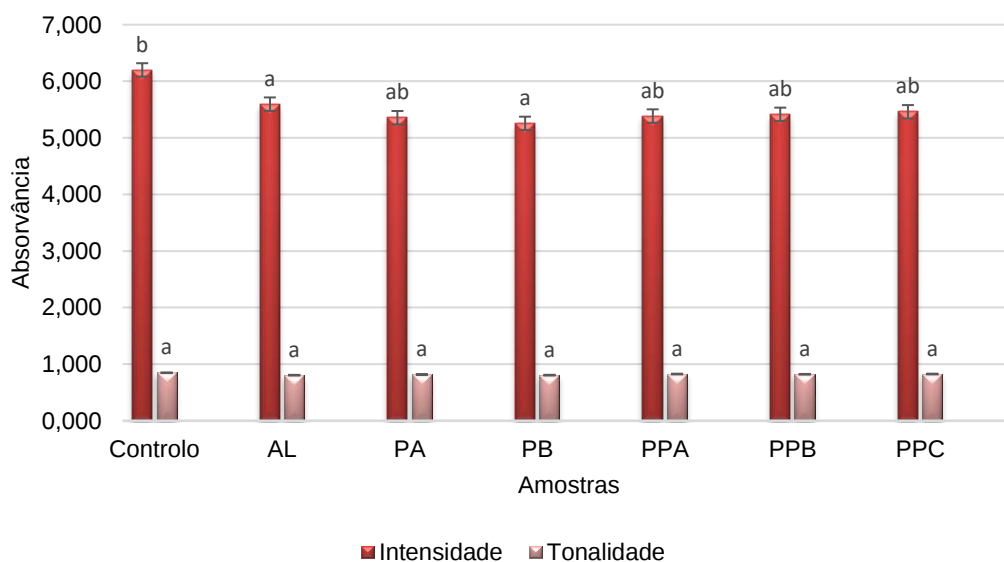


Figura 8 – Intensidade e tonalidade corante do vinho controlo e dos vinhos após colagem com proteínas. (média ± desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

Relativamente aos valores das antocianinas coradas houve diminuição em todas as amostras que foram submetidas a colagem, contudo as diminuições observadas não são significativamente diferentes relativamente ao vinho controlo.

5.3. Influência da colagem com proteínas de origem vegetal e animal nas características cromáticas, pigmentos totais e poliméricos

A colagem do vinho deve realizar-se com os menores efeitos possíveis nas características cromáticas do vinho, principalmente no vinho tinto, para o qual a cor é um atributo que afeta a perceção de qualidade por parte dos consumidores (Jackson, 2002). Para verificar o efeito da colagem com proteínas de origem vegetal e animal nas características do vinho tinto foram analisados os parâmetros cromáticos e os pigmentos totais e poliméricos, dando estes últimos informação da quantidade de antocianinas combinadas com taninos presentes no vinho (Braga, 2007; Gambuti et al., 2012). Em relação aos valores dos pigmentos poliméricos, todas as amostras referentes às colagens demonstraram uma diminuição em comparação com os valores da amostra controlo, sendo que as amostras que apresentam uma diminuição significativa relativamente ao vinho controlo foram as amostras coladas com uma das patatinas, uma das colas de proteína de ervilha, e também com a albumina de ovo. Relativamente aos pigmentos totais, não se verificaram diferenças significativas relativamente ao vinho controlo. Estes resultados estão diretamente ligados aos valores da análise dos parâmetros cromáticos (método CIElab), na medida em que para a luminosidade, L^* , não são observáveis diferenças significativas relativamente ao vinho controlo. A componente da cor vermelha, a^* , na qual se observou um decréscimo dos seus valores em todas as amostras, mas, novamente, com maior expressão nas amostras às quais foram aplicadas a albumina de ovo (AL) e as patatinas (PA e PB), mas de forma não significativa relativamente ao vinho controlo. Todas estes resultados vão ao encontro do que foi observado por Cosme et al. (2007). O parâmetro b^* decresceu de forma significativa nas amostras de vinho que sofreram colagem com as duas patatinas (PA, PB), e na amostra que foi colada com albumina de ovo (AL); este decréscimo significa uma perda ao nível do tom amarelado do vinho. No que toca à componente C^* , o qual mede o contributo relativo tanto da componente a^* como da b^* para a cor do vinho, verificou-se que para a maioria das amostras de vinho que foram submetidas a colagem houve uma diminuição dos seus valores em relação à amostra de controlo, mais esse decréscimo só foi significativo no vinho colado com albumina de ovo (AL). A ligeira diminuição dos valores do croma, C^* , estão de acordo como o observado por Kang et al. (2017). No parâmetro, H^* , a diminuição foi significativa nos vinhos colados, com patatina (PA, PB) e albumina de ovo (AL).

Por fim, observou-se que os valores de diferença de cor (ΔE) das amostras às quais foram aplicadas colas relativamente ao vinho controlo, é visível que todos eles são próximas de 1, significando que as diferenças de cor presentes não são detetáveis ao olho humano (Gonnet, 1998).

Tabela 5.1 – Pigmentos totais e pigmentos poliméricos do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas (média $\pm$ desvio padrão) (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA – proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo), u.a – unidades de absorvância.

Amostras	Pigmentos Totais u. a	Pigmentos Poliméricos u. a
Controlo	9,04 $\pm$ 0,29 ^a	1,69 $\pm$ 0,00 ^b
PA	9,58 $\pm$ 1,01 ^a	1,59 $\pm$ 0,00 ^b
PB	9,08 $\pm$ 0,22 ^a	1,36 $\pm$ 0,00 ^a
PPA	9,24 $\pm$ 1,46 ^a	1,34 $\pm$ 0,00 ^a
PPB	7,98 $\pm$ 0,70 ^a	1,54 $\pm$ 0,00 ^{ab}
PPC	9,48 $\pm$ 0,34 ^a	1,61 $\pm$ 0,00 ^b
AL	9,53 $\pm$ 0,66 ^a	1,34 $\pm$ 0,00 ^a

Tabela 5.2 – Características cromáticas do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas (média $\pm$ desvio padrão) (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA – proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

