

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Comparação e avaliação do impacto físico-químico e sensorial da
aplicação de patatina, quitosano e proteína de ervilha em vinho
branco**

Dissertação de Mestrado em Enologia

MARIA MANUEL BALTAR MARTINS ARANHA FERREIRA

Orientadores: Professora Doutora Maria Fernanda Gil Cosme Martins

Mestre Luís Filipe Ribeiro



Vila Real, 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Comparação e avaliação do impacto físico-químico e sensorial da
aplicação de patatina, quitosano e proteína de ervilha em vinho
branco**

Dissertação de Mestrado em Enologia

MARIA MANUEL BALTAR MARTINS ARANHA FERREIRA

Orientadores: Professora Doutora Maria Fernanda Gil Cosme Martins

Mestre Luís Filipe Ribeiro



Vila Real, 2015

Os Orientadores

Professora Doutora Maria Fernanda Gil Cosme Martins

Mestre Luís Filipe Mota Ribeiro

Instituição	Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro
Curso	Mestrado em Enologia
Título	Comparação e avaliação do impacto físico-químico e sensorial da aplicação de patatina, quitosano e proteína de ervilha em vinho branco
Autor	Maria Manuel Baltar Martins Aranha Ferreira
Orientadores	Professora Doutora Fernanda Cosme Mestre Luís Filipe Ribeiro

Dissertação original apresentada na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Enologia.

“As doutrinas apresentadas neste trabalho são da
exclusiva responsabilidade do autor”

Dedico este trabalho à minha mãe por todos os valores
que me transmitiu e porque me ensinou a lutar
por aquilo que quero, sem nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Fernanda Cosme, orientadora desta dissertação, um muito obrigado pelo apoio, motivação e boa disposição que a caracteriza. Agradeço também, todos os conhecimentos científicos transmitidos e dedicação.

Ao Mestre Luís Filipe Ribeiro, orientador desta dissertação, um obrigado pelo apoio prestado, conselhos e sugestões que foram uma mais-valia na elaboração desta dissertação.

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio prestado neste último ano. Pelo esforço e dedicação com que sempre me ajudaram na concretização deste sonho.

À Aveleda SA, um muito obrigado por me ter cedido o espaço do laboratório e o vinho sem o qual não seria possível a realização desta dissertação. Agradeço, ainda todos os ensinamentos transmitidos durante o meu percurso na Quinta da Aveleda. Ao Eng.º Pedro Costa, pelos conhecimentos transmitidos durante a elaboração desta dissertação. À Sara Dias, um muitíssimo obrigado pelos conselhos, pela paciência e por me ensinar a ultrapassar os obstáculos mesmo que estes pareçam impossíveis de ser ultrapassados.

Ao Professor Doutor Fernando Nunes pelo apoio dado nas análises efetuadas por HPLC.

À minha família e aos meus amigos, um muito obrigada pelo apoio e paciência que tiveram comigo durante todo o período de desenvolvimento da minha dissertação.

Ao Carlos Mota e à Maria do Carmo, por me terem transmitido conhecimentos e por serem uma boa companhia no laboratório. Agradeço também a todos os colaboradores da Aveleda, S.A que, de uma forma ou outra, ajudaram na realização desta dissertação.

RESUMO

A utilização de proteínas de origem não animal como agentes clarificantes em vinhos brancos, carece ainda de estudos, nomeadamente sobre o seu impacto, quer a nível das características físico-químicas, quer a nível das características sensoriais dos vinhos. Assim, neste contexto, a presente dissertação pretende melhorar o conhecimento da utilização de colas vegetais e de polissacarídeos, bem como, verificar a sua eficiência para futura utilização a nível industrial. Neste sentido foram selecionadas várias colas, elementares ou misturas, à base de proteína de ervilha, proteína da batata (patatina) e quitosano, tendo sido comparados com agentes de colagem tradicionais, como o PVPP e o caseinato de potássio. Os ensaios foram realizados em vinho branco proveniente da região da Bairrada. O vinho ensaiado foi analisado em vários parâmetros físico-químicos e sensoriais, com o intuito de avaliar o impacto da colagem ao nível da sua composição fenólica, nomeadamente ácidos fenólicos, potencial de acastanhamento, cor, e a sua suscetibilidade ao pinking. Globalmente, pode-se concluir que as diferenças entre a aplicação das colas de origem não animal e as utilizadas tradicionalmente nas características do vinho não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). A patatina, o caseinato de potássio, o PVPP e o quitosano diminuíram significativamente o índice de polifenóis totais, a mesma tendência foi observada para os resultados da concentração de flavonóides. Relativamente às concentrações de não-flavonóides, apenas a proteína de ervilha não demonstrou diferenças significativas relativamente à testemunha, todos os outros agentes clarificantes diminuíram este parâmetro. Com exceção do caseinato de potássio, todas as colas diminuíram a cor do vinho (A_{420nm}) o que está de acordo com os resultados das características cromáticas. Relativamente ao potencial de acastanhamento, apenas o *Mix 1* (PVPP, proteína de ervilha e celulose) diminuiu significativamente em relação ao controlo, apresentando também diminuição da concentração de catequina e do ácido cafeico relativamente aos outros agentes de colagem. Nos resultados da suscetibilidade ao pinking, todas as colas utilizadas melhoraram o vinho, excetuando a patatina. Quanto, à análise sensorial, apenas foram notadas diferenças significativas no *Mix 2* (bentonite, PVPP, levedura e celulose) relativamente aos descritores frutado, floral e cor.

Palavras-chave: vinho branco, proteínas vegetais, perfil fenólico, cor, perfil sensorial

ABSTRACT

The use of non-animal proteins as fining agents in white wines, lacks of studies namely on their impact, on the physicochemical characteristics, as well as on wine sensorial characteristics. So, the aims of this study is to improve the knowledge of the use of vegetable protein and polysaccharides as fining agents, as well as to verify their efficiency for future use at an industrial scale. Several fining agents have been selected, such as pea protein, potato protein (patatin), chitosan and have been compared with traditional fining agents, such as PVPP and potassium caseinate. Assays were performed in white wine from Bairrada region.

The wine was analysed concerning several physicochemical and sensory parameters, in order to know the impact on wine phenolic composition including phenolic acids, browning potential, colour, and pinking susceptibility. Overall, it can be concluded that the differences between non-animal and traditional fining agents are not significantly different ($p > 0.05$). Patatin, potassium caseinate, PVPP and chitosan reduced significantly total phenolic compounds. The same trend was observed for the flavonoid compounds. For non-flavonoid compounds, only pea protein showed no significant differences compared to control, all the other fining agents decreased this parameter. With exception of potassium caseinate, all fining agents decreased wine color (A_{420nm}) which is in accordance with the results obtained for the chromatic characteristics. Regarding browning potential, only *Mix 1* (PVPP, pea protein and cellulose) decreased significantly this parameter compared to control, this proving its decrease in the concentration of catechin and caffeic acid when comparing to the other fining agents. The pinking susceptibility was improved by all fining agents, except with patatin. Sensory analysis data showed that *Mix 2* (bentonite, PVPP, inert yeast and cellulose) decreased significantly the descriptors fruity, floral and color.

Keywords: white wine, vegetable protein, phenolic profile, colour, sensory profile

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
ÍNDICE GERAL	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
I – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Apresentação da empresa	2
1.2. Introdução	3
2. COMPOSTOS FENÓLICOS DO VINHO BRANCO.....	5
2.1. Classificação dos compostos fenólicos.....	6
2.1.1. Compostos de natureza não-flavonóide	6
2.1.2. Compostos de natureza flavonóide	7
2.2. Oxidação de vinhos brancos.....	9
3. COLAGEM	11
3.1. Características das colas.....	12
3.1.1. Gelatina	12
3.1.2. Caseína/ Caseinato de potássio	12
3.1.3. Cola de Peixe	12
3.1.4. Bentonite	13
3.1.5. Polivinilpirrolidona	13
3.1.6. Patatina	13
3.1.7. Quitosano	14
3.1.8. Proteína de ervilha	14
4. INTERAÇÃO ENTRE AGENTES DE COLAGEM E OS COMPOSTOS DO VINHO BRANCO.....	15
5. Objetivos	16
6. Referências	17
II. Impact of patatin, chitosan and pea protein on white wine physicochemical and sensory characteristics	21
Abstract	22
1. Introduction	23
2. Material and methods.....	24
2.1. Wine sample.....	24

2.2.	Analysis of conventional oenological parameters	24
2.3.	Fining experiments	24
2.4.	Total phenolic index	25
2.5.	Quantification of flavonoid phenols and non-flavonoid phenols	25
2.6.	Browning potential.....	25
2.7.	Color analysis.....	26
2.8.	Pinking sensitivity index (PSI)	26
2.9.	Phenolic acids and flavonoid profile	26
2.10.	Chromatic characteristics.....	26
2.11.	Sensory analysis	27
3.	Results and discussion.....	28
3.1.	Effect of oenological fining agents on phenolic compounds, color and chromatic characteristics	28
3.2.	Effect of oenological fining agents on browning potential and pinking	30
3.3.	Quantitative effects of oenological fining agents on catechin and phenolic acids.....	31
3.4.	Effect of oenological fining agents on the wine sensory profile	33
4.	Conclusions	35
5.	References.....	36
III.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....	38
IV.	ANEXOS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vista sobre uma parte da vinha da Quinta da Aveleda.....	2
Figura 2 Esquema ilustrativo dos tipos de compostos fenólicos do vinho branco	5
Figura 3 Estrutura química do ácido cinâmico (A) e dos ácidos cinâmicos mais importantes (B).....	6
Figura 4 Estrutura química geral dos ácidos hidroxicinamiltartáricos	7
Figura 5 Estruturas químicas dos flavonóis.....	7
Figura 6 Estrutura química das principais procianidinas	8
Figura 7 Estrutura química dos taninos. A - Ácido gálico (galotaninos); B - Ácido elágico (elagitaninos); C - Tanino hidrolisável	9
Figura 8 Estrutura química de taninos condensados (Procianidina: R=H; Prodelfinidina: R=OH)	9
Figura 9 Esquema da reação química devido ao escurecimento enzimático (A - inserção de um grupo hidroxilo na posição <i>orto</i> do anel aromático de um monofenol; B - oxidação de <i>orto</i> -difenois).....	10
Figure 1 Sensory profile of white wine treated with different fining agents obtained by mean of scores given by the pannelists.	34
Figure 2 PCA analysis projection of sensorial data of white wine treated with different fining agents.	35

ÍNDICE DE TABELAS

Table 1 Oenological fining agents and doses used for the trials	25
Table 2 Effect of oenological fining agents on total phenolic index (TPI), total phenols, flavonoid and non-flavonoid phenols, chromatic characteristics and color of white wine (mean $\pm$ SD)	29
Table 3 Effect of oenological fining agents on browning potential and susceptibility to pinking (PSI)(mean $\pm$ SD).....	30
Table 4 Effect of oenological fining agents on the percentage of area of catechin and phenolic acids determined by HPLC of white wine (mean $\pm$ SD)	32
Table 5 Effect of oenological fining agents on white wine sensorial profile (mean $\pm$ SD).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

DOC – Denominação de Origem Controlada

FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy

GMO - Genetically modified organism

HACCP – Hazard analysis and critical control points

HPLC – High-performance liquid chromatography

IPT – Índice de polifenóis totais

ISO – International Organization for Standardization

NTU – Nephelometric turbidity unit

OIV - International Organisation of Vine and Wine

PCA – Principal Component Analysis

PFO – Polifenoxidase

PVPP – Polivinilpolipirrolidona

SD – Standard Deviation

I – INTRODUÇÃO GERAL

1. ENQUADRAMENTO TEMÁTICO

1.1. Apresentação da empresa

A Aveleda, S.A. é uma empresa familiar fundada em 1870 cuja principal missão é a criação de vinhos reconhecidos pela sua qualidade. A sua dedicação, simplicidade e excelência, bem como, ética e responsabilidade fazem com que esta empresa seja uma das maiores produtoras de vinho nacional.

