



**Efeito nas Características Físico-Químicas de Vinhos cv  
Touriga Nacional e Trincadeira de Colagem com Proteínas  
Vegetais**

**Ana Cristina Carvalheira Laranjo Romão**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Viticultura e Enologia**

Orientador: Olga Maria Carrasqueira Laureano, Investigadora Coordenadora do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Júri:

PRESIDENTE - Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

VOGAIS - Licenciada Olga Maria Carrasqueira Laureano, Investigadora Coordenadora do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Baoshan Sun, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Lisboa, 2012

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho só foi possível devido ao valioso contributo de um elevado número de pessoas que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a sua execução. Venho deste modo agradecer a esse grupo de pessoas e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até este momento, momento este que marca mais uma etapa da minha vida e, a transição para outra, fora do mundo académico e do meu actual percurso de vida profissional.

Começo por agradecer à minha orientadora, Investigadora Coordenadora Olga Maria Carrasqueira Laureano, pelos esclarecimentos prestados, não só para a elaboração deste trabalho, como ao longo do mestrado, cujos sábios ensinamentos, me proporcionaram aprofundar os conhecimentos na área da Enologia. Agradeço também a preocupação demonstrada ao longo de toda a elaboração da parte prática deste trabalho.

Ao Professor Jorge Ricardo-da-Silva, pelos valiosos ensinamentos ao longo do curso e pela disponibilidade demonstrada para a realização do delineamento das análises deste trabalho, assim como no esclarecimento de dúvidas.

Agradeço também às empresas privadas que estiveram envolvidas e sem as quais não teria sido possível a realização do presente trabalho, Enartis, Eccofiltra, AEB Group e Proenol que, através da disponibilização das colas usadas, permitiram o presente estudo.

À D.Graziela Rodrigues e à Maria Júlia Barata, funcionárias do Laboratório de Enologia Ferreira Lapa, pelo apoio na realização das análises e esclarecimento de dúvidas no HPLC. À Rosario Pinto pelo apoio logístico, nas fotocópias de documentos de trabalho e no envio de dados dos ensaios para o meu endereço de e-mail. Ao Sr. António Marçal, por ter cuidado de todo o processo de vinificação e conservação do vinho, com toda a dedicação.

À minha amiga Inês Morais, pela ajuda na revisão de textos e pelo apoio nas etapas mais difíceis deste trabalho.

Por fim, quero agradecer aos meus filhos João Pedro e Guilherme, pela compreensão na minha ausência como mãe, e pelo carinho dado, mesmo quando não estava disponível para estar com eles. Aos meus pais, ao meu irmão Paulo, à minha cunhada Jussara e sobrinha Sara, que me têm apoiado incondicionalmente e que tiveram um papel primordial neste estudo, fornecendo o background emocional imprescindível a um trabalho desta envergadura. Um agradecimento especial à minha mãe, pela sua força interior, pela sua generosidade de carácter, pelo seu amor incondicional, pelo apoio e incentivo, por ser sempre a minha rectaguarda.

## RESUMO

Nos nossos dias a colagem é ainda uma técnica na qual os mecanismos e as suas consequências não estão totalmente definidas. Considerando a complexidade dos fenómenos e das dificuldades referentes à análise dos principais compostos implicados (colóides, taninos, proteínas), só alguns autores citados propuseram teorias que explicam estes mecanismos. O seu objectivo é a clarificação e redução do teor fenólico, relativamente em particular a excesso de adstringência em vinhos. As colas proteicas utilizadas em Enologia apresentam uma composição físico-química variada, em que a distribuição da massa molecular e a densidade de carga de superfície influenciam as propriedades da cola proteica.

Assim sendo, o assunto das proteínas vegetais na colagem dos vinhos segue as diferentes etapas impostas pelo O.I.V. e pela regulamentação portuguesa e europeia. Algumas conclusões retiradas até ao momento indicam que as proteínas vegetais, sobre os vinhos tintos, reagem como as gelatinas, sendo até mais activas na clarificação e/ou degustação. De modo geral, originam também menor volume de borra, não modificam a intensidade corante, nem a tonalidade, e ligam-se fortemente aos taninos.

O presente trabalho estudou o efeito de colas não-tradicionais com a composição físico-química em vinhos, nomeadamente os parâmetros da cor, comparados com os obtidos com a bentonite e ovalbumina.

Em todas as colas utilizadas, verificou-se uma diminuição na intensidade da cor, antocianas totais, antocianas coloridas e taninos, embora mais pronunciada nas não-tradicionais. Da análise dos cromatogramas, verificou-se uma diminuição da concentração de antocianinas, em particular das aciladas.

Os resultados obtidos com as colas não convencionais demonstraram que estas conduzem a um decréscimo menos acentuado dos parâmetros de cor do que os obtidos com a albumina de ovo.

Palavras-chave: Touriga Nacional, Trincadeira, Antocianas, proteínas vegetais, extrato de levedura, HPLC.

## ABSTRACT

Currently, wine fining is still a common practice, in which, the mechanisms and consequences are not entirely defined. Considering the complexity of the phenomena and the difficulties related to the analysis of the main compounds involved (colloids, tannins, proteins), only a few authors cited proposed theories that explain these mechanisms.

The main goal is the clarification and decrease of phenolic compounds, regarding in particular the excess of astringency in wines. Protein fining agents used in Enology present a varied physico-chemical composition subsequently, the distribution of molecular weight and charge density influence their properties.

Meanwhile, the increasing problems during the 90s (last century) with the BSE disease, led the oenological industry, to a certain deal of concern, regarding the products used, particularly in fining agents used in wines. As a result, the subject of plant proteins for collage in wines followed the phases imposed by the OIV, Portuguese and European regulations.

The present work studied the effect of fining agents from vegetable and microbiological proteins on the physico-chemical composition in wines, in particular anthocyanins. The results were compared with the ones obtained by using bentonite and egg albumin.

In the laboratory the following analyses had been made: measurements on the physico-chemical parameters of color, using Somers method, and assays of high pressure liquid chromatography (HPLC), to verify the effect of the fining treatment on total amount of anthocyanins.

In all fining agents used, there was a decrease in color intensity, total anthocyanins, colored anthocyanins and tannins, although was more pronounced in non-traditional fining agents. For the chromatograms it was verified a decrease in the anthocyanin concentrations.

This results obtained with non conventional fining agents led to a smaller decrease than the results from the traditional protein fining agents, concerning the anthocyanins parameters and the decreasing of tannins, involved in astringency.

Keywords: Touriga Nacional, Trincadeira, anthocyanins, plant protein, yeast extract, HPLC.

## EXTENDED SUMMARY

Currently, wine fining is still a common practice, in which, the mechanisms and consequences are not entirely defined. Considering the complexity of the phenomena and the difficulties related to the analysis of the main compounds involved (colloids, tannins, proteins), only a few authors have proposed theories explaining these mechanisms.

The main goal, of this technique, is the clarification and decrease of phenolic compounds, regarding in particular the excess of astringency in wines. The protein fining agents used in Enology present a varied physico-chemical composition subsequently, the distribution of molecular weight and charge density influence his own properties .