Amostras	L*	a*	b*	C*	H*	ΔE
Controlo	69,8 $\pm$ 0,74 ^a	40,40 $\pm$ 0,80 ^{ab}	1,12 $\pm$ 0,41 ^c	40,41 $\pm$ 0,80 ^b	0,03 $\pm$ 0,01 ^c	
PA	71,5 $\pm$ 0,65 ^a	39,39 $\pm$ 0,46 ^{ab}	0,47 $\pm$ 0,16 ^{ab}	39,39 $\pm$ 0,46 ^{ab}	0,01 $\pm$ 0,00 ^{ab}	1,72 $\pm$ 0,33
PB	71,4 $\pm$ 0,30 ^a	39,34 $\pm$ 0,22 ^{ab}	0,24 $\pm$ 0,12 ^a	39,34 $\pm$ 0,22 ^{ab}	0,01 $\pm$ 0,00 ^a	1,62 $\pm$ 0,46
PPA	70,8 $\pm$ 0,44 ^a	40,11 $\pm$ 0,40 ^{ab}	0,66 $\pm$ 0,16 ^{abc}	40,12 $\pm$ 0,40 ^{ab}	0,02 $\pm$ 0,00 ^{abc}	1,00 $\pm$ 0,32
PPB	70,2 $\pm$ 0,94 ^a	40,21 $\pm$ 0,80 ^{ab}	0,85 $\pm$ 0,24 ^{bc}	40,21 $\pm$ 0,80 ^{ab}	0,02 $\pm$ 0,01 ^{bc}	0,42 $\pm$ 0,28
PPC	69,8 $\pm$ 0,58 ^a	40,43 $\pm$ 0,38 ^b	0,86 $\pm$ 0,19 ^{bc}	40,44 $\pm$ 0,38 ^b	0,02 $\pm$ 0,00 ^{bc}	0,25 $\pm$ 0,07
AL	70,7 $\pm$ 0,81 ^a	38,88 $\pm$ 0,68 ^a	0,48 $\pm$ 0,19 ^{ab}	38,88 $\pm$ 0,68 ^a	0,01 $\pm$ 0,01 ^{ab}	1,36 $\pm$ 0,94

5.4. Efeito da colagem proteica na composição fenólica do vinho tinto

5.4.1. Compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides

Os compostos fenólicos totais diminuíram em todas as amostras relativamente ao vinho controlo, sendo a amostra de vinho colada com proteína ervilha (PPA) a que obteve valores mais baixos, contudo a diminuição observada não é significativamente diferente relativamente ao vinho controlo. Os trabalhos de Gambuti et al. (2012) suportam esta

diminuição da aplicação de colas de proteínas vegetais, nomeadamente com patatina. Kang et al. (2017) obtiveram resultados nos quais outras proteínas vegetais, como a de arroz e da soja se mostraram mais eficazes na redução dos compostos fenóis totais em comparação com a patatina e proteína de ervilha. A quantificação dos não flavonóides demonstrou que estes compostos diminuiram em todas as amostras submetidas a colagem, sendo as amostras que apresentaram valores mais baixos as coladas com uma da proteína de ervilha (PPA) e com uma das patatinas (PA); as amostras que foram coladas com albumina de ovo demonstraram, no entanto, uma subida significativa dos seus valores. Em relação à quantificação dos flavonóides, tal como se pode observar na Tabela 5.4, os resultados demonstraram uma diminuição destes valores na maioria das amostras, sendo que as que se submeteram à colagem com albumina de ovo (AL) demonstraram os valores mais baixos, tendo uma redução de 5%, aproximadamente, mas não significativas relativamente ao vinho controlo.

Tabela 5.3 – Compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas (Média ± Desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

Amostras	Compostos Fenólicos Totais (mg/L eq. Ácido Gálico)	Não Flavonóides (mg/L eq. Ácido Gálico)	Flavonóides (mg/L eq. Ácido Gálico)
Controlo	390 ± 10 ^a	117 ± 6 ^a	273 ± 15 ^a
PA	386 ± 8 ^a	111 ± 2 ^a	275 ± 7 ^a
PB	386 ± 11 ^a	114 ± 1 ^a	272 ± 10 ^a
PPA	378 ± 0 ^a	110 ± 1 ^a	269 ± 1 ^a
PPB	387 ± 5 ^a	112 ± 3 ^a	275 ± 7 ^a
PPC	384 ± 6 ^a	114 ± 0 ^a	270 ± 6 ^a
AL	396 ± 9 ^a	137 ± 12 ^b	259 ± 20 ^a

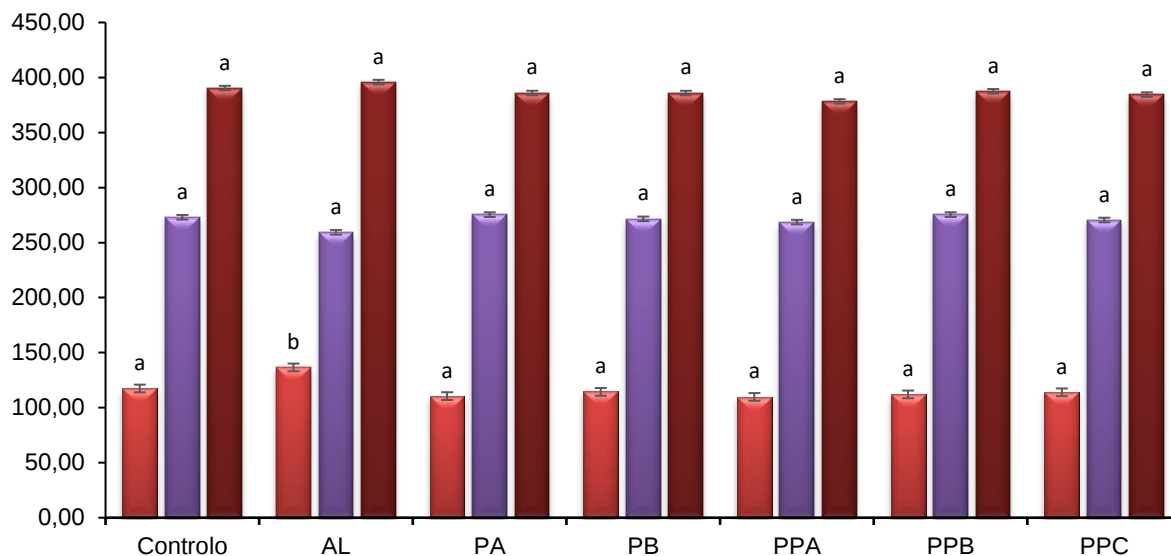


Figura 9 – Não – flavonóides, flavonóides e compostos fenóis totais (CFT*) do vinho controlo e dos vinhos após colagem com colas proteicas (média $\pm$ desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