A Aveleda possui cerca de 160 hectares de vinhas localizadas na Região Demarcada dos Vinhos Verdes de onde são provenientes as castas mais características desta região e que resultam em vinhos de excelência. Entre elas encontram-se as castas Loureiro, Fernão Pires, Alvarinho, Arinto e Trajadura.

Apesar de ser uma empresa com alguma história, as técnicas adotadas são modernas e eficazes, nunca esquecendo a sustentabilidade da biodiversidade e o cumprimento de requisitos legais e outros aplicáveis aos seus aspetos ambientais.

Relativamente à produção, a Aveleda detém dois centros de vinificação: um localizado na Quinta da Aveleda, em Penafiel (representada na figura 1), e outro na Quinta da Aguieira, em Valongo do Vouga (Região da Bairrada). O processo de fermentação dos vinhos é controlado através dos parâmetros pré-estabelecidos pelo Departamento de Enologia. Todo o processo está de acordo com o sistema HACCP e a certificação ISO 22000 (Quinta da Aveleda 2014).



Figura 1 Vista sobre uma parte da vinha da Quinta da Aveleda, retirado do site <http://guiastecnicos.turismodeportugal.pt/pt/enoturismo/ver/Quinta-da-Aveleda>

O vinho utilizado neste trabalho experimental era proveniente da Quinta da Agueira, situada na região demarcada da Bairrada.

A região da Bairrada tem a classificação DOC (Denominação de Origem Controlada) e destaca-se pelos vinhos tintos de cor densa e taninos acentuados, bem como pelos vinhos brancos e espumantes de excelência, resultantes da diversidade de solos e do seu clima suave, temperado pela proximidade ao Oceano Atlântico (Apontamento Histórico 2014). Os vinhos brancos desta região são delicados e aromáticos. Apresentam uma cor citrina carregada, usualmente com reflexos esverdeados, quando novos possuem aromas frutados, porém, quando envelhecidos, apresentam-se harmoniosos, frescos e persistentes (Características Organoléticas 2014). As castas brancas predominantes nesta região são a Maria Gomes, Arinto, Rabo de Ovelha, Cercial e Chardonnay (Bairrada 2014).

A Aveleda S.A. é uma empresa em constante progresso e desenvolvimento. Os seus enólogos desejam ter sempre os melhores produtos do mercado com o menor custo possível mas também se preocupam com a sociedade e as exigências do mercado. Devido ao aumento da procura de produtos com requisitos específicos, incluindo vinhos, que não contenham alergénios nem utilizem produtos de origem animal, a Aveleda S. A. demonstrou bastante interesse na execução desta dissertação podendo com base nos resultados obtidos eventualmente no futuro, substituir algumas produtos enológicos por outras de origem não animal.

1.2. Introdução

O vinho é um dos produtos com maior interesse a nível económico e cultural por todo o mundo, sendo crescente a exigência por parte dos consumidores ao nível da estabilidade, qualidade sensorial e segurança alimentar.

A operação de colagem dos vinhos é uma das práticas mais usuais em Enologia. Esta tem como objetivo a estabilização dos vinhos bem como melhorar as suas características sensoriais. Com este objetivo, são aplicados diferentes produtos enológicos ao vinho com o intuito de interagirem com os compostos indesejáveis do vinho, melhorando assim as suas características físico-químicas e sensoriais. Esta interação pode ser com os compostos fenólicos do vinho, melhorando a sua cor, adstringência, amargo e também o perfil sensorial (Boulton et al. 1996).

A utilização de proteínas vegetais como agentes de colagem em vinhos tem cada vez mais interesse e aplicação, uma vez que o seu potencial alergénio pode ser inferior ou mesmo inexistente, comparativamente a algumas colas proteicas de origem animal. Este potencial alergénio deve-se à presença residual das colas proteicas de origem animal nomeadamente albumina de ovo e caseinato de potássio no produto final (Cattaneo et al. 2002).

O impacto da aplicação de colas não alergénicas em vinhos brancos, ainda não é bem conhecido. As colas não alergénicas foram desenvolvidas sobretudo devido à obrigatoriedade de indicação na rotulagem do uso de colas alergénicas na produção do vinho, nomeadamente da albumina de ovo e do caseinato de potássio. As colas não alergénicas são essencialmente compostas por PVPP, proteína de ervilha, paredes de levedura, celulose e bentonite. Mais recentemente surgiram produtos enológicos provenientes de proteína da batata (patatina) e também à base de quitosano de origem fúngica.

2. COMPOSTOS FENÓLICOS DO VINHO BRANCO

Os compostos fenólicos têm extrema importância em Enologia uma vez que influenciam direta ou indiretamente, as características físico-químicas e sensoriais dos vinhos, nomeadamente a cor e o sabor (adstringência e sensação de volume). Estes são também os principais componentes do vinho implicados em fenómenos de oxidação, que se traduzem por alterações de cor (acastanhamento) e por uma evolução do sabor (perda ou aumento da adstringência) (Cardoso 2007).

Os compostos fenólicos são constituídos por um anel benzénico e um grupo hidroxilo, pelo menos (Cardoso 2007). Na Figura 2, encontra-se um esquema ilustrativo dos diferentes tipos de compostos fenólicos presentes tanto na película como na polpa das uvas de castas brancas.

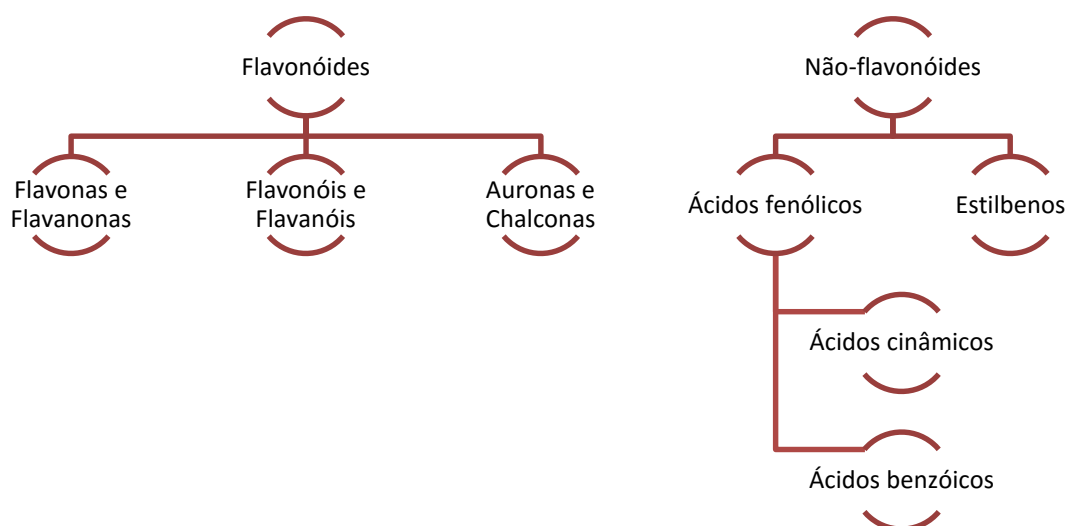


Figura 2 Esquema ilustrativo dos tipos de compostos fenólicos das uvas de castas brancas

A concentração de compostos fenólicos no vinho é influenciada pelo clima, natureza do solo, casta, região geográfica de crescimento da uva, maceração pré-fermentativa da uva, temperatura de fermentação, pH, processo de vinificação, tipo de envelhecimento e idade do vinho entre outras (Teissedre et al. 1995).

2.1. Classificação dos compostos fenólicos

2.1.1. Compostos de natureza não-flavonóide

Os compostos fenólicos não-flavonóides são divididos em ácidos fenólicos (que incluem os ácidos cinâmicos e benzoicos) e os estilbenos. Estes compostos estão localizados maioritariamente na película e na polpa das uvas, principalmente os ácidos hidroxicinâmicos, sob a forma de ésteres tartáricos (Ribéreau-Gayon 1965). Estes compostos têm um papel fundamental no que diz respeito à oxidação dos mostos e vinhos (Singleton 1987). Apesar de não afetarem o gosto dos vinhos, estes são responsáveis pelo aparecimento de fenóis voláteis que, por sua vez, implicam alterações aromáticas. No mosto obtido por prensagem direta das uvas, a maior percentagem de compostos fenólicos pertence à fração dos não-flavonóides.

Os ácidos mais importantes derivados do ácido benzoico são os ácidos vanílico, sirínico e salicílico, que aparecem ligados às paredes celulares, principalmente, o ácido gálico que se encontra sob a forma de éster dos flavonóis. Existem ainda outros ácidos presentes em menor quantidade nas uvas na forma de ésteres e, durante a vinificação e conservação do vinho, vão sofrendo uma hidrólise lenta encontrando-se quer livres quer combinados no vinho (Ribéreau-Gayon et al. 1972). A proporção entre os ácidos vanílico e sirínico permite distinguir diferentes vinhos quanto à sua caracterização varietal (Di Stefano 1996).

Os ácidos fenólicos pertencentes à série cinâmica encontram-se combinados com o ácido tartárico na forma de monoésteres, representados na figura 3. O teor em ácidos hidroxicinâmicos nas uvas varia muito de acordo com a casta (Romeyer et al. 1985).

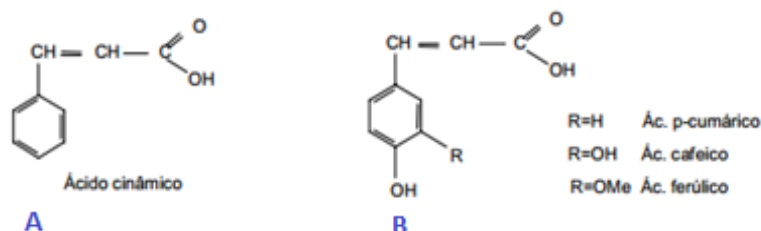


Figura 3 Estrutura química do ácido cinâmico (A) e dos ácidos cinâmicos mais importantes (B) (adaptado de www.scielo.br).

Contrariamente aos outros fenóis, os ácidos hidroxicinamiltartáricos contribuem para os fenómenos de acastanhamento que os mostos ou vinhos brancos podem sofrer. A sua estrutura química encontra-se representada na figura 4. Estes compostos, devido à presença de grupos hidroxilo, são os primeiros a sofrer oxidação pelas enzimas fenoxidásicas, nas respetivas quinonas. Estas envolvem-se em reações que conduzem ao aparecimento de compostos com colorações que variam do amarelo ao castanho (melaninas) (Romeyer et al. 1985).

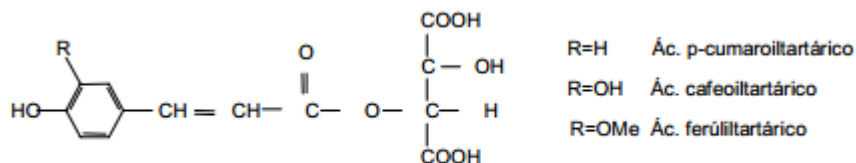


Figura 4 Estrutura química geral dos ácidos hidroxicinamiltartáricos (adaptado de www.scielo.br)

2.1.2. Compostos de natureza flavonóide

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum C₆-C₃-C₆. A estrutura base é constituída por dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano. Esta classe de compostos fenólicos pode dividir-se em famílias que se distinguem pelo grau de oxidação do anel pirano (Zoecklein et al. 1995).

Os flavonóis são caracterizados por apresentarem uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxilo na posição 3, como se pode observar na figura 5. Nas uvas encontram-se apenas nas películas, como glucósidos ou glucurónidos. Estes heterósidos das uvas são facilmente hidrolisáveis (Ribéreau-Gayon et al. 1972). Os flavonóis possuem uma cor amarela mas não são considerados muito importantes para a coloração dos vinhos brancos (Allen 1994).