Meanwhile, the increasing problems in the food sector during the 90s, of the last century with the BSE disease, led the oenological industry, legislators and consumers to a certain deal of concern, regarding the products used in the treatment and storage of food products, particularly in fining agents used in wines. As a result, the subject of plant proteins for collage in wines followed the phases imposed by the OIV, Portuguese and European regulations.

From oenological point of view, vegetable proteins show efficiency and reliability in fining treatment both in wine or grape must. Conclusions indicate so far, that plant proteins, used in red wines had the same reaction as gelatins, being even more active in the clarification and / or tasting than the last ones. Generally, they also originate a lower volume of sludge, do not change the color intensity and strongly bind to tannins.

The present work studied the effect of fining agents from vegetable and microbiological proteins on the physico-chemical composition in wines (Touriga Nacional and Trincadeira varieties), in particular anthocyanins. The results were compared with the ones obtained the using bentonite and egg albumin.

In the laboratory the following analyses had been made: measurements on the physico-chemical parameters of color, using Somers method, and assays of high pressure liquid chromatography (HPLC), to verify the effect of the fining treatment on total amount of anthocyanins on both varieties.

In all fining agents analyzed, there was a decrease in color intensity, total anthocyanins, colored anthocyanins and tannins, although was more pronounced in non-traditional fining agents. For total pigments and polymerized pigments, the values obtained were quite similar between albumin and non-traditional fining agents (vegetable proteins). For the chromatograms it was verified a decrease in the anthocyanin concentrations, particularly in acylated anthocyanins. .

This results obtained with non conventional fining agents led to a smaller decrease then the results from the tradicional protein fining agents, concerning the anthocyanins parameters and the decreasing of tanins, involved in astringency.

Keywords: Touriga Nacional, Trincadeira, anthocyanins, plant protein, yeast extract, HPLC.

## Índice

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. A Colagem.....	3
2.2. As Colas.....	10
2.2.1. Proteínas vegetais.....	11
2.2.2. Envelopes celulares de levedura.....	14
2.2.3. Bentonite.....	18
2.2.4. Albumina (clara de ovo).....	19
2.3. Antocianinas.....	20
2.3.1. Factores que influenciam a estabilidade das antocianinas.....	26
2.3.2. Antocianinas no vinho.....	27
2.3.3. A cor dos vinhos.....	28
3. Objectivos.....	29
4. Materiais e Métodos.....	29
4.1. Determinações Analíticas.....	31
4.1.1. Caracterização Geral.....	31
4.1.2. Determinações Específicas.....	32
4.1.2.1. Caracterização da Cor e composição fenólica.....	33
5. Resultados e Discussão.....	37
6. Conclusões.....	61
7. Bibliografia.....	63
ANEXOS.....	71

## Índice de Figuras

Figura 1- Estrutura das antocianidinas existentes na natureza. ....	22
Figura 2 – Equilíbrio das antocianidinas em função do pH. ....	23
Figura 3 – Estrutura de : (a) 3-glucósidos de antocianidinas; (b) 3,5-diglucósidos de antocianidinas.....	24
Figura 4 – Estruturas da malvidina 3-glucósido e respectivos ésteres acilados (adaptado de Mateus,2002) .....	25
Figura 5 – Fotografia com ensaio de colagem em garrafa .....	30
Figura 6 – Curva de Calibração da catequina .....	35
Figura 7– Evolução ao longo do tempo da Intensidade da cor nos ensaios testemunha para a casta Trincadeira. ....	37
Figura 8– Evolução ao longo do tempo da Intensidade da Cor nos ensaios testemunha para a casta Touriga Nacional. ....	38
Figura 9 - Valores da turbidez média para a casta Trincadeira na testemunha (T) e nas concentrações mais baixa (C1) e mais elevada (C2). ....	39
Figura 10 - Valores da turbidez média para a casta Touriga Nacional na testemunha (T) e nas concentrações mais baixa (C1) e mais elevada (C2). ....	40
Figura 11 – Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola L para a casta Trincadeira.....	49
Figura 12– Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola L para a casta Touriga Nacional.....	50
Figura 13– Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Trincadeira .....	52
Figura 14 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Touriga Nacional .....	53
Figura 15 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Trincadeira .....	54
Figura 16 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Touriga Nacional .....	55
Figura 17 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Alb para a casta Trincadeira.....	56
Figura 18- Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Alb para a casta Touriga Nacional.....	56
Figura 19 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Bent para a casta Trincadeira .....	58
Figura 20 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Bent para a casta Touriga Nacional .....	59

## Índice de Quadros

Quadro 1 -Partículas dispersas nos vinhos segundo Berger (1977), Moutounet et al. (1989), Feuilat (1987), Gautier (1984), Rivet (1981) adaptado de Boulet e Escudier (1998). .....	4
Quadro 2 - Natureza físico-química dos colóides segundo Brugirard (1997) .....	5
Quadro 3– Colas comerciais com as concentrações usadas nos ensaios .....	30
Quadro 4– Resultados dos ensaios de Repetibilidade (r) e Reprodutibilidade (R) .....	31
Quadro 5 - Determinações analíticas e Métodos utilizados.....	32
Quadro 6 - Resultados da análise corrente aos vinhos das castas Trincadeira e Touriga Nacional.....	37
Quadro 7 -Intensidade da Cor e Tonalidade para a casta Trincadeira .....	41
Quadro 8 - Intensidade da Cor e Tonalidade para a casta Touriga Nacional .....	42
Quadro 9 - Parâmetros Pigmentos Totais e Polimerizados para a casta Trincadeira ..	43
Quadro 10 - Parâmetros Pigmentos Totais e Polimerizados para a casta Touriga Nacional.....	44
Quadro 11 - Antocianas Totais, Antocianas Coradas e Índice de Polimerização para a casta Trincadeira .....	45
Quadro 12 - Antocianas Totais, Antocianas Coradas e Índice de Polimerização para a casta Touriga Nacional .....	46
Quadro 13 - Taninos para as castas Trincadeira e Touriga Nacional.....	47
Quadro 14 - Valores médios das antocianas na casta Trincadeira para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) .....	49
Quadro 15 - Valores médios das antocianas na casta Touriga Nacional para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) .....	50
Quadro 16 - Valores médios das antocianas na casta Trincadeira para a cola à base da proteína de ervilha (E) .....	51
Quadro 17 - Valores médios das antocianas na casta Touriga Nacional para a cola à base de proteína de ervilha (E).....	52
Quadro 18 - Valores médios das antocianas na casta Trincadeira para a cola à base de proteína de ervilha e de proteína de levedura. (E + L) .....	53
Quadro 19 - Valores médios das antocianas na casta Touriga Nacional para a cola à base de proteína de ervilha e de proteína de levedura. (E + L).....	54
Quadro 20 - Valores médios das antocianas na casta Trincadeira para a cola à base de albumina de ovo atomizada. (Alb).....	57
Quadro 21 - Valores médios das antocianas na casta Touriga Nacional para a cola à base de albumina de ovo atomizada. (Alb) .....	57
Quadro 22 - Valores médios das antocianas na casta Trincadeira para a cola feito à base de Bentonite.....	58
Quadro 23 - Valores médios das antocianas na casta Touriga Nacional para a cola feito à base de Bentonite .....	59
Quadro 24 – Valores médios das antocianas nas castas Trincadeira e Touriga Nacional para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) ao fim de 7 dias de ensaio. ....	60
Quadro 25 - Valores médios das antocianas nas castas Trincadeira e Touriga Nacional para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) ao fim de 2 meses de ensaio. ....	60