5.4.2. Perfil das antocianinas monoméricas

As antocianinas monoméricas que foram separadas e detetadas por HPLC foram: delfinifina-3-monoglucósido, cianidina – 3 – monoglucósido, petunidina – 3 – monoglucósido, peonidina – 3 – monoglucósido, malvidina – 3 – monoglucósido e malvidina – 3 – acetilglucósido. Os tempos de retenção médios de cada uma das antocianinas está representados na tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Antocianinas monoméricas detetadas no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas e respetivos tempo de retenção padrão (tempo de retenção $\pm$ desvio padrão);

Antocianinas	Tempos de Retenção $\pm$ DP
delfinifina-3-monoglucósido	17,98 $\pm$ 0,21
cianidina – 3 – monoglucósido	22,59 $\pm$ 0,22
petunidina – 3 – monoglucósido	27,75 $\pm$ 0,22
peonidina – 3 – monoglucósido	30,31 $\pm$ 0,19
malvidina – 3 – monoglucósido	31,68 $\pm$ 0,19
malvidina – 3 – acetilglucósido	43,26 $\pm$ 0,21

Na análise realizada é possível observar que a malvidina – 3 – monoglucósido é a antocianina monomérica com maior concentração nas amostras em estudo; por outro lado a peonidina – 3 – monoglucósido e delfinidina – 3 – monoglucósido são as antocianinas que têm menor concentração no vinho em estudo.

De uma forma geral, todas as antocianinas sofreram um decréscimo em relação à sua concentração na amostra de vinho controlo, tal como demonstrado na Figura 10 e Tabela 5.5, contudo essa diminuição não foi significativa relativamente ao vinho controlo. As antocianinas que tiveram uma diminuição maior mesmo que não tenha sido significativa, foram a peonidina – 3 – monoglucósido e a malvidina – 3 – monoglucósido. Estes resultados estão em concordância com Gambuti et al. (2012), uma vez que também observaram decréscimos da concentração das antocianinas monoméricas mencionadas, nas amostras que foram submetidas a colagens com albumina de ovo (AL) e patatina (PA).

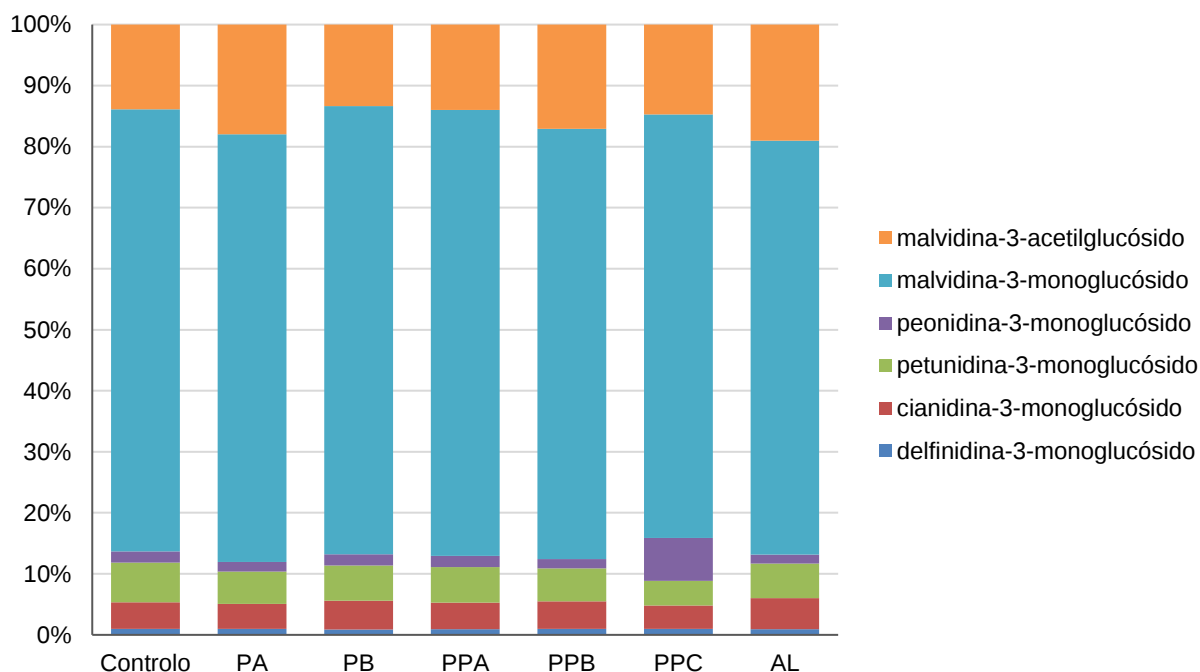


Figura 10 – Concentração relativa das antocianinas monoméricas detetadas e quantificadas no controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas; (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

Tabela 5.5 – Antocianinas monoméricas detectadas, identificadas e quantificadas no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas (média ± desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

	Controlo	AL	PA	PB	PPA	PPB	PPC
delfinidina-3-monoglucósido (mg/L)	0,84 ± 0,15 ^a	0,58 ± 0,15 ^a	0,61 ± 0,05 ^a	0,71 ± 0,09 ^a	0,69 ± 0,01 ^a	0,60 ± 0,09 ^a	0,71 ± 0,10 ^a
cianidina-3-monoglucósido (mg/L)	3,65 ± 1,27 ^a	3,08 ± 0,78 ^a	2,57 ± 0,02 ^a	3,89 ± 0,58 ^a	3,24 ± 0,32 ^a	2,79 ± 0,58 ^a	2,88 ± 0,57 ^a
petunidina-3-monoglucósido (mg/L)	5,43 ± 1,56 ^a	3,46 ± 2,01 ^a	3,33 ± 0,99 ^a	4,72 ± 0,27 ^a	4,33 ± 0,98 ^a	3,36 ± 0,06 ^a	3,01 ± 0,98 ^a
peonidina-3-monoglucósido (mg/L)	1,58 ± 0,42 ^a	0,90 ± 3,68 ^a	0,97 ± 0,34 ^a	1,52 ± 0,11 ^a	1,36 ± 0,91 ^a	0,96 ± 0,00 ^a	1,25 ± 0,91 ^a
malvidina-3-monoglucósido (mg/L)	60,75 ± 11,65 ^a	41,45 ± 9,83 ^a	43,90 ± 10,69 ^a	60,19 ± 3,21 ^a	54,33 ± 7,19 ^a	43,69 ± 0,55 ^a	51,72 ± 7,19 ^a
malvidina-3-acetilglucósido (mg/L)	11,63 ± 0,21 ^a	11,61 ± 0,99 ^a	11,25 ± 0,18 ^a	10,96 ± 0,58 ^a	10,40 ± 0,50 ^a	10,57 ± 0,54 ^a	10,97 ± 0,50 ^a
Totais (mg/L)	83,78	61,08	62,63	81,99	74,35	61,97	74,54