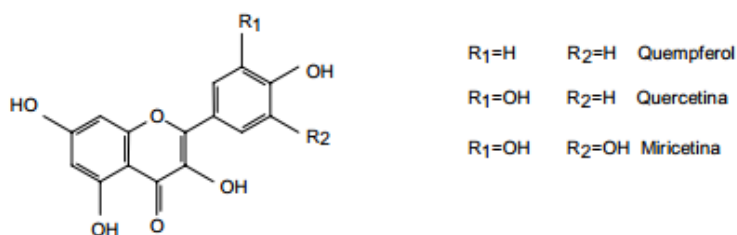


Figura 5 Estruturas químicas dos flavonóis (adaptado de www.scielo.br)

A estrutura dos vinhos deve-se aos flavonóides compostos fenólicos que se encontram quer nas grainhas, quer na polpa quer na película das uvas brancas. Os

mais importantes são os flavan-3-ol e as proantocianidinas dado que são os principais responsáveis pela estrutura dos vinhos. Os flavonóides podem ser encontrados tanto no estado livre como polimerizados com outros flavonóides, açúcares, não-flavonóides ou combinações entre estes.

Os flavano-3-ol possuem um anel heterocíclico saturado. Os carbonos 2 e 3 são os centros assimétricos da molécula. Ao contrário de outros flavonóis, encontram-se na uva no estado livre, a catequina é mais abundante do que a epicatequina (Haslam 1980).

As proantocianidinas são compostos fenólicos que libertam antocianinas quando sujeitas ao aumento da temperatura em meio ácido e alcoólico devido à rutura das ligações entre as unidades monoméricas (Ricardo-da-Silva 1995). Se o composto libertado for cianidina, a molécula recebe a denominação procianidina se, por outro lado, for delfinidina, chama-se prodelfinidina. A unidade fundamental das proantocianidinas são as moléculas de flavano-3-ol, e consoante o número de vezes que esta unidade se repete, estas podem ser dímeras, trímeras, oligoméricas ou polímeras.

Em vinhos brancos onde existe um limitado contacto com as películas, as catequinas são os principais flavonóis, responsáveis pelo acastanhamento dos vinhos brancos e por algum amargo (Zoecklein et al. 1995).

A estrutura química destes compostos fenólicos está representada na figura 6.

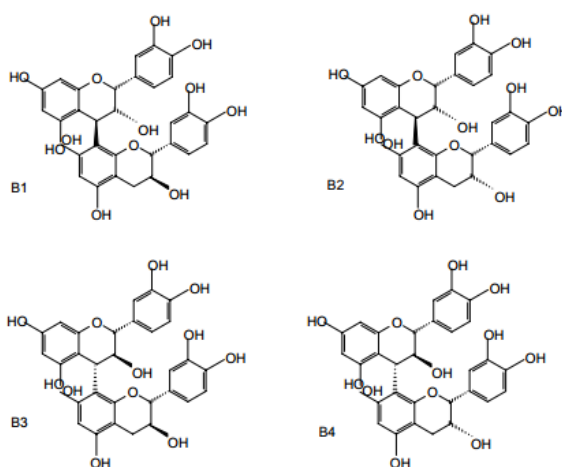


Figura 6 Estrutura química das principais procianidinas (adaptado de www.scielo.br)

Os taninos são compostos fenólicos que têm a capacidade de se combinarem com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos, provocando a sensação

de adstringência (Allen 1994). São classificados em hidrolisáveis e não hidrolisáveis ou taninos condensados. Os primeiros resultam da ligação de um açúcar (normalmente glucose) a um composto fenólico, principalmente ácido gálico ou ácido elágico cuja estrutura química se encontra representada na figura 7 (A e B). Estes não contêm moléculas de flavonóides e não aparecem naturalmente nas uvas, são resultado de estágio em madeira. Um exemplo de um tanino hidrolisável encontra-se representado na figura 7 C.

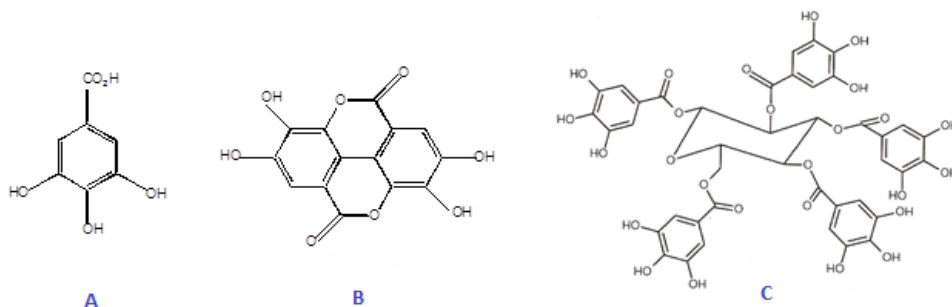


Figura 7 Estrutura química dos taninos hidrolisáveis. A - Ácido gálico (galotaninos); B - Ácido elágico (elagitaninos); C – Tanino hidrolisável (adaptado de www.scielo.br)

Os taninos condensados estão presentes nas uvas, maioritariamente nas grainhas e nas películas, e são formados por moléculas de flavano-3-ol, chamadas proantocianidinas e não são facilmente hidrolisáveis. Na natureza os flavano-3-ol variam no grau de hidroxilação dos anéis aromáticos A e B e na estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel pirano C. As estruturas mais simples são as catequinas e as galhocatequinas, como se pode observar na figura 8.

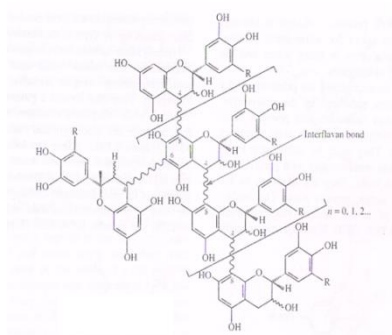


Figura 8 Estrutura química de taninos condensados (Procianidina: R=H; Prodelphinidina: R=OH) (adaptado de www.scielo.br)

2.2. Oxidação de vinhos brancos

A adição de oxigénio aos vinhos brancos, raramente os melhora, dado que a preservação dos aromas é requisito necessário e o acastanhamento diminui significativamente a aparência e consequente a qualidade do vinho (Kilmartin 2009).

Alguns compostos do vinho são potenciais alvos de oxidação. Estes tanto podem ser o etanol, como diversos ácidos presentes no vinho e compostos aromáticos. No entanto, estes não são os principais substratos iniciais no que toca à oxidação (Wildenradt e Singleton 1974).

Os ácidos fenólicos, no vinho branco podem provocar o escurecimento enzimático do vinho quando se encontram na presença de oxigénio e da enzima polifenoloxidase (PFO), originando melaninas. Devido à ação da enzima polifenoloxidase, os monofenóis são hidroxilados a *orto*-difenois que oxidam originando *orto*-quinonas, de acordo com as reações apresentadas na Figura 9.

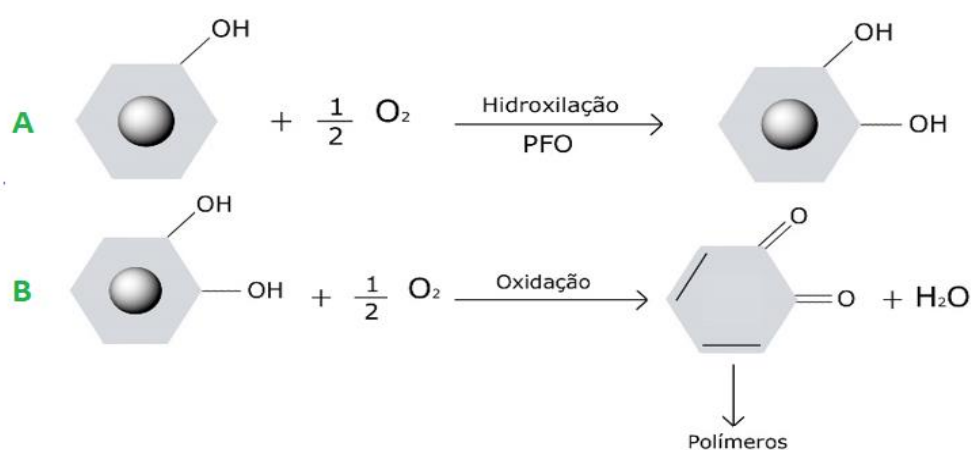


Figura 9 Esquema da reação química devido ao escurecimento enzimático (A - inserção de um grupo hidroxilo na posição orto do anel aromático de um monofenol; B - oxidação de orto-difenóis).

Existe uma longa variedade de aromas provenientes da oxidação do vinho como, por exemplo, acetaldeído (aroma a maçã cortada), sotolon (aroma a caril, noz verde), fenilacetaldeído (marmelo, mel, flores mortas) e aminocetofenona (aroma a pano molhado, naftalina). Quando presentes em baixas concentrações, podem adicionar alguma complexidade ao vinho. Por outro lado, quando em excesso, deterioram a sua qualidade (Silva Ferreira et al. 2003).

Juntamente com a produção de novos aromas, a oxidação do vinho pode levar à remoção de compostos aromáticos existentes no vinho, particularmente aqueles que contêm enxofre. Isto pode ser positivo uma vez que estes compostos produzem aromas indesejáveis como borracha ou couve cozida (Tominaga et al. 1998).

3. COLAGEM

A colagem corresponde à adição deliberada de uma substância capaz de flocular e de sedimentar e por conseguinte de arrastar as partículas responsáveis pela turvação do vinho e eventualmente outras substâncias presentes.

A colagem tem como objetivo a remoção do excesso de alguns compostos do vinho, com o intuito de o clarificar/estabilizar e de melhorar as suas características sensoriais.

A indústria enológica teve de tomar um rumo distinto a partir do momento em que foram identificados produtos de origem bovina como fonte principal da doença de Creutzfeld-Jacob (Encefalopatia espongiforme subaguda ou doença das vacas loucas). Assim, a utilização destes produtos foi avaliada e muitos foram proibidos de ser utilizados na colagem dos vinhos, como a albumina de sangue e a gelatina de origem bovina. Este facto levou a uma maior procura de produtos de origem não-animal, aumentando assim, o mercado para outros produtos de origem vegetal, nomeadamente para as proteínas vegetais (Guerrero et al. 2013), que são permitidas na colagem dos vinhos desde 2005.

Por outro lado, também existem certos agentes de colagem potencialmente alergénios para determinados indivíduos, como por exemplo o caseinato de potássio e a albumina de ovo. Apesar do processo de filtração do vinho remover os agentes de colagem, pode no entanto, existir risco por eventuais concentrações vestigiais no vinho, o que aumenta o risco de alergias no consumidor. Assim, a Regulamentação Europeia relativa à rotulagem de alimentos exige a declaração dos seus ingredientes, bem como alerta aos consumidores para ingredientes considerados alergénios presentes na Diretiva 2003/89/CE (Diretiva 2003/89/CE 2003) que altera a Diretiva 2000/13/CE (Diretiva 2000/13/CE 2000). Esta regulamentação excluía a rotulagem de vinhos que contenham produtos derivados do leite ou ovos, até 30 de Junho de 2012 para investigação científica. A partir de Julho do mesmo ano, a aplicação destes agentes de colagem tem de ser informada ao consumidor através da rotulagem em vinhos. Este facto impulsiona a investigação de colas proteicas de origem vegetal como alternativos aos produtos de origem animal (Cosme et al. 2012).

3.1. Características das colas

3.1.1. Gelatina

A gelatina tem origem em fontes de colagénio derivadas das peles e ossos dos animais de origem suína. São constituídas por um conjunto de aminoácidos, sobretudo glicina, prolina, hidroxiprolina e ácido glutâmico. Na indústria enológica existem vários tipos de gelatina que se diferenciam essencialmente pelo seu grau de hidrólise e densidade de cargas elétrica. As gelatinas solúveis a quente, pouco hidrolisadas, possuem uma massa molecular elevada, ao contrário das gelatinas solúveis a frio, que são muito hidrolisadas (Togores 2003).