## Lista de Abreviaturas

BSE - Encefalopatia Espongiforme Bovina

OIV - Office International de la Vigne e du Vin

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

g.hL<sup>-1</sup> – gramas por hectolitro

∅ - diâmetro

µm - micrometro

Fe<sup>3+</sup> - ião ferro

Cu<sup>2+</sup> - ião cobre

Mg<sup>2+</sup> - ião magnésio

C - carbono

H - hidrogénio

O - oxigénio

N - azoto

S - enxofre

a.a. - aminoácidos

Df 3 –gluc – delphinidina 3-glucósido

Cy 3- gluc – cianidina 3- glucósido

Pt 3-gluc – petunidina 3- glucósido

Pe 3-gluc – peonidina 3-glucósido

Mv 3-gluc – malvidina 3 -glucósido

Cy 3- acet gluc - cianidina 3- acetilglucósido

Pt 3-acet gluc – petunidina 3- acetilglucósido

Pe 3-acet gluc – peonidina 3- acetilglucósido

Malv 3-acet gluc – malvidina 3- acetilglucósido

Df 3 -coum gluc – delphinidina 3-cumaroíglucósido

Pe 3 -coum gluc – peonidina 3-cumaroíglucósido

Malv 3-coum gluc – malvidina 3-cumaroíglucósido

## 1. Introdução

A colagem é uma prática enológica antiga que tem por objectivo obter a clarificação do vinho, através da eliminação de partículas responsáveis pela turvação que contribui para melhorar a sua limpidez, obtendo-se em simultâneo um efeito positivo na estabilização e nas características organolépticas, particularmente nas gustativas. A colagem é, para a maioria dos vinhos de qualidade considerado, o toque final do enólogo.

No mercado de produtos enológicos existe uma grande diversidade de produtos para a colagem do vinho, estando as gelatinas (proteínas de origem animal) largamente difundidas no sector vitivinícola. Ao longo dos últimos anos e depois do surgimento da BSE (Encefalopatia Espongiforme Bovina) deixou-se de usar a gelatina extraída por hidrólise parcial a partir do colagénio dos ossos, pele e tecido conjuntivo de animais (como os bovinos). Na Europa, foi interdito o uso de plasma bovino ou células de sangue na colagem. Durante a primeira década deste século e com a necessidade de encontrar produtos alternativos aos de origem animal, estudou-se a aplicabilidade das proteínas vegetais para a colagem de vinho, visto estas serem já muito utilizadas na indústria alimentar como auxiliares tecnológicos. Foram feitos estudos e ensaios de colagem com diversas proteínas vegetais, como a de trigo, ervilha, arroz, tremço e soja, verificando-se em algumas delas resultados bastante satisfatórios (Mira, 2004). As diversas empresas produtoras de produtos enológicos adaptaram esses estudos e produziram colas proteicas vegetais que hoje são utilizadas pelos produtores vitivinícolas.

A resolução OENO 7/99 (OIV, 1999) modificou a ficha “Colagem” do Código Internacional de práticas enológicas, referente a vinhos, suprimindo as palavras “albumina de sangue”. A possibilidade da doença Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) poder ser transmitida ao homem, ocasionou a interdição da utilização de plasma bovino ou células de sangue vulgarmente utilizadas na colagem de vinhos. O projecto de resolução OIV/OENO/TECHNO/01/198 refere-se à utilização de proteínas vegetais na colagem de mostos e vinhos.

Em diversas reuniões do grupo de peritos em Tecnologia do vinho da OIV, o Dr Michel Moutounet (França), em Março de 2000, a Dra Bosso (Itália) e o Dr. Minguez (Espanha), em Março de 2001, apresentaram resultados da aplicação de proteínas

vegetais para a colagem de vinhos. O grupo decidiu preparar três projectos de resolução, respeitantes à modificação da ficha de colagem, à prática enológica e o último referente ao Codex enológico.

Em 2003, o grupo de peritos em Segurança Alimentar, em resposta a uma solicitação do grupo de peritos em Tecnologia do vinho, emitiu um parecer favorável à utilização de proteínas vegetais na colagem de mostos e vinhos, para a dose máxima de 50 g.hL<sup>-1</sup>.

As resoluções OENO 7/2004 (OIV, 2004a) e OENO 8/2004 (OIV, 2004b) referem a aprovação da utilização de substâncias proteicas de origem vegetal, para a colagem de mostos e vinhos, respectivamente.

A resolução OENO 9/2004 (OIV, 2004c) modifica a ficha “Colagem” do Código Internacional de práticas enológicas, no capítulo 3, referente a vinhos, adicionando na prescrição b) matérias proteicas de origem vegetal.

A resolução OENO 24/2004 (OIV, 2004d) relativamente à “pesquisa de matérias proteicas de origem vegetal em vinhos e mostos”, baseada na proposta da Subcomissão de métodos de análise e de apreciação dos vinhos, refere a inclusão no anexo A do *Recueil* de métodos de análise dos vinhos e dos mostos da OIV, de um método de análise para essa finalidade.

A resolução OENO 28/2004 (OIV, 2004e) menciona a introdução no *Codex Enológico Internacional*, da monografia sobre “Matérias proteicas de origem vegetal derivadas do trigo e da ervilha”.

Nos últimos anos foram introduzidos nos produtos de colagem, as leveduras (cápsulas) que associadas a uma proteína vegetal (ervilha) ou em isolado, produzem resultados interessantes nos vinhos, tornando-os mais macios e redondos de boca.

O objectivo principal deste estudo foi verificar a influência das colas de origem proteica vegetal e microbiológica na composição antociânica do vinho, comparando com uma cola mineral e com uma outra de origem vegetal animal.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1.A Colagem**

A operação de colagem consiste em incorporar num vinho, mais ou menos turvo, uma substância capaz de flocular e sedimentar as partículas em suspensão (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977).

Este processo tem vindo a assumir uma importância dentro das práticas enológicas. Este facto decorre de uma cada vez maior exigência por parte do consumidor em relação à qualidade do vinho.

A colagem, quando bem efectuada, permite obter vinhos límpidos e estáveis do ponto de vista coloidal, e podem ainda apresentar melhorias a nível sensorial.

No entanto há que conhecer e entender o mecanismo segundo o qual a cola actua no vinho. Só assim o enólogo consegue atingir plenamente os seus objectivos.

#### **2.1.1. Mecanismos de actuação da colagem**

Nos nossos dias, a colagem é ainda uma técnica na qual os mecanismos e as suas consequências não estão totalmente definidas. Considerando a complexidade dos fenómenos e das dificuldades referentes à análise dos principais compostos implicados (colóides, taninos, proteínas), só algumas equipas propuseram teorias que explicam estes mecanismos como Rudiger e Mayr (1928-29), Ribereau-Gayon e Peynaud (1934) – teoria que foi completada nos tratados de enologia em 1977 - e Salgues e Razzungles (1983) (Lagune *et al.*, 1996).

As colas, quando adicionadas ao vinho, comportam-se como substâncias coloidais. O vinho possui colóides naturais, que sendo substâncias de natureza química muito complexa e heterogénea assumem um papel muito importante na qualidade e nos processos de elaboração dos mostos e dos vinhos (Ferrarini *et al.*, 1996).

