

TMUP
102
2006

Maria João Coelho Póvoas

U. PORTO

FC

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO**

***ESTUDO DOS FENÓMENOS FÍSICO-QUÍMICOS QUE ESTÃO
ASSOCIADOS AO SABOR DOS ALIMENTOS.
INTERACÇÃO DAS PROTEÍNAS COM OS POLIFENÓIS.***

Departamento de Química

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2006

QD255.4
POVm E
2006



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



D000119369

Maria João Coelho Póvoas

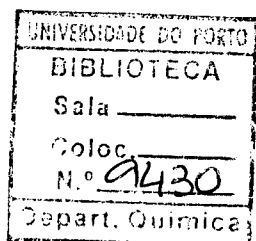
U. PORTO

FC

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO**

***ESTUDO DOS FENÓMENOS FÍSICO-QUÍMICOS QUE ESTÃO
ASSOCIADOS AO SABOR DOS ALIMENTOS.
INTERACÇÃO DAS PROTEÍNAS COM OS POLIFENÓIS.***

***Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção
do grau de Mestre em Química***



A Presidente do júri

N. Agostinho Neto

6.12.2006

Departamento de Química

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2006

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram directa ou indirectamente, para o desenrolar deste trabalho ajudando-me a ultrapassar todos os problemas que foram surgindo.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, o Prof. Doutor Victor de Freitas, pelo acompanhamento, ensinamentos, dedicação, apoio e incentivos que sempre me deu.

Quero agradecer ao Prof. Doutor Nuno Mateus pela disponibilidade e ajuda sempre manifestados.

Agradeço ao Prof. Doutor Celestino Santos-Buelga e ao seu grupo de investigação da Universidade de Salamanca, em particular à Susana, por todas as análises de Espectrometria de Massa.

Quero agradecer ao Luís pelo apoio, ajuda e disponibilidade sempre manifestada, especialmente neste último ano.

Aos meus colegas de laboratório, Beta, Joana, Carlos, Ana, Ana Luísa, Sofia, Nicola e Jingren He por todas as vivências inesquecíveis, pelas constantes ajudas, pelo apoio e pela boa disposição.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram que eu era capaz de levar este projecto até ao fim.

Ao meu namorado pela força, incentivo e paciência que sempre demonstrou, apesar de as coisas nem sempre terem sido fáceis.

A todos os meus amigos, especialmente à Ana P., à Liliana, à Carla, à Lurdes, à Cláudia e à Ana pela compreensão e ajuda que manifestaram sempre.

Por último, gostaria de agradecer à entidade que permitiu que este trabalho fosse possível:

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, especialmente ao Departamento de Química por me ter recebido durante todos estes anos.

Este trabalho de investigação tem como objectivo estudar as interacções entre polifenóis e proteínas de forma a compreender melhor os fenómenos físico-químicos que estão na origem do sabor dos alimentos, em particular a adstringência.

Pretende-se averiguar a influência de diferentes factores, tais como a concentração em proteínas e em taninos, o tipo de estrutura dos taninos e a presença de diferentes carboidratos, na formação de complexos proteína-tanino.

Pretende-se ainda desenvolver um método que permita a análise objectiva da adstringência de vinhos brancos. Para isso foram estudados vinhos brancos portugueses com diferentes origens demográficas com recurso à nefelometria em fluxo.

A formação de agregados entre a BSA (Albumina Sérica Bovina) e diferentes tipos de taninos é influenciada por vários factores tais como a concentração de proteína e taninos, o grau de polimerização dos taninos, a ocorrência de pontes etilo entre unidades de catequinas e a presença de carboidratos. A Actividade Tanante Específica (ATE), designação atribuída ao máximo de turbidez obtido por nefelometria em fluxo, aumenta com a concentração de taninos e de BSA. No entanto, valores elevados de concentração de BSA podem promover a resolubilização dos agregados BSA-tanino, devido a alterações na estequiometria do complexo. A estequiometria do complexo BSA-tanino é de 1:5, para taninos condensados com massa molecular média de 2052 Da, o que está de acordo com os valores citados na literatura. Por outro lado, a ATE aumenta com a massa molecular média das procianidinas e dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-. No entanto, verifica-se que a presença de pontes etilo diminui a ATE deste tipo de compostos comparativamente com procianidinas com a mesma massa molecular.

Os carboidratos estudados (pectina, xantana e goma-arábica) inibiram diferentemente a formação de agregados BSA-tanino, sendo a xantana o carboidrato mais eficiente na inibição da formação dos complexos, provavelmente devido à capacidade deste em formar um gel polimérico com poros capazes de encapsularem partículas de pequena dimensão como os taninos ou pequenos agregados BSA-tanino.

A técnica de nefelometria em fluxo foi adoptada para determinar directamente a ATE de vinhos brancos. Foram analisados dez vinhos brancos provenientes de diferentes regiões demarcadas, que apresentaram valores de ATE bastante distintos. Considerando que a formação de agregados BSA-tanino está directamente relacionada com a adstringência de alimentos, será de esperar que os vinhos com valores superiores de ATE sejam mais adstringentes.

A nefelometria em fluxo revelou-se uma técnica simples, reprodutível e versátil para estudar as interacções entre proteínas, taninos e carboidratos. Esta técnica permite alterar as concentrações relativas das espécies intervenientes, variando os respectivos fluxos, sem necessidade de diluir as amostras.

The formation of aggregates between BSA (protein) and tannins is influenced by several factors such as tannin and protein concentration, the size of polymeric tannins, the presence of ethyl bridges between the catechine units and the presence of carbohydrates. The Specific Activity Tanant (ATE) increases with tannin and BSA concentration. However, for high values of BSA concentrations it can occur the re-solubilization of BSA-tannin aggregates, because of the changes of complexes stochiometry. The BSA-tannin stochiometry is 1:5, for condensed tannins with a 2052 Da, which agrees with the results described in the literature. The ATE increases with the polymerization of the procyanidines and catéchine-(ethyl-catéchine)_n-. But the presence of ethyl bridges decreases the ATE of this type of compounds comparatively to procyanidines with the same polymerization.

The studied carbohydrates (xanthane, pectin and arabic gum) prevent the formation of BSA-tannin aggregates in different way. The xanthane was the most effective carbohydrate in this inhibition, probably because it has the capacity to form a polymeric gel, in solution, with pores able to encapsulate low-size particles like tannins or small BSA-tannin aggregates.

The technique of flow nephelometry allowed the direct determination of ten white wines ATE proceeding of various Portuguese demarked areas. Considering that the formation of BSA-tannin aggregates is directly dependent of food astringency, it provides that the wines with the largest ATE will be the most astringent.

The flow nephelometry is a simple, reproducible and versatile technique for the study of proteins, tannins and carboydrates interactions. Through this technique it is possible to change the substances concentration(s) (tannin, protein and carbohydrate) by changing the respective flows, with out needing to dilute the samples.

La formation d'agrégats entre les protéines et les tannins est influencée par plusieurs facteurs tels que la concentration en protéine et en tannin, la taille des tannins polymériques, et la présence de ponts éthyliques entre les unités de catéchine et la présence de hydrates de carbone. L'Activité Tannante Spécifique (ATE) augmente avec la concentration de tannin et de BSA. Cependant, pour valeurs élevées de concentrations de BSA il peut se produire la re-solubilisation d'agrégats de BSA-tannin, parce que la stéréochimie des complexes change. Ce travail a démontré que la stéréochimie de BSA-tannin est de 1:5, pour les tannins condensés avec 2052 Da, ce qui est d'accord avec les résultats décrits dans la littérature. La ATE augmente avec le degré de polymérisation des procyanidines et de catéchine-(éthyle-catéchine) n -. Mais la présence de ponts éthylique diminue la ATE de ce type de polymères comparativement avec les procyanidines avec le même degré de polymérisation.

Les hydrates de carbone étudiés (xanthane, pectine et gomme arabique) empêchent la formation d'agrégats de BSA-tannin de différentes façons. Le xanthane est l'hydrate de carbone le plus efficace dans cette inhibition, probablement parce qu'il a la capacité de former un gel polymérique, en solution, avec des pores capables d'encapsuler des particules de petite dimension comme les tannins.

La technique de néphélométrie en flux a permis la détermination directe de la ATE de dix vins blancs de différentes régions démarquées qui présentent des valeurs de ATE suffisamment distinctes. Considérant que la formation d'agrégats de BSA-tannin est directement liée avec l'astringence des aliments, il est de prévoir que les vins avec la plus grande ATE seront les plus astringents.

La technique de néphélométrie en flux est simple, versatile et reproductible pouvant être appliquée à l'étude des interactions de protéine, tannin et hydrates de carbone. Cette technique permet de changer les concentrations de substances en changement seulement les flux respectifs, sans avoir besoin de diluer les échantillons.

Índice Geral

Índice de Figuras	17
Índice de Tabelas	21
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	23
 INTRODUÇÃO	 25
1. Breve História do vinho.....	27
2. Propriedades químicas e biológicas dos compostos polifenólicos.....	29
3. Estrutura dos compostos polifenólicos.....	32
3.1. Compostos polifenólicos não-flavonóides.....	32
4. Compostos flavonóides	33
4.1. Antocianinas	34
4.2. Taninos	36
4.2.1. Taninos hidrolisáveis	36
4.2.2. Flavanóis e taninos condensados	37
5. Extracção dos polifenóis no vinho	43
6. Interação dos taninos com as proteínas – conceito de adstringência.....	44
6.1. Adstringência.....	46
6.2. Alterações de Adstringência durante o amadurecimento de frutos e bebidas	48
6.3. Factores que influenciam a adstringência.....	51
6.3.1. Concentração de taninos e de proteínas	51
6.3.2. Estrutura dos taninos e das proteínas	52
6.3.3. Papel do acetaldeído na polimerização de polifenóis e na adstringência dos vinhos.....	53
6.3.4. Papel dos carboidratos	55
6.3.4.1. Efeito das estruturas de carboidratos nas interações proteína-tanino.....	57
6.3.5. Influência de factores experimentais na interação proteína-tanino	60
6.3.5.1 pH.....	60
6.3.5.2 Força iónica.....	60
6.3.5.3 Temperatura	61
6.3.5.4 Concentração de Etanol.....	61
7. Método de estudo da interação dos taninos com as proteínas e carboidratos	62

Descrição do trabalho	65
MATERIAL E MÉTODOS	67
1. Reagentes.....	69
2- Compostos polifenólicos.....	69
2.1. Procianidinas oligoméricas.....	69
2.2- Síntese dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n	70
3. Análise cromatográfica por HPLC	72
4. Análise por espectrometria de massa	73
5. Nefelometria em Fluxo.....	74
6. Estudo da formação de agregados proteína-tanino por nefelometria em fluxo....	75
6.1. Influência da concentração de proteínas na formação de agregados com polifenóis...	75
6.2. Influência da concentração de procianidinas na formação de agregados com a proteína	75
6.3. Influência da estrutura dos taninos	76
6.3.1– Influência da massa molecular média das procianidinas	76
6.3.2– Influência da massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n -	76
7. Estudo da influência dos carboidratos na complexação entre polifenóis e proteínas.....	77
7.1. Influência de diferentes carboidratos na formação de agregados proteína-procianidinas (fracção IV).....	77
7.2. Influência da estrutura dos taninos na constante de inibição de agregação BSA-tanino por parte da xantana.....	78
7.2.1. Influência da massa molecular média das procianidinas	78
7.2.2. Influência da massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n -	78
8. Estudo da reactividade de taninos presentes em vinho branco com proteínas.....	79
8.1. Vinhos Brancos	79
8.2. Estudo preliminar das condições de análise de vinhos brancos	80
8.3. Estudo da reactividade entre a BSA e taninos de vinhos brancos	80
8.4. Análise Estatística	81

RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES	83
1. Isolamento e caracterização estrutural de taninos	85
1.1. Identificação das procianidinas oligoméricas por Espectrometria de Massa	85
1.2- Síntese de compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n -	89
1.2.1- Mecanismo geral da polimerização da (+)-catequina induzida por acetaldeído	89
1.2.2. Análises estrutural por espectrometria de massa de compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n -	93
2. Estudo da interacção entre proteína e taninos	98
2.1. Influência da concentração de taninos e proteínas	99
2.1.1. Influência da concentração de proteínas	99
2.1.2. Influência da concentração de taninos	102
2.2- Influência da estrutura dos taninos.....	103
2.2.1– Influência da massa molecular média das procianidinas na ATE.....	103
2.2.2 – Influência massa molecular média de compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n -.	104
2.3 - Influência dos carboidratos na complexação entre polifenóis e proteínas.....	106
2.3.1- Influência de diferentes carboidratos na formação de agregados proteína-procianidinas (fracção IV).....	109
2.4. Influência da estrutura dos taninos na constante de inibição de agregação BSA-tanino pela xantana.	111
2.4.1. Influência da massa molecular média das procianidinas	111
2.4.2. Influência da massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n -	112
3. Estudo das Actividades Tanantes Específicas de vinho branco	114
3.1. Estudo preliminar das condições de análise de vinhos brancos	114
3.2. Estudo da reactividade entre a BSA e taninos de vinhos brancos.....	115
CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

Índice de Figuras

Figura 1- Relação entre a mortalidade e o consumo de vinho em vários países (adaptado de Bourzeix, 1979)	30
Figura 2- Curva em U: relação entre a mortalidade por doença cardiovascular e o consumo de álcool.....	30
Figura 3: Estruturas dos ácidos fenólicos.....	32
Figura 4: Estrutura do resveratrol.....	33
Figura 5: Estrutura base dos flavonóides	33
Figura 6: Estrutura fundamental de algumas das principais famílias de flavonóides presentes na natureza	34
Figura 7: Estrutura das antocianidinas (agliconas) presentes nas uvas <i>Vitis vinífera</i> e nos respectivos vinhos (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2000).	35
Figura 8: Estrutura de um tanino hidrolisável (pentagaloilglucose)	36
Figura 9: Estruturas de 3-flavanóis.	37
Figura 10: Estruturas de proantocianidinas diméricas	38
Figura 11: Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (Bate-Smith, 1954)	39
Figura 12: Estruturas das procianidinas diméricas tipo B.....	40
Figura 13: Estruturas das procianidinas diméricas tipo A.....	41
Figura 14: Estrutura da procianidina trimérica do tipo C (trímero C1).....	41

Figura 15: Esquema da estrutura das proantocianidinas polimerizadas (Haslam 1998).....	42
Figura 16: Representação esquemática da formação de agregados proteína-tanino (Monteleone <i>et al.</i> , 2004).	45
Figura 17: Interações entre as proteínas e os taninos (adaptado de Asano <i>et al.</i> , 1982) ...	46
Figura 18: Diagrama da superfície da língua com a localização dos cinco sabores básicos (adaptado de Murray <i>et al.</i> , 2004).	47
Figura 19: Modelo representativo da formação de complexos proteína-tanino (adaptado de Haslam, 1981).....	51
Figura 20: Esquema da BSA, em que o azul representa os resíduos de aminoácidos básicos, o vermelho os ácidos e o amarelo os neutros (adaptado de Cáster and Ho, 1994).	53
Figura 21: Estrutura de dímeros de catequina com ponte etilo.	54
Figura 22: Esquema representativo dos dois mecanismos possíveis para a inibição da formação dos agregados insolúveis proteína-tanino, pelos carboidratos i) formação do complexo ternário carboidrato-tanino-proteína, solúvel em meio aquoso; ii) competição entre a proteína e o carboidrato, resultando na formação do complexo solúvel carboidrato-tanino (Mateus <i>et al.</i> , 2003).....	56
Figura 23: Constituintes maioritários da pectina: (1→4) ácido α-D-galacturónico.....	57
Figura 24: Unidade de α-D-ácido galacturónico com o grupo carboxílico livre (1) ou esterificado com metanol (2).	57
Figura 25: Molécula de xantana, constituída por cerca de 7000 pentâmeros.	58
Figura 26: Rede polimérica formada em solução pela xantana, criando poros hidrofóbicos aptos a encapsularem os taninos (Hagerman e Butler, 1987).....	59

Figura 27: Esquema de montagem da nefelometria de fluxo (Carvalho <i>et al.</i> , 2004)	63
Figura 28: Espectros de massa das fracções I, II, III, IV e V correspondentes às procianidinas de grainha fraccionadas por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW-40 (S).	86
Figura 29: Mecanismo geral da polimerização de flavanóis induzido pelo acetaldeído em meio ácido	90
Figura 30: Cromatograma de HPLC a 280 nm da mistura reaccional de (+)-catequina e acetaldeído após 96 horas de reacção, numa solução água/etanol 12% (v/v), pH 2,5	91
Figura 31: Espectro de massa dos picos cromatográficos (1), (2) e (3) da figura 30.....	92
Figura 32: Espectros de massa das seis fracções obtidas a partir da reacção de polimerização da (+)-catequina mediada pelo acetaldeído, em meio ácido, e após fraccionamento por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW 40 (S).	95
Figura 33: Formação de agregados tanino-proteína (BSA) em função do aumento da concentração de proteína, partindo-se de duas concentrações diferentes de proteína (11 e 15 g/L; fluxo 0,5 ml/min), obtidos por nefelometria em fluxo. A solução de taninos (0,15 g/L; fluxo 2,0 ml/min) corresponde a procianidinas oligoméricas com massa molecular média de 2052 g/mol (fracção V).....	100
Figura 34: Formação de agregados BSA-tanino em função do tempo (gradiente crescente de proteína (11 g/L; 0,5 ml/min)), partindo-se de três concentrações diferentes de tanino (0,10; 0,15 e 0,20 g/L; 2,0 ml/min), obtidos por nefelometria em fluxo. As soluções de taninos correspondem a procianidinas oligoméricas com massa molecular média de 949 g/mol (fracção III).	102
Figura 35: Efeito inibidor da goma-arábica na formação de agregados entre taninos (fracção III de procianidinas oligoméricas; 0,15 g/L) e a proteína BSA (0,82 g/L).	107

Índice de Tabelas

Tabela 1: Fracções de procianidinas oligoméricas obtidas por fraccionamento em cromatografia líquida em coluna (gel Toyopearl TSK HW-40 S)	70
Tabela 2: Fracções de compostos do tipo catequina-(etil-catequiana)-n recolhidas por cromatografia líquida em coluna (gel Toyopearl TSK HW-40 S)	71
Tabela 3: Condições do gradiente de proteína e carboidrato	77
Tabela 4: Identificação dos vinhos brancos estudados e características de pH e teor alcoólico.	79
Tabela 5: Actividade Tanante Especifica (ATE) de um vinho branco para diferentes condições experimentais.....	80
Tabela 6: Procianidinas identificadas por espectrometria de massa nas cinco fracções obtidas por cromatografia em coluna de um extracto de grainha (PC)	87
Tabela 7: Massa molecular média dos polifenóis presentes nas cinco fracções obtidas por cromatografia em coluna de um extracto de grainha.....	88
Tabela 8: Compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n - identificados por espectrometria de massa das seis fracções obtidas por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW 40 (S)	96
Tabela 9: Massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n - presentes nas seis fracções obtidas por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW 40 (S)	97
Tabela 10: Actividade tanante especifica de cinco fracções com diferentes massa moleculares médias.....	103
Tabela 11: Actividade tanante especifica de seis fracções de compostos do tipo catequina-(etil-catequina) _n - com diferentes massa moleculares médias	105

- Tabela 12:** Constantes de inibição de agregação dos diferentes carboidratos para a fracção IV de procianidinas oligoméricas (0,15 g/L; 2,0ml.min⁻¹) com BSA (0,82 g/L; 0,5ml.min⁻¹) determinados por nefelometria em fluxo..... 109
- Tabela 13:** Constante de inibição de agregação (K_{AI}) da xantana para as cinco fracções de procianidinas oligoméricas (0,15 g/L; 2,0ml.min⁻¹) com BSA (0,82 g/L; 0,5ml.min⁻¹), determinada por nefelometria em fluxo..... 111
- Tabela 14:** Constante de inibição de agregação (K_{AI}) da xantana para as seis fracções de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- (0,15 g/L; 2,0 ml.min⁻¹) com BSA (0,82 g/L; 0,5 ml.min⁻¹), determinadas por nefelometria em fluxo 112
- Tabela 15:** Estudo das condições experimentais e valores de turvação obtidos para um vinho branco (B) por nefelometria em fluxo. 114
- Tabela 16:** Actividade tanante específica (ATE) de vinhos brancos portugueses comerciais determinado por nefelometria em fluxo. Letras diferentes na coluna das ATE indicam variâncias significativamente diferentes para ($p < 0,05$)..... 115

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

Abs – absorvância

ASTM - American Society of the Tasting of Materials

ATE – actividade tanante específica

BSA – Albumina Sérica Bovina (Bovine Seric Albumin)

Da – Dalton

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

LCMS – cromatografia líquida acoplada a um detector de massa

K_{AI} – constante de inibição de agregação

MS – massa do ião principal

MS^2 – primeiro fragmento do ião principal

MS^3 – segundo fragmento do ião principal

m/z – relação massa/carga (espectrometria de massa)

n.d.- não determinado

NTU – unidades de turbidez (Nephelos Turbidity Units)

Δ NTU – variação da turbidez

PC – procianidinas

PRP - proteína rica em prolina

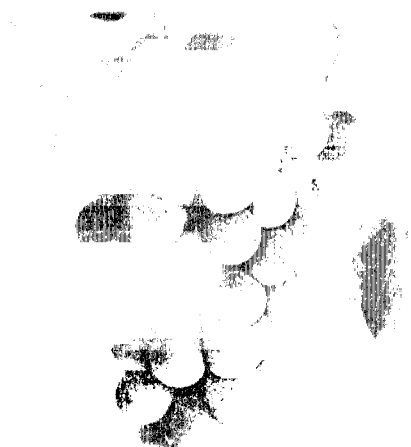
RMN – ressonância magnética nuclear

U.A.- unidades de absorvância

UV – Ultravioleta

Vis - Visível

INTRODUÇÃO



1. Breve História do vinho

O momento e o local em que o homem bebeu o primeiro trago de vinho continuam a ser uma incerteza. As antigas civilizações elegeram deuses como os dadores do vinho, Dionísio na Grécia, Osíris no Egipto e Baco em Roma. Atribui-se ao último período da Era Terciária o surgimento da videira, tendo esta surgido primeiro do que o Homem. A viticultura desenvolveu-se inicialmente nas planícies da Suméria e nas margens do Nilo. Contudo, foi por intermédio dos Fenícios e dos Gregos que o vinho chegou à Europa. Com a ocupação romana, a cultura do vinho consolidou-se na Europa central. Sendo assim, as vinhas italianas serão de origem grega, as francesas de origem romana e as espanholas de origem fenícia.

No que se refere ao nosso país, não se sabe quando surgiu o vinho, pensa-se que as primeiras vinhas tenham sido cultivadas pelos Fenícios e que com a instalação dos Gregos na Península Ibérica o desenvolvimento da viticultura tenha sido consolidado. Na necrópole de Alcácer do Sal foi encontrada uma "cratera" grega de sino, vaso onde os Gregos diluíam o vinho com água antes de o consumirem. A romanização da Península Ibérica contribuiu para a modernização da cultura da vinha, com a introdução de novas variedades e com o aperfeiçoamento de certas técnicas de cultivo, nomeadamente a poda. Nos séculos VI e VII d.C. o vinho tornou-se indispensável para os Cristãos no acto da Comunhão, evidenciado através de documentos canónicos da época. Documentos existentes dos séculos XII e XIII, (doações, legados, livros de aniversários, livros de tombos de bens, entre outros) confirmam a importância da vinha e do vinho no território português, mesmo antes do nascimento da nacionalidade. A fundação de Portugal, em 1143 por D. Afonso Henriques, e a conquista da totalidade do território português aos mouros, em 1249, permitiu que se instalassem Ordens religiosas, militares e monásticas, que povoaram extensas regiões, tornando-se activos centros de colonização agrícola, alargando-se as áreas de cultivo da vinha.

No período áureo que se seguiu aos Descobrimentos, os vinhos portugueses eram levados nas naus e caravelas que comercializavam os produtos trazidos do

Brasil e do Oriente. Durante as viagens o vinho envelhecia de forma suave proporcionada pelo calor dos porões ao passarem pelo Equador e pela permanência do vinho nos tonéis. As viagens vieram facultar o conhecimento empírico de um certo tipo de envelhecimento, cujas técnicas científicas se viriam a desenvolver posteriormente. No século XVIII, a vitivinicultura sofreu a influência do Marquês de Pombal, beneficiando a região do Alto Douro e o Vinho do Porto. A Companhia Geral da Agricultura das Vinhas do Alto Douro foi criada com o fim de disciplinar a produção e o comércio dos vinhos da região, prevendo ainda a necessidade de se fazer a demarcação da região, o que veio a concretizar-se. Assim, segundo alguns investigadores, foi esta a primeira região demarcada oficialmente no mundo vitivinícola. Em 1907/1908, iniciou-se o processo de regulamentação oficial de várias denominações de origem portuguesas. Para além da região produtora de Vinho do Porto e dos vinhos de mesa Douro, demarcavam-se as regiões de produção de alguns vinhos como a região dos vinhos da Madeira, Moscatel de Setúbal, Carcavelos, Dão, Colares e Vinho Verde. Em 1986 criou-se o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV), organismo adaptado às estruturas impostas pela nova política de mercado decorrente da adesão de Portugal à Comunidade Europeia. O conceito de Denominação de Origem foi harmonizado com a legislação comunitária e foi criada a classificação de "Vinho Regional", para os vinhos de mesa com indicação geográfica. Actualmente estão reconhecidas e protegidas, na totalidade do território português, 32 Denominações de Origem e 8 Indicações Geográficas.