A sua aplicação nos vinhos brancos reduz o teor de compostos fenólicos e o seu potencial de acastanhamento. Em alguns casos, quando os compostos fenólicos mais adstringentes são removidos, os compostos fenólicos mais amargos ficam mais pronunciados causando um efeito sensorial indesejável e desagradável (Morris e Main 1995).

3.1.2. Caseína/ Caseinato de Potássio

A caseína é a proteína principal do leite. Esta só é solúvel a um pH superior a 11, enquanto o caseinato de potássio é solúvel em água. Esta proteína é adequada a vinhos brancos uma vez que estes são pobres em colóides eletronegativos e não resulta em sobrecolagem (Bastasin e Ceresa 1991). A sua principal ação é a absorção dos compostos fenólicos e, por isso, é utilizada para eliminar compostos fenólicos oxidados ou com tendência à oxidação em mostos e vinhos brancos (Cantarelli e Lanzarini 1989; Siebert et al. 1996; Cardoso 2007). Esta também pode ser utilizada para eliminar odores indesejáveis, diminuir a intensidade da cor e clarificar vinhos brancos (Morris e Main 1995). É uma cola também utilizada para eliminar ferro no vinho, o que reduz o risco de precipitação metálica, ajudando também a retardar reações de oxidação do vinho.

3.1.3. Cola de Peixe

A cola de peixe (ictiocola) proveniente da bexiga-natatória de certos peixes, como o esturção é uma proteína carregada positivamente ao pH do vinho. É formada

por fibras de colagénio de alto peso molecular. É utilizada principalmente em vinhos brancos e espumantes (Morris e Main 1995). Esta pode ser apresentada em forma de lâminas, pó de cor branca, flocos ou suspensão líquida (Togores 2003). No entanto, não é aconselhável a sua conservação em solução dado que a sua hidrolisação faz com que perca as suas características iniciais (Úbeda 2000). Uma das desvantagens da aplicação deste agente de colagem é a produção de borras leves e volumosas que dificultam a trasfega (Ribéreau-Gayon et al. 2002).

3.1.4. Bentonite

A bentonite é uma argila originária de rochas vulcânicas. Esta argila consiste num complexo de aluminossilicato com componentes catiónicos permutáveis. Este complexo argiloso dispõe-se em forma de pratos que, após hidratação, expandem-se, aumentando a superfície de contacto disponível para trocas catiónicas (Boulton et al. 1996; Sarmento et al. 2000). Existem vários tipos de bentonite sendo as mais predominantes a bentonite sódica e a bentonite cálcica. A bentonite sódica possui uma maior capacidade de adsorção o que significa que é mais eficiente nomeadamente na remoção de proteínas (Blade e Boulton 1988; Boulton et al. 1996; Sarmento et al. 2000).

3.1.5. Polivinilpolipirrolidona

Polivinilpolipirrolidona (PVPP) é um polímero vinílico resultante da polimerização de vinilpolipirrolidona na presença de um radical alquilo (Doner et al. 1993; Ribéreau-Gayon et al. 2006)

O PVPP complexa com compostos fenólicos no vinho por absorção, nomeadamente com as catequinas (Morris e Main 1995). É normalmente utilizado em vinhos para reduzir a adstringência, sabor amargo e o potencial de acastanhamento. Este liga-se a compostos fenólicos monoméricos e poliméricos através de pontes de hidrogénio entre os grupos carboxilo e hidroxilo (Sims et al. 1995).

3.1.6. Patatina

A patatina P é uma proteína da família das glicoproteínas (isomorfas idênticas imunologicamente com massa molecular baixa) extraídas dos subprodutos aquosos

das batatas (Bárta e Bártova 2008). Esta proteína é uma excelente alternativa às proteínas de origem animal dado que diminui os compostos fenólicos totais e os taninos e consequentemente diminui a adstringência (Gambuti et al. 2012). Em termos legais, a patatina não necessita de rotulagem como um potencial alergénio e ainda pode ser marcado como adequado para vegetarianos e *vegans* (Iturmendi et al. 2013).

3.1.7. Quitosano

O quitosano [poli-(b-1/4)-2-amino-2-dioxi-D-glucopiranosose] é um polissacarídeo obtido através da desacetilação total ou parcial da quitina proveniente do exoesqueleto dos crustáceos, endoesqueletos de lulas ou de fungos e leveduras (Tikhonov et al. 2006).

O quitosano possui uma elevada atividade antimicrobiana (Hirano e Nagao 1989), sendo a sua aplicação no vinho, segundo (Renou et al. 2010), eficaz na remoção de *Brettanomyces*.

O facto de este produto ser atóxico a nível alimentar e de relativamente baixo custo, faz com que a sua utilização no vinho seja uma mais-valia. Segundo alguns autores, o quitosano possui uma grande afinidade com os compostos fenólicos do vinho reduzindo o seu potencial de acastanhamento (Spagna et al. 1996).

3.1.8. Proteína de ervilha

A proteína de ervilha é uma possível alternativa às colas de origem animal e já é utilizada em produtos *vegan* pelo facto de não ser geneticamente modificada. Além disso, possui a vantagem de não estar rotulada como um potencial alergénio (Walker et al. 2007)

Segundo Granato et al. (2013), esta proteína não altera a quantidade dos flavonóis oligoméricos, tendo assim pouco impacto nos polifenóis. No entanto, também concluíram que a proteína de ervilha possui grande afinidade com os compostos aromáticos fermentativos, como o éter e os ésteres metílicos de ácidos gordos de cadeia média (heptanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo e decanoato de metilo), de ésteres de acetato e de álcoois de longa cadeia, diminuindo as suas concentrações iniciais em 40-60%.

4. INTERAÇÃO ENTRE AGENTES DE COLAGEM E OS COMPOSTOS DO VINHO BRANCO

A utilização de proteínas como agentes de colagem em vinhos já é uma prática usada há muito tempo. Dependendo das suas características estruturais, incluindo composição, origem e modo de preparação, cada proteína possui um efeito diferente quando interage com os diferentes compostos do vinho, originando vinhos provenientes da mesma matriz com características díspares (Cosme et al. 2008).

As colas proteicas interagem com os compostos fenólicos presentes no vinho através de dois tipos de ligações: pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas (Le Bourvellec e Renard 2012).

O acastanhamento do vinho branco deve-se à vasta abundância de compostos fenólicos suscetíveis à oxidação, provocando uma diminuição da qualidade visual e sensorial dos vinhos. Este processo implica instabilidade no vinho branco e deve-se à oxidação de compostos fenólicos, principalmente catequinas, proantocianidinas e ácidos hidroxicinâmicos (Bravo-Haro et al. 1991; Ricardo-da-Silva et al. 1991). Contudo, nem todos os compostos fenólicos são igualmente suscetíveis à oxidação. De um modo geral, as catequinas e as procianidinas diméricas sofrem mais intensamente este efeito. Os flavonóides são mais predispostos a sofrerem oxidação e são também aqueles que mais facilmente são removidos através da colagem (Lee e Jaworski 1988). Segundo vários estudos, a caseína, o caseinato de potássio e a cola de peixe diminuem significativamente o potencial de acastanhamento e a cor do vinho, tornando-as as colas mais recomendadas para reduzir a oxidação (Schneider 1988; Sims et al. 1995; Cosme et al. 2008; Cosme et al. 2012).

5. Objetivos

A utilização de proteínas vegetais como agentes de colagem no vinho, carece ainda de estudos que verifiquem o seu impacto, quer ao nível das características físico-químicas, quer ao nível das características sensoriais dos vinhos. Neste contexto, a presente dissertação pretende contribuir para um melhor conhecimento da aplicação de proteínas vegetais e de polissacarídeos, comparativamente às tradicionalmente utilizadas, quer nas características físico-químicas, quer nas características sensoriais de vinho branco.

Assim, efetuaram-se ensaios de colagem utilizando diferentes proteínas vegetais, polissacarídeos e agentes de colagem tradicionais da indústria enológica, com o intuito de compará-las quanto à sua influência na concentração de compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides; ácidos fenólicos, cor, características cromáticas, potencial de acastanhamento e na suscetibilidade ao *pinking* do vinho branco; bem como verificar a influência dos produtos selecionados nas características sensoriais do vinho branco.

A necessidade do estudo de produtos alternativos às proteínas de origem animal deve-se ao facto de, nos últimos anos, ter aumentado a procura de alimentos incluindo vinho que durante o seu processamento não entrem em contacto com produtos de origem animal, não só pelos vegetarianos e *vegans*, mas também por outros consumidores que tem preocupações com a sua alimentação, nomeadamente com a ingestão de produtos potencialmente alergénios.

6. Referências

- Allen, M. *Advanced Oenology*. Charles Stur University, 1994.
- Apontamento Histórico. Maio de 2014.
<http://www.cvbaorrada.pt/pt/conteudos/conteudos/scripts/core.htm?p=conteudos&f=conteudos&lang=pt&idcont=108>.
- Baorrada. Maio de 2014. <http://www.infovini.com/pagina.php?codNode=3895>.
- Bárta, J., e V. Bártova. "Patatin, the Major Protein of Potato (*Solanum Tuberosum* L) Tubers, and Its Occurrence as Genotype Effect: Processing Versus Table Potatoes." *Czech Journal of Food Science*, 2008: 347-359.
- Basha, S. M., M. Musingo, e V. S. Colova. "Compositional Differences in the Phenolic Compounds of Muscadine and Bunch Grape Wines." *African Journal of Biotechnology*, 2004: 523-528.
- Bastasin, P., e L. Ceresa. *Industria Agroalimentari*. Milano: Ed. Lucisano, 1991.
- Batista, L., S. Monteiro, V. B. Loureiro, A. R. Teixeira, e R. B. Ferreira. "Protein Haze Formation in Wines Revisited. The Stabilization Effect of Organic Acids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010: 1067-1075.
- Blade, W., e R. Boulton. "Adsorption of Protein by Bentonite in a Model Wine Solution." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1988: 193-199.
- Boulton, R., V. Singleton, L. Bisson, e R. Kunkee. "Principles and Practices of Winemaking." New Delhi: CBS Publishers and Distributors, 1996.
- Bravo-Haro, S., J. C. Rivas-Gonzalo, e C. Santos-Buelga. "Influencia de Distintos Clarificantes Sobre Las Fracciones Polifenólicas Y El Color En Un Vino Tinto Envejecido." *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 1991: 584-590.
- Cantarelli, C, e G. Lanzarini. *Biotechnology Applications in Beverage Production*. London: Elsevier Applied Science, 1989.
- Características Organolépticas. Maio de 2014.
<http://www.cvbaorrada.pt/pt/conteudos/conteudos/scripts/core.htm?p=conteudos&f=conteudos&lang=pt&idcont=168>.
- Cardoso, A. D. *O Vinho - Da Uva à Garrafa*. Âncora Editora, 2007.
- Cattaneo, A., et al. "Assessment of Residual Immunoreactivity in Red or White Wines Clarified with Pea or Lupin Extracts." *International Journal of Tissue Reactions*, 2002: 159-165.
- Cosme, F., I. Capão, L. Filipe-Ribeiro, R. N. Bennett, e A. Mendes-Faia. "Evaluating Potencial Alternatives to Potassium Caseinate for White Wine Fining: Effects on Physicochemical and Sensory Characteristics." *LWT - Food Science and Technology*, 2012: 382-387.
- Cosme, F., J. M. Ricardo-da-Silva, e O. Laureano. "Interactions between Protein Fining Agents and Proanthocyanidins in White Wine." *Food Chemistry*, 2008: 536-544.
- Di Stefano, R. "Chemical Methods in Varietal Characterization." *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 1996: 51-56.
- "Diretiva 2000/13/CE." *Jornal Oficial da União Europeia*, 2000.
- "Diretiva 2003/89/CE ." *Jornal Oficial da União Europeia*, 2003.
- Doner, L., G. Bécard, e P. Irwin. "Binding of Flavonoids by Polyvinylpyrrolidone." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993: 753-757.
- Esteruelas, M., N. Kontoudakis, M. Gil, M. F. Fort, J. M. Canals, e F. Zamora. "Phenolic compounds present in natural haze protein of sauvignon white wine." *Food Research International*, 2011: 77-83.
- Gambut, A., A. Rinaldi, e L. Moio. "Use of Patatin, a Protein Extracted from Potato, as Alternative to Animal Proteins in Fining of Red Wine." *European Food Research and Technology*, 2012: 735-765.
- Granato, T. M., A. Nasi, P. Ferranti, S. Iametti, e F. Bonomi. "Fining White Wine with Plant Proteins: Effects of Fining on Proanthocyanidins and Aroma Components." *European Food Research and Technology*, 2013: 265-274.