Os colóides, quando de alguma dimensão, podem apresentar opalescência

provocada pela difusão da luz (efeito de Tyndall) e o movimento contínuo e desordenado (movimento browniano) do disperso na fase dispersante. A velocidade de sedimentação destas partículas é regida pela lei de Stokes.

As teorias referentes à colagem dos vinhos são baseadas no conhecimento coloidal do vinho.

As substâncias coloidais são classificadas de acordo com:

- o seu tamanho no meio solvente, em micelas (agregados de átomos, moléculas ou iões) e em macromoléculas;
- na sua afinidade com o meio solvente, em hidrófobas e hidrófilas;
- na sua carga superficial, em electropositivas e em electronegativas.

Segundo Usseglio-Tomasset (1989) e Feuillat (1980 e 1997), todo o fenómeno que modifique o tamanho destas partículas destrói o estado coloidal. No quadro 1 representa-se a descrição e a dimensão das partículas dispersas no vinho.

**Quadro 1 -Partículas dispersas nos vinhos segundo Berger (1977), Moutounet *et al.* (1989), Feuillat (1987), Gautier (1984), Rivet (1981) adaptado de Boulet e Escudier (1998).**

	<b>Partículas visíveis ao microscópio electrónico</b>	<b>Partículas visíveis ao microscópio óptico</b>	<b>Partículas visíveis a olho nú</b>
<b><math>\varnothing &lt; 0,001 \mu\text{m}</math></b>	<b><math>0,001 \mu\text{m} &lt; \varnothing &lt; 0,3 \mu\text{m}</math></b>	<b><math>0,3 \mu\text{m} &lt; \varnothing &lt; 30 \mu\text{m}</math></b>	<b><math>\varnothing &gt; 30 \mu\text{m}</math></b>
Solução verdadeira <sup>a)</sup>	Soluções Colidais <sup>b)</sup>	Suspensões microbianas <sup>b)</sup>	Depósitos <sup>b)</sup>
<i>Açúcares</i>	<i>Polipéptidos</i>	<i>Leveduras</i>	<i>Cristais de sais tartáricos</i>
<i>Ácidos orgânicos</i>	<i>Polissacáridos</i>	<i>Bactérias</i>	<i>Precipitados corantes</i>
<i>Sais</i>	<i>Polifenóis</i>		<i>Restos da filtração</i>
	<i>Casses de origem química</i>		

a) Mistura homogénea constituído por componente minoritário (soluto) e por um componente maioritário (solvente).

b) Mistura heterogénea constituída por um meio disperso e um meio dispersante.

A floculação é uma perda de estabilidade. Este fenómeno acontece com a intervenção de alguns mecanismos, que podem ser diferentes segundo se tratem de colóides hidrófobos ou hidrófilos (Usseglio-Tomasset, 1989). No quadro 2 estão presentes exemplos destes dois grandes grupos de colóides.

**Quadro 2 - Natureza físico-química dos colóides segundo Brugirard (1997)**

<b>Colóides macromoleculares (hidrófilas)</b>	<b>Colóides micelares – dispersões microcristalinas (hidrófobas)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polipéptidos</li> <li>• Polifenóis</li> <li>• Polissacáridos: Pectina Glucana</li> <li>• Polipéptidos das colas</li> <li>• Polissacáridos adicionados: Goma arábica Alginato (cola)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristais microcristais de sais tartáricos</li> <li>• Sais férricos: Fosfato- casse branca Polifenóis – casse negra Antocianinas – casse azul</li> <li>• Sulfureto de cobre</li> <li>• Sais adicionados: Ferrocianeto de potássio Sais de ferro e de metais pesados</li> </ul>

Segundo Ribereau-Gayon *et al.*, (1977), os colóides macromoleculares (hidrófilos) para se tornarem instáveis sofrem duas transformações (não necessariamente pela ordem apresentada):

- perda de água ou desidratação pela acção de agentes desidratantes, tais como, o álcool, os taninos e o calor;

-perda de carga eléctrica ou neutralização pela acção de electrólitos.

A estabilidade dos colóides hidrófilos está dependente da força electrostática repulsiva, conferida pelo semelhante sinal de carga eléctrica, e da adsorção do solvente às partículas, ou seja, a estabilidade termodinâmica dos colóides hidrófilos é devida, principalmente, à sua afinidade para o meio dispersante, o solvente.

Por outro lado, os colóides micelares (hidrófobos) para flocular terão de sofrer uma neutralização da carga eléctrica da partícula. A estabilidade dos colóides hidrófobos está dependente da carga eléctrica das partículas e da sua pequena dimensão, o que implica uma velocidade de agregação e de sedimentação muito lenta.

A agregação dos colóides hidrófobos é devida às colisões resultantes do

movimento browniano. A frequência das colisões e, portanto, a velocidade de agregação depende da temperatura e da viscosidade do meio, do tamanho e da concentração das partículas e das forças de atracção e de repulsão. Os simples movimentos de convecção, devidos a pequenas diferenças de temperatura no seio da massa, bastam para manter as partículas dispersas em solução de uma maneira homogénea (Usseglio-Tomasset, 1989).

Um colóide hidrófilo colocado em presença de um colóide comunitário, muitas vezes, estabelece ao segundo tipo de colóide, o qual se torna mais resistente à acção dos agentes floculantes, tratando-se de um colóide protector (Ribereau-Gayon *et al.*, 1977).

A estabilidade do ponto de vista cinético está relacionada com a distribuição da carga eléctrica na superfície das partículas coloidais. Em meios dispersantes (solventes) polares, as partículas adquirem muitas vezes uma superfície carregada, quer por ionização, quer por adsorção de iões da dispersão. A partícula carregada atrai iões de sinal contrário e repele iões de carga semelhante.

A carga eléctrica das partículas coloidais varia com o pH que por isso influencia consideravelmente nos fenómenos de adsorção e troca iónicas e nos fenómenos de dispersão e floculação.

Ao pH do vinho, a carga eléctrica dos colóides mais importantes presentes neste meio tão rico é resumida por: proteínas, colas orgânicas, matéria corante e metais como o  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (carga positiva), complexos férricos (carga positiva ou negativa) e taninos, colas minerais, complexos cuprosos e gomas (carga negativa).

A estabilidade do sistema no estado coloidal disperso é tanto maior quanto maior for o potencial eléctrico das partículas coloidais. Se se provocar a diminuição desse potencial, o sistema torna-se menos estável e, abaixo de certo valor crítico do potencial, a repulsão atenua-se suficientemente para deixar de impedir a associação de partículas coloidais, que reúnem em grupos ou flocos.

O vinho, como a maioria dos líquidos de origem biológica, é simultaneamente uma solução verdadeira e uma dispersão coloidal (Ribereau-Gayon *et al.*, 1977).

Os trabalhos de Ribereau-Gayon *et al.* (1977) tentaram explicar os mecanismos de colagem. O processo pode ser dividido em duas etapas:

- Floculação, devido às interações entre taninos e proteínas;
- Clarificação, mecanismo pelo qual a colagem separa do vinho as partículas em suspensão.