5.4.3. Perfil dos ácidos fenólicos e flavonóides

Os ácidos fenólicos e flavonóides que foram detetados por HPLC foram: ácido gálico, catequina, (-) – galhocatequina, ácido *trans*-caftárico, ácido *p*-coutárico, ácido cafeico, ácido hidroxicumárico e ácido ferúlico. Os tempos de retenção médios de cada um dos ácidos e flavonóides estão representados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Ácidos fenólicos e flavonóides detetados no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas e respetivo tempo de retenção (tempo de retenção $\pm$ desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

Ácidos fenólicos/Flavonóides	Tempos de Retenção $\pm$ DP
Ácido Gálico	4,86 $\pm$ 0,16
Catequina	12,92 $\pm$ 0,50
(-) Galhocatequina	4,09 $\pm$ 0,28
Ácido <i>trans</i> -caftárico	10,59 $\pm$ 0,07
Ácido <i>p</i> -coutárico	12,69 $\pm$ 0,05
Ácido Cafeico	17,14 $\pm$ 0,28
Ácido Hidroxicumárico	23,94 $\pm$ 0,21
Ácido Ferúlico	27,80 $\pm$ 0,22

Analisando os resultados obtidos é possível verificar que os ácidos fenólicos que têm maior expressão nas amostras são o ácido *trans* – caftárico, o ácido gálico e o ácido *p*-coutárico. De forma oposta, a catequina e o ácido ferúlico são os compostos que estão em menor percentagem na constituição do vinho analisado.

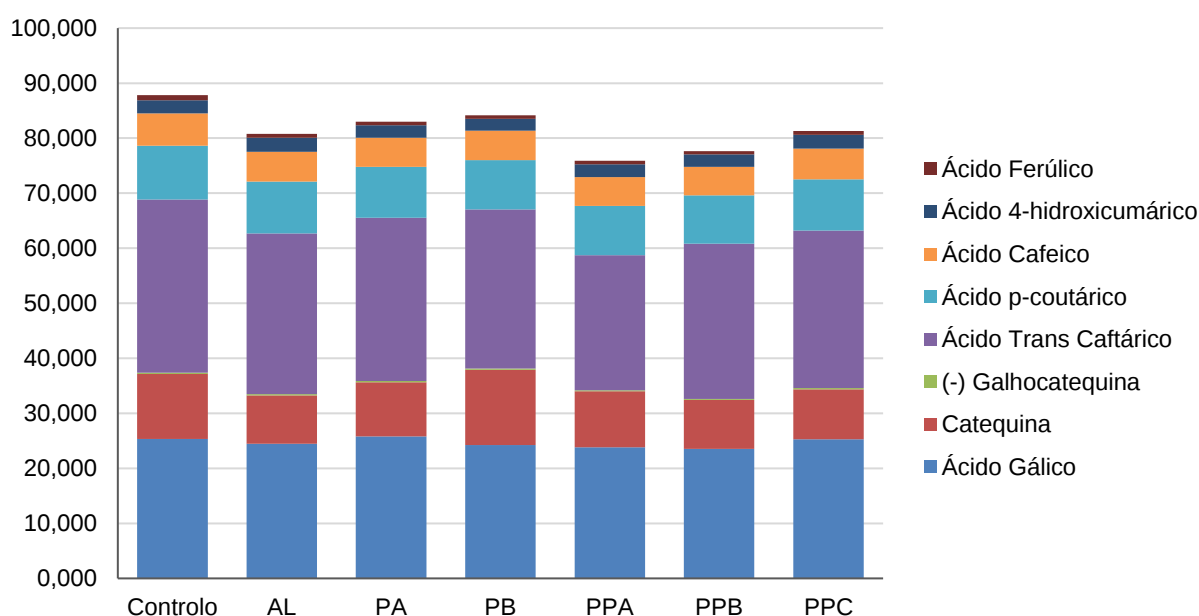


Figura 11 – Concentração relativa dos ácidos fenólicos e flavonóides detetados e quantificados no vinho controlo e nos vinhos após colagem com as colas proteicas; (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

Os resultados obtidos revelam uma diminuição geral do conteúdo de ácidos fenólicos. As colas proteicas que mais se evidenciaram na diminuição dos ácidos fenólicos foram as patatinas (PB) e a proteína de ervilha (PPB), o que está em concordância com a diminuição dos compostos não flavonóides, também verificada pela determinação pelos métodos espectrofotométricos. Ghanem et al. (2017) obtiveram resultados nos quais o efeito das proteínas vegetais na colagem de vinho tinto é bastante fraco ou quase nulo, o que está de acordo com o efeito verificado neste trabalho

Tabela 5.7 - Ácidos Fenólicos e flavonoides, detetados, identificados e quantificados no vinho controlo e nos vinhos após colagem com colas proteicas (média $\pm$ desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