- Guerrero, R., P. Smith, e K. A. Bindon. "Application of Insoluble Fibers in the Fining of Wine Phenolics." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013: 4424-4432.
- Haslam, E. "In Vino Veritas: Oligomeric Procyanidins and the Ageing of Red Wines." *Phytochemistry*, 1980: 2577-2582.
- Hirano, S., e N. Nagao. "Effects of Chitosan, Pectic Acid, Lysozyme, Andchitinase on the Growth of Several Phytopathogens." *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989: 3065-3066.
- "ISO 3591:1977 ." *Sensory analysis -- Apparatus -- Wine-tasting glass*. 1977.
- "ISO 4121:2003 ." *Sensory analysis -- Guidelines for the use of quantitative response scales*. 2003.
- Iturmendi, N., V. Moine, V. Renouf, A. Rinaldi, A. Gambuti, e L. Moio. *Vegecoll, a Revolutionary New Vegetal, Allergen-Free Fining Alternative to Gelatine and Egg White*. Dezembro de 2013. <http://www.wineland.co.za/technical/vegecoll%C2%AE-a-revolutionary-new-vegetal-allergen-free-fining-alternative-to-gelatine-and-egg-white>.
- Jones, P. R., R. Gawel, I. L. Francis, e E. J. Waters. "The Influence of Interactions between Major White Wine Components on the Aroma, Flavour, and Texture of Model White Wine." *Food Quality and Preference*, 2008: 596-607.
- Kilmartin, P. A. "The Oxidation of Red and White Wines and Its Impact on Wine Aroma." *Chemistry in New Zealand*, 2009: 18-22.
- Kramling, T. E., e V. L. Singleton. "An Estimate of the Nonflavonoid Phenols in Wines." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1969: 86-92.
- Lamuela-Raventó, R. M., M. Huix-Blanquera, e A. L. Waterhouse. "Treatments for Pinking Alteration in White Wines." *American Journal of Enology and Viticulture*, 2001: 156-158.
- Le Bourvellec, C., e C. M. G. C. Renard. "Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012: 213-248.
- Lee, C. Y., e A. W. Jaworski. ". 1988. "Phenolics and Browning Potential of White Grapes Grown in New York." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1988: 337-340.
- Lefebvre, S., P. Restani, e B. Scotti. "L'utilisation Des Protéines Végétales En Oenologie: Le Point Sur L'autorisation et Les Risques D'allergie." *Revue Française d'Oenologie*, 2003: 10-14.
- Lefebvre, S., Sieczkowski, N., e F. Vidal. " La Sécurité Alimentaire En Oenologie: Cas Des Proteins Végétales." *Revue Française d'Oenologie*, 2005: 23-30.
- Morris, J. R., e G. L. Main. *Fining Agents for Wine*. Proc. 14th NM Conf., 1995.
- OIV. "Récueil de Méthodes Internationeiles D' Analyse Des Vins et Des Moûts." Paris: Edition Officielle., 2006.
- Quinta da Aveleda*. Maio de 2014. www.aveleda.pt.
- Renou, A., A. Bornet, L. Pic-Blateyron, D. Granès, e P. L. Teissedre. "Prévention Du Risque Brettanomyces Par L'utilisation D'un Biopolymère D'origine Fongique: Le Chitosane." *33rd World Congress of Vine and Wine and 8th General Assembly of the OIV*. Tbilisi, Georgia, 2010.
- Ribéreau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Sudraud, e P. Ribéreau-Gayon. "*Traité D'oenologie*." *Science et Techniques Du Vin. Tome 1*. Paris: Dunod, 1972.
- Ribéreau-Gayon, P. "Identification D'esters Des Acides Cinnamiques et de L'acide Tartrique Dans Les Limbes et Les Baies de V. Vinifera." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 1965: 124-162.
- Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, e D. Dubourdieu. *Tratado de Enologia: Química Del Vino, Estabilización Y Tratamientos*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2002.
- Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, e Dubourdieu D. *Handbook of Enology. II: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. Bordeaux: John Wiley and Sons, Ltd, 2006.

- Ricardo-da-Silva, J. M. "Estrutura E Composição Das Procianidinas Da Uva E Do Vinho. Efeitos Potenciais Na Saúde." *3º Simpósio de Vitivinicultura Do Alentejo*, 1995: 343-355.
- Ricardo-da-Silva, J. M., C. Veronique, S. Jean Marc, e M. Michel. "Interaction of Grape Seed Procyanidins with Various Proteins in Relation to Wine Fining." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1991: 111-125.
- Romeyer, F. M., J. C. Sapis, e J. J. Macheix. "Hidroxycinnamic Esters and Browning Potential in Mature Berries of Some Grape Varieties." *Journal Science of Food and Agriculture*, 1985: 728-732.
- Sarmento, M., J. Oliveira, e R. Boulton. "Selection of Low Swelling Materials for Protein Adsorption from White Wines." *Internacional Journal of Food Science and Technology*, 2000: 41-47.
- Schneider, V. "A Caseína - Uma Cola Pouco Conhecida." *Enologia*, 1988: 57-62.
- Siebert, K. J., A. Carrasco, e P. Y. Lynn. "Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996: 1997-2005.
- Silva Ferreira, A. C., T. Hogg, e P. Guedes de Pinho. "Identification of Key-Odorants Related to the Typical Aroma of Oxidation-Spoiled White Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003: 1377-1381.
- Sims, C. A., R. P. Bates, e J. S. Eastridge. "Changes in Phenols, Color and Sensory Characteristics of Muscadine Wines by Pre- and Post-Fermentation Additions of PVPP, Casein and Gelatin." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1995: 155-158.
- Singleton, V. L. "Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1987: 69-77.
- Singleton, V. L., e T. E. Kramling. "Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1976: 157-160.
- Spagna, G., P. G. Pifferi, C. Rangoni, F. Mattivi, G. Nicolini, e R. Palmonari. "The Stabilization of White Wine by Adsorption of Phenolic Compounds on Chitin and Chitosan." *Food Research International*, 1996: 241-248.
- Teissedre, P. L., A. L. Waterhouse, e E. N. Frankel. *Principal Phytochemicals in French Syrah and Grenache Rhône Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low Density Lipoproteins*. 1995.
- Tikhonov, V. E., et al. "Bactericidal and Antifungal Activities of a Low Molecular Weight Chitosan and Its N-2(3)-(dodec-2-Enyl)succinoyl-Derivatives." *Elsevier Carbohydrate Polymers*, 2006: 66-72.
- Togores, J. H. *Tratado de Enología*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2003.
- Tominaga, T., M. L. Murat, e D. Dubourdieu. "Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from Vitis Vinifera L. Cv. Sauvignon Blanc." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998: 1044-1048.
- Úbeda, R. M. *Teoría de La Clarificación de Mostos Y Vinos Y Sus Aplicaciones Prácticas*. Madrid: AMV Ediciones, 2000.
- Verza, S. G., C. Pavei, e G. G. Ortega. "Study of the Specificity of Crosspovidone (PVPP) as Binding Agent in the Quantification of Polyphenolic Compounds." *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2008: 1627-1633.
- Walker, S. L., G. Freeman, e M. C. D. Camarena. "Alternatives to Isinglass for Beer Clarification." *Journal of the Institute of Brewing*, 2007: 347-354.
- Weber, P., H. Steinhart, e A. Paschke. "Investigation of the Allergenic Potential of Wines Fined with Various Proteinogenic Fining Agents by ELISA." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007: 3127-3133.
- Wildenrad, H. L., e V. L. Singleton. "The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and Its Relation to Wine Aging." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1974: 119-126.

Zoecklein, B. W., K. C. Fugelsang, B. H. Gump, e F. S. Nury. *Wine Analysis and Production*. The Chapman & Hall Enology Library.: International Thompson Publishing, 1995.

II. Impact of patatin, chitosan and pea protein on white wine physicochemical and sensory characteristics

(To be submitted to Food Chemistry)

Abstract

The use of non-animal protein fining agents in white wines, lacks of studies namely on their impact, on the physicochemical characteristics, as well as on wine sensorial characteristics. So, the aims of this study is to improve the knowledge of the use of vegetable protein and polysaccharides, as fining agents, as well as to verify their efficiency for future use at industrial scale. Several fining agents have been selected, such as pea protein, potato protein (patatin), chitosan and have been compared with traditional fining agents, such as PVPP and potassium caseinate. Assays were performed in white wine from Bairrada region.

The wine was analysed concerning several physicochemical and sensory parameters, in order to know the impact on wine phenolic composition including phenolic acids, browning potential, colour, and pinking susceptibility.

Overall, it can be concluded that the differences between non-animal and traditional fining agents are not significantly ($p > 0.05$); patatin, potassium caseinate, PVPP and chitosan reduced significantly ($p < 0.05$) the total polyphenol content. The same trend was observed for flavonoid compounds. For non-flavonoid compounds, only pea protein showed no significant differences compared to the control, all other fining agents decreased this parameter. With exception of potassium caseinate, all fining agents decreased wine colour (A_{420nm}) in accordance to the chromatic characteristics. Only *Mix 1* (PVPP, pea protein and cellulose) decreased significantly the browning potential comparatively to the control, this proving the decrease in the concentration of catechin and caffeic acid when comparing to the other fining agents. The pinking susceptibility improved with all fining agents used, except with patatin. Sensory analysis data showed that *Mix 2* (bentonite, PVPP, inert yeast, cellulose) decreased significantly the descriptors fruity, floral and colour.

Keywords: white wine, vegetable protein, phenolic profile, colour, sensory profile

1. Introduction

Fining is one of the least expensive operations in wine production, but one that can have the greatest impact on wine quality. The main objective of this operation is wine stabilization and improving wine sensorial characteristics. For this purpose, different fining agents interact with diverse wine compounds, improving wine physicochemical and sensory characteristics. Fining will be specially used to remove polyphenols compounds, to improve colour stability, to reduce astringency, bitterness and also to improve the wine sensorial profile (Morris and Main 1995).

The interest in using vegetable proteins as wine fining agents has been increasing, mostly since its allergenic potential may be less or non-existent, compared with animal proteins, such as casein and egg albumin. On the other hand, protein fining agents used in white wines, susceptible to develop allergies become necessary to be indicated on the bottle label (OIV 2006).