Em Portugal, as vinhas estendem-se por todo o território nacional e pelos arquipélagos, ocupando cerca de quatrocentos mil hectares, produzindo, em média e por ano, cerca de dez milhões de hectolitros de vinho, o que coloca Portugal no 6º lugar mundial em área de vinha e no 7º lugar em quantidade de vinho produzido.

(adaptado de textos do Instituto da Vinha e do Vinho)

2. Propriedades químicas e biológicas dos compostos polifenólicos

Os polifenóis são compostos naturais que resultam do metabolismo secundário das plantas e intervêm directamente na sua pigmentação, crescimento, reprodução e protecção contra infecções e agentes agressores. Constituem um amplo grupo de substâncias químicas, com várias estruturas e actividades englobando mais de oito mil compostos diferentes. Estes compostos estão presentes em vários alimentos (cacau e diversos frutos como a uva, a maçã, o morango, entre outros) e em bebidas (café, chá, cerveja e vinho) (Murray *et. al.*, 1993), sendo responsáveis pelas características organolépticas que apresentam. Em Enologia os compostos polifenólicos possuem um papel extremamente importante, uma vez que estão na origem da cor vermelha e contribuem para o sabor do vinho através do carácter adstringente (Ribéreau-Gayon e Glories, 1971; Haslam, 1980). Durante a fermentação e o envelhecimento do vinho os compostos polifenólicos sofrem diversas transformações estruturais, originando novos compostos com diferentes características físico-químicas que modificam as características organolépticas do vinho (Somes 1971; Pissarra *et al.*, 2003).

No campo da saúde os compostos polifenólicos assumem um papel muito importante devido às suas excelentes propriedades antioxidantes. Por esta e outras razões, o consumo moderado de vinho, especialmente de vinho tinto, foi associado à redução da mortalidade provocada por doenças cardiovasculares e que deu origem do “Paradoxo Francês”. Este paradoxo baseia-se em estudos epidemiológicos, revelando que a população Francesa (figura 1), que tinha uma alimentação de risco à base de gorduras do tipo saturadas, apresentava um número de casos de doenças cardiovasculares reduzido quando comparado ao de outros países com o mesmo tipo de alimentação, mas onde não existia o costume de beber vinho às refeições (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

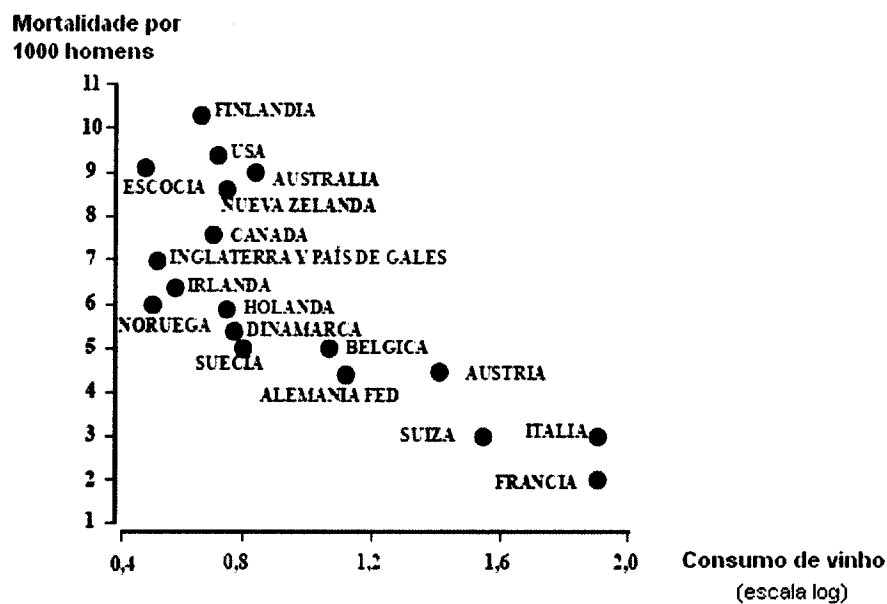


Figura 1-Relação entre a mortalidade e o consumo de vinho em vários países (adaptado de Bourzeix, 1979)

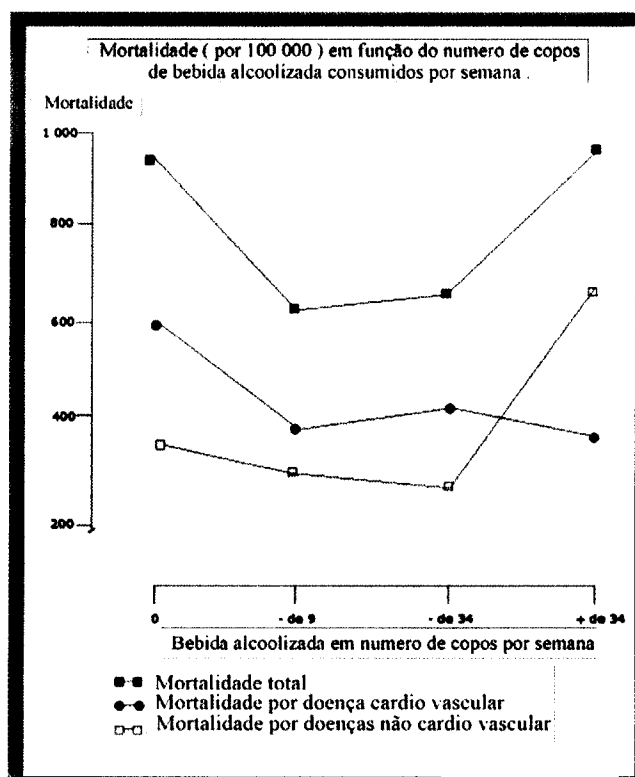


Figura 2- Curva em U: relação entre a mortalidade por doença cardiovascular e o consumo de álcool.

Outros estudos revelaram a existência de uma relação entre o consumo de vinho e a mortalidade por doença cardiovascular designada por “curva em U” (figura 2) (Marmot e Brunner, 1991). Em média, um consumo moderado de álcool demonstrou reduzir os riscos de doenças coronárias, enquanto um consumo elevado ou inexistente resulta no aumento desses riscos.

Os compostos polifenólicos apresentam propriedades biológicas importantes, o que leva a serem usados como suplementos alimentares. As formas mais utilizadas são os extractos de grainha de uva e os de vinho tinto. Os extractos de grainha de uva contêm cerca de 92 a 95% de compostos polifenólicos. Estes extractos revelaram um largo espectro de actividade farmacológica, que pode ser dividida em dois grandes mecanismos de acção: co-factor da vitamina C na regeneração do colagénio, por um lado, e a sua acção antioxidante, por outro. No primeiro caso, os compostos polifenólicos aumentam os níveis intracelulares de vitamina C, diminuem a permeabilidade e fragilidade capilar, neutralizam oxidantes e radicais livres e inibem a degradação do colagénio. Deste modo, estes compostos intervêm em diversos processos imunológicos, anti-inflamatórios e anti-infecciosos do organismo humano. Em relação ao seu poder antioxidante no combate aos radicais livres que se formam no organismo. Apresentam ainda a característica de protegerem as células tanto de radicais livres do tipo hidrossolúveis como do tipo lipossolúveis (Meyer. *et al.*, 1997). Está actualmente bem estabelecida a relação existente entre os radicais livres e os processos de degradação orgânica que levam ao envelhecimento precoce e a todas as doenças degenerativas, incluindo as cardiovasculares, as artrites e o cancro. Os polifenóis apresentam uma enorme potencialidade para a prevenção destas doenças (Saito *et al.*, 1998).

3. Estrutura dos compostos polifenólicos

Os compostos polifenólicos podem ser classificados em compostos flavonóides e em compostos não-flavonóides.

3.1. Compostos polifenólicos não-flavonóides

Os compostos não-flavonóides compreendem os ácidos fenólicos tais como ácidos benzóicos e cinâmicos e outros derivados fenólicos como os estilbenos (*e.g.* resveratrol) (figuras 3 e 4). Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos das células das películas e polpas sobretudo na forma de ésteres tartáricos (Ribéreau-Gayon, 1965). Importa referir que embora não exerçam uma influência directa no gosto dos vinhos.

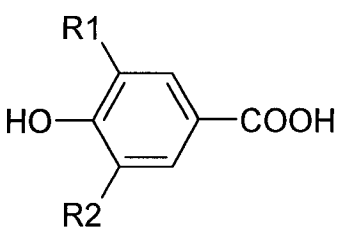
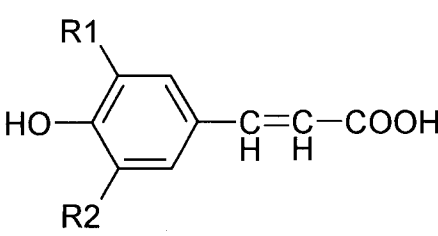
	R₁	R₂	Ácidos benzóicos
	H	H	Ácido p-hidroxibenzóico
	OH	H	Ácido protocatéquico
	OH	OH	Ácido gálgico
	OCH ₃	H	Ácido vanílico
	OCH ₃	OCH ₃	Ácido sirínico
	R₁	R₂	Ácidos hidroxicinâmicos
	H	H	Ácido p-cumárico
	OH	H	Ácido cafeico
	OCH ₃	H	Ácido ferúlico
	OCH ₃	OCH ₃	Ácido sinápico

Figura 3: Estruturas dos ácidos fenólicos

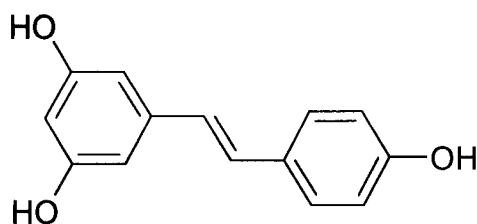


Figura 4: Estrutura do resveratrol

4. Compostos flavonóides

Os compostos flavonóides caracterizam-se por apresentarem um esqueleto do tipo C6-C3-C6, possuindo dois anéis fenólicos (A e B) unidos por um anel heterocíclico pirânico (C) (figura 5). Estão descritos mais de quatro mil flavonóides divididos por famílias que se distinguem pelo grau de oxidação do anel pirânico C.

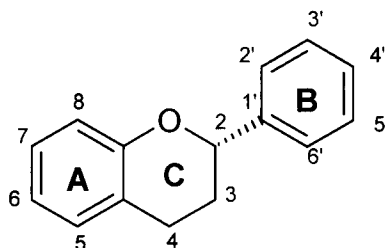


Figura 5: Estrutura base dos flavonóides

Os compostos flavonóides subdividem-se em flavanóis (*e.g.* catequina e taninos condensados ou proantocianinas), flavonóis, flavanonas, flavonas e antocianinas (figura 6) (Maken e Beecher, 2000).

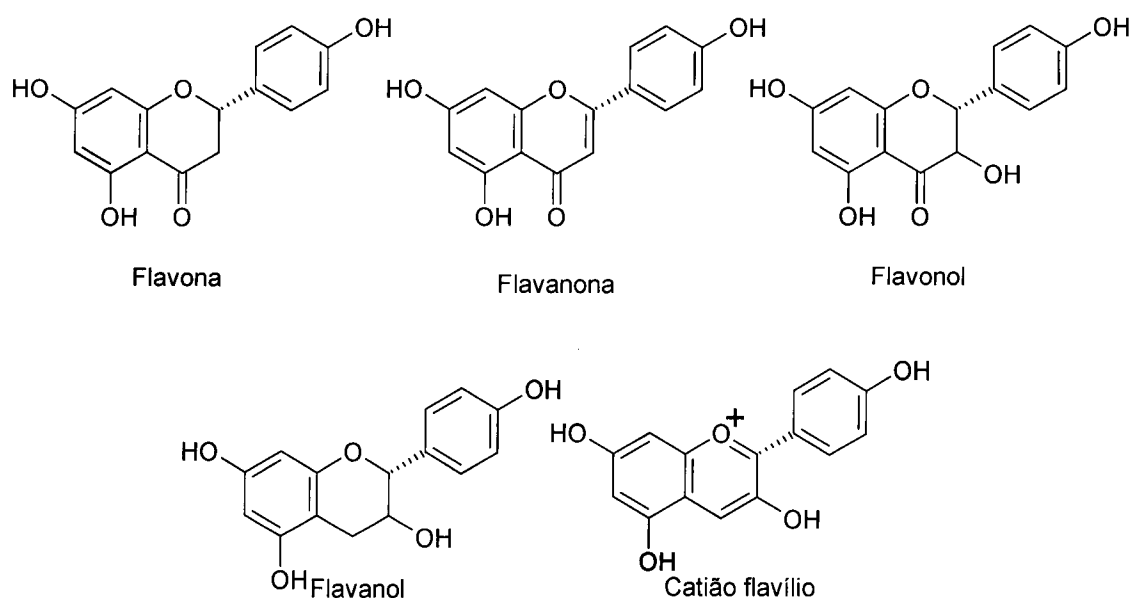
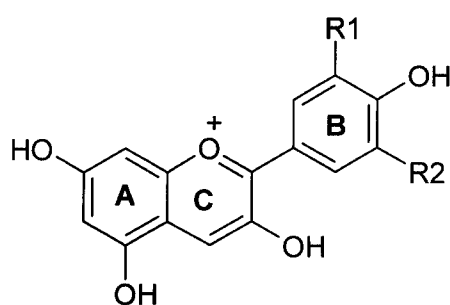


Figura 6: Estrutura fundamental de algumas das principais famílias de flavonóides presentes na natureza

4.1. Antocianinas

A palavra antocianinas deriva do grego *anthos* que significa flor e *kyanos* azul. As antocianinas são os pigmentos vermelhos das uvas, que na maioria dos casos se encontram localizadas nas películas e só muito raramente na polpa, contribuindo para a cor característica do vinho tinto. Estão também presentes, em largas quantidades na folhagem, especialmente no fim da época de crescimento (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). De uma forma geral, as estruturas das antocianinas correspondem a glucósidos do catião flavílio poli-hidroxilados e/ou metoxilados. As formas não glicosiladas designam-se por antocianidinas e diferem no número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo ligados aos anéis A e B. Na natureza estas moléculas são mais estáveis na forma glicosídica (antocianinas) do que na forma aglicona (antocianidina).

A cianidina, a peonidina, a delphinidina, a petunidina e a malvidina são agliconas correspondentes às antocianinas presentes no género *Vitis vinifera* (figura 7), que diferem umas das outras nos substituintes R_1 e R_2 . A composição das uvas em antocianinas depende de vários factores, como é o caso da casta, factores climáticos e factores ambientais que caracterizam a região geográfica de onde são provenientes.



R_1	R_2	Antocianidinas
OH	H	cianidina
OH	OH	delfinidina
OCH ₃	OH	petunidina
OCH ₃	H	peonidina
OCH ₃	OCH ₃	malvidina

Figura 7: Estrutura das antocianidinas (agliconas) presentes nas uvas *Vitis vinifera* e nos respectivos vinhos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

A quantificação destes pigmentos no vinho é extremamente difícil, pois a maioria deles encontram-se combinados (ligações covalentes ou complexadas) e condensam-se com outros constituintes formando novas estruturas mais estáveis e que contribuem para a cor que observamos no vinho. As antocianinas possuem a capacidade de se agruparem entre si formando agregados não covalentes empilhados verticalmente segundo um fenómeno de auto-associação, contribuindo para a estabilização e intensificação da cor. As antocianinas podem ainda ser estabilizadas através da copigmentação intermolecular, envolvendo outras espécies presentes em solução, como por exemplo os taninos condensados.

4.2. Taninos

Os taninos são por definição compostos polifenólicos solúveis em água, com peso molecular a variar entre 500 e alguns milhares de Dalton, que apresentam a capacidade de interagirem com proteínas (Bath-Smith e Swain, 1962).

Nos cachos das uvas, os taninos estão presentes nas partes sólidas (película, grainhas e engaço). A concentração existente no vinho depende de vários factores tais como a variedade da uva e os métodos de vinificação usados, podendo também ser de origem exógena (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Os taninos podem ser divididos em taninos hidrolisáveis (Haslam, 1989) e em taninos não hidrolisáveis, também designados por taninos condensados (proantocianidinas).

4.2.1. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são polifenóis constituídos por um açúcar, geralmente a glucose, ligado a compostos fenólicos, nomeadamente o ácido galhico ou o ácido elágico, formando os galhotaninos (figura 8) ou os elagitaninos respectivamente (Haslam, 1966).

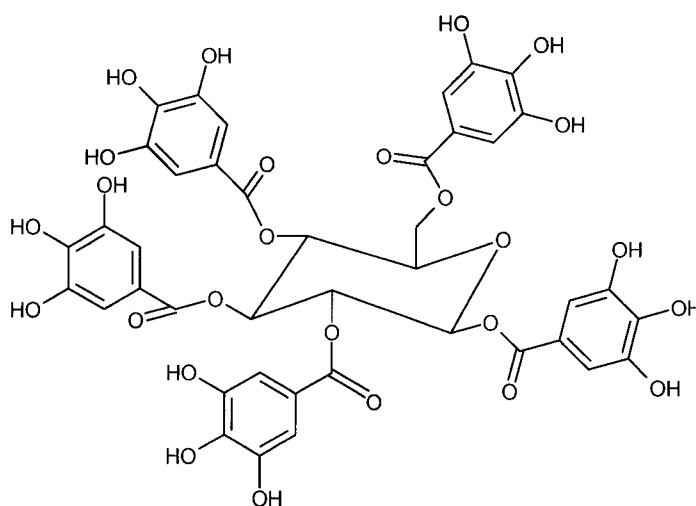


Figura 8: Estrutura de um tanino hidrolisável (pentagalolilglucose)

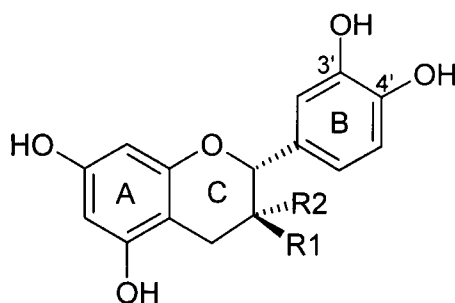
Estes compostos não aparecem naturalmente nas uvas. Importa referir que são substâncias que estão presentes na madeira e por isso podem aparecer em vinhos armazenados ou envelhecidos em cascos.

4.2.2. Flavanóis e taninos condensados

Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros derivados estruturalmente do 3-flavanol (figura 6).

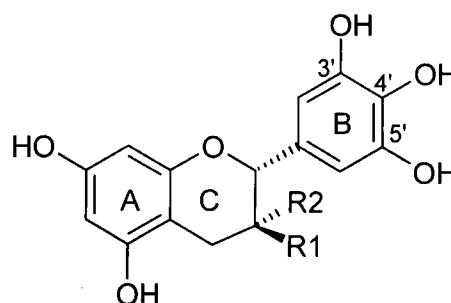
Na natureza os 3-flavanóis variam no grau de hidroxilação dos anéis aromáticos A e B e na estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel pirânico C. As estruturas mais simples são as catequinas e as galhocatequinas (figura 9).

As catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) estão hidroxiladas nas posições 3' e 4' do anel aromático B e as galhocatequinas ((+)-galhocatequina e (-)-epigalhocatequina) encontram-se hidroxiladas nas posições 3', 4' e 5' do anel B.



$R_1: \text{OH}$ e $R_2: \text{H} \rightarrow (+)\text{-catequina}$

$R_1: \text{H}$ e $R_2: \text{OH} \rightarrow (-)\text{-epicatequina}$



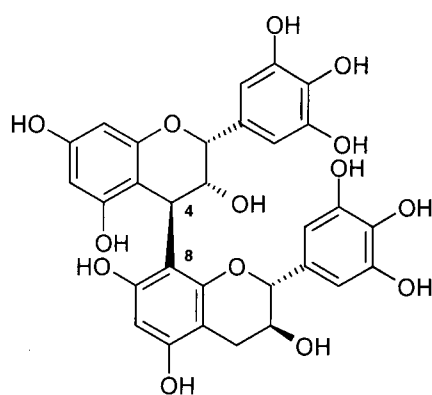
$R_1: \text{OH}$ e $R_2: \text{H} \rightarrow (+)\text{-galhocatequina}$

$R_1: \text{H}$ e $R_2: \text{OH} \rightarrow (-)\text{-epigalhocatequina}$

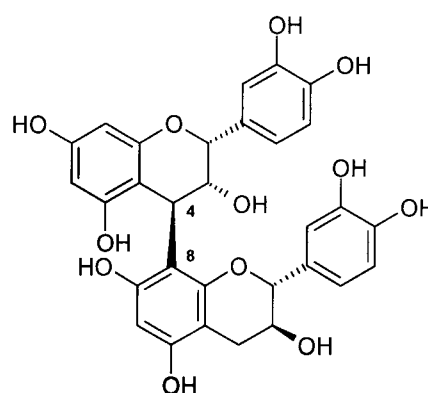
Figura 9: Estruturas de 3-flavanóis.

Os taninos condensados (proantocianidinas) são constituídos por duas ou mais unidades de catequinas ou galhocatequinas e variam entre si no grau de polimerização, no tipo de ligação interflavanólica (C4-C6 ou C4-C8) e no grau de esterificação com o ácido galhico.

As proantocianidinas dividem-se em procianidinas (derivadas da catequina e epicatequina) e prodelfinidinas (derivadas da galhocatequina e epigalhocatequina) (figura 10).



Prodelfinidina



Procianidina

Figura 10: Estruturas de proantocianidinas diméricas

Os nomes de procianidinas e de prodelfinidinas resulta do facto destes compostos se decomporem por aquecimento em meio ácido, dando origem a cianidina e delfinidina, respectivamente, segundo o mecanismo descrito por Bate-Smith (figura 11) (Bate-Smith, 1954).

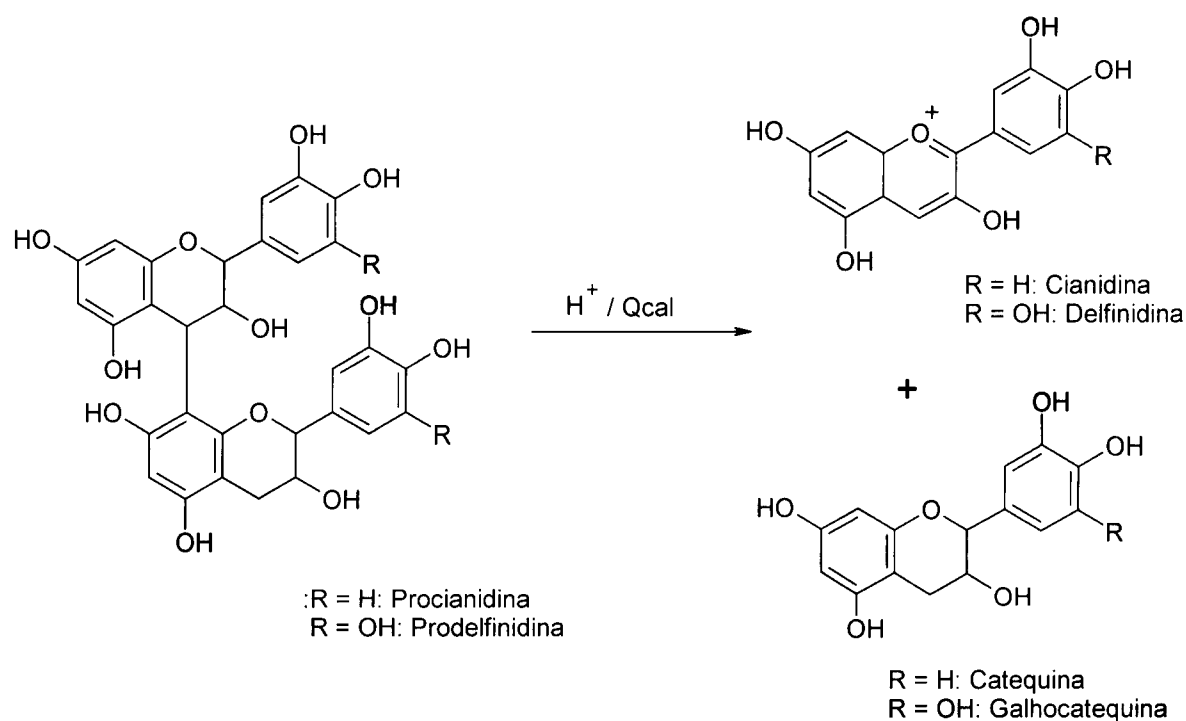
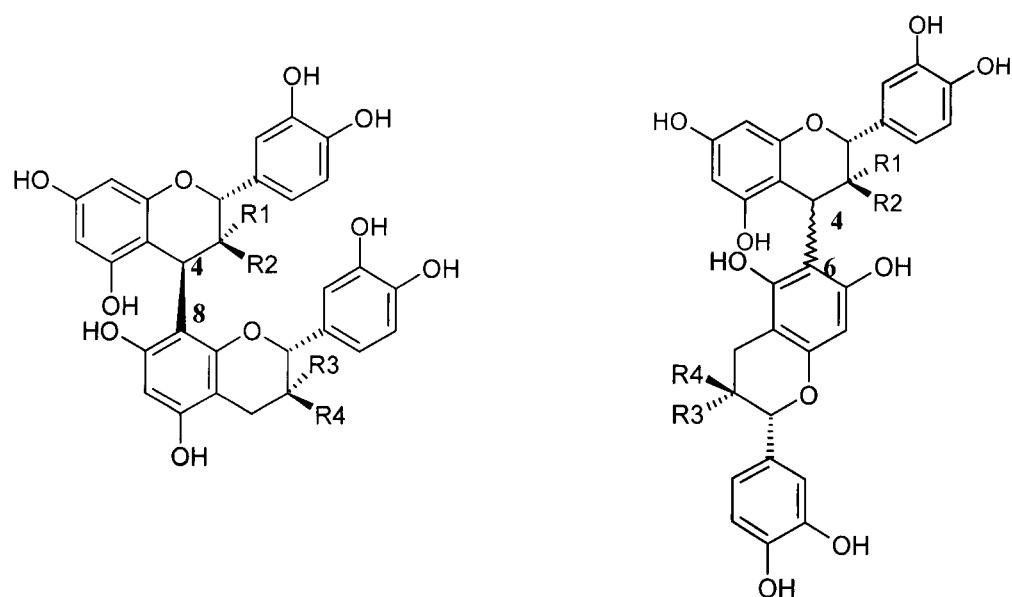


Figura 11: Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (Bate-Smith, 1954)

As procianidinas diméricas, triméricas e de ordem superior são divididas nos diferentes grupos por letras, de acordo com o tipo de ligação interflavanólica e por algarismos, que identificam o isômero dentro de cada grupo (Weinges *et al.*, 1968; Thompson *et al.*, 1972).