Na floculação, os taninos transformam as proteínas (colóides hidrófilos positivos) em colóides hidrófobos negativos. Assim, formam-se complexos entre as proteínas e os taninos que são função de vários factores, tais como o pH, temperatura, concentração em taninos e concentração em proteínas. Os complexos formados são estáveis em solução límpida, mas floculam na presença de cationes metálicos que provocam a sua descarga. Esta floculação traduz-se pela formação e aumento da turvação visível a olho nu.

As reacções taninos-proteínas correspondem à floculação, o que significa dizer, à associação de partículas e à formação de flocos que se juntam e precipitam. Este fenómeno é função de dois parâmetros: a neutralização eléctrica e a desidratação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977).

Após o fenómeno de floculação, verifica-se o fenómeno de clarificação que corresponde à eliminação das partículas em suspensão. A clarificação corresponde a um conjunto de fenómenos complexos cujos intervenientes são a cola usada e os elementos que turvam.

As proteínas que ainda não reagiram com os taninos podem-se combinar com partículas em suspensão ou em solução coloidal, uma vez que a maioria tem carga negativa. Denomina-se este processo de floculação mútua, que acontece na ausência de taninos, e que faz parte do processo de clarificação.

Outros estudos (Salgues e Razungles, 1983) atribuem na colagem a noção de forças de ligação química e a reversibilidade ou não de certas etapas.

Na colagem intervêm as reacções entre as partículas coloidais do vinho e a cola, tais como a atracção, repulsão, hidratação e desidratação de partículas com dimensões inferiores a 0,1  $\mu\text{m}$  e que escapam às leis químicas das soluções verdadeiras.

Os taninos têm a capacidade de, em solução aquosa, estabelecerem ligações com as proteínas, levando à sua precipitação. Sensorialmente, esta característica distingue-se por um efeito de secura da língua provocada pela precipitação das proteínas da saliva, quando em contacto com o vinho. Esta sensação denomina-se

adstringência (Bath Smith, 1954). A formação destes complexos, leva também ao aparecimento de turvações nos vinhos. Por outro lado, a formação destes complexos é o mecanismo fundamental da colagem proteica, visto que provoca a floculação e posterior sedimentação dos compostos fenólicos indesejáveis.

Comprovada a importância deste fenómeno é natural que, na área da Enologia, seja tema de vários estudos, faltando ainda esclarecer totalmente, os mecanismos envolvidos neste tipo de interacções (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Os dois principais tipos de interacções são as ligações por pontes de hidrogénio e as interacções hidrófobas.

Os complexos formados podem ser solúveis ou insolúveis. A sua precipitação efectua-se em duas etapas. A proteína e o tanino associam-se, formando um complexo solúvel que pode, numa fase seguinte, agregar-se a precipitar. Esta última etapa depende da capacidade dos polifenóis estabelecerem ligações entre moléculas proteicas (Cheynier *et al.*, 1998).

As colas proteicas usadas em Enologia apresentam uma composição físico-química muito variada. A sua aplicação visa fundamentalmente a clarificação e a redução da composição fenólica, nomeadamente no que se refere ao excesso de adstringência dos vinhos. A distribuição da massa molecular e a densidade de carga de superfície influenciam as propriedades da cola proteica.

As mais utilizadas em Enologia são a gelatina, a albumina de ovo, a caseína, o caseinato de potássio e a ictiocola. A colagem do vinho é uma prática tradicional em Enologia que, independentemente das características físico-químicas de cada cola, tem sido amplamente estudada por diversos autores no que se refere sobretudo ao seu efeito global nas características do vinho (Kaufmann, 1988; Flak *et al.*, 1990; Bravo-Haro *et al.*, 1991; Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991; Marchal *et al.*, 1993; Caillet, 1994; Machado-Nunes *et al.*, 1995; Sims *et al.*, 1995; Scotti e Poinssaut, 1997; Lovino *et al.*, 1999; Lagune-Ammirati e Glories, 2001).

A clarificação por colagem consiste basicamente em adicionar ao vinho um produto clarificante. Antigamente usavam-se produtos existentes na natureza como o leite, sangue e clara de ovo. Hoje em dia, utilizam-se, após transformação, gelatina, albumina, caseína e bentonite (argila), entre outros.

O produto clarificante tem uma carga oposta ao elemento a clarificar, geralmente uma carga eléctrica positiva no vinho, sendo a bentonite excepção, com carga negativa. Como os corpos de sinais contrários se atraem, e como as partículas responsáveis pelas casses e os taninos estão carregadas negativamente, há uma atracção entre as partículas e o produto.

Quando adicionado, o produto é capaz de coagular e formar flocos, o que leva ao respectivo aumento de peso e à sua sedimentação. Os flocos, com a sua sedimentação atraem e arrastam as partículas de turvação e assim clarificam o vinho.

Resumindo, alguns factores que podem influenciar a colagem são: a presença dos catiões sódio e ferro; a temperatura, a proteína (cola) é menos eficiente a altas temperaturas; acidez do vinho, quanto mais fraca for a acidez, melhor é a clarificação; colóides protectores, porque dificultam e podem impedir a floculação; cubas muito altas também dificultam a sedimentação das partículas.

A colagem também permite fixar as matérias corantes coloidais e arrastar taninos mais ou menos polimerizados dotados de adstringência. Com a colagem conseguimos um efeito de clarificação, pelo arraste das impurezas, e um efeito estabilizador, pela precipitação de factores predisponentes às casses férrica e cúprica e as matérias corantes instáveis.

## 2.2. As Colas

A lista de substâncias que podem intervir na operação clarificante de colagem está definida a nível internacional pelo O.I.V. (Office International de la Vigne e du Vin).

As colas podem pertencer a dois grandes grupos:

- Colas orgânicas (colas electropositivas, ou com potencial zeta mais, às condições naturais e normais do vinho): gelatina, ictiocola, albumina de ovo, caseína, alginato ( extractos de algas castanhas).
- Colas minerais (colas electronegativas, ou com potencial zeta menos, às condições naturais e normais do vinho): bentonite, caulinite, geis de sílica.

Existem, actualmente, outras colas que são de síntese química como o PVPP (polivinilpirrolidona).

Os problemas ocorridos no sector alimentar durante os anos 90 do século passado, com a BSE, conduziram a uma maior preocupação, por parte da indústria enológica, por parte dos legisladores e por parte de quem consome sobre os produtos usados no tratamento e conservação dos produtos alimentares e, em particular, nas colas usadas nos vinhos. Assim sendo, o assunto das proteínas vegetais na colagem dos vinhos segue as diferentes etapas impostas pelo O.I.V. e pela regulamentação portuguesa e europeia (Lefebvre *et al.*, 2002). Do ponto de vista enológico, as proteínas vegetais (não OGM) mostram eficácia e fiabilidade na colagem, quer de vinhos, quer de mostos. Algumas conclusões tidas até ao momento indicam que as proteínas vegetais, sobre os vinhos tintos, reagem como as gelatinas, sendo até mais activas na clarificação e/ou degustação. De modo geral, originam também menor volume de borra, não modificam a intensidade corante, nem a tonalidade, e ligam-se fortemente aos taninos (Lefebvre *et al.*, 2000).

A escolha da cola e a dose utilizada tem em conta as características físico-químicas e organolépticas do vinho e os propósitos que o produtor fixou para a comercialização e o consumo do seu vinho (Lagune e Glories, 2001). Será apresentada uma breve explicação referente às colas usadas no presente estudo.