	Controlo	AL	PA	PB	PPA	PPB	PPC
Ácido Gálico	25,319 $\pm$ 0,07 ^{cd}	24,495 $\pm$ 0,18 ^{abc}	25,808 $\pm$ 0,39 ^d	24,261 $\pm$ 0,18 ^{ab}	23,857 $\pm$ 0,05 ^a	23,524 $\pm$ 0,18 ^a	25,261 $\pm$ 0,22 ^{bcd}
Catequina	11,805 $\pm$ 2,17 ^a	8,761 $\pm$ 1,83 ^a	9,852 $\pm$ 0,23 ^a	13,659 $\pm$ 1,05	10,135 $\pm$ 0,26 ^a	8,885 $\pm$ 1,05	9,125 $\pm$ 0,74 ^a
(-) Galhocatequina	0,247 $\pm$ 0,01 ^b	0,231 $\pm$ 0,00 ^{ab}	0,206 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,192 $\pm$ 0,01 ^a	0,209 $\pm$ 0,00 ^{ab}	0,209 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,228 $\pm$ 0,02 ^{ab}
Ácido <i>Trans</i> Caftárico	31,507 $\pm$ 1,39 ^b	29,221 $\pm$ 0,72 ^b	29,652 $\pm$ 0,18 ^b	28,928 $\pm$ 0,53 ^b	24,533 $\pm$ 0,19 ^a	28,202 $\pm$ 0,53 ^b	28,586 $\pm$ 0,16 ^b
Ácido <i>p</i>-coutárico	9,775 $\pm$ 0,18 ^c	9,378 $\pm$ 0,02 ^{bc}	9,252 $\pm$ 0,12 ^{ab}	8,990 $\pm$ 0,09 ^{ab}	8,971 $\pm$ 0,07 ^{ab}	8,785 $\pm$ 0,09 ^a	9,335 $\pm$ 0,05 ^{bc}
Ácido Cafeico	5,863 $\pm$ 0,45 ^a	5,459 $\pm$ 0,12 ^a	5,316 $\pm$ 0,13 ^a	5,308 $\pm$ 0,15 ^a	5,241 $\pm$ 0,01 ^a	5,209 $\pm$ 0,15 ^a	5,550 $\pm$ 0,04 ^a
Ácido 4-hidroxicumárico	2,402 $\pm$ 0,13 ^a	2,561 $\pm$ 0,24 ^a	2,239 $\pm$ 0,05 ^a	2,190 $\pm$ 0,12 ^a	2,236 $\pm$ 0,03 ^a	2,229 $\pm$ 0,12 ^a	2,520 $\pm$ 0,16 ^a
Ácido Ferúlico	0,878 $\pm$ 0,20 ^a	0,652 $\pm$ 0,00 ^a	0,676 $\pm$ 0,02 ^a	0,638 $\pm$ 0,05 ^a	0,643 $\pm$ 0,02 ^a	0,615 $\pm$ 0,05 ^a	0,691 $\pm$ 0,01 ^a

5.5. Efeito da colagem proteica na caracterização sensorial do vinho tinto

5.5.1. Perfil sensorial do vinho tinto

O perfil sensorial de cada amostra de vinho está representado pela Fig.12 onde a soma dos valores médios concedidos pelos membros do painel de prova para cada atributo está assinalada no eixo correspondente, desta forma o perfil sensorial da amostra revela-se quando os pontos se ligam. O centro do gráfico representa o valor mais baixo da escala utilizada no processo de avaliação, para além disso, a intensidade de cada atributo aumenta do centro do gráfico para a sua periferia. A partir da análise dos resultados de análise sensorial, através da aplicação da análise de variância (ANOVA) e do teste de Duncan com um nível de significância de 5%, para se compararem os valores médios de classificação para cada atributo verificou-se que não existem diferenças significativas ao nível sensorial de entre as amostras estudadas, isto é, as amostras possuem um perfil sensorial semelhante, também representado na Tabela 5.9.

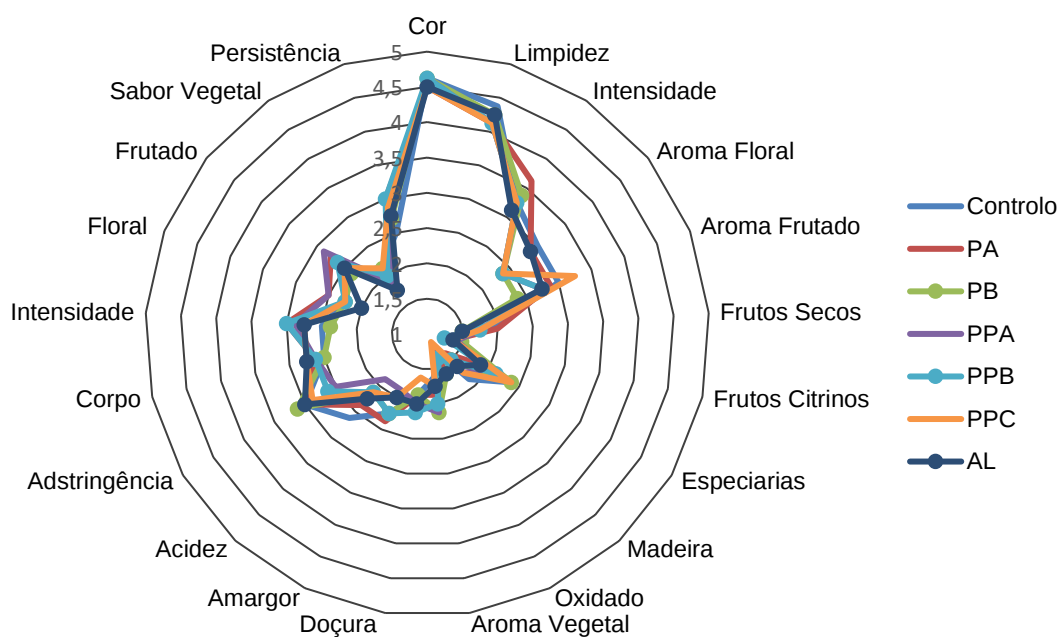


Figura 12 –Perfil sensorial dos 7 vinhos colados com diferentes colas proteicas e comparados com o vinho sem tratamento (vinho controlo). Vinho Controlo (Controlo); patatina (PA, PB); proteína de ervilha (PPA, PPB, PPC) e albumina de ovo (AL)

Tabela 5.8 – Avaliação sensorial do vinho controle e nos vinhos após colagem com colas proteicas (média ± desvio padrão); (PA – patatina A; PB – patatina B; PPA - proteína de ervilha A; PPB – proteína de ervilha B; PPC – proteína de ervilha C; AL – albumina de ovo)