The alternative fining agents are essentially composed by PVPP, pea protein, yeast cells, cellulose and bentonite. However, it is very difficult to substitute the traditional animal protein fining agents, such as casein/potassium caseinate, since they are well known by the winemakers. Potassium caseinate is a protein that is soluble in water, it is used to eliminate or hide some off-flavours; to diminish white wine colour and to clarify white wines. Its best feature is to eliminate oxidized phenolic compounds or compounds with tendency to oxidation (Morris and Main 1995). A potential non-animal alternative to these fining agents is polyvinylpyrrolidone (PVPP) which can effectively adsorb phenols from white wine (Laborde et al. 2006; Cosme et al. 2012). PVPP binds the phenolic compounds by hydrogen bonds between the PVPP-carbonyl group with the phenolic-hydroxyl groups of simple phenolics and flavonoids (Doner et al. 1993; Verza et al. 2008). Therefore, PVPP could be a possible alternative solution to replace casein/potassium caseinate, however it is much more expensive in spite of its effectiveness at lower concentration (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Pea protein is non-GMO protein and it is used in vegan winemaking. Once it is not considered an allergen, it is a possible alternative to casein/potassium caseinate or gelatine (Walker et al. 2007; Cosme et al. 2012). Pea protein diminishes off-flavours and eliminates quinones, which are responsible for white wines browning (Lefebvre et al. 2003; Lefebvre and

Vidal 2005). Patatin is also a valuable option to replace animal proteins since it lessens total phenolic content and tannins which means it decreases the astringency of the wine (Iturmendi et al. 2013). Chitosan is known to have a great affinity with wine phenolic compounds, reducing its browning potential (Spagna et al. 1996).

However, there is a lack of information related to the impact of non-allergenic fining agents on white wine physicochemical and sensorial characteristic. Therefore, this paper intends to evaluate various non-allergenic fining agents with different origins and composition, using traditional protein fining agents as reference.

2. Material and methods

2.1. Wine sample

A white wine from Bairrada region (Quinta da Aguieira, Portugal) 2013 vintage was used, the main wine characteristics were as follows: alcohol content (%v/v) 11.80, titratable acidity 7.2 g/L (expressed as tartaric acid), volatile acidity 0.48 g/L (expressed as acetic acid), pH 3.41, protein stability heat test 3.43 NTU (unstable > 2 NTU), total phenolic compounds 59 mg/L (expressed as Gallic acid), flavonoids 43 mg/L (expressed as Gallic acid) and non-flavonoids 16 mg/L (expressed as Gallic acid).

2.2. Analysis of conventional oenological parameters

Alcohol, titratable acidity, volatile acidity and pH were analysed using Bacchus micro FTIR (Microderm, France).

2.3. Fining experiments

Fining experiments were performed using commercial fining agents, pea protein, *mix 1* (PVPP, pea protein, cellulose), *mix 2* (bentonite, PVPP, inert yeast, cellulose), patatin, chitosan, casein and PVPP. The oenological products were prepared under the manufacturer's specifications and applied at the average dose indicated by the manufacturer (Table 1). The products were thoroughly mixed, added to each treatment and allowed to stand in contact with the wine in 1000 mL flasks at room temperature for 7 days. Before analysis, the samples were centrifuged at 4.000 rpm during 15 min. All experiments were performed in duplicate.

Table 1 *Oenological fining agents and doses used for the trials*

Codes	Fining agent	Recommended dosage (g/hL)	Applied dosage (g/hL)
T	Control	-	-
PE	Pea protein	10 – 30	20
M1	Mix 1	10 – 50	30
M2	Mix 2	30 – 100	65
PTT	Patatin	5 - 20	12.5
QT	Chitosan	20 – 60	40
CS	Casein	20 – 50	35
PVPP	PVPP	20 – 70	45

Mix 1 - PVPP, pea protein, cellulose; Mix 2 - Bentonite, PVPP, inert yeast, cellulose

2.4. Total phenolic index

The total phenolic index was determined by a spectrophotometric method, using a JASCO – V-530 UV/Vis spectrophotometer, and expressed as a total phenolic index ($TPI = A_{280nm} \times \text{dilution factor}$). All analyses were performed in duplicate.

2.5. Quantification of flavonoid phenols and non-flavonoid phenols

The phenolic content was determined using the absorbance at 280 nm before and after precipitation of the flavonoid phenols through reaction with formaldehyde, according to Kramling and Singleton (1969). Using this method, total phenols and non-flavonoids were determined. Quantification was performed by means of a calibration curve of Gallic acid standard. The results were expressed as Gallic acid equivalents.

2.6. Browning potential

Test tubes were filled with 10 mL of the wine to be tested. Control and test samples were sparged thoroughly with nitrogen and oxygen, respectively. All tubes were sealed hermetically and maintained at 55 °C for 5 days. The test was conducted on treated and untreated wine, and the browning potential was calculated by measuring the increase in A_{420nm} , using a JASCO – V-530 UV/Vis spectrophotometer, in the samples in relation to the control, as recommended by Singleton and Kramling (1976). All analyses were performed in duplicate.

2.7. Colour analysis

Colour was determined by measuring absorbance at 420 nm (10 mm cell) using a JASCO – V-530 UV/Vis spectrophotometer in line with the Organization International de la Vigne et du Vin methods (OIV 2012). All analyses were performed in duplicate.

2.8. Pinking sensitivity index (PSI)

The susceptibility to pinking was determined by measuring absorbance at 400, 410, 420, 500, 600 and 650 nm using a JASCO – V-530 UV/Vis spectrophotometer after the reaction with hydrogen peroxide for 24 hours. If $PSI > 5$, the wine is susceptible to pinking (Lamuela-Raventó et al. 2001).

2.9. Phenolic acids and flavonoid profile

Phenolic acids and flavonoids were performed according to Guise et al. (2014) by Dionex Ultimate 3000 HPLC with a photodiode-array detector. The column was a reverse phase C-18 column (25cm, 4.5mm diameter, 5µm particles, ACE-5). The eluent was constituted by 5% aqueous formic acid (solvent A) and methanol (solvent B). The elution program was the following: 5% of B from zero to 5min. followed by a linear gradient up to 65% of B until 65min and from 65 to 67min down to 5% of B. The flow rate was 1mL/min. Detection was performed from 200 to 650 nm with injection volume 25µL. The identification was made considering their retention times and UV spectra comparing with standards. The chromatograms were recorded at 280 and 325 nm for phenolics in general. Before analysis 50 mL of white wines were vacuum concentrated at 30 °C and the solid residue was dissolved in 2 mL of aqueous methanol solution (1:1). All analyses were performed in duplicate.

2.10. Chromatic characteristics

The absorption spectra of wine samples were recorded with a spectrophotometer scanned from a range of 380 nm to 770 nm, using 1 cm path length quartz cells. Data were collected to determine a measure of L^* (lightness), a^* (redness), and b^* (yellowness) coordinates using the CIELab method according to Organization International de la Vigne et du Vin (OIV, 2006). The Chroma [$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$] and hue-angle [$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$] values were also determined. To distinguish

the colour more accurately, the difference was calculated using the following equation: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ and reported in CIELab units. This allows reliable quantification of the overall colour difference, a sample when compared to a reference sample (unfined wine). Colour differences can be distinguished by the human eye when the difference between ΔE^* values are greater than two units (Spagna et al. 1996). All analyses were performed in duplicate.

2.11. Sensory analysis

The sensory analysis was performed by a trained panel with extensive wine tasting experience. The samples were stored at appropriate light and temperature conditions. Samples were presented to the panel in tasting glasses marked with three letters and in randomized order. Thirteen attributes were selected: visual (colour, limpidity), aroma (fruity, floral, vegetable, oxidized, chemist) and taste (sweetness, acidity, bitter, body, taste balance, persistence). The attributes were quantified using a ten-point intensity scale (ISO 4121:2003). Total sensory score was calculated for each wine as the sum of an average score of visual, aroma and taste attributes. All evaluations were conducted according to standardized procedures (ISO 3591:1977).

2.12. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analyses were carried out using Statistica 7 software (Statsoft, OK, USA) program. One-way ANOVA was used to compare both physicochemical and sensory data. Tukey honestly significant difference (HSD, 5% level) test was applied to physicochemical data to determine significant differences between the fining treatments. Duncan's multiple range test (MRT) was applied to sensory data to determine significant differences between the fining treatments. The model was statistically significant when p values were less than 0.05. Principal component analysis (PCA) was carried out to identify patterns between wine treatments and sensorial analysis.

3. Results and discussion

3.1. Effect of oenological fining agents on phenolic compounds, colour and chromatic characteristics

The results (Table 2) indicate that comparatively to the untreated wine (T), only patatin (PTT), casein (CS), PVPP and chitosan (QT) decreased significantly total phenol content, about 8.6%. The same tendency was observed for the results of flavonoids that decreased between 8.2 and 9.0% in relation to the untreated wine (T) after application of patatin (PTT), casein (CS), PVPP and chitosan (QT). Regarding the concentrations of non-flavonoids, only pea protein (PE) shows no significant differences in relation to the untreated wine (T), whereas the other oenological fining agents decreased significantly the non-flavonoid content (11-13%).

All fining agents tested decreased (15-25%) significantly wine colour ($A_{420\text{ nm}}$), with exception of the wine fined with casein (CS). These results are in line with the value obtained for the b^* value (yellowness) with the Cielab method. Lightness was maintained in all wines, except in the wine fined with chitosan where lightness was improved. Results showed that a^* values are negative and b^* values are positive, which means that the colour of the wine is positioned at 2° quadrant of the colour space defined by the variables ($-a^*$) and ($+b^*$) where is positioned the colour green to yellow, which means that these wines have a yellow-green matrix (Table 2).

The colour variation (ΔE^*) which is the geometric mean of ΔL^* , Δa^* and Δb^* , can be visually discriminated by the human eye when it is greater than 2 CIELab units. Only wine fined with casein obtained a slightly higher value than 2 (2.06). However, as this value is very close to 2, it is not relevant to the perception of the human eye.

Table 2 Effect of oenological fining agents on total phenolic index (TPI), total phenols, flavonoid and non-flavonoid phenols, chromatic characteristics and colour of white wine (mean± SD)

Fining treatment	TPI	Non-flavonoid (mg/L Gallic acid)	Flavonoid (mg/L Gallic acid)	Total phenols (mg/L Gallic acid)	Chromatic characteristics						
					L*(%)	a*	b*	C*	h°	ΔE*	Colour
T	58±0 ^a	18±1 ^a	203±0 ^a	220±1 ^a	98.3±0.2 ^{a,b}	-1.14±0.08 ^{a,b}	3.76±0.06 ^a	3.93±0.06 ^a	180.29±0.02 ^{a,b,c}	-	0.180±0.011 ^a
PE	57±0 ^a	18±0 ^a	200±6 ^a	218±6 ^a	98.0±0.2 ^{a,b}	-0.98±0.12 ^{a,b}	3.41±0.10 ^a	3.55±0.10 ^a	180.28±0.04 ^{a,b}	0.57±0.26 ^a	0.153±0.009 ^b
M1	57±0 ^a	16±0 ^b	203±2 ^a	200±6 ^a	97.6±0.6 ^{a,b}	-1.14±0.04 ^{a,b}	2.90±0.46 ^a	3.12±0.46 ^a	180.38±0.06 ^{a,b,c}	1.18±0.85 ^a	0.147±0.013 ^c
M2	56±0 ^a	16±1 ^b	199±6 ^a	215±4 ^a	97.8±0.9 ^{a,b}	-1.07±0.06 ^{a,b}	2.88±0.70 ^a	3.08±0.70 ^a	180.37±0.10 ^{a,b,c}	1.11±0.98 ^a	0.148±0.016 ^c
PTT	53±0 ^b	14±0 ^c	188±6 ^b	202±6 ^b	97.3±0.8 ^{a,b}	-1.13±0.06 ^{a,b}	2.54±0.62 ^a	2.78±0.62 ^a	180.43±0.09 ^{b,c}	1.65±1.11 ^a	0.135±0.016 ^d
CS	53±0 ^b	14±0 ^c	187±4 ^b	201±4 ^b	96.5±1.9 ^a	-0.94±0.22 ^a	3.62±0.53 ^a	3.75±0.53 ^a	180.26±0.09 ^a	2.06±1.89 ^a	0.172±0.005 ^a
PVPP	53±0 ^b	12±0 ^d	188±1 ^b	200±2 ^b	97.4±0.5 ^{a,b}	-1.22±0.04 ^b	2.53±0.42 ^a	2.81±0.42 ^a	180.46±0.08 ^c	1.54±0.57 ^a	0.143±0.012 ^d
QT	53±0 ^b	14±1 ^c	187±3 ^b	201±2 ^b	98.7±0.8 ^b	-0.90±0.13 ^a	3.59±0.60 ^a	3.71±0.60 ^a	180.26±0.08 ^a	1.11±0.29 ^a	0.153±0.024 ^b

Untreated wine (T), pea protein (PE), mix 1 (M1), mix 2 (M2), patatin (PTT), casein (CS), polyvinylpyrrolidone (PVPP) and chitosan (QT). TPI – total phenolic index, L* (%) – lightness, a* - redness, b* - yellowness, C* - Chroma, h° - hue angles, The values corresponding to ΔE* - were obtained taking as a reference the unfined wine. Means within a column followed by the same letter are not significantly different, $p < 0.05$.