### 2.2.1. Proteínas vegetais

A palavra proteína deriva do grego *proteios*, que significa “ocupar o primeiro lugar”. As proteínas contêm C (50 a 55%); H (6 a 8%); O (20 a 24%); N (15 a 18%) e S (0,2 a 0,3%).

Quimicamente são polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas são os aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, formando longas cadeias em várias estruturas geométricas e combinações químicas para formar as proteínas específicas, cada qual com sua própria especificidade fisiológica (Vicenzi, 2000).

Apesar da sua complexidade estrutural, as proteínas podem ser hidrolisadas (quebradas) nos seus constituintes aminoácidos por enzimas ou por meio de aquecimento em meio ácido e álcalis, sob certas condições. As proteínas puras e secas são razoavelmente estáveis, mas sob as condições em que são encontradas nos alimentos, elas tendem a decompor-se à temperatura ambiente, auxiliadas pela acção bacteriana, e podem formar produtos tóxicos para o corpo; assim, é necessário conservar refrigerados alimentos protéicos, como ovos, peixes, aves, carne e leite.

Os vegetais são capazes de sintetizar as suas próprias proteínas a partir de fontes inorgânicas de azoto, enquanto os animais necessitam de ingeri-las na dieta. O metabolismo animal, a excreção e finalmente a morte, devolvem o azoto ao solo. Esse processo contínuo é conhecido como o *ciclo do azoto*. As proteínas vegetais, geralmente, são deficientes num ou mais aminoácidos essenciais. São encontrados quase que em todos os alimentos, tanto de origem animal (carne, ovos, leite), como de origem vegetal (cereais, a soja e raízes ou tubérculos) e somente uma pequena quantidade é proveniente das chamadas fontes não convencionais, sendo que, nos primeiros, em geral, encontra-se uma maior quantidade e melhor qualidade, já que, nos animais, as proteínas são consideradas como proteínas de Alto Valor Biológico (Vicenzi, 2000).

Proteínas são heteropolímeros formados por unidades menores chamadas aminoácidos. Os aminoácidos (a.a.) estão ligados em sequência formando uma cadeia polipeptídica. Esta cadeia é a base da proteína e é chamada de estrutura primária. As propriedades de uma proteína são determinadas pelo número e espécie dos resíduos de aminoácidos e pela sua sequência.

Os aminoácidos são chamados essenciais, pois o organismo não é capaz de sintetizá-los. Na digestão há a quebra da cadeia de proteínas e os aminoácidos livres são absorvidos e usados na síntese de novas proteínas. São aminoácidos essenciais: valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, treonina, lisina, arginina, histidina.

Nem todos os aminoácidos estão presentes nas proteínas e alguns, estão em grande quantidade. Exemplo é a hidroxiprolina que constitui 12% do colagénio, aproximadamente. A degradação da proteína seja química (ácida ou alcalina) ou enzimática leva à formação de aminoácidos (Vicenzi, 2000).

O *Codex Alimentarius* define as proteínas vegetais como “produtos alimentares obtidos a partir de cereais, de leguminosas ou de oleaginosas por redução ou eliminação de certos constituintes principais não proteicos, como a água, óleo, amido ou outros glúcidos”.

As matérias proteicas são classificadas em quatro grandes famílias que são coincidentes com a sua classificação botânica: cereais (trigo, milho, arroz, centeio, sésamo, aveia), leguminosas (soja, tremço, ervilha, fava), oleaginosas (colza, girassol) e diversas (onde se encontram as espécies que não pertencem às famílias anteriormente descritas, como a batata).

As proteínas de origem vegetal são produtos de extracção obtidos de matérias proteicas que contém no mínimo 50% de proteína, podendo atingir 90% ou mais (Godon, 1996).

Cada proteína tem uma composição em aminoácidos que lhe é específica, própria da espécie botânica da planta. Excepto as proteínas foliares, a grande maioria das outras proteínas vegetais constitui as proteínas de reserva que são sintetizadas, transportadas e depositadas em grãos ou raízes (Godon, 1996).

Nos dias de hoje, devido à evolução tecnológica dos processos de extracção, há uma grande diversificação de fontes de proteínas vegetais, extraídas de vegetais correntemente cultivados na Europa, e estão disponíveis como ingrediente alimentar, sendo vastamente utilizadas na agro-indústria. Estas proteínas entram na composição de diversos alimentos, tais como produtos lácteos (gelados, sobremesas, queijos fundidos), produtos ultracongelados, produtos à base de peixe, produtos à base de carne, de charcutaria, alimentos dietéticos, alimentos infantis, produtos de pastelaria, de confetaria, de chocolate e de revestimento alimentar, entre outros (Lefebvre *et al.*,

2000). As proteínas vegetais podem ser usadas na indústria alimentar como ingrediente funcional ou facultativo para aumentar o teor proteico, para substituir parcial ou totalmente as proteínas animais ou como fonte proteica (Lefebvre *et al.*, 2000).

Podem ser utilizadas inteiras (estado nativo) ou podem sofrer uma hidrólise parcial, química ou enzimática, para melhorar as suas propriedades físico-químicas, nomeadamente, a solubilidade.

Nas proteínas vegetais, diferenciam-se diferentes classes, que se caracterizam pelo seu teor em proteína: farinha (se o teor proteico é da ordem de 45%), concentrado (teor proteico próximo de 70%) e isolado proteico (teor proteico próximo de 90%) (Lefebvre *et al.*, 2000).

As proteínas podem ter também a seguinte classificação (Bobbio, *et al.*, 2003): proteínas simples, proteínas conjugadas e proteínas derivadas (primárias e secundárias)

Apenas os dois primeiros grupos são encontrados na natureza.

No caso das proteínas simples, são as que por hidrólise total resultam em aminoácidos como os únicos produtos. As Escleroproteínas são proteínas simples mais insolúveis, possuem estrutura fibrosa como, por exemplo, a queratina (pele, cabelo) e o colagénio (tendões e ligamentos).

As proteínas simples podem ser classificadas quanto à solubilidade: como o caso das Albuminas (solúveis em água, em soluções fracamente ácidas ou alcalinas, coagulam pela acção do calor; exemplos ovalbumina (clara de ovo), a lactalbumina (leite), a legumitina (ervilhas)). As Globulinas que são insolúveis em água, mas solúveis em soluções de sais neutros. Os exemplos são a miosina (músculo), a legumina (ervilhas). As Glutelinas que se encontram somente em vegetais são insolúveis em água e solventes neutros, mas solúveis em soluções diluídas de ácidos e bases; exemplo: glutenina (trigo). As Prolaminas encontradas somente em vegetais, insolúveis em água e etanol absoluto, mas solúvel em a 50-80%; exemplos: gliadina (trigo e centeio), zeína (milho), hordeína (cevada) (Bobbio, *et al.*, 2003). Existem outras que sendo de origem animal não são relevantes para o presente trabalho.

As proteínas da ervilha são de Baixo Valor Biológico, não possuem na sua composição aminoácidos essenciais em proporções adequadas. É uma proteína incompleta.