Amostras		Controlo	PA	PB	PPA	PPB	PPC	AL
Aspeto	Cor	4,63 ± 0,70 ^a	4,50 ± 0,70 ^a	4,63 ± 0,87 ^a	4,63 ± 0,87 ^a	4,63 ± 0,70 ^a	4,50 ± 0,87 ^a	4,50 ± 0,87 ^a
	Lipidez	4,38 ± 1,09 ^a	4,13 ± 1,05 ^a	4,25 ± 1,05 ^a	4,13 ± 1,05 ^a	4,13 ± 1,05 ^a	4,13 ± 1,05 ^a	4,25 ± 1,09 ^a
Aroma	Intensidade	3,25 ± 0,99 ^a	3,63 ± 0,66 ^a	3,38 ± 0,70 ^a	3,25 ± 0,78 ^a	3,25 ± 0,66 ^a	3,25 ± 0,66 ^a	3,13 ± 0,78 ^a
	Floral	3,00 ± 1,00 ^a	2,88 ± 0,87 ^a	2,38 ± 0,43 ^a	2,38 ± 0,66 ^a	2,38 ± 0,86 ^a	2,38 ± 0,48 ^a	2,88 ± 0,78 ^a
	Frutado	3,00 ± 0,83 ^a	2,88 ± 0,87 ^a	2,38 ± 1,17 ^a	2,75 ± 0,87 ^a	2,75 ± 0,43 ^a	3,25 ± 1,20 ^a	2,75 ± 0,83 ^a
	Frutos Secos	1,88 ± 0,86 ^a	2,00 ± 0,83 ^a	1,50 ± 0,83 ^a	1,75 ± 0,99 ^a	1,75 ± 0,83 ^a	1,75 ± 0,83 ^a	1,50 ± 1,00 ^a
	Frutos Citrinos	1,38 ± 0,70 ^a	1,38 ± 0,43 ^a	1,50 ± 0,70 ^a	1,43 ± 0,35 ^a	1,25 ± 0,43 ^a	1,38 ± 0,70 ^a	1,38 ± 0,70 ^a
	Especiarias	2,38 ± 0,71 ^a	1,88 ± 0,71 ^a	2,38 ± 1,22 ^a	2,00 ± 0,50 ^a	2,13 ± 0,78 ^a	2,38 ± 1,22 ^a	1,88 ± 0,60 ^a
	Madeira	1,88 ± 0,97 ^a	1,38 ± 0,87 ^a	1,50 ± 0,97 ^a	1,75 ± 0,70 ^a	1,50 ± 0,87 ^a	1,75 ± 0,97 ^a	1,63 ± 0,70 ^a
	Oxidado	1,25 ± 0,33 ^a	1,50 ± 0,43 ^a	1,63 ± 0,70 ^a	1,25 ± 1,00 ^a	1,38 ± 0,70 ^a	1,13 ± 0,33 ^a	1,63 ± 0,99 ^a
	Vegetal	1,63 ± 1,30 ^a	1,88 ± 1,30 ^a	2,13 ± 0,87 ^a	2,13 ± 0,70 ^a	2,00 ± 1,32 ^a	1,75 ± 0,83 ^a	1,75 ± 0,66 ^a
Sabor/Flavor	Doçura	1,88 ± 0,87 ^a	1,88 ± 0,78 ^a	1,88 ± 0,83 ^a	2,00 ± 0,71 ^a	2,13 ± 0,78 ^a	1,63 ± 0,70 ^a	2,00 ± 0,71 ^a
	Amargor	2,25 ± 0,78 ^a	2,38 ± 1,39 ^a	2,25 ± 0,93 ^a	1,88 ± 1,27 ^a	2,25 ± 1,39 ^a	2,00 ± 1,00 ^a	2,00 ± 1,22 ^a
	Acidez	2,63 ± 0,78 ^a	2,38 ± 0,60 ^a	2,13 ± 0,60 ^a	1,88 ± 0,66 ^a	2,13 ± 0,60 ^a	2,13 ± 0,60 ^a	2,25 ± 0,66 ^a
	Adstringência	3,00 ± 0,48 ^a	3,00 ± 1,00 ^a	3,13 ± 0,71 ^a	2,50 ± 0,66 ^a	2,63 ± 0,99 ^a	2,88 ± 0,78 ^a	3,00 ± 0,71 ^a
	Corpo	2,50 ± 0,87 ^a	2,63 ± 0,48 ^a	2,50 ± 0,78 ^a	2,63 ± 0,70 ^a	2,63 ± 0,48 ^a	2,75 ± 0,83 ^a	2,75 ± 0,66 ^a
	Intensidade	2,50 ± 0,66 ^a	3,00 ± 0,50 ^a	2,38 ± 1,20 ^a	2,88 ± 1,05 ^a	3,00 ± 0,50 ^a	2,75 ± 1,20 ^a	2,75 ± 1,09 ^a
	Floral	2,25 ± 0,48 ^a	2,50 ± 0,83 ^a	2,25 ± 0,66 ^a	2,50 ± 0,87 ^a	2,25 ± 0,83 ^a	2,25 ± 0,66 ^a	2,00 ± 0,87 ^a
	Frutado	2,38 ± 0,99 ^a	2,75 ± 1,09 ^a	2,38 ± 1,00 ^a	2,88 ± 0,86 ^a	2,63 ± 0,99 ^a	2,50 ± 1,00 ^a	2,50 ± 0,87 ^a
	Vegetal	2,14 ± 0,99 ^a	1,75 ± 1,32 ^a	2,13 ± 0,93 ^a	1,88 ± 0,83 ^a	2,00 ± 1,32 ^a	2,13 ± 0,93 ^a	1,75 ± 0,83 ^a
	Persistência	2,50 ± 0,97 ^a	3,00 ± 1,05 ^a	2,71 ± 0,93 ^a	2,75 ± 1,09 ^a	3,00 ± 1,00 ^a	2,88 ± 0,93 ^a	2,75 ± 1,09 ^a

Conclusão

A colagem dos vinhos tintos com colas proteicas quer de origem vegetal quer de origem animal tem como objetivo a estabilização do vinho, com consequente melhoria sensorial do mesmo. No âmbito de se oferecer uma alternativa para as colas tradicionais, de origem animal, face à alergeinidade e/ou intolerância apresentada por alguns consumidores, foram testadas colas de origem vegetal relativamente ao seu nível de eficiência comparativamente uma cola de origem animal tradicionalmente utilizada. Em relação à avaliação do impacto ao nível da composição fenólica e cromática comparativamente à albumina foi possível verificar que a patatina foi a proteína de origem vegetal que ao nível da tonalidade corante, antocianinas totais e monoméricas, pigmentos totais e poliméricos mostrou uma diminuição, mas não significativa, seguindo-se da albumina de ovo. Por consequência da diminuição destes parâmetros, os vinhos colados com patatina obtiveram o maior aumento de luminosidade, L^* , e maior decréscimo da componente da cor vermelha (a^*) como resultado da maior remoção de antocianinas e pigmentos do vinho. Contudo os valores de ΔE são próximos de 1, o que faz com que o efeito das colas nas características cromáticas do vinho não foi detetável a olho nu. No âmbito do impacto ao nível da análise sensorial comparativamente à albumina, não foram identificadas diferenças significativas entre as amostras de vinho. No que toca à quantificação dos ácidos fenólicos e flavonóides a diminuição mais significativa foi detetada nas amostras de vinhos coladas com patatina e com proteína de ervilha, resultados que se encontram em concordância com os valores dos compostos não flavonóides e flavonóides (ácido gálico e catequina) das amostras de vinho onde foram aplicadas estas mesmas colas, contudo as diferenças não foram significativas. A análise sensorial das amostras de vinho submetidas às várias colas aplicadas não revelou diferenças significativas em quaisquer dos atributos em relação à amostra de vinho controlo.