As procianidinas diméricas tipo B resultam da condensação entre duas estruturas flavanólicas por uma ligação entre o carbono 4 de uma unidade e o carbono 8 ou carbono 6 da outra unidade (figura 12).



R_1	R_2	R_3	R_4	Dímeros C ₄ -C ₈	Dímeros C ₄ -C ₆
OH	H	H	OH	B₁	B₅
OH	H	OH	H	B₂	B₆
H	OH	H	OH	B₃	B₇
H	OH	OH	H	B₄	B₈

Figura 12: Estruturas das procianidinas diméricas tipo B

Nas procianidinas tipo A, a ligação interflavanólica é igual à do tipo B apresentando adicionalmente outra ligação do tipo éter entre o grupo hidroxilo do anel A e o carbono 2 do anel pirânico da outra unidade (Salagoity-Auguste e Bertrand, 1984).

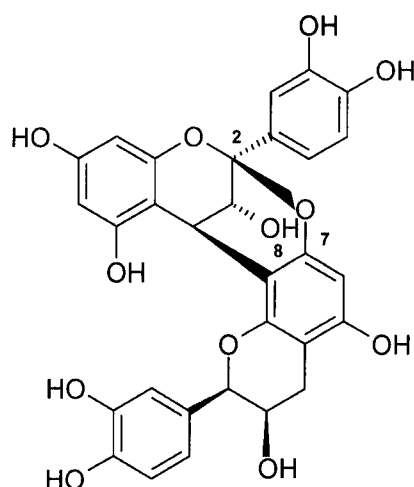


Figura 13: Estruturas das procianidinas diméricas tipo A.

As procianidinas triméricas são também divididas em dois grupos: as do tipo C (figura 14), em que as ligações interflavanólicas são como as das procianidinas diméricas tipo B; as do tipo D, em que estabelecem uma ligação do tipo B e uma do tipo A.

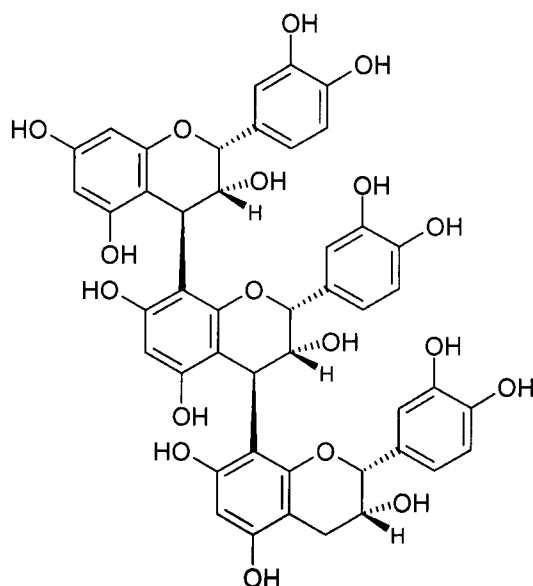


Figura 14: Estrutura da procianidina trimérica do tipo C (trímero C1)

Na realidade, a maioria das proantocianidinas que existem nos tecidos vegetais encontram-se numa forma mais polimerizada. Até seis unidades monoméricas são designadas por oligómeros e acima desse número designam-se por polímeros (figura 15) (Haslam, 1998).

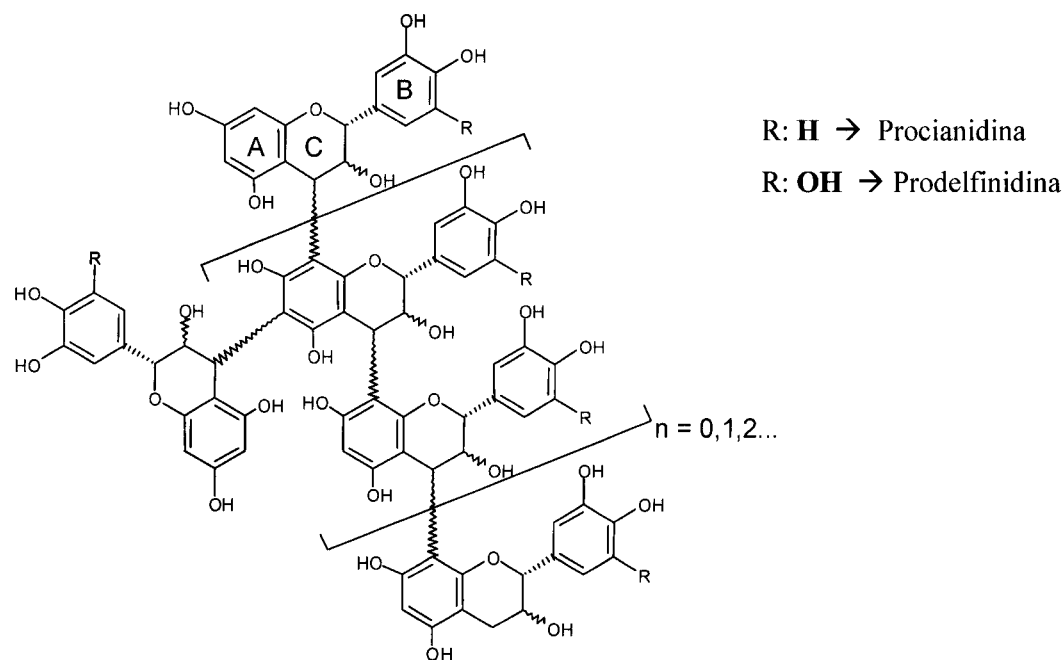


Figura 15: Esquema da estrutura das proantocianidinas polimerizadas (Haslam 1998)

Nas uvas os taninos condensados encontram-se presentes em maior quantidade nas grainhas e nas películas (Bourzeix *et al.*, 1986; Ricardo-da-Silva *et al.*, 1992; de Freitas *et al.*, 1998^a; de Freitas *et al.*, 1999). As grainhas são constituídas essencialmente por procianidinas, enquanto que as películas além de procianidinas apresentam ainda prodelfinidinas em elevadas concentrações (de Freitas 1995; Souquet *et al.*, 1996). O grau de polimerização varia também entre as grainhas e as películas, caracterizando-se em cerca de duas a dez unidades para as grainhas e de três unidades para as películas (Souquet *et al.*, 1996).

5. Extracção dos polifenóis no vinho

Nas uvas os compostos polifenólicos podem encontrar-se em diversas partes podendo surgir dissolvidos nos vacúolos das células da polpa, adsorvidos ou complexados a polissacáridos nos vasos fibrovasculares ou então livres no suco vascular das células da película.

Durante o esmagamento das uvas e a fermentação, os compostos polifenólicos transferem-se das partes sólidas dos cachos de uvas (a película, as grainhas e o engaço) para o vinho. A velocidade de transferência depende de vários factores incluindo a concentração de compostos polifenólicos existente nas uvas, o tempo de maceração, a temperatura, a concentração em álcool e SO₂, a frequência de remontagens e homogenização do mosto por agitação (Timberlake e Bridle, 1976b; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977; Singleton *et al.*, 1980; Dallas e Laureano, 1994). Esta extracção revela-se de extrema importância no processo de vinificação, pois é a partir da constituição em compostos polifenólicos que irá depender, em larga medida, a qualidade de um vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Ao longo do processamento do vinho ocorrem diversos tipos de transformações químicas envolvendo os polifenóis: oxidação, polimerização, condensação e fenómenos de copigmentação. Estas transformações têm início a partir do momento em que a uva é danificada (ruptura da película) e prolongam-se por todo processo de envelhecimento do vinho, resultando na presença de uma grande diversidade de compostos polifenólicos na bebida final que lhe conferem propriedades distintas. A composição polifenólica de um vinho vai depender, por isso, da variedade (casta) de uvas, da região geográfica de crescimento das uvas, do processo de vinificação, da idade do vinho e também do tipo de envelhecimento utilizado, que pode ser realizado em meio oxidante (barril de madeira) ou em meio redutor (garrafa) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os vinhos brancos contêm, geralmente, quantidades inferiores de compostos polifenólicos comparativamente com os vinhos tintos porque a maior parte destas substâncias estão localizadas nas partes sólidas dos cachos de uvas e requerem longos períodos de maceração para serem extraídos (Ricardo-da-Silva *et al.*, 1993). Geralmente, as uvas brancas são prensadas imediatamente depois de serem esmagadas e antes de ser iniciado o processo de fermentação, recuperando-se em seguida o mosto. Nas uvas tintas o mosto fermenta com as partes sólidas e só depois as uvas são prensadas, resultando numa extracção de compostos polifenólicos das películas e das grainhas superior à que se verifica para os vinhos brancos.

6. Interação dos taninos com as proteínas – conceito de adstringência

Como já foi referido os taninos são compostos solúveis em água, com peso molecular variável entre 500 e alguns milhares de Dalton, que têm a capacidade de precipitarem com proteínas (Bath-Smith e Swain, 1962).

Apesar de não existirem dados muito concretos sobre os mecanismos envolvidos na interacção entre proteína-tanino, sabe-se que a formação de agregados proteína-tanino envolve ligações do tipo cruzadas (cross-linking) entre as cadeias peptídicas da proteína e os taninos, que se comportam como ligandos polidentados à superfície da proteína (Oh *et al.*, 1980; Hagerman e Butler, 1981; Asano *et al.*, 1982; Luck *et al.*, 1994; Haslam, 1996; Cheynier e Moutournet, 1999).

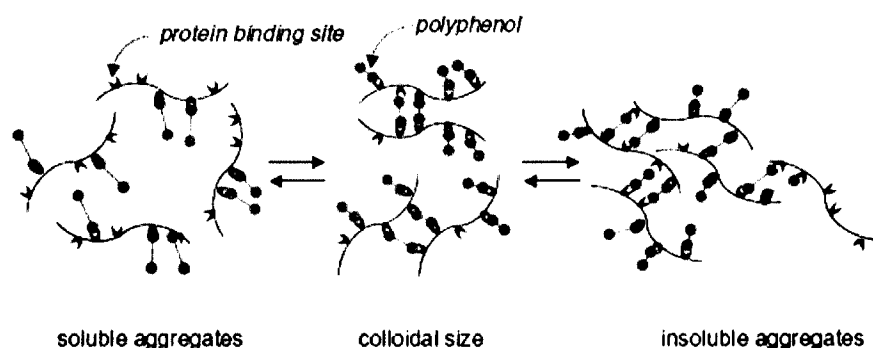


Figura 16: Representação esquemática da formação de agregados proteína-tanino (Monteleone *et al.*, 2004).

Estas interações envolvem ligações por pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as cadeias peptídicas (Gustavson, 1956; Asano, 1982). Haslam (1974) concluiu que as pontes de hidrogénio ocorrem entre os grupos hidroxílicos dos polifenóis e os grupos carbonilo das proteínas. As interações hidrofóbicas estabelecem-se, por sua vez, entre o núcleo aromático do polifenol e os grupos ou aminoácidos hidrofóbicos da cadeia peptídica, como por exemplo a prolina (Bate-Smith, 1954; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977; Asano *et al.*, 1982; Luck *et al.*, 1994). De facto, as proteínas salivares são muito ricas em resíduos de prolina, cerca de 70% (Kauffman e Keller, 1979), o que indica que provavelmente as interações hidrofóbicas possuem maior importância e estão envolvidas na origem do fenómeno de adstringência dos alimentos.

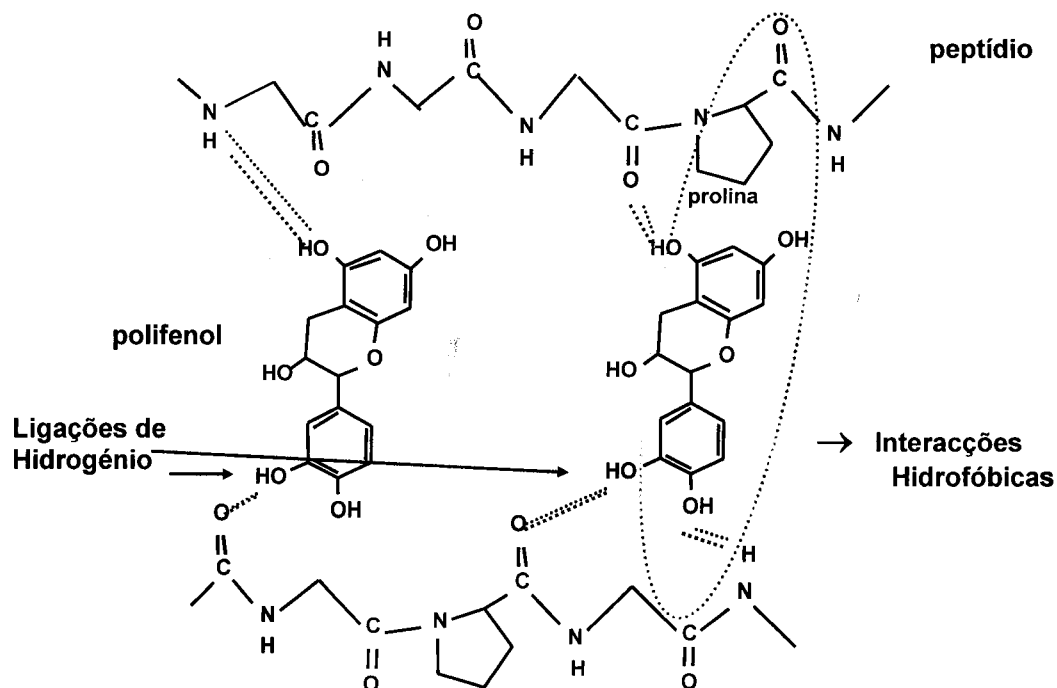


Figura 17: Interações entre as proteínas e os taninos (adaptado de Asano *et al.*, 1982)

6.1. Adstringência

O sabor dos alimentos desenvolve-se à superfície da língua, onde se encontram as papilas gustativas, que são receptores sensoriais. As papilas são formadas por dezenas de células gustativas que reconhecem os diferentes tipos de sabores básicos (figura 18): doce, azedo, salgado, amargo e *umami* (nome de origem japonesa atribuído à presença do aminoácido glutamato monossódico, comercialmente conhecido como “ajinomoto”, que origina um sabor comparado ao gosto da carne) (Lindemann, 2000; Murray *et al.*, 2004, Huang, *et al.*, 2006). A estes sabores básicos acrescentam-se também as sensações de temperatura e sensações tácteis que definem a textura do alimento e a adstringência.

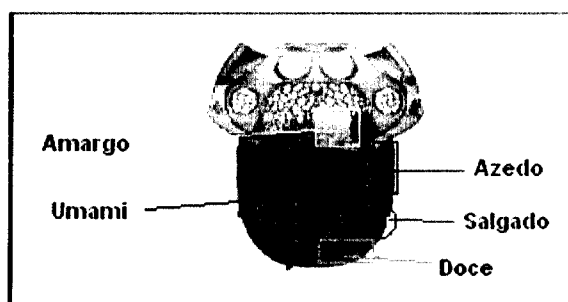


Figura 18: Diagrama da superfície da língua com a localização dos cinco sabores básicos (adaptado de Murray *et al.*, 2004).

A adstringência resulta de interações que ocorrem entre os polifenóis, presentes nos alimentos e nas bebidas e as proteínas salivares, originando a formação de agregados proteína-tanino, que acabam por precipitar, causando uma sensação de secura e constrição designado por adstringência (Joslyn e Goldstein, 1964). É importante referir que a palavra adstringência deriva do latim *ad* e *stringer* que significa “ligar”, sugerindo por isso uma reacção de ligação. Segundo a American Society of the Tasting of Materials (ASTM, 1989) a adstringência é definida como uma sensação de secura e constrição que ocorre na boca e está associada à presença de taninos.

A superfície exposta da cavidade oral está coberta por uma camada composta por proteínas salivares e glicoproteínas, cuja função é manter a lubrificação desta. A saliva é produzida nas glândulas salivares e contém uma grande variedade de proteínas, sendo a prolina o aminoácido mais abundante nessas proteínas. O primeiro fenómeno físico-químico que leva à sensação de adstringência é a precipitação das proteínas pelos compostos polifenólicos. Neste fenómeno estão envolvidas ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas das proteínas salivares e os grupos fenólicos dos polifenóis, que actuam como ligandos polidentados, levando à agregação e consequente precipitação.

A sensação de adstringência não é confinada a uma região particular da cavidade oral, mas é um fenómeno de superfície difusa (Bate-Smith, 1959), caracterizado pela perda de lubrificação, como resultado da precipitação das proteínas e glicoproteínas locais por interacção com os polifenóis. Esta propriedade leva ao aumento do atrito durante a mastigação, podendo demorar entre quinze a vinte segundos para se desenvolver, originando a sensação de adstringência (Guinard *et al.*, 1986a).

Por vezes, a adstringência é confundida com a sensação de amargor pelo facto de alguns polifenóis, como é o caso do ácido cafeoilquínico, apresentarem a dupla propriedade: serem adstringentes e terem um gosto amargo (Lea e Arnold, 1978; Lea, 1992). No entanto, a adstringência não é um sabor (ao contrário do amargor), pois a língua não possui receptores específicos por este fenómeno (Joslyn e Goldstein, 1964). A adstringência também pode ser definida pelo estado de viscosidade da solução, através da formação de complexos insolúveis proteína-tanino (Clifford, 1997).

6.2. Alterações de Adstringência durante o amadurecimento de frutos e bebidas

As alterações de adstringência podem ocorrer durante o amadurecimento dos frutos e durante o envelhecimento no caso das bebidas derivadas desses frutos (Golstein e Swain, 1999). Apesar de alguns frutos apresentarem uma diminuição da concentração em taninos durante o amadurecimento, noutros frutos essa concentração mantém-se constante.

A perda de adstringência durante o amadurecimento dos frutos pode ser explicada com base em diversos factores. Por um lado, o aumento de polimerização dos polifenóis durante o amadurecimento dos frutos provoca uma diminuição na solubilidade dos polímeros, levando à precipitação destes e consequentemente à

diminuição da adstringência. Outra explicação possível é a alteração da estrutura celular dos frutos pela libertação de pequenos fragmentos de pectina, com alguns grupos de metil-D-galacturónico esterificados (Aspinall, 1970). Este polissacárido desenvolve, em solução, uma estrutura secundária contendo poros hidrofóbicas capazes de encapsular os polifenóis, impedindo-os de se ligarem às proteínas salivares quando são ingeridos, causando a diminuição da adstringência. Segundo estudos efectuados com frutos, a perda de adstringência que ocorre à medida que o fruto amadurece advém não da diminuição da concentração polifenólica nos frutos mas devido a fragmentos solúveis de pectina que competem com as glicoproteínas, na cavidade oral, pela ligação aos taninos (Ozawa *et al.*, 1987).

Factores como o clima, a qualidade do fruto e o seu estado de maturação são alguns dos agentes que podem influenciar a adstringência dos frutos durante o processo de maturação.

Os fenómenos de alteração da adstringência ocorrem não só frutos mas também em bebidas derivadas desses frutos. No vinho, durante o seu envelhecimento ocorre a alteração de adstringência influenciando marcadamente as suas características organolépticas. Durante o processo de envelhecimento ocorrem várias reacções químicas que são responsáveis pela alteração da estrutura dos taninos nomeadamente reacções de oxidação, de agregação e de polimerização por catálise ácida, resultando na formação de compostos polifenólicos mais complexos e pouco solúveis que acabam por precipitar, promovendo a diminuição da adstringência do vinho (Haslam, 1980). Foram realizados diversos estudos que contribuíram para sustentar esta constatação. Dyer (1985) efectuou um estudo com vinhos brancos onde demonstrou que um terço da quantidade total de compostos polifenólicos presentes no vinho após a fermentação é constituído por polímeros de treze ou mais unidades de flavonóides. Decorridos apenas seis meses de envelhecimento, os mesmos vinhos apresentavam um aumento significativo na polimerização dos compostos polifenólicos, apresentando polímeros com números de unidades monoméricas superiores a treze (Dyer, 1985).

Ribéreau-Gayon (1974) estudou, por sua vez, a composição polifenólica de vinhos tintos novos e envelhecidos, tendo verificado que os vinhos tintos novos apresentavam valores de massa molecular de flavanóides compreendidos entre 500 e 700 Da, o que corresponde a dímeros e trímeros. Após alguns anos de envelhecimento os polifenóis presentes nestes vinhos polimerizavam resultando em polímeros constituídos por oito a catorze unidades de flavanóides (Ribéreau-Gayon, 1974). Devido ao aumento da polimerização, os polímeros de flavanóides tornavam-se menos solúveis no vinho acabando por precipitar.

Apenas os vinhos que apresentam uma elevada concentração de polifenóis serão apropriados para envelhecer durante longos períodos de tempo (Singleton, 1974). Os vinhos tintos novos que apresentam uma maior concentração de oligómeros (flavonóides com menos de cinco unidades) do que de polímeros são adstringentes e designados na gíria dos enólogos vinhos “pesados” e “rústicos” (vinho muito adstringente). O envelhecimento destes vinhos promove a polimerização e precipitação dos flavonóides resultando na diminuição da adstringência tornando-os vinhos mais “leves” (Lea e Arnold, 1983). Assim, o aumento da polimerização dos compostos fenólicos resulta na redução da adstringência do vinho à medida que os polímeros se tornam menos solúveis e precipitam, formando depósitos no fundo da garrafa ou barril.

O meio de envelhecimento do vinho, redutor (garrafa) ou oxidativo (barril), também afecta a polimerização dos polifenóis e consequentemente a adstringência. Noble e Aiken (1984) verificaram que o vinho envelhecido durante um ano em meio redutor (garrafa) continha 35% de polifenóis polimerizados, enquanto que para o mesmo período de envelhecimento em meio oxidativo (barril de madeira), o mesmo vinho apresentava 40% de polifenóis polimerizados.

6.3. Factores que influenciam a adstringência

As interacções entre os taninos e as proteínas podem ser afectadas por vários factores, que vão provocar alterações de adstringência. Entre estes factores destacam-se a concentração de proteínas e taninos, as suas estruturas, a ocorrência de pontes etilo entre as unidades monoméricas, a presença de outras moléculas (*e.g.* os carboidratos), e ainda factores experimentais tais como o pH, a força iónica, a temperatura e a concentração em etanol.

A presença de açúcares simples (glucose e frutose) em vinhos é um factor que afecta a percepção da adstringência. Uma possível explicação é o facto do sabor doce dos açúcares suprimir a sensação de adstringência (Pyle, 1986).

6.3.1. Concentração de taninos e de proteínas

O modelo de interacção entre taninos e proteínas proposto por Haslam ainda hoje é utilizado (figura 19) (Haslam, 1981).

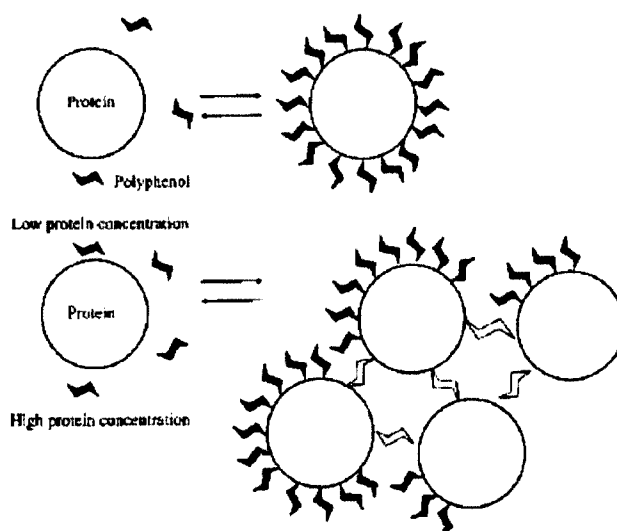


Figura 19: Modelo representativo da formação de complexos proteína-tanino (adaptado de Haslam, 1981).