3.2. Effect of oenological fining agents on browning potential and pinking

The main objective of white wine fining is to clarify and to eliminate, by adsorptive precipitation, those compounds that could lead to turbidity or changes in colour. Some oenological fining agents minimize browning potential of white wines by removing phenolic compound of low molecular weight. Browning potential of white wine is due to the oxidation of polyphenols, meaning that the presence of large quantities of phenolic compounds increases susceptibility to oxidation, causing a decrease in wine's visual and sensory qualities.

The results presented in Table 3, showed that M1, was the only fining agent that decreased significantly the browning potential of the white wine. These results could be explained by the reduction of compounds that have more tendencies to oxidation such as catechin and phenolic acids.

Relatively to pinking sensitivity index (PSI), it is shown that the wine used in this work presented low risk of pinking (that means $PSI < 5$) (Lamuela-Raventó et al. 2001; Ribéreau-Gayon et al. 2006). All the fining agents tested reduce the wine sensitivity to the pinking, with exception of patatin. PVPP was the fining agent that reduced more the PSI, and is normally the fining agent recommended to treat wines with high risk of pinking.

Table 3 Effect of oenological fining agents on browning potential and susceptibility to pinking (PSI)(mean±SD)

Fining treatment	Browning potential	PSI
T	0.033±0.019 ^a	2.46±0.28
PE	0.035±0.008 ^a	1.94±0.54
M1	0.006±0.009 ^b	1.69±0.97
M2	0.023±0.017 ^a	1.73±0.99
PTT	0.079±0.034 ^c	2.52±0.31
CS	0.013±0.018 ^a	1.82±0.04
PVPP	0.017±0.011 ^a	0.84±0.20
QT	0.014±0.020 ^a	1.17±0.31

Untreated wine (T), pea protein (PE), mix 1 (M1), mix 2 (M2), patatin (PTT), casein (CS), polyvinylpyrrolidone (PVPP) and chitosan (QT). Means within a column followed by the same letter are not significantly different, $p < 0.05$.

3.3. Quantitative effects of oenological fining agents on catechin and phenolic acids

Phenolic acids are presented in white wine usually combined with other molecules (Batista, et al. 2010) proving mainly from the grape pulp (Basha et al. 2004), they include cinnamic and benzoic acids and are one of the major classes of compounds in *Vitis vinifera* (Zoecklein et al. 1995).

Phenolic acids and flavonoids were also analysed by HPLC and the results are presented in Table 4. In general, no significant differences were observed among unfined and fined wines, with exception of the wine fined with M1 that showed a significant decrease in catechin (2.2%) and caffeic acid (6.5%) when comparing with the untreated wine (Table 4). The results are in accordance to the results obtained for the browning potential observed in Table 3 after application of the mix M1.

After addition of pea protein an increase in the percentage of coumaric acid was observed. The increase observed in some phenolic compounds may be related to the hydrolysis of other compounds (Esteruelas et al. 2011). The phenolic compounds, ferulic acid, ethyl caffeic and ethyl coumaric were present in minor quantity in this wine and remained unchanged after treatment.

Table 4 Effect of oenological fining agents on the percentage of area of catechin and phenolic acids determined by HPLC of white wine (mean±SD)

Fining Treatment	Gallic acid	catechin	<i>trans</i> -caftaric acid	2-S-glutathionylcaftaric acid	coutaric isomeric acid	coutaric acid	caffeic acid	4-hydroxycumaric acid	ferulic acid	ethyl caffeic acid	ethyl coumaric acid
T	13.814±3.316 ^a	86.186±3.316 ^a	2.577±0.366 ^a	49.619±0.147 ^a	0.462±0.014 ^a	1.553±0.171 ^a	26.954±0.113 ^a	7.833±0.029 ^a	2.946±0.027 ^a	6.528±0.268 ^a	1.527±0.027 ^a
PE	13.664±1.162 ^a	86.336±1.162 ^a	2.506±0.181 ^a	48.329±0.871 ^b	0.482±0.028 ^a	1.699±0.107 ^b	27.479±0.659 ^a	8.126±0.158 ^b	2.971±0.086 ^a	6.827±0.177 ^a	1.582±0.053 ^a
M1	15.715±0.556 ^a	84.285±0.556 ^a	2.707±0.225 ^a	50.841±0.565 ^c	0.544±0.004 ^a	1.400±0.010 ^c	25.200±0.396 ^{b,c}	7.868±0.145 ^a	3.058±0.072 ^a	6.779±0.130 ^a	1.603±0.033 ^a
M2	9.668±1.464 ^a	90.332±1.464 ^a	2.846±0.046 ^a	49.759±0.075 ^a	0.519±0.010 ^a	1.354±0.031 ^c	26.313±0.027 ^{a,b}	7.889±0.001 ^a	3.010±0.010 ^a	6.725±0.003 ^a	1.586±0.008 ^a
PTT	13.647±1.906 ^a	86.353±1.906 ^a	2.336±0.076 ^a	49.093±0.390 ^b	0.539±0.011 ^a	1.330±0.010 ^c	27.123±0.383 ^a	7.940±0.128 ^a	3.290±0.222 ^b	6.808±0.006 ^a	1.542±0.018 ^a
CS	9.937±0.245 ^a	90.063±0.245 ^a	2.784±0.060 ^a	48.944±0.309 ^b	0.698±0.262 ^a	1.305±0.096 ^c	26.972±0.024 ^a	7.925±0.015 ^a	3.039±0.000 ^a	6.762±0.046 ^a	1.570±0.004 ^a
PVPP	8.377±4.198 ^a	91.623±4.198 ^a	3.020±0.206 ^a	51.265±0.516 ^d	1.004±0.075 ^a	1.477±0.021 ^a	24.228±0.274 ^c	7.722±0.068 ^a	2.981±0.026 ^a	6.701±0.014 ^a	1.602±0.009 ^a
QT	10.714±2.222 ^a	89.286±2.222 ^a	2.508±0.348 ^a	48.716±0.102 ^b	0.701±0.274 ^a	1.249±0.066 ^c	27.364±0.308 ^a	7.964±0.098 ^a	3.096±0.045 ^a	6.841±0.125 ^a	1.561±0.011 ^a

Untreated wine (T), pea protein (PE), mix 1 (M1), mix 2 (M2), patatin (PTT), casein (CS), polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and chitosan (QT). Means within a column for each wine followed by the same letter are not significantly different (Tukey, $p < 0.05$).

3.4. Effect of oenological fining agents on the wine sensory profile

The wine is a complex matrix with a lot of chemical components, their composition and relative quantity influence there sensory characteristics, but also winemaking techniques, such as fining treatment can induce changes (Jones et al. 2008).

After sensory analysis, only the wine fined with M2 presented significant differences ($p<0.05$) in the descriptors colour, fruity, and floral in relation to the untreated wine, being less scored as shown in Table 5..

Table 5 Effect of oenological fining agents on white wine sensorial profile (mean $\pm$ SD)

Descriptors	Fining Treatments							
	T	PE	M1	M2	PTT	CS	PVPP	QT
Colour	5 $\pm$ 1 ^{a,b}	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	3 $\pm$ 1 ^b	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^{a,b}	5 $\pm$ 1 ^{a,b}
Limpidity	4 $\pm$ 2 ^a	4 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	4 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 1 ^a
Fruity	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^{a,b}	5 $\pm$ 1 ^{a,b}	3 $\pm$ 1 ^b	5 $\pm$ 2 ^{a,b}	4 $\pm$ 2 ^{a,b}	5 $\pm$ 2 ^{a,b}	5 $\pm$ 2 ^{a,b}
Floral	5 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 1 ^{a,b}	5 $\pm$ 1 ^{a,b}	3 $\pm$ 1 ^b	4 $\pm$ 2 ^{a,b}	4 $\pm$ 1 ^{a,b}	4 $\pm$ 2 ^{a,b}	4 $\pm$ 1 ^{a,b}
Vegetable	3 $\pm$ 1 ^a	3 $\pm$ 2 ^a	3 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 2 ^a	3 $\pm$ 2 ^a	3 $\pm$ 1 ^a	2 $\pm$ 2 ^a	3 $\pm$ 2 ^a
Oxidised	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	4 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a
Chemist	3 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 2 ^a	3 $\pm$ 2 ^a	4 $\pm$ 3 ^a	3 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 3 ^a	4 $\pm$ 3 ^a	5 $\pm$ 3 ^a
Sweetness	6 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a
Acidity	6 $\pm$ 1 ^a	7 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	7 $\pm$ 2 ^a	7 $\pm$ 1 ^a	7 $\pm$ 2 ^a
Bitterness	4 $\pm$ 3 ^a	3 $\pm$ 2 ^a	4 $\pm$ 3 ^a	4 $\pm$ 3 ^a	3 $\pm$ 3 ^a	3 $\pm$ 3 ^a	4 $\pm$ 3 ^a	3 $\pm$ 2 ^a
Body Balance	6 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 1 ^a
Flavour Balance	6 $\pm$ 1 ^a	7 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 2 ^a
Persistence	6 $\pm$ 1 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 2 ^a

Untreated wine (T), pea protein (PE), mix 1 (M1), mix 2 (M2), patatin (PTT), casein (CS), polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and chitosan (QT). Means within a column for each wine followed by the same letter are not significantly different (Duncan, $p<0.05$).

The sensory profile of each treatment is shown graphically in Figure 1, where the sum of the values assigned by the panelists for each attribute is marked on the corresponding axis. The centre of the graphic represents the lowest point of the scale used in the evaluation, while the intensity increases from the centre to the periphery. Generally, the attributes most pointed were acidity, body balance, flavour balance and sweetness.

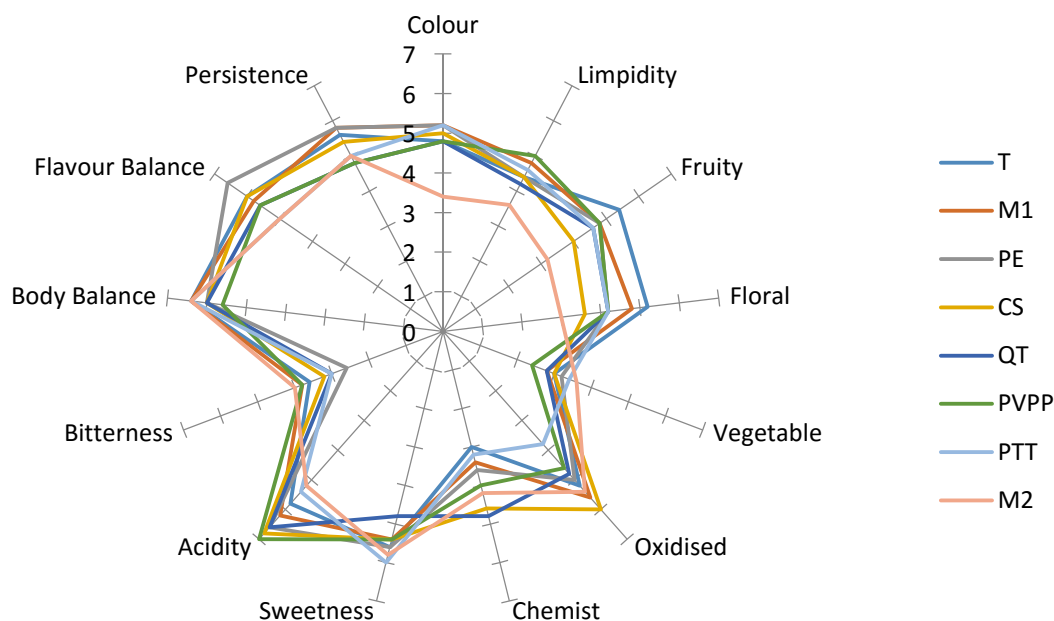


Figure 1 Sensory profile of white wine treated with different fining agents obtained by mean of scores given by the pannelists (Untreated wine (T), pea protein (PE), mix 1 (M1), mix 2 (M2), patatin (PTT), casein (CS), polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and chitosan (QT).