A partir do presente trabalho é possível reter a informação de que a colagem com patatina é uma alternativa adequada à colagem com a albumina de ovo, a cola mais frequentemente aplicada em vinhos tintos, uma vez que ao nível físico-químico apresenta valores bastante idênticos sem serem detetados efeitos indesejáveis a nível sensorial, sendo possível, portanto, verificar a viabilidade de aplicação de proteínas de origem vegetal como tratamento de colagem em vinhos tintos.

Futuramente teria bastante interesse a repetição deste mesmo estudo em vinhos com matrizes fenólicas ou até mesmo resultantes de métodos de vinificação diferentes, de forma a verificar a consistência de resultados e aplicabilidade de colas de patatina. Para

além disto, seria de todo o interesse da comunidade científica o aprofundar do estudo de novas colas de proteínas vegetais, bem como da sua caracterização, por exemplo, ao nível do peso molecular e estado de pureza.

Referências Bibliográficas

- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64 (Supplement C), 1-12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008>
- Bajec, M. R., & Pickering, G. J. (2008). Astringency: mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food and Science Nutrition*, 48(9), 858-875. doi:10.1080/10408390701724223
- Barros, A., & Cosme, F. (2013). Allergenic proteins in foods and beverages. *Food Technology and Biotechnology*, 51(2), 153-158.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414-431. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Braga, J. W. B., Bottoli, C. B., Jardim, I. C., Goicoechea, H. C., Olivieri, A. C., & Poppi, R. J. (2007). Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods. *Journal of Chromatography A*, 1148(2), 200-210.
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1593-1601. doi:10.1021/jf010897z
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2007). Protein fining agents: Characterization and red wine fining assays. *Italian Journal of Food Science*, 19(1), 39-56.
- Cosme, F., Capão, I., Filipe-Ribeiro, L., Bennett, R.N., Mendes-Faia, A. (2012). Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white wine fining: Effects on physicochemical and sensory characteristics, *LWT- Food Science and Technology*, 46, 382-387
- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2008). Interactions between protein fining agents and proanthocyanidins in white wine. *Food Chemistry*, 106(2), 536-544. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.038>
- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Effect of Various Proteins on Different Molecular Weight Proanthocyanidin Fractions of Red Wine during Wine Fining. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(1), 74-81.
- Cristino, R., Costa, E., Cosme, F., & Jordão, A. M. (2013). General phenolic characterisation, individual anthocyanin and antioxidant capacity of matured red

- wines from two Portuguese Appellations of Origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2486-2493. doi:10.1002/jsfa.6064
- Deckwart, M., Carstens, C., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Kang, S., Paschke-Kratzin, A. (2014). Development of a sensitive ELISA for the detection of casein-containing fining agents in red and white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6803-6812. doi:10.1021/jf5006098
- Deckwart, M., Carstens, C., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Schröter, F., . . . Paschke-Kratzin, A. (2014). Impact of wine manufacturing practice on the occurrence of fining agents with allergenic potential. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(11), 1805-1817. doi:10.1080/19440049.2014.963700
- Esau, P. S. L., Vernon. (1969). *Phenolic Substances in Grapes and Wine, and Their Significance* (C. O. M. Chichester, E. M.; Stewart, G. F. Ed.).
- Faria, M. E. S. P. d. O. (2000). *Proantocianidinas do vinho*. Universidade do Porto. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10216/54590>
- Filipe-Ribeiro, L., Milheiro, J., Matos, C. C., Cosme, F. & Nunes, F. M. (2017). Data on changes in red wine phenolic compounds, headspace aroma compounds and sensory profile after treatment of red wines with activated carbons with different physicochemical characteristics. Data in Brief 12: 188-202
- Fortes, A. M., & Pais, M. S. (2016). Chapter 12 - Grape (*Vitis* species) A2 - Simmonds, Monique S.J. In V. R. Preedy (Ed.), *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 257-286). San Diego: Academic Press.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., & Moio, L. (2012). Use of patatin, a protein extracted from potato, as alternative to animal proteins in fining of red wine. *European Food Research and Technology*, 235(4), 753-765. doi:10.1007/s00217-012-1791-y
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(2), 74-95. doi:10.1111/j.1755-0238.1998.tb00137.x
- Gawel, R., Iland, P. G., & Francis, I. L. (2001). Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Quality and Preference*, 12(1), 83-94. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293\(00\)00033-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293(00)00033-1)
- Gawel, R., Oberholster, A., & Francis, I. L. (2000). A 'Mouth-feel Wheel': terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(3), 203-207. doi:10.1111/j.1755-0238.2000.tb00180.x
- Geana, E. I., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O. R., Ionete, R. E., Stefanescu, I., Bala, C. (2016). Classification of red wines using suitable markers coupled with

- multivariate statistic analysis. *Food Chemistry*, 192, 1015-1024. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.112>
- Ghanem, C.; Taillandier, P.; Rizk, M.; Rizk, Z.; Nehme, N.; Souchard, J.P.; El Rayess, Y. Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and manno-proteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine. *LWT Food Science and Technology*. 2017, 83, 101–109.
- Guise, R., Filipe-Ribeiro, L., Nascimento, D., Bessa, O., Nunes, F. M., Cosme, F. (2014). Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chemistry*, 156, 250-257.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4494-4497.
- Harbertson, J.; Spayd, S. Measuring phenolics in the winery. *American Journal of Enological and Viticultural*, 57, 280-288, 2006
- International Organization for Standardization. (1977). Sensory Analysis – Apparatus – Wine Tasting (ISO Standard No. 3591:1977). <https://www.iso.org/standard/9002.html>
- International Organization for Standardization. (2007). Sensory Analysis – General guidance for the design of test rooms (ISO Standard No. 8589:2007). <https://www.iso.org/standard/36385.html>
- International Organization for Standardization. (2003). Sensory Analysis – Guidelines for the use of quantitative response scales (ISO Standard No. 4121:2003). <https://www.iso.org/standard/33817.html>
- International Organization for Standardization. (1985). Sensory Analysis – Methodology - General guidance (ISO Standard No. 6658:1985). <https://www.iso.org/standard/13086.html>
- Jackson, R. S. (2002). *WINE TASTING: A Professional Handbook*. Oxford: Elsevier Ltd.
- Jackson, S. R. (2008). *Wine Science - Principles and Applications* (3rd Edition ed.): Elsevier Inc.
- Jauregi, P., Olatujoye, J. B., Cabezudo, I., Frazier, R. A., & Gordon, M. H. (2016). Astringency reduction in red wine by whey proteins. *Food Chemistry*, 199, 547-555. doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.052
- Karamanidou, A., Kallithraka, S., & Hatzidimitriou, E. (2011). Fining of red wines: Effects on their analytical and sensory parameters. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 45(1), 47-60.