Segundo este modelo, sempre que a concentração de proteínas for baixa, os polifenóis ligam-se à superfície das proteínas, em um ou mais locais activos, formando uma monocamada. Se, por outro lado, a concentração em proteínas for elevada, os polifenóis actuam como ligandos polidentados formando ligações cruzadas entre as várias moléculas de proteína. Em qualquer uma das situações, verifica-se que há um aumento do carácter hidrofóbico do complexo insolúvel em água, acabando por precipitar.

6.3.2. Estrutura dos taninos e das proteínas

As interacções entre os taninos e as proteínas podem ser influenciadas pela estrutura molecular dos taninos. A capacidade dos taninos para se agregarem às proteínas aumenta com o peso molecular do tanino até valores de 3000 Da, por causa do grau de polimerização. Com o aumento do peso molecular dos polifenóis aumento o número de anéis aromáticos e o carácter hidrofóbico, fomentando as interacções hidrofóbicas com as proteínas e consequentemente a formação de um número superior de agregados entre os taninos e as proteínas (Baxter *et al.*, 1997).

Polifenóis pequenos como a catequina fixam-se apenas à proteína sendo difícil a sua precipitação (Gustavson, 1956; Haslam, 1974), enquanto que taninos muito polimerizados, em meio aquoso, formam complexos demasiados volumosos que acabam por precipitar (Oh *et al.*, 1980).

O tamanho das proteínas, a sua estrutura, o tipo de conformação (estrutura aberta ou globular) e a sua composição em aminoácidos são factores que também determinam a formação de complexos proteína-tanino (Hagerman e Butler, 1980, 1981; Spencer *et al.*, 1988). Proteínas com elevado teor em prolina (*e.g.* proteínas salivares) têm uma afinidade maior para os taninos condensados, devido ao carácter hidrofóbico deste aminoácido.

No presente trabalho utilizou-se a Albumina Sérica Bovina (BSA) (figura 20) como proteína modelo para estudar a influência entre os taninos e as proteínas. A escolha desta proteína deve-se ao facto de ser considerada uma proteína de referência na avaliação da reactividade dos taninos, utilizada por vários grupos de investigação. No entanto, a BSA tem uma conformação globular e por isso, as interacções que ocorrem entre ela e os polifenóis envolvem provavelmente, apenas interacções hidrofóbicas entre os anéis aromáticos e os aminoácidos apolares (*e.g.* prolina) (Baxter *et al.*, 1997).



Figura 20: Esquema da BSA, em que o azul representa os resíduos de aminoácidos básicos, o vermelho os ácidos e o amarelo os neutros (adaptado de Cáster and Ho, 1994).

6.3.3. Papel do acetaldeído na polimerização de polifenóis e na adstringência dos vinhos

A diminuição da adstringência do vinho foi inicialmente atribuída à formação de pigmentos entre as antocianinas e os flavanóis por condensação directa (Timberlake e Bridle, 1976; Haslam, 1980; Liao *et al.*, 1992), ou mediada pelo acetaldeído (Bakker *et al.*, 1993).

No entanto, estudos em soluções modelo da auto-polimerização da (+)-catequina induzida por acetaldeído mostraram que esta reacção podia também ocorrer nos vinhos e ser responsável pelo decréscimo dos flavanóides, como resultado da precipitação das formas mais polimerizadas (Fulcrand *et al.*, 1996a; Saucier *et al.*, 1997a). De facto, foi detectado em vinho tinto dímeros e trímeros de (+)-catequina com pontes etilo (figura 21) (Saucier *et al.*, 1997b; Cheynier *et al.*, 1997). Os dímeros formados podem apresentar pontes etilo do tipo C8-C8 ou C8-C6, atendendo aos locais de ligação da primeira unidade de catequina com a segunda unidade de catequina

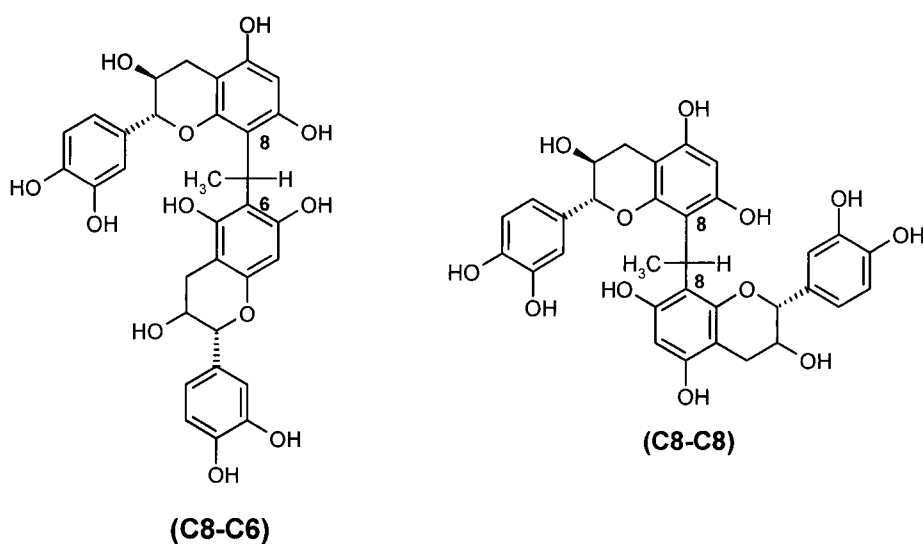


Figura 21: Estrutura de dímeros de catequina com ponte etilo.

A polimerização e precipitação dos flavanóides devido à reacção com o acetaldeído poderá explicar, em parte, a diminuição parcial de adstringência dos vinhos durante o seu envelhecimento. O acetaldeído presente nos vinhos resulta da oxidação do etanol durante o seu envelhecimento (Singleton e Esau, 1969).

Segundo um estudo realizado por Vidal (2003) modificando a estrutura molecular dos taninos através da introdução de pontes etilo diminui a adstringência.

6.3.4. Papel dos carboidratos

Como já foi referido, durante o amadurecimento dos frutos podem libertar-se pequenos fragmentos de pectinas (polissacáridos) que vão competir com as proteínas salivares diminuindo a sensação de adstringência dos frutos após a sua ingestão.

Vários estudos têm demonstrado que a presença de carboidratos influencia a adstringência dos alimentos, devido à capacidade que estes apresentam de inibir a formação dos complexos proteína/tanino (Ozawa *et al.*, 198). Num estudo efectuado por Lesschaeve e Noble (2005) verificou-se que quando taninos de grainha de uva são postos em contacto com a carboximetilcelulose, que é um carboidrato, a adstringência diminui significativamente. Neste estudo observou-se ainda reduções semelhantes de adstringência para soluções de sumo de aronia e leite de soja.

Os possíveis mecanismos que permitem explicar a diminuição da adstringência, devido à presença de carboidratos, encontram-se representados de forma esquemática na figura 22.

Vários autores propõem um mecanismo (*i*) no geral ocorre a formação de um complexo ternário carboidrato/proteína/tanino que, devido ao carácter hidrofílico dos carboidratos, teria uma maior solubilidade em solução aquosa (Ozawa *et al.*, 1987; Luck *et al.*, 1994). Os carboidratos adsorvem os polifenóis através de ligações por pontes de hidrogénio entre o átomo de oxigénio dos carboidratos e o grupo hidroxilo dos polifenóis, bem como por interacções hidrofóbicas. No segundo mecanismo *ii*) ocorre competição entre o carboidrato e a proteína para se ligarem ao tanino. Alguns carboidratos (*e.g.* xantana) desenvolvem bolsas hidrofóbicas capazes de encapsularem os polifenóis (McManus *et al.*, 1985; Ozawa *et al.*, 1987).

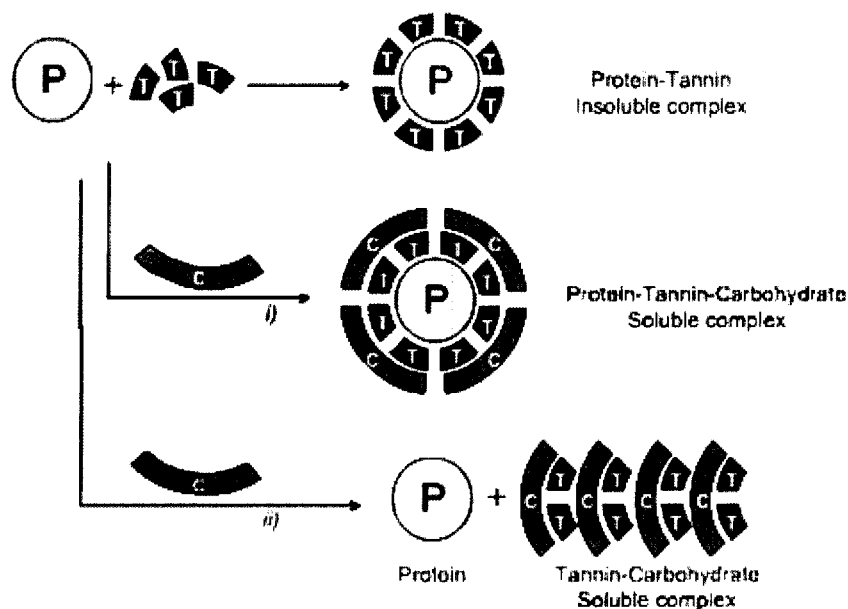


Figura 22: Esquema representativo dos dois mecanismos possíveis para a inibição da formação dos agregados insolúveis proteína-tanino, pelos carboidratos i) formação do complexo ternário carboidrato-tanino-proteína, solúvel em meio aquoso; ii) competição entre a proteína e o carboidrato, resultando na formação do complexo solúvel carboidrato-tanino (Mateus *et al.*, 2003).

Estudos nefelométricos recentes demonstraram que carboidratos iônicos possuem a capacidade de inibir as interações entre polifenóis e a proteína (BSA) (de Freitas *et al.*, 2003). Segundo o mesmo estudo, a pectina, a goma-arábica e a xantana, que são carboidratos iônicos, são mais eficientes na redução da concentração de agregados proteína-tanino do que carboidratos neutros (glucose, β -ciclodextrina e arabinogalactana) (de Freitas *et al.*, 2003).

6.3.4.1. Efeito das estruturas de carboidratos nas interações proteína-tanino.

A pectina é constituída por unidades de ácido α -D-galacturónico unidas entre si por ligações 1 $\rightarrow$ 4 (figura 23).

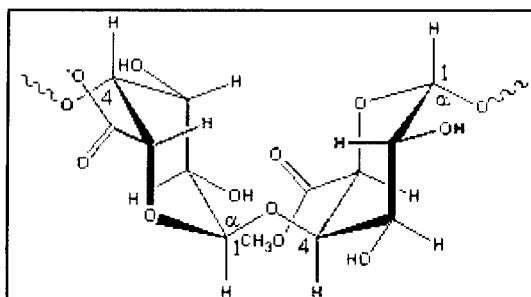


Figura 23: Constituintes maioritários da pectina: (1 $\rightarrow$ 4) ácido α -D-galacturónico

A cadeia principal deste carboidrato apresenta também resíduos de L-ramnose, enquanto que as cadeias laterais podem apresentar D-galatose e L-arabinose e, em menores quantidades, açúcares flucose e xilose. A pectina é um carboidrato em que os grupos carboxílicos das várias unidades estruturais de α -D-ácido surgem parcialmente esterificados com o metanol (figura 24).

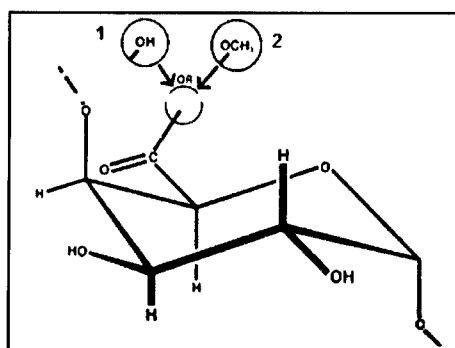


Figura 24: Unidade de α -D-ácido galacturónico com o grupo carboxílico livre (1) ou esterificado com metanol (2).

A polaridade da pectina depende do grau de esterificação do grupo carboxílico com o metanol. Deste modo, quando os grupos carboxílicos estão esterificados, a polaridade da pectina diminui, assim como, as interações hidrofílicas, reduzindo a capacidade do carboidrato para inibir a formação de agregados insolúveis do tipo proteína-tanino (Mateus *et al.*, 2003).

A pectina é capaz de formar um gel em solução sobretudo para valores de pH compreendidos entre 2,0 e 3,5. A partir da perda dessas cargas e da hidratação, as moléculas poliméricas associam-se, formando uma rede de cadeias poliméricas que encapsulam partículas de pequena dimensão (*e.g.* polifenóis). Valores de pH superiores a 3,0 resultam em géis moles, enquanto que valores muito baixos (até pH=2,0) formam géis muito duros. A formação do gel é directamente proporcional ao peso molecular e inversamente proporcional ao grau de esterificação.

A xantana é um polielectrólito aniónico que se apresenta na forma de um esqueleto linear de β -(1 $\rightarrow$ 4)D-glucose, com uma cadeia lateral composta por um trissacárido carregado, encontrando-se ligada a cada dois resíduos de glucose da cadeia principal.

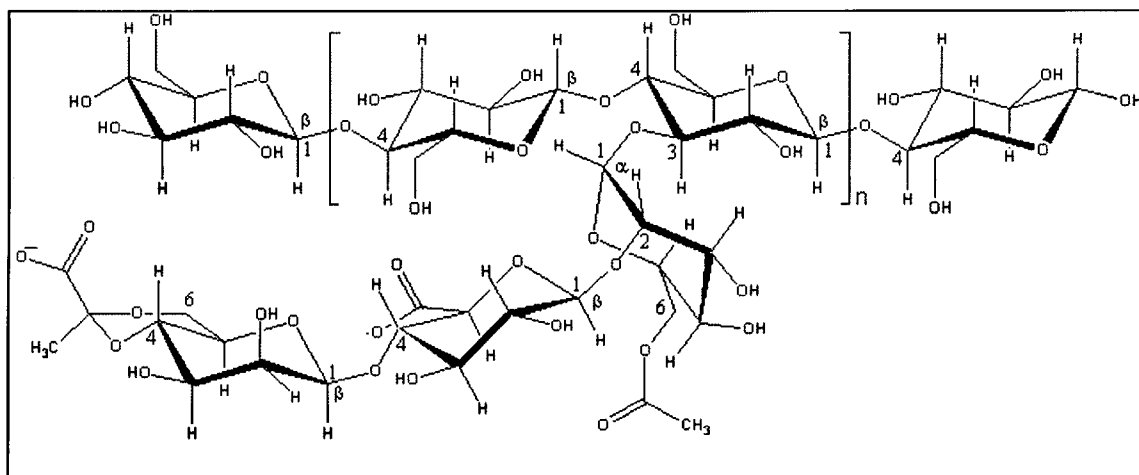


Figura 25: Molécula de xantana, constituída por cerca de 7000 pentâmeros.

Em solução, a xantana é capaz de formar uma rede polimérica (figura 26) capaz de encapsular pequenas partículas nos seus poros, como os polifenóis prevenindo deste modo a ocorrência de interação entre as proteínas e os polifenóis (Ozama *et al.*, 1987; Haslam, 1998).

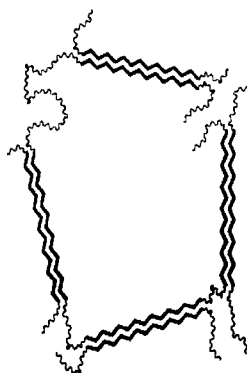


Figura 26: Rede polimérica formada em solução pela xantana, criando poros hidrofóbicos aptos a encapsularem os taninos (Hagerman e Butler, 1987).

A goma-arábica é uma complexa e variável mistura de arabinogalactanas e glicoproteínas. Dependendo da fonte de onde provêm, os componentes contêm uma maior ou menor proporção de L-arabinose, D-galactose e L-ramnose. Além disso, este carboidrato apresenta uma estrutura principal iônica, com resíduos de ácido β -D- galacturônico unidos entre si por ligações (1 $\rightarrow$ 3), contendo cadeias laterais ligadas na posição seis da cadeia principal. Este carboidrato é muito ramificado e é um composto neutro ou ácido fraco.

Estes três carboidratos (pectina, xantana e goma-arábica) foram os carboidratos escolhidos para realizar este trabalho, uma vez que já tinham demonstrado ser eficientes na inibição de agregação entre taninos e proteínas em estudos anteriores (de Freitas *et al.*, 2002).

6.3.5. Influência de factores experimentais na interacção proteína-tanino

6.3.5.1 pH

A formação de complexos proteína-tanino é fortemente afectada pelo pH da solução, já que as interacções entre proteínas e taninos são favorecidas para valores de pH perto do ponto isoeléctrico da proteína (Asano *et al.*, 1982; Haslam, 1996). As procianidinas oligoméricas revelam uma grande afinidade com a BSA a um pH próximo de 4,5 (Hagerman e Butler, 1978 e 1981; de Freitas e Mateus, 2002), enquanto que as proteínas salivares (α -amilase e PRP_s) apresentam dois valores de pH: 3,5 e 5,0 aos quais a formação de agregados com polifenóis é máxima (De Freitas e Mateus, 2000).

6.3.5.2 Força iónica

Dependendo do tipo de polifenóis envolvidos nas interacções estas podem aumentar (Luck *et al.*, 1994; Siebert *et al.*, 1996; Kawamoto e Nakatsubo, 1997) ou diminuir com a força iónica (de Freitas *et al.*, 2002). Desse modo, aumentando a força iónica da solução, por adição de cloreto de sódio, a quantidade de agregados proteína-tanino diminui, sugerindo que estas interacções são afectadas por factores iónicos (de Freitas e Mateus, 2001; de Freitas *et al.*, 2002). Em geral, as procianidinas são ácidos fracos com constante de acidez (pKa) a variar entre 9 e 10, indicando que praticamente não têm carga negativa na sua estrutura a pH 5 (Vernhet *et al.*, 1996). Duas possíveis explicações podem ser apresentadas para o facto de um aumento da força iónica se reflectir numa diminuição da quantidade de agregados em solução: a primeira explicação, refere-se à adsorção ou fixação dos iões, sobretudo iões cloreto (Cl⁻), directamente da solução para a superfície hidrofóbica do tanino, restringindo as interacções a ligações por pontes de hidrogénio; a segunda explicação baseia-se na fixação directa dos iões à superfície do complexo

proteína-tanino originando uma camada iónica, que resulta na solubilização dos agregados, uma vez que o complexo se torna mais hidrofílico.

6.3.5.3 Temperatura

Ao diminuir a temperatura da solução, a quantidade de agregados formados entre proteínas e taninos diminui, levando à consequente diminuição da adstringência. Esta situação pode ser explicada por vários mecanismos entre os quais, o facto de a velocidade da interacção entre as proteínas e os taninos ser menor em soluções a temperaturas mais baixas do que em soluções a temperaturas mais elevadas (Brunstrom *et al.*, 1997). Importa ainda referir que soluções frias apresentam uma maior viscosidade, que poderá diminuir o atrito durante a mastigação (hipótese do mecanismo da adstringência) com a consequente diminuição da adstringência. No entanto, é também importante ter em conta a interacção cognitiva entre as sensações de frio e de adstringência.

6.3.5.4 Concentração de Etanol

A adstringência no vinho diminui com o aumento da concentração em etanol, que é justificada pela diminuição dos agregados proteína-tanino. A alteração das propriedades ácido-base do solvente, como o aumento do teor em etanol diminui a coesão do solvente e favorece a solvatação dos agregados. Por outro lado, um aumento da concentração de etanol, em solução hidroalcoólica, resulta numa diminuição da tensão superficial do solvente, interferindo nas interacções hidrofóbicas que ocorrem entre proteínas e taninos, diminuindo a precipitação destes últimos. Refira-se ainda que a presença de etanol na cavidade oral estimula a lubrificação, evitando a sensação de secura e constrição que caracterizam a adstringência (Martin e Pangborn, 1971).

7. Método de estudo da interacção dos taninos com as proteínas e carboidratos

Algumas características sensoriais dos alimentos podem ser objectivamente determinadas, como é o caso da cor através da medição da absorvância a um dado comprimento de onda. No entanto, não existe nenhum método que nos permita quantificar objectivamente o sabor e nomeadamente a adstringência. A análise sensorial tem sido uma técnica continuamente usada para avaliar o sabor de alimentos e bebidas, mas devido à subjectividade que o processo acarreta, tornou-se necessário desenvolver métodos físico-químicos que permitissem avaliar de forma mais objectiva as interacções entre os polifenóis e as proteínas que condicionam e permitem caracterizar o sabor. Neste sentido, a complexação dos polifenóis com as proteínas tem sido largamente estudada em solução recorrendo a métodos colorimétricos (Bate-Smith, 1973; Porter e Woodruffe, 1984), à espectroscopia de RMN (Murray *et al.*, 1994; Baxter *et al.*, 1997), à microcalorimetria (Beart *et al.*, 1985), à inibição enzimática (Goldstein e Swain, 1965) e por cromatografia de afinidade (Oh, *et al.*, 1980).

Um dos métodos usados para detectar a formação de complexos insolúveis proteína-tanino, tem sido a nefelometria, que consiste em medir a luz difractada pela presença de agregados insolúveis em solução. Chapon (1961) foi o primeiro a adoptar esta técnica, usando como modelo proteico o PVP (polivinilpirrolidona). Esta técnica voltou a ser usada mais tarde para medir a turbidez da solução resultante da formação de agregados proteína-tanino (Chapon, 1993; de Freitas, 1995, 2001, 2002). Recentemente foi desenvolvido um método que permite medir a formação de agregados proteína-tanino por nefelometria em fluxo, em substituição da tradicional “batch”.

O esquema da técnica de nefelometria em fluxo está representado na figura 27 e é constituída por diversas partes: uma bomba peristáltica, uma bomba de gradiente, uma câmara de mistura, um reactor composto por um tubo de silicone com quatro metros e uma célula de fluxo adaptada a um turbidímetro convencional. A bomba peristáltica bombeia a amostra de taninos até à câmara de mistura, onde esta se junta com um gradiente de proteína. A mistura de proteínas e taninos resultante vai reagindo ao longo do percurso do reactor, até que passa na célula onde os complexos formados são detectados pelo turbidímetro. A aquisição e o tratamento dos dados são efectuados por um computador equipado com um software próprio. O gráfico obtido permite observar a formação gradual de agregados proteína-tanino e o máximo de turvação, que corresponde à Actividade Tanante Específica (ATE).

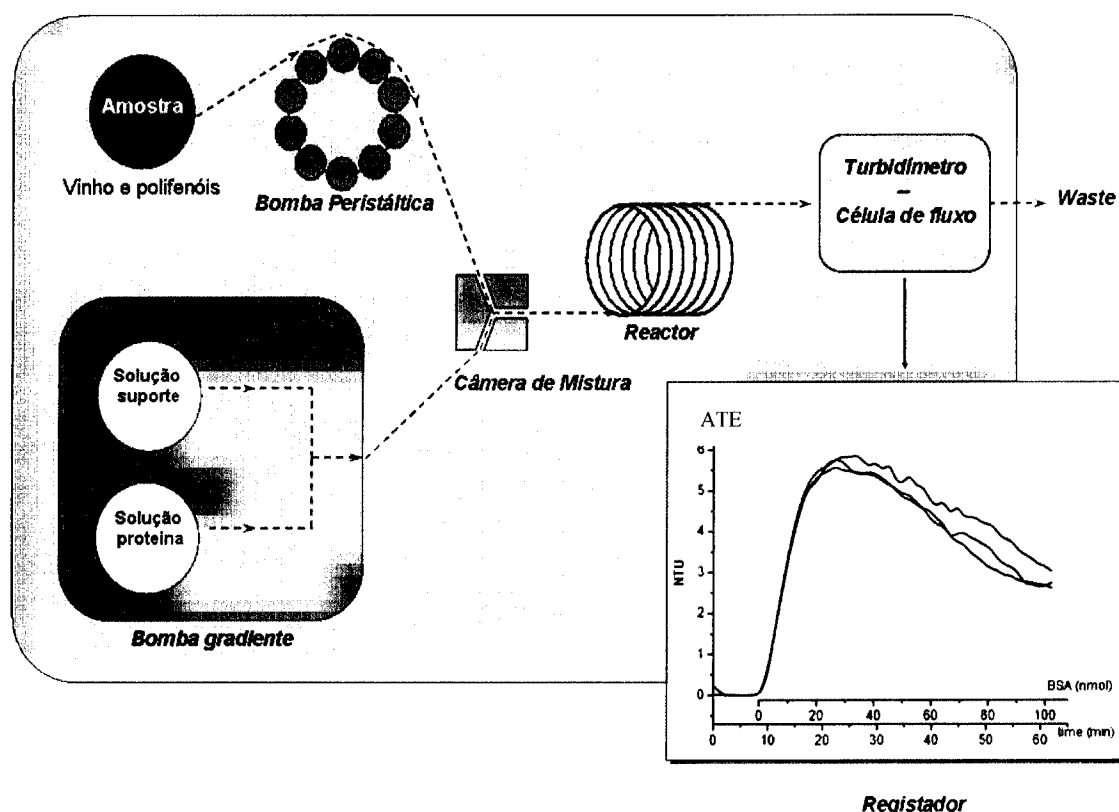


Figura 27: Esquema de montagem da nefelometria de fluxo (Carvalho *et al.*, 2004)

A nefelometria em fluxo é uma técnica versátil, que permite alterar de uma forma rápida o gradiente de solução e o fluxo de proteína e taninos. Por outro lado, permite efectuar uma análise directa, sem diluições prévias da amostra, e por esta razão não afectada pelas características coloidais dos taninos nas amostras líquidas (*e.g.* vinho) e que interferem igualmente nas interacções entre taninos e proteínas. A nefelometria em fluxo permite averiguar a afinidade dos taninos para se ligarem às proteínas através da medição da turvação de complexos proteína-tanino, durante a adição de um gradiente crescente de proteína (gráfico da figura 27). Assim, a quantidade de agregados proteína-tanino aumenta progressivamente com a adição crescente da proteína, até atingir um valor de turvação máximo que é designado por Actividade Tanante Especifica (ATE). Após este valor a contínua adição de proteína poderá não afectar a formação de agregados ou então provocar a diminuição da turvação da solução para concentrações elevadas de proteína. Este fenómeno leva à re-solubilização dos agregados, por alteração da estequiometria do complexo proteína-tanino (Chapon, 1993; Coupais-Paul, 1993; de Freitas, 1995; de Freitas e Mateus, 2001; de Freitas *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004).