### **2.2.2. Envelopes celulares de levedura**

As leveduras são fungos pertencentes à classe dos Ascomicetes e à ordem das Saccharomycetales. São fungos unicelulares com uma forma esférica, elíptica ou oval e normalmente (com excepção das leveduras dimórficas) não formam hifas.

Em geral, as leveduras reproduzem-se assexualmente por gemulação, um processo em que uma nova célula, designada célula filha, é formada pela célula parental a partir de uma protuberância designada gema.

Quando as leveduras se reproduzem sexuadamente, produzem vários tipos de esporos sexuais (ascósporos). O tipo de esporos produzido é muitas vezes utilizado na classificação das leveduras. As actividades metabólicas também são utilizadas para identificar e classificar leveduras.

A membrana celular das leveduras é composta principalmente por polissacarídeos da glucose e da manose, algumas proteínas e muito pouca quitina. A sua substância de reserva é o glicogénio, contendo também muitas vitaminas geralmente do grupo B.

Relativamente à estrutura da célula, esta possui um citoplasma com vários organelos e um núcleo revestido por uma estrutura como as células vegetais. As células de levedura têm dois envelopes celulares: a parede celular e a membrana.

A composição e manutenção da integridade da membrana plasmática são essenciais para o funcionamento das células e sua adaptação às constantes alterações do ambiente extracelular (Konings, 2006). Esta estrutura celular desempenha múltiplas funções na célula. Por um lado, funciona como barreira de separação entre o citoplasma e o ambiente exterior, permitindo à célula manter uma composição relativamente constante e reter os constituintes que lhe são próprios, o que é essencial para a manutenção do potencial de membrana necessário à realização de uma variedade de processos de transporte activo secundário (Konings & Velkamp, 1983; Konings *et al.*, 1995).

Por outro lado, a membrana possui proteínas com múltiplas funções entre as quais transporte de substratos de e para o interior da célula, biossíntese de parede celular, constituição do citosqueleto e transdução de sinal [Konings, 2006]. A membrana plasmática tem ainda que permitir a passagem de nutrientes presentes no exterior e de produtos residuais do metabolismo que têm de ser libertados, isto é, a membrana é permeável numa forma selectiva (Konings, 2006). Esta característica deve-se à sua composição lipídica e, em parte, aos seus sistemas de transporte que permitem à célula controlar as suas trocas com o meio. O funcionamento destes transportadores é, por sua vez, igualmente influenciado pela composição lipídica da membrana, da qual depende também a fluidez desta (Henschke & Rose, 1991; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Sendo a membrana constituída por lípidos e proteínas, a sua composição determina as suas características e condiciona vários processos metabólicos. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A parede celular constitui 15 a 30% do peso seco da célula (Orlean, 1997) e 25 a 50% do volume, segundo cálculos feitos por "electron micrographs" (Lipke e Ovalle, 1998). A parede é constituída 80 a 90% por polissacarídeos, que existem fundamentalmente em três formas distintas: (a) polímeros ramificados de glucose contendo ligações (3,1 e 1,6 (p-glucanos); (b) polímeros não ramificados de N-acetil-D-glucosamina contendo ligações  $\beta$ ,4 (quitina); e (c) polímeros de manose covalentemente associados a proteínas (glico(mano)-proteínas). Para além de hidratos de carbono, comprova-se na parede a existência de proteínas (6 a 25%) e quantidades pequenas de lípidos (1 a 7%). (Bailou, 1982; Cabib *et al.*, 1982; Sheperd *et al.*, 1985; Sheperd, 1987; Cassone, 1989; Calderone *et al.*, 1993; Chaffin *et al.*, 1998). A arquitectura molecular da parede celular não é constante. A célula pode fazer ajustamentos consideráveis à composição e estrutura da sua parede durante, por exemplo, o ciclo celular ou em resposta a condições ambientais, tais como, disponibilidade de nutrientes ou oxigénio, temperatura e pH.

O uso de um reagente de biotinação impermeável à membrana celular permitiu obter a identificação das proteínas de parede de levedura, evitando assim o risco de contaminação dos extractos com proteínas intracelulares (Casanova *et al.*, 1992; Mrsa *et al.*, 1997). Foram assim identificadas 20 proteínas de parede, das quais nove são extraídas com SDS/mercaptoetanol e onze são insolúveis (Mrsa *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). As proteínas insolúveis dividem-se em dois grandes grupos: proteínas GPI e proteínas Pir.

Por digestão de paredes com  $\beta$ 1,6-glucanases obtêm-se as proteínas GPI. São proteínas que possuem, para além de um sinal peptídico no terminal amino, uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos no terminal carboxílico que, no retículo endoplasmático, uma transamidase substitui por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ferguson e Williams, 1988; Cross *et al*, 1990; Udenfriend *et al*, 1991; Orlean, 1997).

Se, em paredes previamente tratadas com SDS, realizarmos uma extracção alcalina (30 mM NaOH, 4°C, 8 horas) obtêm-se as proteínas Pir (Mrsa *et al*, 1997). São proteínas codificadas pelos genes *Pir*, sendo caracterizadas por possuírem um péptido sinal no terminal amino, um local de reconhecimento para uma protease (Toh-E *et al*, 1993; Mrsa *et al*, 1997; Kapteyn *et al*, 1999). Tal como as proteínas GPI, as proteínas Pir são altamente O-glicosiladas e o papel das cadeias O-ligadas no ancoramento destas proteínas é baseado no facto de se verificar a ausência de proteínas Pir (Mrsa *et al*, 1997). As proteínas Pir ligam-se à parede através do pi,3-glucano, já que quase todas as proteínas de parede são libertadas com pi,3-glucanase, enquanto apenas 84% são extraídas com pi,6-glucanase, o que pode significar que a fracção resistente a esta última enzima, corresponde às proteínas Pir, ligadas ao pi,3-glucano através das suas cadeias O-ligadas (Kapteyn *et al*, 1999). A ligação do glucano com as proteínas Pir parece necessitar da presença de manosilfosfato (Nakayama *et al*, 1999). Recentemente, Yun *et al* (1997) demonstraram que as proteínas Pir conferem resistência à proteína antifúngica (de planta), osmotina.

As proteínas de parede solubilizadas com SDS (proteínas solúveis) são proteínas ligadas não covalentemente a este organelo. A sua incorporação na parede não depende da existência de um glucano bem formado conforme se pode deduzir de experiências realizadas com protoplastos em regeneração (Pastor *et al*, 1984). São proteínas de massa molecular reduzida e manosiladas, com excepção da glicosidase Bgl2p (Valentin *et al*, 1984; Sanz *et al*, 1989; Van Rinsum *et al*, 1991). No que diz respeito às funções associadas a estas proteínas, foram descritas várias, incluindo a de receptores em fenómenos de aglutinação, degradação e síntese da parede, modificação de factores nutricionais, factores de conjugação, factores de floculação e protecção contra o stress. Relativamente ao conteúdo em aminoácidos, predominam os resíduos ácidos (glutamato e aspartato) e hidroxí-aminoácidos (serina e treonina) (LipKe *et al*, 1989).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de levedura utilizada há milhares de anos na panificação e na fermentação de bebidas alcoólicas, sendo a levedura

fermentativa por excelência, tendo sido utilizada igualmente nos últimos anos para produção de bioetanol. É também muito importante como organismo modelo (Ostergaard *et al.*, 2000), quer em estudos fisiológicos (efeitos de diversos tipos de stresse - osmótico, oxidativo, etanol e ácidos fracos), quer na área de Biologia Celular e Molecular, sendo o microrganismo eucariótico mais estudado e aquele cujo genoma foi o primeiro a ser sequenciado (Williams,1996). A *Saccharomyces ellipsoideus* é a levedura do vinho e a *Saccharomyces cerevisiae* a da cerveja, que possui numerosas variedades obtidas a partir de culturas artificiais. Além de se utilizar na produção da cerveja, é também o agente fermentativo utilizado no fabrico do pão.