- Kennedy, J. A., Saucier, C., & Glories, Y. (2006). Grape and Wine Phenolics: History and Perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 239-248.
- Kirschner, S., Belloni, B., Kugler, C., Ring, J., & Brockow, K. (2009). Allergenicity of wine containing processing aids: a double-blind, placebo-controlled food challenge. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 19(3), 210-217.
- Koestel, C., Simonin, C., Belcher, S., & Rösti, J. (2016). Implementation of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Quantification of Allergenic Egg Residues in Red Wines Using Commercially Available Antibodies. *Journal of Food Science*, 81(8), T2099-T2106. doi:10.1111/1750-3841.13378
- Kramling, T. E., & Singleton, V. L. (1969). An Estimate of the Nonflavonoid Phenols in Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20(2), 86-92.
- Lefebvre S., Sieczkowski N., & F., V. (2005). La sécurité alimentaire en œnologie : cas des protéines végétales. *Revue française d'oenologie*(210), 23-30.
- Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 330s-335s.
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 6-19. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.001>
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- Mateus, N., Machado, J. M., & de Freitas, V. (2002). Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(14), 1689-1695. doi:10.1002/jsfa.1237
- Meyer, P., & Zanetti, S. (2015). Detection of Traces of Ovalbumin and Casein in White and Red Wines by Quantitative Western Blotting. *Journal of Food Science*, 80(9), 2102-2109. doi:10.1111/1750-3841.12990
- Mills, E. N., Mackie, A. R., Burney, P., Beyer, K., Frewer, L., Madsen, C., . . . van Ree, R. (2007). The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Allergy*, 62(7), 717-722. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01425.x
- Mills, E. N. C., & Breiteneder, H. (2005). Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnology Advances*, 23(6), 409-414. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.05.006>

- Noriega-Domínguez, M. J., Duran, D. S., Vírveda, P., & Marín-Arroyo, M. R. (2010). Non-animal proteins as clarifying agents for red wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 44(3), 179-189.
- OIV. (2016). *OIV Statistical Report on World Vitiviniculture*. Retrieved from
- P. Ribéreau-Gayon, A. Maujean Y. G., D. Dubourdieu. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments* West Sussex PO19 8SQ, England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Póvoas, M. J. C. (2006). *Estudo dos fenómenos físico-químicos que estão associados ao sabor dos alimentos : interação das proteínas com os polifenóis* Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Porto. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10216/64113>
- Quijada-Morin, N., Regueiro, J., Simal-Gandara, J., Tomas, E., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailon, M. T. (2012). Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *J Agric Food Chem*, 60(50), 12355-12361. doi:10.1021/jf3044346
- Reinkensmeier, A., Bußler, S., Schlüter, O., Rohn, S., & Rawel, H. M. (2015). Characterization of individual proteins in pea protein isolates and air classified samples. *Food Research International*, 76(Part 1), 160-167. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.009>
- Restani, P., Uberti, F., Tarantino, C., Ballabio, C., Gombac, F., Bastiani, E., . . . Danzi, R. (2014). Collaborative Interlaboratory Studies for the Validation of ELISA Methods for the Detection of Allergenic Fining Agents Used in Wine According to the Criteria of OIV Resolution 427-2010 Modified by OIV-Comex 502-2012. *Food Analytical Methods*, 7(3), 706-712. doi:10.1007/s12161-013-9741-2
- Schmidt, J. M., Damgaard, H., Greve-Poulsen, M., Larsen, L. B., & Hammershøj, M. (2018). Foam and emulsion properties of potato protein isolate and purified fractions. *Food Hydrocolloids*, 74(Supplement C), 367-378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.032>
- Soares, S., Brandao, E., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017). Sensorial properties of red wine polyphenols: Astringency and bitterness. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(5), 937-948. doi:10.1080/10408398.2014.946468
- Somers, T. C., & Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(3), 279-287. doi:10.1002/jsfa.2740280311

- Stanković, S.B., Jović, S., & Zivkovic, J.V. (2004). Bentonite and Gelatine Impact on the Young Red Wine Coloured Matter. *Food Technology and Biotechnology*, 42, 183-188.
- Tolin, S., Pasini, G., Curioni, A., Arrigoni, G., Masi, A., Mainente, F., & Simonato, B. (2012). Mass spectrometry detection of egg proteins in red wines treated with egg white. *Food Control*, 23(1), 87-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.016>
- Tolin, S., Pasini, G., Simonato, B., Mainente, F., & Arrigoni, G. (2012). Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. *Food Control*, 28(2), 321-326. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.015>
- Tschiersch, C., Nikfardjam, M. P., Schmidt, O., & Schwack, W. (2010). Degree of hydrolysis of some vegetable proteins used as fining agents and its influence on polyphenol removal from red wine. *European Food Research and Technology*, 231(1), 65-74. doi:10.1007/s00217-010-1253-3
- Uberti, F., Danzi, R., Stockley, C., Peñas, E., Ballabio, C., Di Lorenzo, C., . . . Restani, P. (2014). Immunochemical investigation of allergenic residues in experimental and commercially-available wines fined with egg white proteins. *Food Chemistry*, 159, 343-352. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.025>
- Vidal, L., Giménez, A., Medina, K., Boido, E., & Ares, G. (2015). How do consumers describe wine astringency? *Food Research International*, 78, 321-326. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.025>
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., . . . Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3), 209-217. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00059-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00059-4)
- Weber, P., Steinhart, H., & Paschke, A. (2007). Investigation of the Allergenic Potential of Wines Fined with Various Proteinogenic Fining Agents by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3127-3133. doi:10.1021/jf063436s