Descrição do trabalho

O trabalho incidiu no estudo das interacções entre taninos e proteínas de forma a compreender os fenómenos físico-químicos que estão na origem do sabor de alimentos e nomeadamente na adstringência de bebidas constituídas por polifenóis.

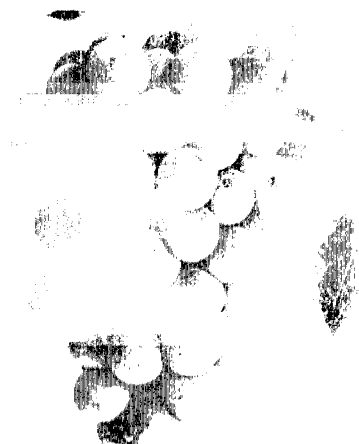
Iniciou-se o trabalho efectuando o isolamento de procianidinas de grainha de uva e a síntese de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-, a partir da reacção de polimerização da (+)-catequina com o acetaldeído, em meio ácido. Seguidamente, fraccionaram-se as procianidinas e compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-, por cromatografia em coluna de gel Toyopearl, em função da massa molecular média. Os compostos foram identificados e caracterizados por HPLC e Espectrometria de Massa.

Posteriormente, estudaram-se por nefelometria em fluxo, vários factores que podem influenciar a formação de agregados proteína-tanino e consequentemente a adstringência, entre os quais a concentração dos intervenientes (taninos e proteínas) e a estrutura dos taninos condensados (procianidinas) e dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-.

A técnica de nefelometria em fluxo foi adaptada de modo a introduzir uma terceira variável no sistema, ou seja, para além dos taninos e das proteínas foram introduzidos os carboidratos. Deste modo, foi possível estudar a influência de alguns carboidratos (pectina, goma-arábica e xantana) nas interacções entre polifenóis e a BSA.

Na última parte do trabalho adaptou-se o método por nefelometria em fluxo para estudar a interacção da BSA com os taninos de vinho branco. Assim, foi possível determinar a Actividade Tanante Específica relativamente à BSA de dez vinhos brancos portugueses provenientes de diferentes regiões demarcadas.

MATERIAL E MÉTODOS



1. Reagentes

A proteína utilizada foi a Albumina Sérica Bovina (BSA) (pH~7). Os carboidratos estudados foram: a pectina citrus (ácido galacturónico >70%), a goma xantana (de *Xanthomonas campestris*), e a goma-arábica (acácia). Todos os reagentes foram comprados à Sigma Chemical Co (USA).

2- Compostos polifenólicos

2.1. Procianidinas oligoméricas

As procianidinas oligoméricas foram extraídas de grainhas de uvas *Vitis vinífera* com uma solução de etanol-água-clorofórmio (1:1:2, v/v/v) usando um misturador (Ultra-Turrax) de acordo com o método descrito na literatura (Darné e Madero-Tamargo, 1979). A fase hidroalcoólica, que continha as procianidinas, foi separada da fase orgânica, composta por clorofilas, lípidos e outros compostos indesejáveis. O etanol foi removido da fase hidroalcoólica usando um evaporador rotativo. A solução aquosa resultante com procianidinas oligoméricas foi extraída com acetato de etilo, seguido de precipitação com hexano de forma a obter procianidinas oligoméricas, de acordo com o procedimento descrito na literatura (Michaud *et al.*, 1971).

A purificação e fraccionamento das procianidinas oligoméricas presentes no extracto aquoso das grainhas foi realizada por cromatografia líquida em coluna de gel Toyopearl TSK HW-40 S (Tosoh, Japão), (100 x 10 mm i.d.; fluxo de 0,7 ml/min) utilizando como eluentes inicialmente o metanol 99,8%, seguindo-se uma solução de metanol e ácido acético a 5% (v/v) e finalmente uma solução de metanol e ácido acético 10% (v/v) de forma a separar as procianidinas oligoméricas de acordo com a tabela 1 (de Freitas *et al.*, 1998).

Tabela 1: Fracções de procianidinas oligoméricas obtidas por fraccionamento em cromatografia líquida em coluna (gel Toyopearl TSK HW-40 S)

Eluente	MeOH 99,8%			MeOH/ CH ₃ COOH 5% (v/v)	MeOH/ CH ₃ COOH 10% (v/v)
	I	II	III	IV	V
Tempo	30 min	1 h	5 h	14 h	8 h

Os solventes das fracções foram removidos num evaporador rotativo sob vácuo a 30°C. Os resíduos obtidos foram recuperados numa solução de metanol/água (5:95). Estas soluções foram congeladas (-18 °C) e subsequentemente liofilizadas, sendo mantidas a -18 °C até à sua análise por espectrometria de massa e ensaios nefelométricos.

2.2- Síntese dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-

Vários sompostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- foram obtidos a partir da reacção entre a (+)-catequina e o acetaldeído em meio ácido.

Preparou-se uma solução hidroalcoólica (12% etanol) contendo (+)-catequina (0,52 g/L) e acetaldeído. O rácio molar utilizado foi de 1:10 de catequina/acetaldeído. O valor de pH foi ajustado a 2,5 e a mistura reaccional foi mantida à temperatura ambiente num matraz rolhado e protegido da luz. Acompanhou-se a formação dos novos compostos por HPLC ao longo do tempo. A reacção foi interrompida quando a concentração dos novos produtos atingiu o valor máximo (96 horas após o início da reacção).

Evaporou-se o etanol no evaporador rotativo e a solução aquosa resultante foi purificada através gel sílica C18 de fase reversa (Fluka, Espanha), usando um

sistema constituído por funil de vidro (100 x 40 mm d.i.) com uma placa porosa (porosidade média G3), onde estava colocado o gel C18, adaptado a um kitasato ligado a uma bomba de vácuo.

Colocou-se a mistura reaccional na superfície do gel e fez-se passar em seguida água desionizada para remover o excesso de acetaldeído, sais inorgânicos e outras impurezas. Os produtos da reacção foram recuperados com metanol destilado. Removeu-se o solvente num evaporador rotativo a 30°C e o resíduo foi recuperado numa solução de metanol/água (5:95 v/v). A solução foi congelada (-18 °C) e posteriormente liofilizada.

Procedeu-se ao fraccionamento dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- por cromatografia líquida em coluna de gel Toyopearl TSK HW-40 S (Tosoh, Japão), (100 x 16 mm d. i.; fluxo de 0,7 ml/min) usando o metanol 99,8% como eluente. O fraccionamento foi seguido por detecção a 280 nm num detector UV-Vis. Foram recuperadas seis fracções de acordo com a tabela 2 de forma a separar os compostos em função da massa molecular média.

Tabela 2: Fracções de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)-n recolhidas por cromatografia líquida em coluna (gel Toyopearl TSK HW-40 S)

Eluente	MeOH 99,8%					
Fracção	1	2	3	4	5	6
Tempo	1h	2h	3h 30m	5h 30m	7h 45m	14h 45m

O solvente foi evaporado num evaporador rotativo sob vácuo a 30°C e o resíduo de cada fracção foi recuperado numa solução de metanol/água (5:95). As fracções foram congeladas (-18 °C) e subsequentemente liofilizadas, sendo mantidas a -18 °C até à sua análise por espectrometria de massa e ensaios nefelométricos.

3. Análise cromatográfica por HPLC

Utilizou-se um equipamento de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) Lachrom Merck Hitachi (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) constituído por uma bomba Merck L-7100, um forno para colunas Merck L7350 e um detector de díodos Merck L-7450. O controlo, aquisição e tratamento de dados cromatográficos foram efectuados através do software HSM D-7000.

- Coluna: C18 Merck (250 x 4,6 mm d.i.);
- Temperatura da coluna: 25 °C;
- Volume de injeção: 20 µl;
- Solvente A: água/ácido acético (97,5:2,5 v/v);
- Solvente B: Solvente A/acetonitrilo (20:80 v/v);
- Fluxo: 1,0 ml/min;
- Gradiente:

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	93	7
5	93	7
90	80	20
95	0	100
105	0	100
110	93	7

4. Análise por espectrometria de massa

Utilizou-se um equipamento de cromatografia líquida da série Hewlett-Packard 1100 com um detector de massa *Finnigan LCQ* (Finnigan, Corporation, San Jose, Califórnia, USA), equipado com uma fonte API (*Atmospheric Pressure Ionization*) e uma interface ESI (*ElectroSpray Ionization*), controlado por um software apropriado.

- Temperatura capilar: 270 °C
- Voltagem capilar: 28 V
- Voltagem da fonte: 4,5 KW
- Gases auxiliar e de arrasto: azoto a fluxos de 6 e 1,2 ml/min respectivamente
- Detecção: os espectros foram obtidos no modo de íão negativo no intervalo entre 150 e 2200 m/z, sendo o espectrômetro de massa programado para realizar uma série de três scans: uma análise de massa total (MS), um scan com zoom dos íões mais abundantes do primeiro scan (MS) e um scan (MS²) dos íões mais abundantes do segundo scan (MS³), usando uma energia de colisão normalizada de 45%.

5. Nefelometria em Fluxo

Todas as experiências foram efectuadas num turbidímetro de laboratório HACH 2100 N, com componente óptica equipada com uma lâmpada de tungsténio e três detectores: dois detectores de dispersão da luz e um detector de transmitância.

A nefelometria em fluxo era constituída por três partes distintas.

- Primeira parte: bomba de gradiente (Konics Instruments, HPLC-500 B), responsável por formar um gradiente de proteína com um fluxo apropriado à análise. O gradiente era conseguido através de duas ou três (caso das análises de carboidratos) soluções, designadas genericamente por:

- ✓ Solução A: solução de etanol 12% (v/v), tampão acetato 0,1 M, pH 5,0
- ✓ Solução B: solução de proteína (BSA; 11 g/L) na solução A.
- ✓ Solução C: solução carboidrato na solução A (no caso dos ensaios com carboidrato)

- Segunda parte: bomba peristáltica que controla o fluxo da solução de taninos até à válvula de mistura, onde entram em contacto com as soluções provenientes da bomba de gradiente

- Terceira parte: é constituída pelo reactor (tubo de silicone com diâmetro interno de 1,5 mm, 4 m de comprimento e a um tempo de reacção de 4,5 minutos para um fluxo de 0,5 ml/min) e o detector, um turbidímetro de laboratório HACH 2100 N, que está acoplado a um computador com um software adequado, que regista os resultados obtidos em unidades NTU (unidades de turbidez).

6. Estudo da formação de agregados proteína-tanino por nefelometria em fluxo

6.1. Influência da concentração de proteínas na formação de agregados com polifenóis

Uma solução de procianidinas oligoméricas (fracção V; 0,15g/l) foi bombeada através da bomba peristáltica do sistema de nefelometria a um fluxo de 2,0 ml/min. Simultaneamente criou-se um gradiente crescente de solução de proteína BSA (11g/L ou 15g/L) de 0% a 100% em 43 minutos, a um fluxo de 0,5 ml/min., que se misturou com a solução de procianidinas na válvula de mistura. Desta forma, foi possível estabelecer as quantidades estequiométricas de proteína e taninos nos agregados proteína/tanino formados, que correspondem à Actividade Tanante Específica (ATE). Cada ensaio foi efectuado em triplicado.

6.2. Influência da concentração de procianidinas na formação de agregados com a proteína

Prepararam-se 3 soluções de procianidinas oligoméricas (fracção III) de 0,10, 0,15 e 0,20 g/L em solução de etanol 12% (v/v), tampão acetato 0,1 M, pH 5,0. Todas as soluções foram filtradas com filtros de 0,45 µm. Cada uma destas soluções foi sujeita a um estudo de formação de agregados proteína-tanino por nefelometria em fluxo, com um gradiente crescente de solução de proteína BSA (11 g/L) nas condições experimentais descritas no ponto 6.1. As análises foram efectuadas em triplicado.

6.3. Influência da estrutura dos taninos

6.3.1– Influência da massa molecular média das procianidinas

Para averiguar o efeito da estrutura dos taninos (massa molecular média) na formação de agregados proteína-tanino, determinou-se a Actividade Tanante Especifica para várias fracções de procianidinas oligoméricas de diferentes massas moleculares. Foram analisados por nefelometria em fluxo as cinco fracções de procianidinas oligoméricas com diferentes graus de polimerização (tabela 1), nas mesmas condições experimentais descritas no ponto 6.2. As análises foram analisadas em triplicado.

6.3.2– Influência da massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-

Para investigar a influência da presença de pontes etilo entre unidades de flavanóis procedeu-se à determinação da Actividade Tanante Especifica de seis fracções de compostos catequina-(etil-catequina)_n- obtidas por condensação da (+)-catequina com acetaldeído, em meio ácido.

Analisaram-se por nefelometria em fluxo as seis fracções de compostos catequina-(etil-catequina)_n- nas mesmas condições experimentais descritas no ponto 6.2.

7. Estudo da influência dos carboidratos na complexação entre polifenóis e proteínas

7.1. Influência de diferentes carboidratos na formação de agregados proteína-procianidinas (fracção IV)

Foram preparadas as seguintes soluções de carboidratos em solução modelo (solução de etanol 12% (v/v), tampão acetato 0.1 M, pH 5.0): xantana (0,20 g/L), goma-arábica (20 g/L) e pectina (5,0 g/L). A turvação original destas soluções foi eliminada por centrifugação.

Utilizou-se a fracção IV (0,15 g/L) de procianidinas oligoméricas, que foi bombeada a um fluxo de 2,0 ml/min, através da bomba peristáltica. A bomba de gradiente era constituída por três soluções: solução A: solução de etanol 12% (v/v), tampão acetato 0,1 M, pH 5; solução B: solução de proteína (BSA; 4,1g/L (20%)) em solução A; solução C: solução de carboidrato em solução A. A formação de agregados BSA-procianidinas (fracção IV) foi estudada ao longo do tempo (63 minutos) usando as condições de gradiente apresentadas na tabela 3. As análises foram efectuadas em triplicado.

Tabela 3: Condições do gradiente de proteína e carboidrato

Tempo (minutos)	Solvente A (%) (solução modelo)	Solvente B (%) (proteína)	Solvente C (%) (carboidrato)
0	80	20	0
3	80	20	0
63	0	20	80

7.2. Influência da estrutura dos taninos na constante de inibição de agregação BSA-tanino por parte da xantana.

Para compreender de que forma o grau de polimerização dos taninos alteram o desempenho de carboidratos na inibição da formação de agregados proteína-tanino realizaram-se várias análises apenas com a xantana (0,20 g/L) com procianidinas e compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-.

7.2.1. Influência da massa molecular média das procianidinas

Foram analisadas as cinco fracções de procianidinas oligoméricas com diferentes massas moleculares médias (tabela 1). As condições de análises foram as mesmas que as descritas no ponto 7.1.

7.2.2. Influência da massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-

Foram analisadas as seis fracções de polímeros obtidas a partir da condensação da (+)-catequina com acetaldeído em meio ácido (tabela 2). As condições de análises foram as mesmas que as descritas no ponto 7.2.1.

8. Estudo da reactividade de taninos presentes em vinho branco com proteínas

8.1. Vinhos Brancos

Foram escolhidos aleatoriamente dez vinhos brancos de diferentes regiões demarcadas de Portugal com as características descritas na tabela 4.

Tabela 4: Identificação dos vinhos brancos estudados e características de pH e teor alcoólico.

Vinho	Região	Ano de colheita	pH	Teor alcoólico (%)
A	Douro	2003	3,14	12,5
B	Dão	2003	3,32	12,5
C	Dão	2003	3,51	13,0
D	Dão	*	3,16	12,0
E	Dão	2003	3,22	12,5
F	Douro	2002	3,16	13,0
G	Alentejo	2003	3,11	12,5
H	Douro	2003	3,26	12,0
I	Terras do Sado	*	3,61	12,5
J	Alentejo	2003	3,11	12,0

* Não especificado

8.2. Estudo preliminar das condições de análise de vinhos brancos

De forma a determinar a ATE em vinhos brancos por nefelometria em fluxo, realizaram-se vários testes, atendendo às concentrações relativas de taninos e proteína. Foram utilizadas duas soluções de BSA com concentrações iniciais diferentes (5 e 11 g/L), sujeito a um gradiente crescente através da bomba de gradiente. Estudou-se o vinho branco B da tabela 4. O vinho foi introduzido directamente através da bomba peristáltica no sistema de nefelometria em fluxo, sem qualquer diluição prévia. A quantidade de vinho no sistema foi alterada através de mudanças de fluxo da bomba peristáltica. O estudo foi realizado com as condições experimentais apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Actividade Tanante Especifica (ATE) de um vinho branco para diferentes condições experimentais

Variáveis	Teste			
	i	ii	iii	iv
Concentração inicial da solução de BSA (g/L)	11	5	5	5
Fluxo de vinho (ml/ minuto)	2,0	2,5	2,0	1,5

8.3. Estudo da reactividade entre a BSA e taninos de vinhos brancos

Os vinhos foram bombeados através da bomba peristáltica a um fluxo de 1.5 ml.min⁻¹ até à válvula de mistura onde se misturou com a solução de concentração crescente de proteína BSA (5g/L), de 0% a 50% em 43 minutos a um fluxo de 0,5 ml.min⁻¹. A partir do valor máximo de turvação determinou-se a ATE.

8.4. Análise Estatística

Todos os ensaios dos vinhos brancos foram efectuados em quadriplicado. Os valores foram expressos como médias aritméticas $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através de análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES

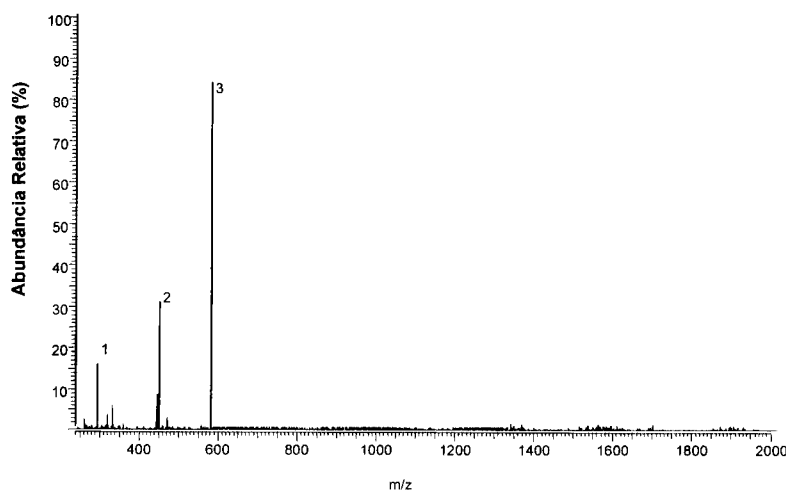


1. Isolamento e caracterização estrutural de taninos

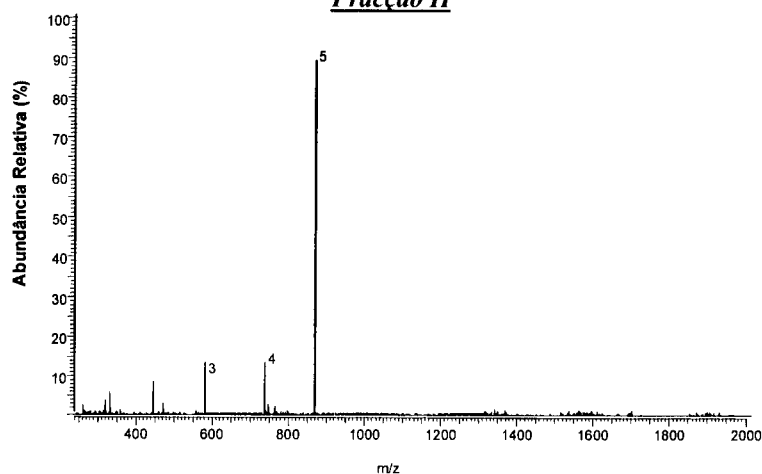
1.1. Identificação das procianidinas oligoméricas por Espectrometria de Massa

As procianidinas oligoméricas foram extraídas directamente de grainhas de uvas do género *Vitis vinífera* e fraccionadas por cromatografia líquida em coluna de gel Toyopearl de acordo com o método descrito na literatura (de Freitas *et al.*, 1998). Obtiveram-se as fracções I, II, III, IV e V correspondentes a procianidinas com diferentes massa moleculares médias. As procianidinas presentes em cada fracção foram identificadas através dos respectivos espectros de massa, figura 28 e tabelas 6 e 7.

Fracção I



Fracção II



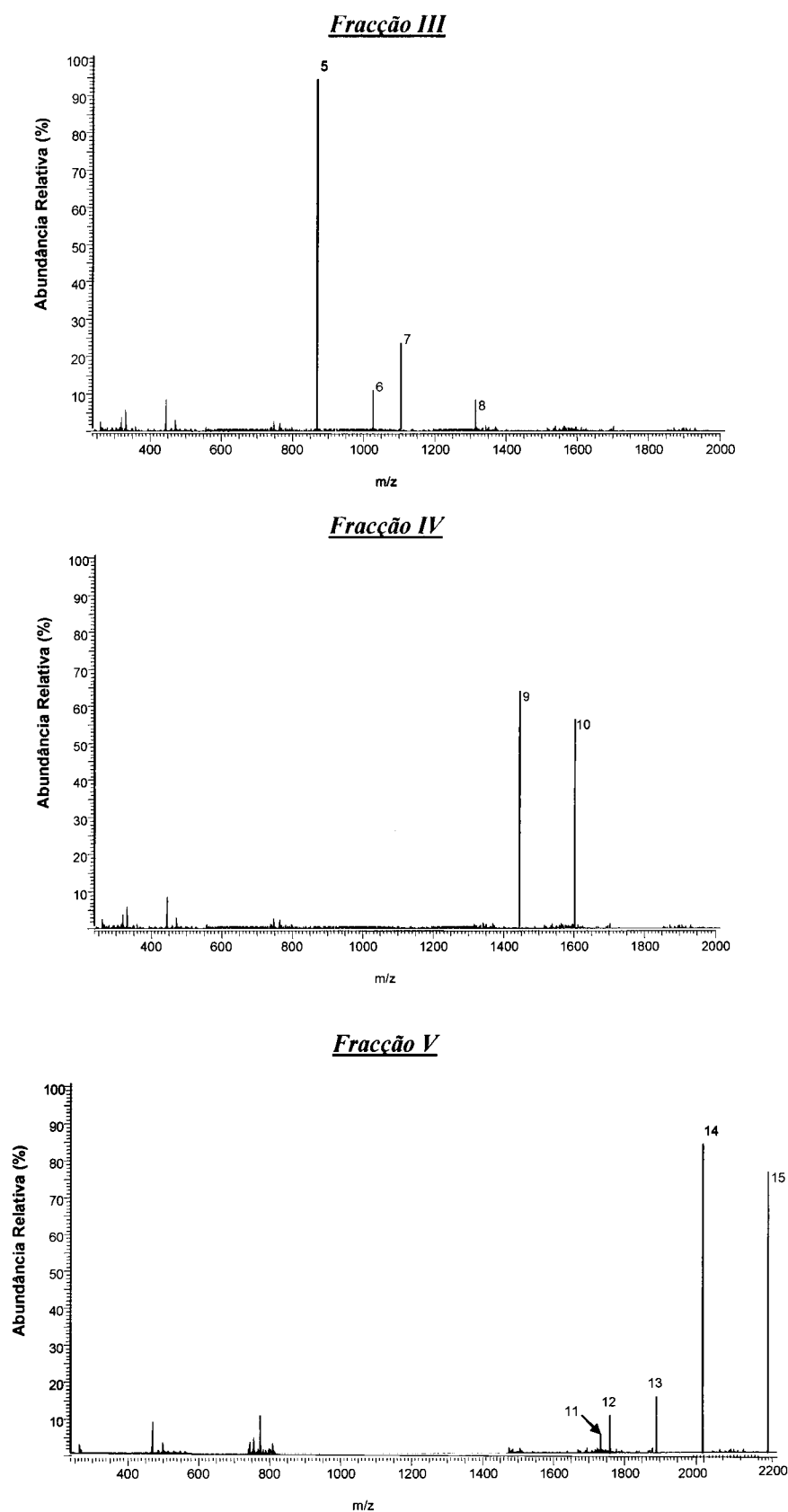


Figura 28: Espectros de massa das fracções I, II, III, IV e V correspondentes às procianidinas de grainha fraccionadas por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW-40 (S).