To better understand the effect of the different treatments on wine sensorial attributes PCA (Principal Component Analysis) analysis was carried out, as shown in figure 2. The PCA analysis of wine treated with the various fining agents (Figure 2), showed that the first component accounted for 38.33% of the total variance and the second component 25.74%, representing the first two factorial axes 64.07%. In a PCA analysis, if both the first three components accumulate a relative high percentage of the total variation, in general above 70%, they satisfactory explain the variability among the samples tested (Mardia et al. 1979). Among the sensorial attributes assessed in the wines submitted to the different treatments, it is possible to discriminated three groups as followed: group I with T, PTT, MT; group II with PVPP, QT, CS, PE and group III with M2 (Figure 2).

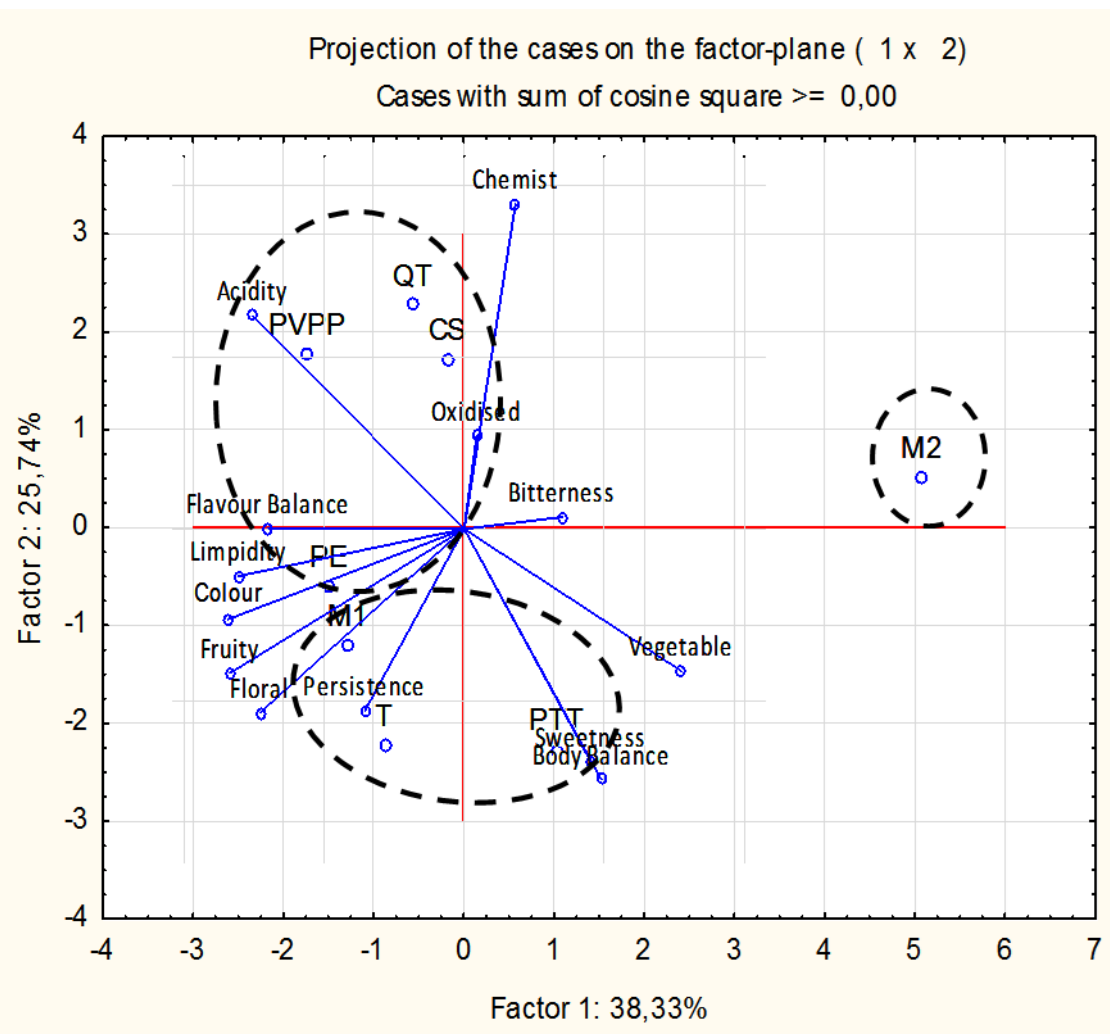


Figure 2 PCA analysis projection of sensorial data of fined wines (Untreated wine (T), pea protein (PE), mix 1 (M1), mix 2 (M2), patatin (PTT), casein (CS), polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and chitosan (QT)).

4. Conclusions

The result obtained in this work, shows that pea protein, chitosan and patatin could be a valid non-animal fining agents that could be used as an alternatives to the animal fining agents, like casein/potassium caseinate. However, the interaction of those products with the different phenolic compounds is different, that means, that previous study of the wine phenolic profile could help to choose the most indicated fining agent in each case, also depends on the fining objective of the winemaker. All of them reduce phenolic compounds, and wine colour, however the sensorial impact is acceptable. The fining agent tested, that reduces more the pinking sensitivity was PVPP.

5. References

- Basha, S. M., M. Musingo, e V. S. Colova. "Compositional Differences in the Phenolic Compounds of Muscadine and Bunch Grape Wines." *African Journal of Biotechnology*, 2004: 523-528.
- Batista, L., S. Monteiro, V. B. Loureiro, A. R. Teixeira, e R. B. Ferreira. "Protein Haze Formation in Wines Revisited. The Stabilization Effect of Organic Acids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010: 1067-1075.
- Doner, L., G. Bécard, e P. Irwin. "Binding of Flavonoids by Polyvinylpyrrolidone." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993: 753-757.
- Esteruelas, M., N. Kontoudakis, M. Gil, M. F. Fort, J. M. Canals, e F. Zamora. "Phenolic compounds present in natural haze protein of sauvignon white wine." *Food Research International*, 2011: 77-83.
- Guise, R., Filipe-Ribeiro, L., Nascimento, D., Bessa, O., Nunes, F. M., Cosme, F. (2014). Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chemistry*, 156, 250-257.
- "ISO 3591:1977 ." *Sensory analysis -- Apparatus -- Wine-tasting glass*. 1977.
- "ISO 4121:2003 ." *Sensory analysis -- Guidelines for the use of quantitative response scales*. 2003.
- Iturmendi, N., V. Moine, V. Renouf, A. Rinaldi, A. Gambuti, e L. Moio. *Vegecoll, a Revolutionary New Vegetal, Allergen-Free Fining Alternative to Gelatine and Egg White*. Dezembro de 2013. <http://www.wineland.co.za/technical/vegecoll%C2%AE-a-revolutionary-new-vegetal-allergen-free-fining-alternative-to-gelatine-and-egg-white>.
- Jones, P. R., R. Gawel, I. L. Francis, e E. J. Waters. "The Influence of Interactions between Major White Wine Components on the Aroma, Flavour, and Texture of Model White Wine." *Food Quality and Preference*, 2008: 596-607.
- Lamuela-Raventó, R. M., M. Huix-Blanquera, e A. L. Waterhouse. "Treatments for Pinking Alteration in White Wines." *American Journal of Enology and Viticulture*, 2001: 156-158.
- Lefebvre, S., P. Restani, e B. Scotti. "L'utilisation Des Protéines Végétales En Oenologie: Le Point Sur L'autorisation et Les Risques D'allergie." *Revue Française d'Oenologie*, 2003: 10-14.
- Lefebvre, S., Sieczkowski, N., e F. Vidal. " La Sécurité Alimentaire En Oenologie: Cas Des Proteins Végétales." *Revue Française d'Oenologie*, 2005: 23-30.
- Morris, J. R., e G. L. Main. *Fining Agents for Wine*. Proc. 14th NM Conf., 1995.
- OIV. "Recueil des Methodes Internationales d'Analyse des Vins et Moûts". Organisation International de la Vigne et du Vin, Paris, 2012.
- Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, e Dubourdieu D. *Handbook of Enology. II: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. Bordeaux: John Wiley and Sons, Ltd, 2006.
- Singleton, V. L., e T. E. Kramling. "Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity." *American Journal of Enology and Viticulture*, 1976: 157-160.
- Spagna, G., P. G. Pifferi, C. Rangoni, F. Mattivi, G. Nicolini, e R. Palmonari. "The Stabilization of White Wine by Adsorption of Phenolic Compounds on Chitin and Chitosan." *Food Research International*, 1996: 241-248.
- Verza, S. G., C. Pavei, e G. G. Ortega. "Study of the Specificity of Crosspovidone (PVPP) as Binding Agent in the Quantification of Polyphenolic Compounds." *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2008: 1627-1633.
- Walker, S. L., G. Freeman, e M. C. D. Camarena. "Alternatives to Isinglass for Beer Clarification." *Journal of the Institute of Brewing*, 2007: 347-354.

Zoecklein, B. W., K. C. Fugelsang, B. H. Gump, e F. S. Nury. *Wine Analysis and Production*. The Chapman & Hall Enology Library.: International Thompson Publishing, 1995.

III. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho pretendeu evidenciar a importância da utilização de agentes clarificantes de origem não animal no processo de colagem do vinho branco.

Para alcançar os objetivos propostos, foram realizadas ensaios de colagem com cinco produtos enológicos diferentes e duas misturas.

Verificou-se no presente trabalho que qualquer um dos produtos testados poderá substituir os produtos de origem animal, sem afetar significativamente o produto final. O vinho colado com proteína de ervilha, patatina, PVPP e quitosano abrange assim todo o tipo de dietas incluindo a vegetariana e *vegan* uma vez que não foi utilizado qualquer tipo de clarificante de origem animal no seu processamento.

Além disso, podemos concluir que de um modo geral todos os agentes de colagem testados reduzem a composição fenólica do vinho branco bem como a sua cor. No entanto, convém salientar que estes resultados devem ser encarados como preliminares, sendo necessário realizar mais estudos com outros tipos de vinhos de outras castas e regiões que apresentem diferentes perfis fenólicos e sensoriais, no sentido de se aprofundar e conhecer melhor as interações de cada cola com os diferentes compostos fenólicos, verificando simultaneamente o seu impacto sensorial.

IV. ANEXOS

ANEXO A – Ficha de Prova da Análise Sensorial

Escala de 1 a 10 (1-péssimo e 10 excelente)

Provedor: _____

Ficha de prova

Características		Descritor	Código das amostras																		
Aspecto	Cor	Palha, c1r10																			
		Limpidez																			
		-1, +10																			
Aroma		Frutado																			
		-1, +10																			
		Floral																			
		-1, +10																			
	Vegetal																				
	1, 10																				
	Oxidado																				
	1, 10																				
	Químico																				
	1, 10																				
Sabor	Doçura	desq1, eq10																			
	Acidez	desq1, eq10																			
	Amargo	1, 10																			
Vol. gustativo	-1, +10																				
Equil. gustativo	-1, +10																				
Persistência	-1, +10																				

Escala de 1 a 10 (1-péssimo e 10-excelente)