Podemos verificar que os extractos de grainhas são constituídos por catequinas, monómeros e procianidinas oligoméricas de diferentes massa moleculares médias e respectivos ésteres galhatos e digalhatos (tabela 6), como já foi referido por outros autores (Ricardo-da-Silva *et al.*, 1996; de Freitas *et al.*, 1998).

Tabela 6: Procianidinas identificadas por espectrometria de massa nas cinco fracções obtidas por cromatografia em coluna de um extracto de grainha (PC)

Fracção	Pico (nº)	Massa molecular (m/z)	Compostos flavanóicos
I	1	289	Catequina (monómero)
	2	441	Monómero galhato
	3	577	PC Dímero
II	3	577	PC Dímero
	4	729	PC Dímero galhato
	5	865	PC Trímero
III	5	865	PC Trímero
	6	1017	PC Trímero galhato
	7	1153	PC Tetrâmero
	8	1305	PC Tetrâmero galhato
IV	9	1422	PC Pentâmero
	10	1594	PC Pentâmero galhato
	11	1745	PC Pentâmero digalhato
V	12	1761	PC Tetrâmero tetragalhato
	13	1881	PC Hexâmero galhato
	14	2017	PC Heptâmero
	15	2169	PC Heptâmero galhato

Depois de identificados os picos referente às catequinas e procianidinas presentes em cada fracção determinaram-se as massas moleculares médias de cada

fracção através das abundâncias relativas presentes nos respectivos espectros de massa (tabela 7).

Tabela 7: Massa molecular média dos polifenóis presentes nas cinco fracções obtidas por cromatografia em coluna de um extracto de grainha

Fracção	Massa molecular (m/z)	% Abundância relativa*	Massa molecular média
I	289	12	513
	441	23	
	577	65	
II	577	10	823
	729	12	
	865	78	
III	865	70	949
	1017	7	
	1153	18	
	1305	4	
IV	1422	54	1513
	1594	46	
V	1745	3	2052
	1761	5	
	1881	6	
	2017	46	
	2169	41	

* dos compostos identificados

Podemos verificar que a massa molecular média aumenta com a ordem de eluição da fracção por cromatografia em coluna de gel Toyopearl TSK-40S tal como já foi referido por outros autores (de Freitas *et al.*, 1998; de Freitas e Mateus, 2001).

1.2- Síntese de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-

Durante o envelhecimento do vinho ocorrem várias reacções, entre elas a condensação e polimerização de flavanóis mediadas pelo acetaldeído, originando compostos com pontes etilo e nomeadamente compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-. O estudo da influência deste tipo de compostos na formação de agregados proteína-tanino é fundamental para compreender a evolução da adstringência no vinho durante o seu envelhecimento, uma vez que a formação destes agregados poderá contribuir para a alteração da sua adstringência.

1.2.1- Mecanismo geral da polimerização da (+)-catequina induzida por acetaldeído

A condensação de flavanóis mediada por aldeídos origina aductos com pontes etilo, estabelecidas entre duas ou mais unidades de flavanóis de acordo com o mecanismo descrito na figura 29 (Es-Safi *et al.*, 2002).

O mecanismo proposto para esta reacção inicia-se com a protonação dos grupos carbonilo dos acetaldeídos (I) presentes em meio ácido, seguido da adição de carbocatião (II) resultantes a uma posição nucleofílica da unidade de flavanol (III), preferencialmente na posição C8, devido à presença de uma carga negativa formal mais intensa neste carbono do que na posição C6. A desidratação do aducto protonado (IV) origina um novo carbocatião (V), que sofre um ataque nucleofílico por parte de outra unidade de (+)-catequina (III), o que leva à formação de aductos catequina-etil-catequina (VI). Na presença de acetaldeídos, estes novos aductos podem reagir com outra unidade de catequina formando trímeros, tetrâmeros e compostos com várias unidades de catequina do tipo catequina-(etil-catequina)_n- (Es-Safi *et al.*, 2002).

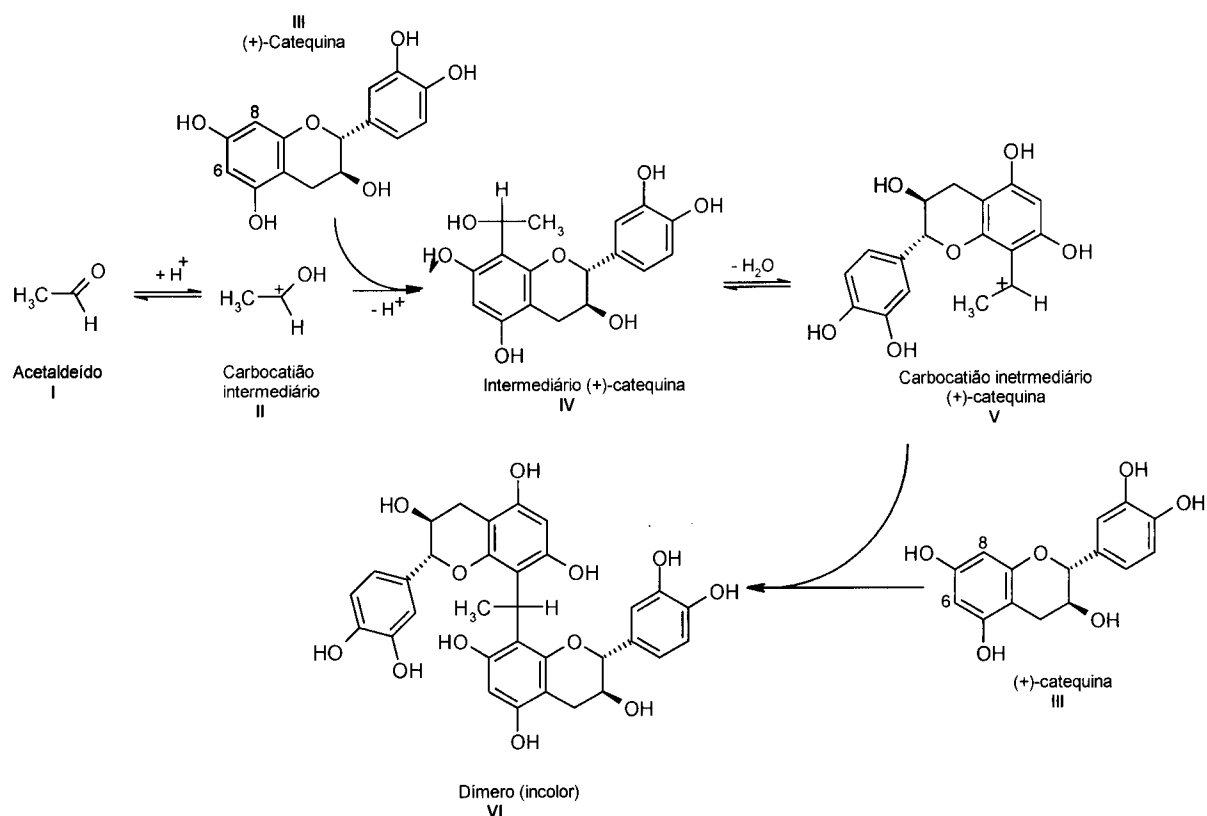


Figura 29: Mecanismo geral da polimerização de flavanóis induzido pelo acetaldeído em meio ácido

A formação dos novos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- foi acompanhada por HPLC ao longo do tempo. A reacção foi interrompida ao fim de 96 horas quando a concentração dos novos produtos atingiu o valor máximo (figura 30).

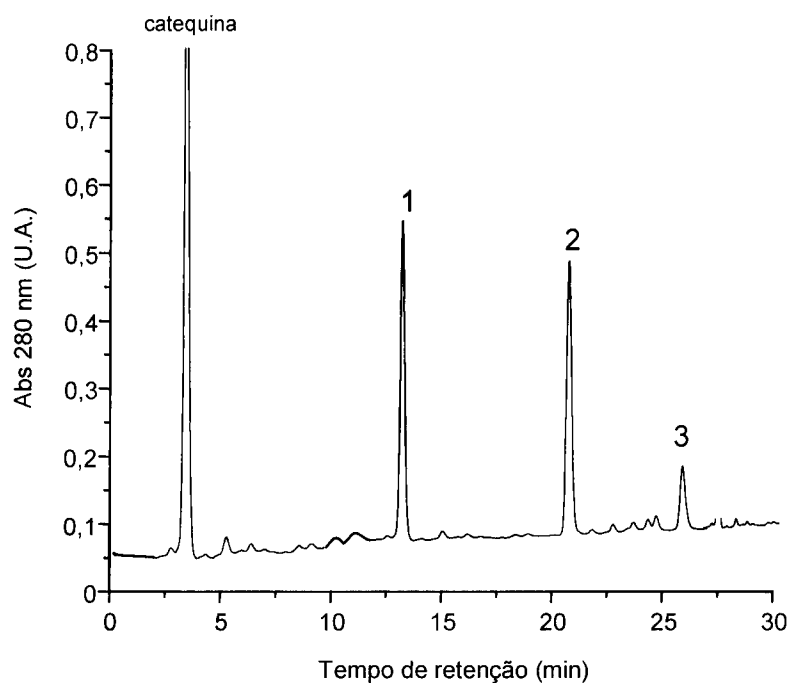


Figura 30: Cromatograma de HPLC a 280 nm da mistura reaccional de (+)-catequina e acetaldeído após 96 horas de reacção, numa solução água/etanol 12% (v/v), pH 2,5

O primeiro pico que surge no cromatograma é referente à catequina, sendo os restantes três picos (1, 2 e 3) de compostos resultantes da condensação da catequina mediada por acetaldeído. Atendendo à bibliografia citada o primeiro pico corresponde ao dímero catequina-8-etil-8-catequina e o segundo e terceiro picos correspondem aos dímeros catequina-8-etil-6-catequina (isómeros *R* e *S*) que diferem entre si no carbono quiral da ponte etilo (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Es-Safi *et al.*, 1996; Saucier, *et al.*, 1997). Efectivamente os três picos apresentam o mesmo espectro de massa e cujo ião molecular $[M]^+$ é 605 (figura 31).

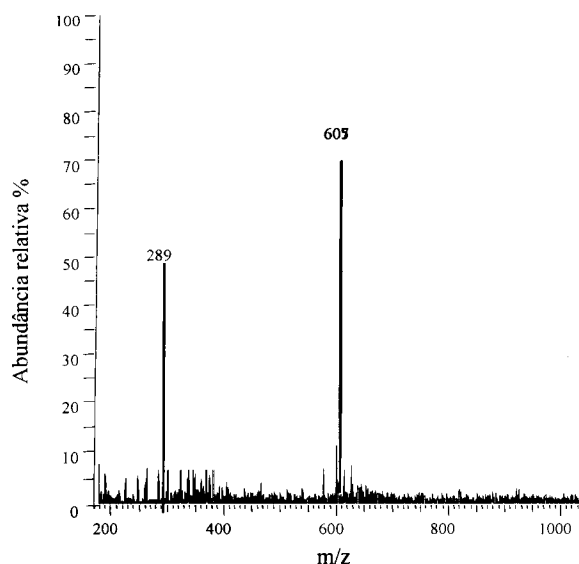


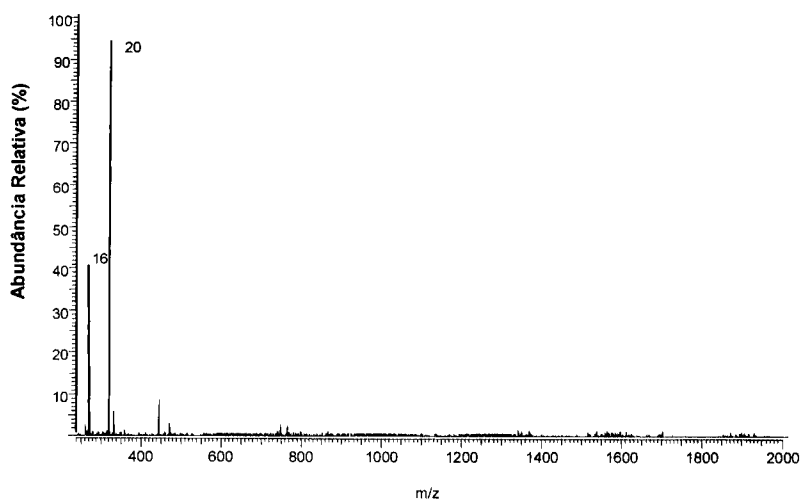
Figura 31: Espectro de massa dos picos cromatográficos (1), (2) e (3) da figura 30

Quanto às formas mais polimerizadas dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- poderiam corresponder aos picos minoritários presentes no cromatograma, ou serem eluídos na fase de lavagem da coluna de HPLC, na qual se observou o aparecimento de um pico muito largo e intenso. De facto, apenas foi possível observar picos cromatográficos bem definidos por HPLC para as fracções 1 e 2 resultantes do fraccionamento por cromatografia líquida de gel, correspondentes à catequina e dímeros etil-catequina. As seguintes fracções apresentaram cromatogramas bastante complexos com picos mal definidos (tipo “bossas”) que poderiam corresponder a estruturas mais polimerizadas.

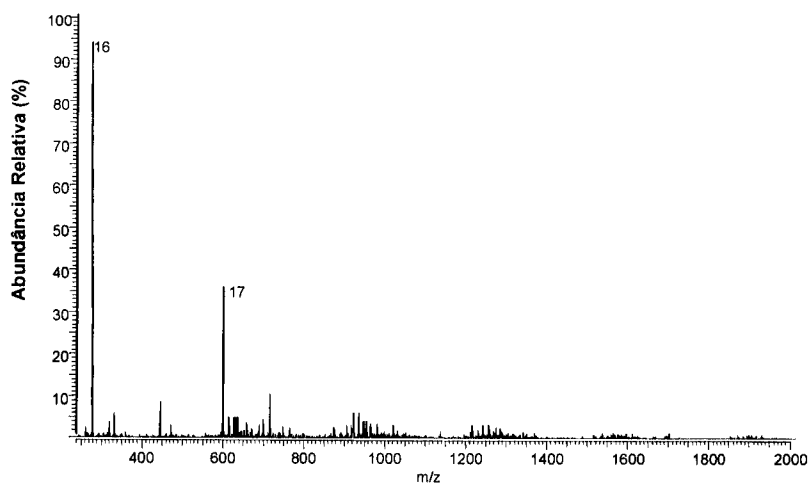
1.2.2. Análises estrutural por espectrometria de massa de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-

O fracionamento por cromatografia líquida (gel Toyopearl) usando metanol como eluente permitiu obter seis frações que foram analisadas directamente por espectrometria de massa. Os compostos foram identificados através dos respectivos espectros de massa (figura 32 e tabelas 8 e 9).

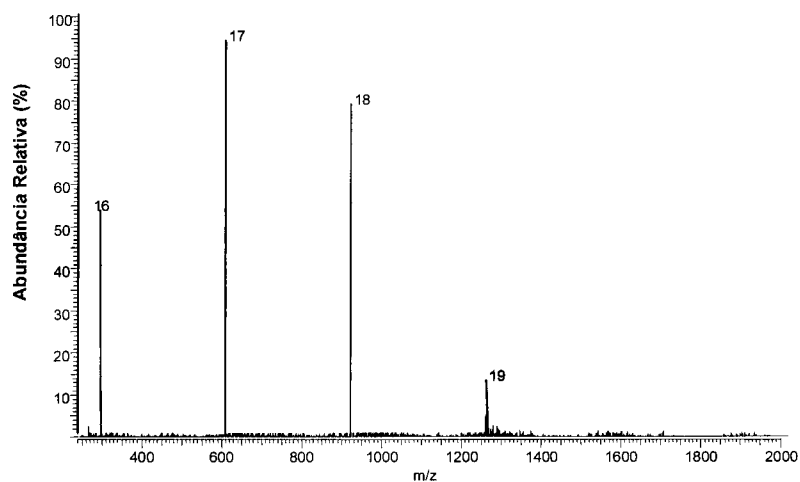
Fracção 1



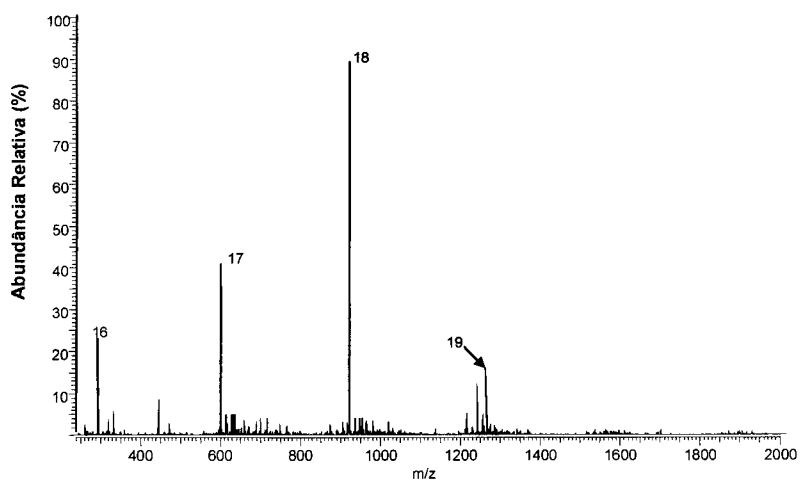
Fracção 2



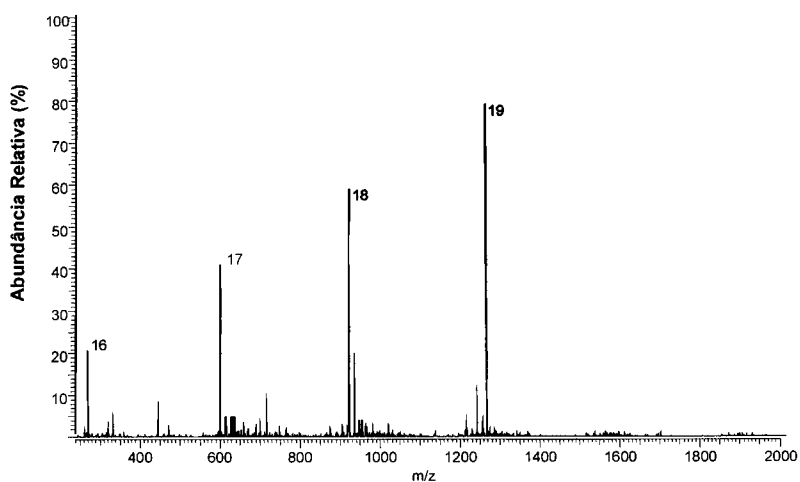
Fracção 3



Fracção 4



Fracção 5



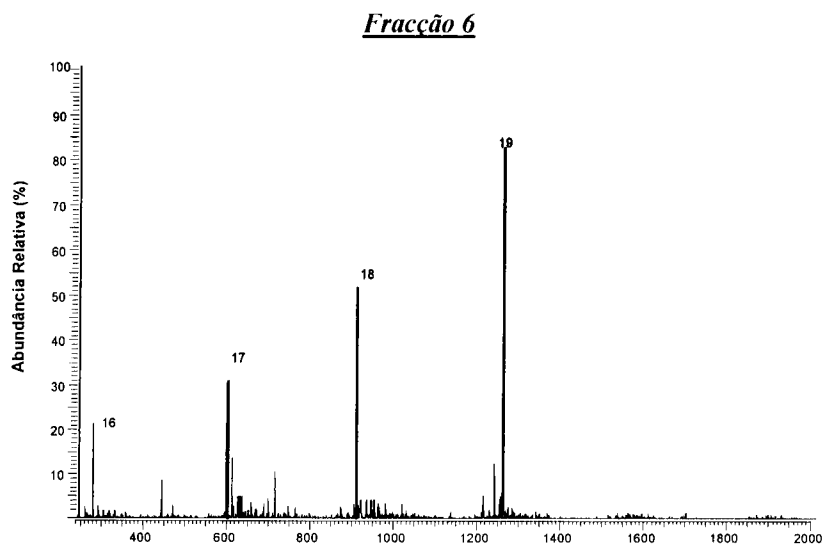


Figura 32: Espectros de massa das seis fracções obtidas a partir da reacção de polimerização da (+)-catequina mediada pelo acetaldeído, em meio ácido, e após fraccionamento por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW 40 (S).

Como podemos observar na figura 32 e tabela 8 não se observou a existência de picos importantes referentes a compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-superiores a tetrâmeros.

Tabela 8: Compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- identificados por espectrometria de massa das seis fracções obtidas por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW 40 (S)

Fracção	Pico (n°)	Massa molecular (m/z)	Compostos flavanólicos
1	16	289	catequina
	20	315	monómero com ponte etilo
2	16	289	catequina
	17	605	dímero com ponte etilo
	18	921	trímero com pontes etilo
3	16	289	catequina
	17	605	dímero com ponte etilo
	18	921	trímero com ponte etilo
	19	1237	tetrâmero com pontes etilo
4	16	289	catequina
	17	605	dímero com ponte etilo
	18	921	trímero com pontes etilo
	19	1237	tetrâmero com pontes etilo
5	16	289	catequina
	17	605	dímero com ponte etilo
	18	921	trímero com pontes etilo
	19	1237	tetrâmero com pontes etilo
6	16	289	catequina
	17	605	dímero com ponte etilo
	18	921	trímero com pontes etilo
	19	1237	tetrâmero com pontes etilo

Depois de identificados os compostos flavanóis, determinou-se a massa molecular média de cada fracção através das abundâncias relativas de cada pico presente no espectro de massa dessas fracções (tabela 9). Tal como se verificou com as procianidinas a massa molecular média aumenta com a ordem de eluição das fracções.

Tabela 9: Massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- presentes nas seis frações obtidas por cromatografia em coluna de gel Toyopearl HW 40 (S)

Fracção	Massa molecular (m/z)	% Abundância relativa*	Massa molecular média
1	289	30	307
	315	70	
2	289	54	516
	605	20	
	921	26	
3	289	22	671
	605	40	
	921	33	
	1237	5	
4	289	14	779
	605	24	
	921	55	
	1237	7	
5	289	10	912
	605	21	
	921	31	
	1237	38	
6	289	14	949
	605	18	
	921	29	
	1237	43	

* dos compostos identificados

2. Estudo da interacção entre proteína e taninos

A afinidade que os taninos têm para se ligarem a proteínas, formando agregados proteína-tanino foi estudada recorrendo à nefelometria em fluxo. Através deste método é possível medir a turvação da solução, provocada pelo aumento gradual de agregados como resultado da adição sucessiva de proteína (Chapon, 1993; de Freitas, 1995; de Freitas e Mateus, 2001; de Freitas *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004).

Para garantir que a intensidade de turvação da solução era proporcional à quantidade de agregados formados, foi necessário escolher as condições ideais em que os agregados eram de pequena dimensão e idênticos entre si. O meio não podia apresentar-se turvo nem com elevadas concentrações de partículas, pois haveria uma significativa absorção da luz incidente por parte das partículas. Nestas condições, os agregados formados teriam tendência para se agregarem precipitando, o que levaria à introdução de erros na medição da formação de agregados insolúveis entre proteínas e taninos (Chapon, 1993).

A concentração de taninos e proteínas foi por isso escolhida de modo a compreender valores de turvação entre 0 e 20 NTU (unidade de turbidez). Deste modo, pode desprezar-se a absorção da luz incidente das partículas e considerar que o índice de refração de partículas solvatadas era idêntico ao da solução, sendo o máximo de turbidez obtido proporcional à quantidade de agregados proteína-tanino formados, designando-o por Actividade Tanante Específica (ATE) (Chapon, 1993).

A ATE pode ser afectada por vários factores físico-químicos como a concentração de polifenóis e proteínas, a estrutura dos polifenóis, a presença de outras partículas em solução (*e.g.* carboidratos) e factores experimentais como o valor de pH e a força iónica (de Freitas e Mateus 2002; de Freitas *et al.*, 2003).

Pequenas variações no valor de pH poderão introduzir grandes diferenças na formação de agregados proteína-tanino e consequentemente na turbidez da solução. Estudos anteriores (Hagerman e Butler, 1978 e 1981; Asquith *et al.*, 1987; de Freitas e Mateus, 2001) mostraram que as procianidinas têm maiores afinidades para a proteína Albumina Sérica Bovina a pH 4,5. Foi seleccionado o pH de 5,0 para realizar todos os estudos de interacção entre polifenóis e proteínas, visto que a este valor de pH a proteína apresentar afinidade para com os taninos e, por outro lado, este valor não se afasta muito do valor do pH da saliva humana (entre 5,6 e 7,9).

Considerando que a adstringência resulta da formação de agregados entre proteínas e taninos, tal como foi anteriormente referido (Joslyn e Goldstein, 1964; Bate-Smith, 1973; Haslam e Lilley, 1988) a Actividade Tanante Específica (ATE), determinada por nefelometria em fluxo, poderá estar directamente relacionada com a adstringência de alimentos.

2.1. Influência da concentração de taninos e proteínas

2.1.1. Influência da concentração de proteínas

Partindo-se de uma solução de procianidinas oligoméricas (fracção V; 0,15 g/L) procurou-se avaliar a influência da concentração da proteína na formação de agregados proteína-tanino. Assim usaram-se duas soluções de gradiente crescente de BSA (11,0 g/L e 15,0 g/L) de forma a estabelecer uma relação entre a quantidade de proteína (BSA) adicionada e a quantidade de agregados proteína-tanino definido pela ATE.

Os gráficos da figura 33 ilustram a influência da concentração de BSA na quantidade de agregados proteína-tanino formados (expresso em unidades de turbidez – NTU).

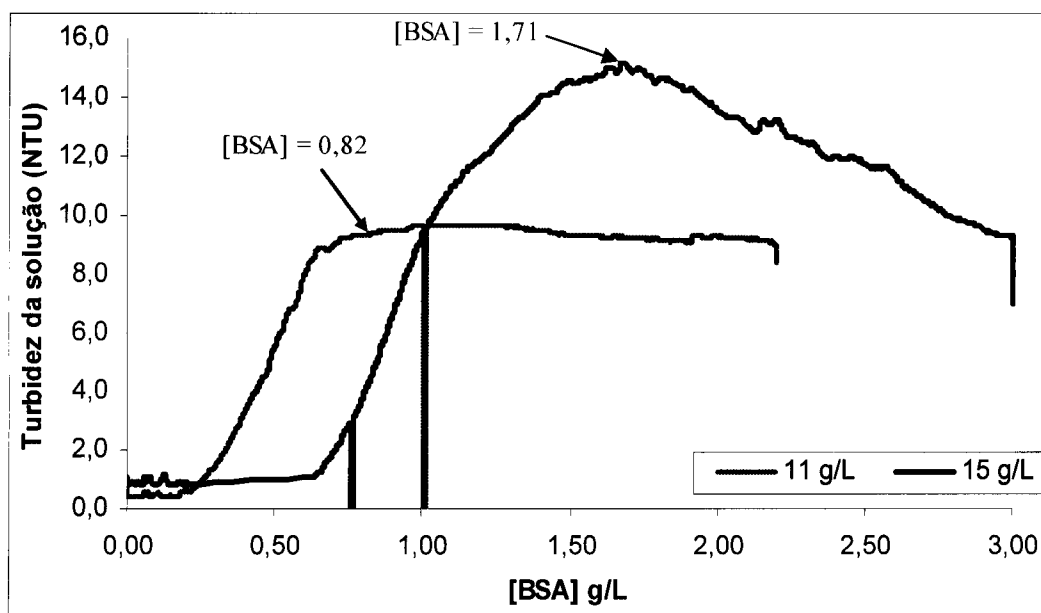


Figura 33: Formação de agregados tanino-proteína (BSA) em função do aumento da concentração de proteína, partindo-se de duas concentrações diferentes de proteína (11 e 15 g/L; fluxo 0,5 ml/min), obtidos por nefelometria em fluxo. A solução de taninos (0,15 g/L; fluxo 2,0 ml/min) corresponde a procianidinas oligoméricas com massa molecular média de 2052 g/mol (fracção V).

Independentemente da concentração da solução de proteína (11 ou 15g/L) verifica-se um aumento da formação de agregados proteína-tanino com a adição da proteína, até um valor máximo, que foi definido como a Actividade Tanante Específica (ATE) e que deverá corresponder às quantidades estequiométricas de taninos e proteínas no complexo. A partir deste ponto, atendendo à concentração de BSA presente, dois fenómenos podem ocorrer: o valor máximo permanece praticamente constante (concentração inicial de BSA mais baixa, 11g/L), apesar de continuar a ser adicionada proteína em excesso; ou verifica-se uma diminuição na formação de agregados (concentração inicial de BSA mais elevada, 15 g/L) devido

à ocorrência da re-solubilização dos agregados, o que já foi referido por outros autores (Haslam e Lilley, 1988; Luck *et al.*, 1994; Siebert *et al.*, 1996; Siebert, 1999; de Freitas *et al.*, 2003). A explicação para a re-solubilização está relacionada com a reversibilidade da formação de agregados proteína-tanino como resultado da alteração da estequiométrica do complexo formado, provocadas por mudanças no rácio proteína-polifenol em solução e que se observa para grandes excessos de proteína (de Freitas *et al.*, 2003).

Como já referido, é possível estimar a estequiométrica dos complexos a partir da concentração relativa de tanino e BSA para o valor máximo de formação de agregados proteína-tanino.

O valor máximo de agregados proteína-tanino é obtido quando a concentração de tanino (da fracção V, massa molecular de 2052 g/mol) é 4,7 vezes maior do que a de BSA (11 g/L), o que corresponde a um rácio molar BSA-tanino de cerca 1:5. A concentração de tanino passa a ser apenas de 2,3 vezes maior do que a proteína no caso do ensaio de 15 g/L de BSA, o que corresponde a um rácio molar BSA-tanino de 1:2, para os mesmos taninos e a pH 5,0. Segundo um estudo semelhante, realizado para complexos constituídos por procianidinas diméricas B₁ (massa molecular 578 g/mol) e a BSA, o rácio molar BSA-tanino obtido foi de 1:20 a pH 4,9 (Hagerman *et al.*, 1998). Outro estudo realizado com complexos de polifenóis (peso molecular de 1002 g/mol) e BSA apresentou um rácio de BSA-tanino de 1:7 a pH 5,0 (de Freitas *et al.*, 2003). Atendendo ao facto dos taninos utilizados neste trabalho apresentarem um peso molecular superior (duas a quatro vezes) dos trabalhos citados na literatura o rácio molar proteína-tanino obtido (1:5) parece estar de acordo com os valores da literatura.

2.1.2. Influência da concentração de taninos

À semelhança do que acontece com a concentração das proteínas, também a concentração de polifenóis influencia a formação de agregados proteína-tanino. De facto, para a fracção III (massa molecular média de 949 g/mol) verificou-se que a quantidade máxima de agregados aumenta com o aumento da concentração de procianidinas (figura 34). Uma explicação possível prende-se com o modelo descrito na literatura (Siebert, 1996; Siebert *et al.*, 1999), que refere que à medida que aumenta a concentração em taninos, diminuem as interações do tipo ligações cruzadas entre estes e as proteínas, agrupando-se os taninos à volta das proteínas formando uma monocamada que origina um complexo menos hidrofílico do que a proteína, acabando por precipitar. Esta alteração das características de solubilidade dos complexos são mais importantes para proteínas globulares, como a BSA (de Freitas e Mateus, 2001).

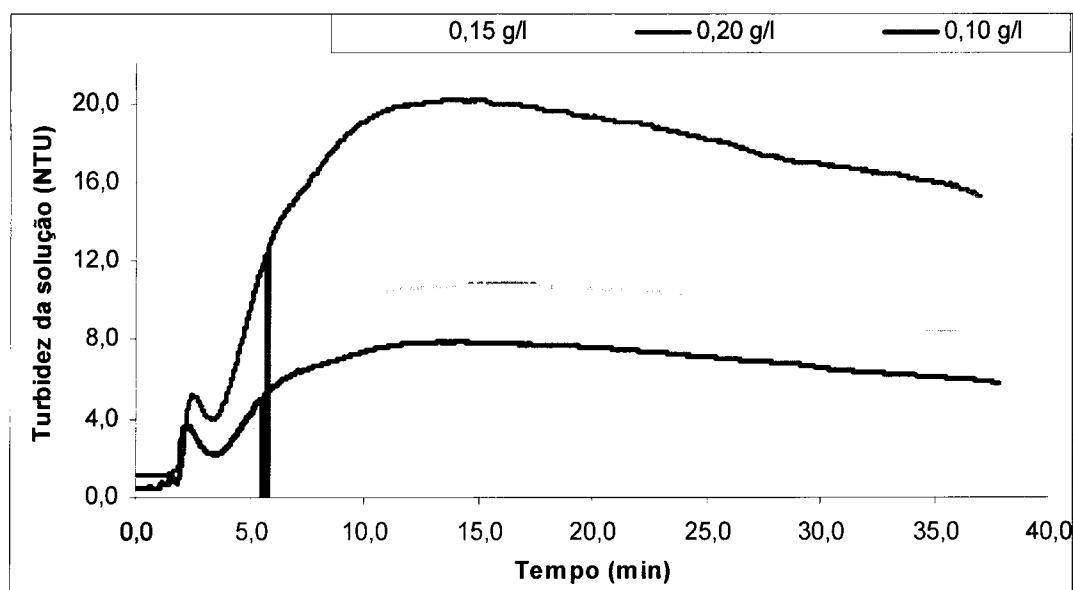


Figura 34: Formação de agregados BSA-tanino em função do tempo (gradiente crescente de proteína (11 g/L; 0,5 ml/min)), partindo-se de três concentrações diferentes de tanino (0,10; 0,15 e 0,20 g/L; 2,0 ml/min), obtidos por nefelometria em fluxo. As soluções de taninos correspondem a procianidinas oligoméricas com massa molecular média de 949 g/mol (fracção III).

2.2- Influência da estrutura dos taninos

2.2.1- Influência da massa molecular média das procianidinas na ATE

Para averiguar o efeito da massa molecular média dos taninos na formação de agregados proteína-tanino, determinou-se a ATE para cinco fracções de procianidinas oligoméricas com diferentes massa moleculares médias dividindo a turvação máxima pela concentração em taninos.

Através da observação da tabela 10 verifica-se que a ATE aumenta com a massa molecular média das procianidinas. Estes resultados estão de acordo com o que está descrito na literatura e que refere que as ligações proteína-tanino mais estáveis se estabelecem para procianidinas, cuja massa molecular se situa entre 500 e 3000 Da (Haslam, 1979; Okuda *et al.*, 1985; de Freitas, 1995; de Freitas e Mateus, 2001).

Tabela 10: Actividade tanante específica de cinco fracções com diferentes massa moleculares médias

Fracção	Massa molecular média (g.mol ⁻¹)	NTU máximo obtido	ATE (NTU/mol . dm ³ _{tanino})
I	513	9,6 ± 0,9	4,9 ± 0,4
II	823	14,4 ± 0,8	11,8 ± 0,6
III	949	17,3 ± 1,6	16 ± 1
IV	1513	19,2 ± 2,0	28 ± 3
V	2052	21,6 ± 1,5	44 ± 3

Os polifenóis de menor peso molecular poderão ser demasiado pequenos para poderem formar ligações cruzadas com as proteínas. De facto, os compostos polifenólicos devem apresentar um tamanho que lhes permita formarem uma ligação com um ou mais sítios da superfície da proteína, actuando como ligandos polidentados (Gustavson, 1956; Haslam, 1974; Oh *et al.*, 1980). Compostos com maior massa molecular são constituídos por mais unidades monoméricas, logo apresentam um número superior de grupos OH, podendo estabelecer por isso, mais ligações por pontes de hidrogénio. Por outro lado, os polifenóis mais polimerizados apresentam mais anéis aromáticos aptos para efectuarem mais interacções hidrofóbicas com as proteínas e nomeadamente com a prolina (ver introdução, parte 6.3.2.).

Embora não se tenha verificado neste estudo, na literatura está descrito que as procianidinas muito polimerizadas (superiores a 3400 Da) têm dificuldades em se ligarem à proteína, como a BSA, devido a impedimentos estereoquímicos, limitando o acesso dos polifenóis aos sítios activos proteicos, impedindo a formação de agregados proteína-tanino (Goldstein e Swain, 1963; de Freitas e Mateus, 2001). Além do peso molecular, também a mobilidade conformacional e a flexibilidade diminuem com o aumento da estrutura molecular das procianidinas (Goldstein e Swain, 1963; Lea, 1992).

2.2.2 – Influência massa molecular média de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-

A presença de pontes etilo entre unidades de flavanóis altera a reactividade dos compostos na formação complexos proteína-tanino. Para investigar esta influência procedeu-se à determinação da Actividade Tanante Especifica de seis fracções com diferentes massas moleculares médias, resultantes da condensação da (+)-catequina mediado pelo acetaldeído.

Tabela 11: Actividade tanante específica de seis fracções de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- com diferentes massa moleculares médias

Fracção	Massa molecular média (g.mol ⁻¹)	NTU máximo obtido	ATE (NTU/mol. dm ³ _{tanino})
1	307	1,1 ± 0,2	0,34 ± 0,01
2	516	2,4 ± 0,3	1,24 ± 0,01
3	671	5,8 ± 0,9	3,9 ± 0,6
4	779	6,5 ± 1,1	5,1 ± 0,6
5	912	8,6 ± 1,1	7,8 ± 0,9
6	949	9,8 ± 0,9	9,6 ± 0,9

Verificou-se que a Actividade Tanante Específica dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- aumenta com a massa molecular média. Este comportamento é semelhante ao verificado com as procianidinas oligoméricas (2.2.1).

Comparando os valores de ATE destes compostos com o das procianidinas, com massa moleculares semelhantes, verifica-se que a presença de pontes etilo entre unidades flavonóides diminui a Actividade Tanante Específica. Por exemplo, a fracção 6 dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- apresenta uma massa molecular média semelhante à da fracção III das procianidinas, sendo a ATE de 9,6 e 16,4 NTU/mol.dm³_{tanino} respectivamente (cerca de metade). Este resultado parece indicar que a presença das pontes etilo afecta as interacções entre flavanóis e proteínas. A explicação para este comportamento baseia-se no tipo de ligação interflavanoide estabelecida na formação destes polímeros. No caso de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- a ligação entre as catequinas faz-se entre o

carbonos 8 de uma unidade com o carbono 6 ou o carbono 8 da unidade seguinte, através de uma ponte etilo, enquanto que nas procianidinas estas ligações entre as catequinas é directa e é conseguida à custa do carbono 4 de uma catequina com o carbono 6 ou o carbono 8 da catequina seguinte. O tipo de ligação intramolecular poderá alterar o carácter hidrofóbico da molécula e consequentemente a reactividade dos taninos para interagir com as proteínas. Os compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- são moléculas mais hidrofóbicas do que as procianidinas devido aos grupos etilo presentes entre as unidades de catequina. Por outro lado, estes compostos poderão adoptar outro tipo de conformação em solução devido a maior flexibilidade da ligação por ponte etilo, comparativamente à ligação interflavanóica C4-C8 e C4-C6 das procianidinas.

Uma vez que a ATE dos taninos poderá está relacionada com a adstringência de alimentos e bebidas, os taninos com menor tendência para formar agregados proteína-tanino serão, provavelmente menos adstringentes. Segundo um estudo organoléptico realizado por Vidal (2003) os taninos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- são menos adstringentes do que os taninos condensados. Por esta razão, durante o envelhecimento do vinho podem ocorrer reacções de condensação e polimerização de flavanóis mediados por aldeídos, o que poderá levar a alterações de adstringência.

2.3 - Influência dos carboidratos na complexação entre polifenóis e proteínas

A presença de alguns compostos em solução, como é o caso de carboidratos, influencia a formação de agregados entre taninos e proteínas. Dependendo da concentração, reactividade e afinidade do carboidrato para o tanino, a complexação de polifenóis e proteínas pode ser inibida. Neste trabalho estudou-se, por nefelometria em fluxo, a influência de três carboidratos (xantana, goma-arábica e pectina) na formação de complexos entre a BSA e dois tipos de flavonoides: as procianidinas oligoméricas e compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- .

O gráfico da figura 35 traduz a evolução da formação de agregados entre procianidinas e a BSA para concentrações crescentes de um carboidrato (goma-arábica).

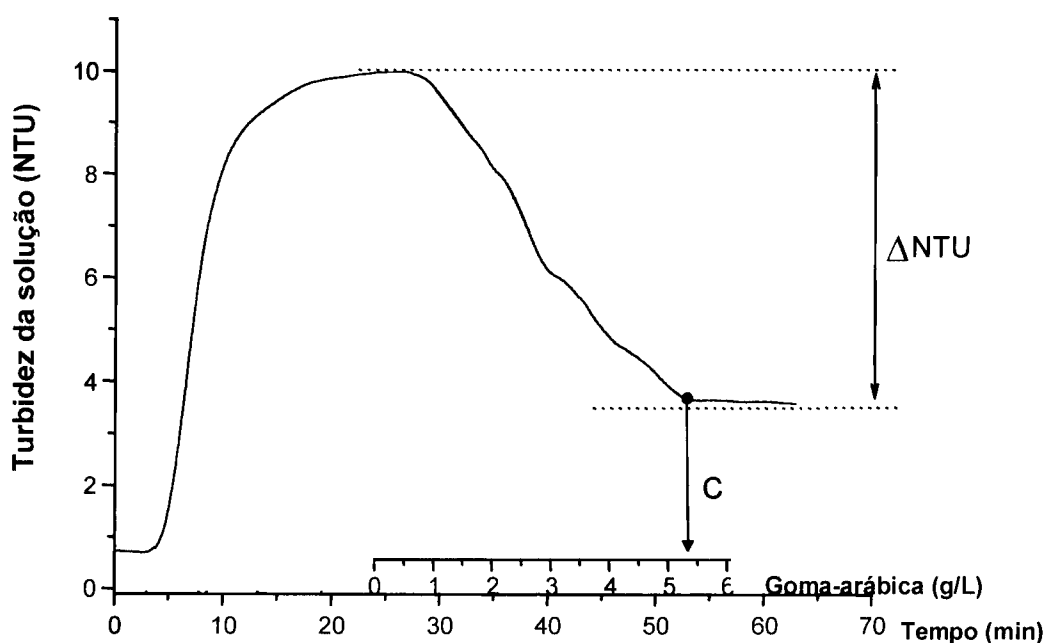


Figura 35: Efeito inibidor da goma-arábica na formação de agregados entre taninos (fracção III de procianidinas oligoméricas; 0,15 g/L) e a proteína BSA (0,82 g/L).

Durante os primeiros vinte minutos ocorre a estabilização da formação de agregados BSA-tanino para as quantidades estequiométricas determinadas anteriormente. A partir deste momento forma-se um gradiente crescente de carboidrato, resultando na diminuição da turvação da solução, o que corresponde a uma diminuição da formação de agregados proteína-tanino.

Para concentrações constantes de carboidrato (fase final) o valor de turbidez mantém-se praticamente constante.

A quantidade de agregados em solução diminui com a adição de carboidrato de uma forma linear, o que permite calcular uma constante de inibição de agregação (K_{AI}). Esta constante obtêm-se dividindo a diferença entre a turvação inicial e a turvação final, ΔNTU , pela concentração de carboidrato usada, (C).

A inibição de formação de complexos proteína-tanino pelos carboidratos pode ocorrer devido à competição entre o carboidrato e a proteína para se ligarem ao tanino, estabelecendo-se preferencialmente a ligação carboidrato-tanino (ver o esquema da figura 22 da introdução). Por outro lado, podem-se formar complexos ternários carboidrato-proteína-tanino solúveis em meio aquoso devido ao carácter hidrofílico do carboidrato.

Através da nefelometria em fluxo conseguiu-se avaliar de forma continua a inibição de agregação de vários carboidratos (xantana, goma-arábica e pectina) na formação de agregados proteína-tanino de forma rápida e reprodutível, o que é um avanço relativamente a outras técnicas descritas na literatura. A nefelometria em batch foi a técnica precursora da nefelometria em fluxo, no entanto era muito morosa, quer na fase experimental quer na fase de tratamento de resultados e menos versátil. De facto, esta técnica permite variar as concentrações relativas das três espécies intervenientes (tanino, proteína e carboidrato) alterando apenas os respectivos fluxos, sem ter necessidade de recorrer a diluições das amostras.

2.3.1- Influência de diferentes carboidratos na formação de agregados proteína-procianidinas (fracção IV)

Determinaram-se as constantes de inibição de agregação (K_{AI}) (tabela 12) da xantana, goma-arábica e pectina na formação de agregados entre a proteína BSA e procianidinas oligoméricas (fracção IV, 0,15 g/L).

Tabela 12: Constantes de inibição de agregação dos diferentes carboidratos para a fracção IV de procianidinas oligoméricas (0,15 g/L; 2,0ml.min⁻¹) com BSA (0,82 g/L; 0,5ml.min⁻¹) determinados por nefelometria em fluxo.

Carboidrato	K_{AI} (NTU/ g.L ⁻¹)
Xantana	74 ± 2
Pectina	36 ± 3
Goma-arábica	2,0 ± 0,4

A xantana demonstrou ser o carboidrato mais eficiente na inibição da formação de agregados proteína-tanino. Este resultado está de acordo com estudos usando a nefelometria em “batch” descritos na literatura que revelaram que a xantana é mais eficiente na inibição da formação de agregados entre a BSA e procianidinas, do que os outros dois carboidratos (pectina e goma-arábica) (de Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2003). Os diferentes valores de K_{AI} apresentados pelos três carboidratos podem ser explicadas atendendo à estrutura, características e propriedades físico-químicas de cada carboidrato.

A xantana é um polieletrólito aniónico que apresenta características de um gel, formando uma rede polimérica em solução (ver figura 26 da introdução), por associação lateral de sequências de cadeias ordenadas capaz de reter pequenas partículas em suspensão (Norton *et al.*, 1984; Ozama *et al.*, 1987; Haslam, 1998). Provavelmente a inibição de agregação entre proteína e taninos pela xantana deve-se à sua capacidade para encapsular nos poros do gel partículas pequenas como os polifenóis, impedindo-os de interagir com as proteínas. Por outro lado, a xantana poderá encapsular pequenos agregados BSA-procianidinas, na rede polimérica, prevenindo a formação de grandes agregados que aumentariam consideravelmente o valor de turvação da solução.

A pectina é um carboidrato iónico constituído por unidades de ácido α -D-galacturónico, com os grupos carboxílicos parcialmente esterificados com metanol. A pectina tem a capacidade de formar um gel, semelhante ao da xantana, que promove o encapsulamento de pequenas partículas, como os polifenóis ou pequenos agregados proteína-tanino. A esterificação reduz a polaridade da molécula e consequentemente as interações hidrofílicas, o que poderá explicar o facto deste carboidrato ser menos eficaz na inibição de formação de agregados proteína-tanino comparativamente ao xantana.

A goma-arábica foi o carboidrato que apresentou a menor capacidade de inibir a formação de agregados proteína-tanino. A concentração de goma-arábica necessária para observar inibição na formação de agregados é cerca de dez vezes maior do que a necessária para a pectina e cerca de duzentas vezes maior do que a da xantana. Isto pode estar relacionado com o facto da goma-arábica apresentar uma estrutura molecular muito ramificada o que a impede de interagir com os taninos e inibir a formação de agregados proteína-tanino. Por outro lado, a goma-arábica apresenta um carácter iónico menor do que os outros dois carboidratos estudados. De facto, apesar de apresentar moléculas de ácido galacturónico, a sua estrutura é constituída por arabinogalactanas, o que a torna uma molécula menos ácida. Além disso, a goma-arábica contrariamente aos outros dois carboidratos não têm tendência a formar géis capazes de encapsular pequenas partículas.

2.4. Influência da estrutura dos taninos na constante de inibição de agregação BSA-tanino pela xantana.

2.4.1. Influência da massa molecular média das procianidinas

Para compreender de que forma a massa molecular média das procianidinas alteram o desempenho dos carboidratos na inibição da formação de agregados BSA-tanino realizaram-se vários estudos com a xantana e as cinco fracções de procianidinas oligoméricas com diferentes massas moleculares médias identificadas no ponto 1.1. Através dos valores obtidos de constante de inibição de agregação (K_{AI}) da xantana (tabela 13) verificou-se que a inibição da formação de agregados diminuiu com o aumento da massa molecular média das procianidinas, o que vai de encontro ao descrito na literatura (Mateus *et al.*, 2003). A explicação para este comportamento poderá estar relacionada com a capacidade da xantana formar em solução uma rede polimérica em que o tamanho dos poros é de dimensões semelhantes à dos polifenóis e/ou complexos proteína-tanino mais pequenos, sendo por isso, mais facilmente encapsulados deixando de estar disponíveis para complexar com a proteína (BSA). As estruturas de taninos maiores terão mais dificuldade de ser encapsuladas pelo xantana.

Tabela 13: Constante de inibição de agregação (K_{AI}) da xantana para as cinco fracções de procianidinas oligoméricas (0,15 g/L; 2,0ml.min⁻¹) com BSA (0,82 g/L; 0,5ml.min⁻¹), determinada por nefelometria em fluxo.

Fracção	K_{AI} (NTU/g.L ⁻¹)
I	120 ± 6
II	116 ± 5
III	109 ± 4
IV	74 ± 2
V	63 ± 3

2.4.2. Influência da massa molecular média dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-

À semelhança do estudo que se efectuou para as procianidinas oligoméricas determinaram-se as constantes de inibição de agregação da xantana na formação de agregados de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- com a BSA (tabela 14).

Tabela 14: Constante de inibição de agregação (K_{AI}) da xantana para as seis fracções de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- (0,15 g/L; 2,0 ml.min⁻¹) com BSA (0,82 g/L; 0,5 ml.min⁻¹), determinadas por nefelometria em fluxo

Fracção	K_{AI} (NTU/g.L ⁻¹)
1	n.d.
2	80 ± 5
3	66 ± 3
4	49 ± 4
5	24 ± 2
6	11 ± 4

n.d.- não determinado

Os compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- com estruturas mais complexas apresentam valores inferiores de inibição de agregação por parte da xantana do que polímeros com estruturas mais simples, tal como se verificou para as procianidinas oligoméricas. O que indica que a xantana inibe a formação de agregados BSA-tanino, provavelmente por reter os taninos menos polimerizados ou os agregados BSA-tanino mais pequenos.

Comparando as constantes de inibição de agregação por parte da xantana para os dois tipos flavanóis estudados, procianidinas oligoméricas e compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n-, verifica-se que apresentam valores distintos. Os compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- apresentam valores de K_{AI} menores do que as procianidinas oligoméricas com a mesma massa molecular média. Por exemplo a fracção 6 de compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- apresenta a mesma massa molecular do que a fracção III das procianidinas, sendo a constante de inibição de agregação cerca de dez vezes inferior. Conclui-se, deste modo, que a presença de pontes etilo entre as unidades monoméricas diminuiu a eficiência da xantana na inibição da formação de agregados BSA-tanino. Importa referir que os compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- são provavelmente mais hidrofóbicas do que procianidinas devido à presença de grupo etilo, o que poderia facilitar a sua inclusão nos poros da xantana, comparativamente com as procianidinas, o que não se verificou. A presença de pontes etilo interflavanóides nos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- torna, por um lado, as estruturas maiores do que as procianidinas com a mesma massa molecular média, e por outro lado, estes compostos poderão adoptar outro tipo de conformação em solução devido a maior flexibilidade da ligação por ponte etilo, comparativamente à ligação interflavanóica C4-C8 e C4-C6 das procianidinas. Ambas as situações poderão dificultar o encapsulamento deste tipo de compostos, devido a impedimentos estereoquímicos, comparativamente às procianidinas com a mesma massa molecular média.

3. Estudo das Actividades Tanantes Específicas de vinho branco

Esta parte do trabalho tem como objectivo desenvolver um método como a nefelometria em fluxo para estudar as interacções entre taninos de vinho branco e proteínas.

3.1. Estudo preliminar das condições de análise de vinhos brancos

Foi seleccionado um vinho branco Alentejano (B) para estudar as condições experimentais a aplicar na determinação da actividade tanante específica de vinhos brancos. A tabela 15 faz referência às condições experimentais testadas e aos valores de turvação obtidos.

Tabela 15: Estudo das condições experimentais e valores de turvação obtidos para um vinho branco (B) por nefelometria em fluxo.

Variáveis	TESTE			
	i	ii	iii	iv
Concentração inicial da solução de BSA (g/L)	11	5	5	5
Fluxo do vinho branco (ml/min)	2.0	2.5	2.0	1.5
NTU máximo obtido	75 ± 9	31 ± 6	18 ± 4	10 ± 3

Foram seleccionadas as condições do teste IV, concentração inicial de BSA de 5 g/L e um fluxo de vinho branco de 1,5 ml/min. O valor de turvação obtido (10 NTU) pretende assegurar que nestas condições a intensidade de turvação da solução é proporcional à quantidade de agregados formados e que os agregados são de pequena dimensão e idênticos entre si, podendo desprezar-se a absorção da luz incidente das partículas.

3.2. Estudo da reactividade entre a BSA e taninos de vinhos brancos

Na tabela 16 estão representados os valores de Actividade Tanante Específica (ATE) dos dez vinhos identificados na tabela 4 (parte experimental).

A ATE do vinho branco foi determinada dividindo o valor máximo de turvação pelo volume de vinho em cada minuto, considerando o fluxo de 1,5 ml/min.

Tabela 16: Actividade tanante específica (ATE) de vinhos brancos portugueses comerciais determinado por nefelometria em fluxo. Letras diferentes na coluna das ATE indicam variâncias significativamente diferentes para ($p < 0,05$)

Vinho	NTU _{máximo obtido}	ATE (NTU. ml vinho ⁻¹)
A	11,7 ± 0,9	7,8 ± 0,4 ^a
B	10,8 ± 0,6	7,1 ± 0,3 ^{a, b}
C	10,0 ± 0,8	6,6 ± 0,2 ^{b, c}
D	9,0 ± 0,9	6,0 ± 0,4 ^c
E	4,9 ± 0,3	3,4 ± 0,4 ^d
F	2,3 ± 0,5	1,6 ± 0,1 ^e
G	2,0 ± 0,5	1,3 ± 0,2 ^e
H	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2 ^e
I	1,7 ± 0,3	1,1 ± 0,3 ^e
J	1,6 ± 0,4	1,1 ± 0,2 ^e

Este método revelou ser bastante discriminativo na avaliação dos vinhos, visto que foram encontrados valores de ATE estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (tabela 16), numa escala que se pode considerar alargada e que foi estabelecida com base nas limitações físicas do método, como se referiu no ponto 3.1. Além disso, o método é bastante versátil, uma vez que, permite variar a quantidade de vinho que entra em contacto com as proteínas, bastando para isso alterar o fluxo de vinho na bomba peristáltica. Esta técnica permite considerar as características coloidais dos taninos no vinho visto não ser necessário proceder a diluições prévias, o que não acontecia para outros métodos descritos na literatura.

Os vinhos de F a J apresentaram valores de actividade tanante específica, estatisticamente iguais para $p < 0,05$, no entanto são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) dos restantes vinho (A a E). Uma vez que, a ATE está relacionado com a quantidade e disponibilidade de taninos presentes para formar agregados insolúveis com proteínas, pode-se afirmar que, provavelmente, os vinhos brancos com quantidades superiores de taninos são, os que apresentaram valores superiores de ATE, ou seja os vinhos brancos de A a E.

Considerando que a adstringência resulta da interacção entre proteínas salivares e taninos dos vinhos, dando origem à formação de agregados proteína-tanino, a ATE poderá estar directamente relacionada com o sabor do vinho. No entanto, esta análise carece de um estudo comparativo entre os valores de ATE e as características sensoriais do vinho determinado por um painel de provadores

CONCLUSÕES



Neste trabalho, foram estudados por nefelometria em fluxo alguns dos factores que influenciam a formação de agregados proteína-tanino, tais como a concentração de taninos e proteínas, a massa molecular dos taninos, a presença de pontes etilo entre unidades monoméricas das catequinas e a presença de carboidratos. Verificou-se que a Actividade Tanante Específica (ATE) aumenta com a concentração de taninos e com a concentração de proteína. No entanto, a partir de determinado valor de concentração de BSA pode ocorrer a re-solubilização dos agregados proteína-tanino devido a alterações na estequiometria do complexo BSA-tanino formado, provocadas por mudanças no rácio proteína-polifenol em solução. Demonstrou-se que a estequiometria do complexo BSA-tanino é de 1:5, para taninos condensados com a massa molecular de 2052 g/mol.

A estrutura dos taninos revelou ser um factor importante que influencia a formação de agregados proteína-tanino. A ATE aumenta com o aumento da massa molecular média das procianidinas e dos compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n. No entanto, verificou-se que a presença de pontes etilo entre unidades dos flavanóis diminui a ATE quando comparada com procianidinas com o mesma massa molecular média. Assim, a polimerização dos flavonóis mediados por acetaldeído (proveniente da oxidação do etanol) que ocorre nos vinhos poderá traduzir-se num aumento da adstringência numa fase inicial do seu envelhecimento, sendo no entanto, a sua contribuição inferior à das procianidinas com o mesmo peso molecular. Por outro lado, a contínua polimerização dos flavanóis resultará, provavelmente, em compostos do tipo catequina-(etil-catequina)_n- muito polimerizados, levando à sua precipitação. Deste modo poderá explicar-se a diminuição parcial da adstringência que ocorre ao longo do envelhecimento dos vinhos.

As alterações de adstringência nos frutos que ocorrerem durante o seu amadurecimento é, em parte, explicada através da libertação de pequenos fragmentos de pectina, das paredes celulares, que vão afectar a interacção entre os polifenóis e as proteínas salivares. Neste trabalho foi estudado a influência de alguns carboidratos (pectina, xantana e goma-arábica) na ATE de taninos por

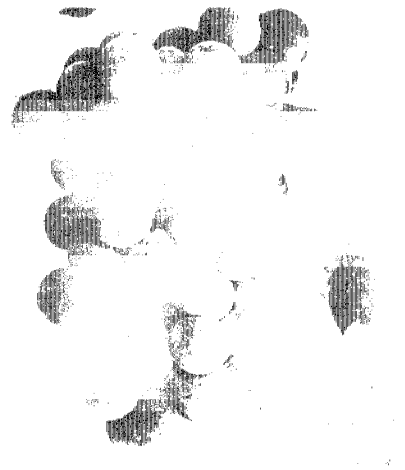
nefelometria em fluxo. Verificou-se que os carboidratos inibem a formação de agregados BSA-tanino, sendo a xantana o carboidrato mais eficiente nesta inibição, provavelmente devido à sua capacidade em formar um gel em solução com poros capazes de encapsularem pequenas partículas como os polifenóis ou pequenos agregados proteína-tanino. A goma-arábica revelou ser o carboidrato menos eficiente na inibição da formação dos agregados, provavelmente devido a estrutura ramificada que esta molécula apresenta. A pectina apresentou um valor de constante de inibição de agregação intermédio entre a xantana e a goma-arábica.

A Nefelometria em Fluxo mostrou ser uma técnica versátil que permite modificar rapidamente a concentração dos vários intervenientes através da alteração dos respectivos fluxos e introduzir novos componentes no sistema, por exemplo carboidratos. A nefelometria em fluxo permite considerar as características coloidais dos polifenóis em solução, já que não são necessárias diluições prévias das amostras.

Esta técnica foi adaptada de forma a permitir a determinação da ATE de vinhos brancos. Foram estudados dez vinhos brancos provenientes de diferentes regiões demarcadas portuguesas. Verificou-se que os resultados obtidos para a ATE são estatisticamente diferentes entre si com $p < 0,05$. Será de esperar uma correlação entre a ATE e a adstringência dos vinhos brancos. No entanto, esta correlação requer uma comparação entre os valores deste parâmetro analítico e a análise sensorial dos mesmos, o que poderá ser realizado em trabalhos futuros.

Futuramente pretende-se também estudar a formação de agregados entre polifenóis do tipo catequina-(etil-catequina)_n- com outras proteínas (proteínas salivares e proteínas ricas em prolina). Por outro lado, pretende-se estudar outros tipos de polifenóis presentes noutros alimentos (frutos, chocolate) e bebidas (chá, sumos de frutas, entre outras).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Aiken, J. W.; Noble, A. C. Composition and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine aged in French versus American oak barrels. *Vitis* 23 (1984) 27-36.

Asano, K.; Chinagawa, K.; Hashimoto, N. Characterisation of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry* 40 (1982) 147-154.

Aspinall, G. O. Pectins, gums and other plant polysaccharides. In: *The Carbohydrate – Chemistry and Biochemistry* 2, Pigman, W.; Horton, D.; Herp, A. Eds., 516 Academic Press, London (1970).

Asquith, T. N.; Uhlig, J.; Mehansho, H.; Putman, L.; Carlson, D. M.; Butler, L. Binding of condensed tannins to salivary praline-rich glycoproteins: the role of carbohydrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35 (1987) 331-334.

Bakke, J.; Picinelli, A.; Bridle, P. Model wine solutions: colour and composition changes during ageing. *Vitis* 32 (1993) 111-118.

Bate-Smith, E. C. Astringency in foods. *Food* 23 (1954) 124.

Bate-Smith, E.C.; Ribéreau-Gayon, P. *Qualitative Plant* 5 (1959) 189.

Bath-Smith, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12 (1973) 907-912.

Bath-Smith, E. C.; Swain, T. Comparative *Biochemistry* 3, Mason, H. S.; Florkin, A. M., Eds., Academic Press, New York (1962) 764.

Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline rich protein. Repeat results in complexation and precipitation. *Biochemistry* 36 (1997) 5566-5577.

Beart, J. E.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Plant polyphenols – secondary metabolism and chemical defence: some observations. *Phytochemistry* 24 (1985) 33-38.

Bender, M. L.; Komiyama, K. Cyclodextrin Chemistry Reactivity and Structure Concepts. In : *Organic Chemistry* 6. Springer, Berlin (1978).

Bourzeix, J. C.; Banquet, J. B.; Lesèvre, N. Potentiels évoqués et états de vigilance induits au cours d'épreuves de temps de réaction de choix. *Electroencéphalographie Neuropsychical* 9 (1979) 221-227.

Bourzeix, M. ; Weyland, D. ; Hérédia, N. ; Desfeux, C. Etudes des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. OIV*, 669-670 (1986) 1179-1254.

Carter, D. C.; Ho, J. X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chemistry* 45 (1994) 153-203.

Carvalho, E.; Mateus, N.; de Freitas, V. Flow nephelometric analysis of protein–tannin interactions. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 97-101.

Chapon, L. Nephelometry as a method for studying the relations between polyphenols and proteins. *Journal of the Institute Brewing* 99 (1993) 49-56.

Chapon, L.; Chollot, B.; Urion, E. Étude physico-chimique des associations entre substances polyphénoliques. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique* 43 (1961) 429-442.

Cheyrier, V.; Moutounet, M; Es-Safi, E. Guerneve, C. Labarbe, B. Fulcrand, H. Structure of a new xanthylum salt derivative. *Tetrahedron Letters*, 40 (1999) 5869-5872.

Cheynier, V.; Prieur, C. The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. In: *Proceedings of ACS Symposium Series 661, Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*. Watkins, T. R., Eds. (1997) 81-83.

Clifford, M. N. Astringency. In: Tomás-Barberán FA, Robins RJ, eds. *Phytochemistry of fruits and vegetables : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. Oxford, United Kingdom: Clarendon Press.(1997) 87-107

Coupois-Paul, L. PhD. Thesis, L' institute National Polytechnique de Lorraine, (1993) 521.

Dallas, C.; Laureano, O. Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of young Portuguese red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65 (1994) 477-485.

Darné, G.; Madero-Tamargo, J. Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne. *Vitis* 18 (1979) 221-228.

De Freitas, V. Recherches sur les tanins condensées: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et vin, PhD, thesis, Faculté of Enology, Université of Bordeaux II, France (1995).

De Freitas, V.; Carvalho, E.; Mateus, N. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* 81 (4) (2003) 503-509.

De Freitas, V.; Glories, Y. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of White *Vitis vinifera* varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 1601-1606.

De Freitas, V.; Glories, Y.; Bourgeois, G.; Vitry, C. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry* 5 (1998) 1435-1441.

De Freitas, V.; Mateus, N. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (2002) 113-119.

De Freitas, V.; Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 940-945.

Dyer, W. G. Evaluation of commercial practices in white wine fermentation in barrels and red wine pomace contact In: *M. Sc. Research Report*, University of California, Davis 1985.

Es-Safi, N. E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002b) 5571-5585.

Es-Safi, N. E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M.; Hmamouchi, M.; Essassi, E. M. Kinetic studies of acetaldehyde induced condensation of flavan-3-ols and malvidin-3-glucoside model solutions systems. In: *Polyphenols Communications* Vercauteren, J.; Cheze, C.; Dumon, M. C.; Weber, J. F.; Eds.; Groupe Polyphenols: Bordeaux, France (1996).

Es-Safi, N. E.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. New phenolic compounds obtained by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic medium. *Tetrahedron Letters* 41 (2000) 1917-1921.

Fulcrand, H.; Cameiro dos Santos, P. J.; Sarni-Machado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Structure of next anthocyanin derived wine pigment. *Journal of Chemistry Society Perkins Trans 1* (1996a) 735-739.

Goldstein, J. L.; Swain, T. Changes in tannins ripening fruits. *Phytochemistry* 2 (1963) 371-383.

Goldstein, J. L.; Swain, T. The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4 (1965) 185-192.

Guinard, J.; Pangborn, R. M.; Lewis, M. J. The time course of astringency in wine upon repeated ingestions. *American Journal of Enology and Viticulture* 37 (1986a) 184-189.

Gustavson, K. H. *The Chemistry of Tanning Processes*, Academic Press, New York, 1956.

Hagerman, A. E.; Butler, L. G. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28 (1980) 944-947.

Hagerman, A. E.; Butler, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26 (4) (1978) 809-812.

Hagerman, A. E.; Butler, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 256 (1981) 4494-4497.

Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin (4-8) catechin (procyanidin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 2590-2595.

Hagerman, A. E.; Robbins, C. T. *Journal of Chemistry Ecological* 13 (1987) 1243.

Haslam, E. Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* 19 (1980) 2577-2582.

Haslam, E. Polyphenol-protein interactions. *Biochemistry* (1974) 139-285

Haslam, E. Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action. Chambrige University Press (1998).

Haslam, E. Vegetable tannins. In: *The Biochemistry of Plants*, 7 Coon, E., Ed., Academic Press, New York, (1981) 527.

Haslam, E.; Brown, A.G.; Falshaw, C. P.; Holmes. A.; Ollis, W. D. The constitution of the flavin. *Tetrahedron Letters* 7 (1966) 1193-1204.

Haslam, E.; Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; McDonald, C. J.; Williamson, M. P. Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. *FEBS Letters* 382(3) (1996) 289-292.

Haslam, E.; Lilley, T. H. Natural astringency in foodstuffs – A molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 27 (1988) 1-41.

Haslam, E.; Luck, G.; Liao, H.; Murray, N. J., Grimmer, H. R.; Warminski, E. E.; Williamson, M. P., Lilley, T. H. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* 37 (1994) 357-371.

Haslam, E; Ozawa, T.; Lilley, T. H. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* 26(1988) 2937-2942.

Huang, A. L.; Chen, X.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Guo, W.; Tränkner, D.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442 (2006) 934-938.

Joslyn, M. A.; Goldstein, J. L. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. *Adv. Food Res.* 13 (1964) 179.

Kallikathraka, S.; Bkker, J.; Clifford, M. N. Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Study* 13 (1998) 29-43.

Kauffman, D. L.; Keller, P. J. *Arch. Oral Biology* 24 (1979) 249-256.

Kawamoto, H.; Nakatsubo, F. Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry* 46 (1997) 479-483.

Lea, A. G. H. Flavour, colour, and stability in fruit products: the effect of polyphenols. *Plant Polyphenols*, Ed by Hemingway, R.W. and Lakks, P. E., Plenum Press, New York (1992) 827-837.

Lea, A. G. H.; Arnold, G. M. Bitterness, astringency and the chemical in foods and beverages. Definition, measurement and control. Ellis Harwood, Ltd, England, (1983) 203-212.

Lesschaeve, I.; Noble, A. C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition* 81 (2005) 330-335.

Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. Polyphenols interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59 (1992) 299-305.

Lindemann, B. A taste for umami. *Nature Neuroscience* 3 (2000) 99 - 100

- Luck, G.; Lião, H.; Murray, N. J.; Grimmer, H. R.; Warminsky, E. E.; Williamson, M. P.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* 37 (1994) 357-371.
- Marmot, M. G.; Stansfeld, S.; Patel, C.; North, F.; Head, J.; White, I.; Brunner, E.; Smith, G. D. Health inequalities among British civil servants: the Whitehall II study. *The Lancet* 337 (1991) 1387-1393.
- Martin, S.; Pangborn, R. M. Human Parotid Secretion in Response to Ethyl Alcohol. *J. Dental Research* 50 (1971) 485-490.
- Mateus, N.; Carvalho, E.; Luís, C.; De Freitas, Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta* 513 (2003) 135-140
- McManus, J. P.; Davis, K. G.; Beart, J. E.; Gaffney, S. H.; Lilley, T. H.; Haslam, E., *Journal of Chemistry Society Perkin Trans. 2* (1985) 1429-1438.
- Merken, H. M.; Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 577-599.
- Meyer, A. S.; Yi, O. S.; Pearson, D. A.; Waterhouse, A. L.; Frankel, E. N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997) 1638-1643.
- Michaud, M; Lagaze, P.; Masquelier, J.; *Society of Pharmaceutical Bordeaux* 110 (1971) 111.
- Murray, N. J.; Williamson, M. P. Conformational study of a salivary praline-rich protein repeat sequence. *Journal of Biochemistry* 219 (1994) 915-921.

Murray, O. J.; Dang, W.; Bergstrom, D. Using an Electronic Tongue to Optimize Taste-Masking in a *Lyophilized Orally Disintegrating Tablet Formulation* Pharmaceutical Technology (2004)

Norton, I. T.; Goodal, D. M.; Frangou, S. A., Morris, E. R., Rees, D. A. Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. *Journal of Molecular Biology* 175 (1984) 371-394.

Oh, H. I., Hoff, J. E.,; Armstrong, G. S., Haff, L. A. Hydrofobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28 (1980) 394-398.

Okuda, T.; Mori, K.; Hatano, T. Relationship of the structures of tannins to the binding activities with haemoglobin and methylene blue. *Chemistry Pharmaceutical Bull* 33 (1985) 1424.

Ozawa, T.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol interaction: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* 26 (1987) 2937-2942.

Pissarra, J.; Mateus, N.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68 (2003) 476-481.

Pyle, H. J. Effect of tartaric acid, ethanol and sucrose on perceived bitterness of caffeine. Thesis, University of California, Davis (1986).

Ribéreau-Gayon, J. ; Peynaud, E.; Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. *Traité d'oenologie. Sciences et Techniques du Vin. Tome I, II, III.* Dunod (1977).

Ribéreau-Gayon, P. Les explosions de poussières dans le stockage agroalimentaire: Les risques d'accident catastrophique et leurs conséquences médicales *Médecine de Catastrophe - urgences collectives* 3 (2000) 13-20.

Ribéreau-Gayon, P. ; Dubernet, M. Isoelectric point changes in *Vitis vinifera* catéchol oxidase. *Phytochemistry* 13 (1974) 1085-1087.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y. Determination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. *C R Académique Society of Paris* 273 (1971) 2269-2371.

Ribéreau-Goyon, P. Evolution des composés phénolique au cours de la maturation du raisin II. Discussion des résultats obtenus en 1969, 1970 et 1971. *Connais. Vig. Vin* (1972) 161-175.

Ribéreau-Goyon, P. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acides tartrique les limbes et les boies de *Vitis vinifera*. *C. R. Académique Society of Paris* (1965) 260-341.

Ribéreau-Goyon, P. Les composés phénolique du raisin et du vin II. Les flavonoides et les anthocyanidines. *Ann. Physiologic Veg.* 6 (1964) 211-242.

Ricardo-da -Silva, J. M., Baoshan, S.; Leandro C.; Spranger, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1996)1390-1396.

Ricardo-da Silva, J. M.; Cheynier, V., Samsom, A.; Bourzeix, M. Effect of pomace contact, carbonic maceration and hyperoxidation on the procyanidin composition of grenache blanc wines. *American Society of Enology and Viticulture* 44 (1993) 168-172.

- Ricardo-da-Silva, J. M.; Belchior, A. P. Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. *Science of the Aliments* 12 (1992) 223-237.
- Ricardo-da-Silva, J. M.; Bourzeix, M. Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. *Vitis* 30 (1991) 245-252.
- Ricardo-da-Silva, J. M.; Cheynier, V.; Samsom, A.; Bourzeix, M. Effect of pomace contact, carbonic maceration and hyperoxidation on the procyanidin composition of grenache blanc wines. *American Society of Enology and Viticulture* 44 (1993) 168-172.
- Ricardo-da-Silva, J. M.; Rigaud, J. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* 4 (1991) 1259-1264.
- Ricardo-da-Silva, J. M.; Rosec, J. P. Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre grape and red wines. *Vitis* 31 (1992) 55-63.
- Rinaudo, M. Relation between the molecular structure of same polysaccharides and original properties in sol and gel state. *Food Hydrocolloids* 5 (2001) 433-440.
- Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. Aggregation of grape seeds tannins in model-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 16 (2002) 17-23.
- Rivas-Gonzalo, J.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (1995) 1444-1449.
- Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T.; Kataoka, S.; Yamaji, N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 1460-1464.

Salagoity-Auguste, M. H.; Bertrand, A. Wine Phenolics – analysis of low molecular weight components by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35 (1984) 1241-1247.

Saucier, C.; Bourgeois, C.; Vitry, D.; Roux, D. ; Glories, Y. Characterization of (+)-catechin- acetaldehyde polymers, a model of colloidal stat of wine polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997a) 1045-1049.

Saucier, C.; Guerra, C.; Pianet, I.; Laguerres, M.; Glories, Y. (+)-Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine – ageing. *Phytochemistry* 46 (1997b) 229-234.

Siebert, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1999) 80-85.

Siebert, K. J.; Troukhanova, N. V.; Lynn, P. Y. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996) 80.

Singleton, V. L., Draper, D. E. The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 15 (1964) 34-40.

Singleton, V. L., Zaya, J.; Trousdale, E. White table wine quality and polyphenol composition as affected by must SO₂ content and pomace contact time. *American Journal of Enology and Viticulture* 31 (1980) 14-20.

Singleton, V. L.; Esau, P. Phenolic substances in grapes and wine and their significance. Academic Press, New York (1969).

Somers, T. C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* 10 (1971) 2175-2186.

Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet. *Phytochemistry* 43 (1996) 509.

Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H.; Goulding, P. N., Magnolato, D., Lilley, T. H., Haslam, E. Polyphenol complexation—some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27 (1988) 2397-2409.

Thompson, R. S., Jacques, D., Haslam, E., Tanner, R. J. N. *Journal of Chemistry Society of Perkin Trans. I* (1972) 1387.

Timberlake, C. F.; Bridle, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 27 (1976) 97-105.

Vernhet, A.; Pellerin, P.; Prieur, C.; Osmianski, J.; Moutounet, M. Charge properties of some grape and tannin wine polysaccharide and polyphenol fractions. *American Journal of Enology and Viticulture* 47 (1996) 25-30.

Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* 513 (2003) 57-65.

Weinges, K.; Kaltenhausser, W., Marx, H. D.; Nader, E., Nader, F., Perner, J.; Seiler, D. *Liebigs Ann. Chemistry* 711 (1968) 184.