Devido à sua composição e acção química, as leveduras são muito utilizadas em medicina contra as avitaminoses (raquitismo e escorbuto), furunculoses, dermatoses e perturbações intestinais.

As leveduras (pertencentes ao grupo dos fungos) são organismos eucarióticos unicelulares que existem no solo, ar, plantas, frutos e alimentos.

A espécie mais comum é a *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida vulgarmente como levedura de padeiro ou da cerveja. Encontra-se no centro da Biotecnologia tradicional, pelo seu papel milenar na produção de pão, vinho e cerveja, devido à sua capacidade de produzir álcool (principalmente o etanol, presente em bebidas fermentadas) e dióxido de carbono (que permite a expansão da massa do pão) a partir de açúcares.

Hieróglifos egípcios sugerem que há mais de 5000 anos a levedura é utilizada em processos fermentativos, quer na produção de pão, quer na de bebidas alcoólicas. Curiosamente, só em 1857 Louis Pasteur provou que a fermentação resulta da acção de organismos vivos.

As colas usadas mais recentemente são produzidas a partir de envelopes celulares de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Uma das colas (constituída somente por envelopes de leveduras) é elaborada a partir de uma preparação específica de envelopes celulares e leveduras com alto teor em péptidos sápidos para a eliminação de alguns polifenóis responsáveis pelo amargo e adstringência.

### 2.2.3. Bentonite

Dos minerais de argila utilizados como clarificantes, a caulinite tem um papel muito secundário, quase figurativo, quando comparado com o papel principal, que a bentonite tem pela quantidade de vezes que é utilizada no tratamento de mostos e de vinhos.

A Colagem por bentonite pode fazer-se em três fases distintas:

- Antes da fermentação, adição sobre o mosto;
- Durante a fermentação vinária;
- Na primeira trasfega, depois do fim da fermentação vinária (com a adição de SO<sub>2</sub>).

A bentonite é usada em mostos pois, já segundo Feuillat (1987), para além da sua acção principal incidir na eliminação das proteínas existentes, proporciona uma fermentação mais regular e adsorve os compostos fenólicos dos mostos das uvas tintas vinificadas pela técnica de fabrico dos vinhos brancos. Por outro lado, no final da fermentação vinária, o volume de depósito é em menor quantidade do que o obtido após a aplicação da bentonite sobre vinho já vinificado.

A bentonite é um mineral 2:1, a estrutura é composta por duas camadas tetraédricas de sílica e uma camada octaédrica de alumina. Esta conformação estrutural confere à bentonite um teor em cargas eléctricas, um poder de retenção para a água e uma expansibilidade superiores ao caso da caulinite.

A bentonite é uma argila coloidal, um silicato de alumínio hidratado do grupo das montmorilonites, que se apresenta na forma de folhas empilhadas. Cada folha é por sua vez constituída por três camadas. As ligações entre as unidades de cada camada, e entre as camadas de cada folha, são ligações com forte carácter covalente. Na ligação entre folhas adjacentes, podem intervir ligações electrostáticas ou essencialmente apenas forças coesivas de superfície (forças de Van der Waals) que são fracas em comparação com as de atracção electrostática (forças de Coulomb).

Na formação desta argila montmorilonítica existem sempre substituições isomórficas, Si<sup>4+</sup> por Al<sup>3+</sup> (verifica-se numa extensão muito limitada), ou Al<sup>3+</sup> por Fe<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Este fenómeno cria um défice de cargas positivas, induzindo um excesso de cargas negativas. As folhas estão separadas entre elas por um espaço interfoliar que

contém os iões sódio, cálcio, magnésio e as moléculas de água. Este espaço pode aumentar por absorção de novas moléculas de água, fenómeno que é a origem da expansibilidade da bentonite na água. Os catiões presentes no espaço interfoliar são catiões permutáveis, o que quer dizer que podem ser substituídos por outros iões e libertados na solução.

As bentonites são sódicas, cálcicas ou magnesianas, em função do catião que se encontra em maior quantidade no espaço interfoliar. As bentonite cálcicas são pouco expansíveis, têm uma carga negativa fraca, sendo a floculação obtida pouco intensa. As bentonite sódicas são mais expansíveis e mais reactivas.

As bentonites são colóides carregados negativamente, as cargas são então devidas ao défice de catião  $Al^{3+}$  no interior das folhas.

A bentonite carregada negativamente vai neutralizar as cargas positivas de certos colóides do vinho, nomeadamente proteínas (Poinsaut e Hardy, 1995).

Segundo Poinsaut e Hardy (1995), a coagulação-floculação também pode produzir-se entre dois colóides negativos graças à intervenção de um catião bivalente ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ). Este catião neutraliza, leva à coagulação e depois à floculação. A floculação depende do pH (o pH óptimo é 4,5) e da concentração em colóides. Existe uma relação óptima (equilibrada) de concentração de colóides para obter uma floculação máxima, se a concentração de um dos colóides é muito baixa ou muito alta, a floculação será diminuída.

A bentonite é usada para remover proteínas de vinhos brancos. Quando usada em doses elevadas pode retirar aromas desejáveis.

#### **2.2.4. Albumina (clara de ovo)**

A clara de ovo contém 12,5% do seu peso húmido em proteínas, uma albumina, uma globulina e uma lisozima. A albumina, proteína de peso molecular um pouco mais elevado, é insolúvel na água e solúvel nas soluções diluídas de sais neutros. A albumina de ovo pode ser utilizada sob diversas formas: fresca, congelada ou em pó (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977).

A clara de ovo ou a albumina de ovo é uma cola universalmente reconhecida pelas suas qualidades.

A albumina de ovo arrasta uma grande quantidade de polifenóis e amacia os vinhos ricos em taninos adstringentes, sendo relativamente neutra sobre as características organolépticas do vinho (Caillet, 1994). Sobre os vinhos jovens ou sobre vinhos pouco estruturados dá resultados medíocres (Lagune e Glories, 2001, 2002).

Para entender as qualidades inegáveis desta cola, numa grande variedade de vinhos, Lagune e Glories (2001, 2002), apoiados nos trabalhos efectuados com as gelatinas, utilizaram a clara de ovo como matéria prima para desenvolver novas colas, os derivados da albumina de ovo que variam em termos da repartição da massa molecular, das densidades de cargas de superfície e da variação destas últimas em função do pH.

Pelo ano da descoberta da penicilina (1928), Fleming sugeriu que a eficácia da colagem com claras de ovo na conservação do vinho se devia à presença de lisozima nestas. Mas Ribéreau-Gayon *et al.* (1977) verificaram que a acção da lisozima contida na clara de ovo não faz diminuir mais a população bacteriana do que a gelatina ou a bentonite, porque a referida enzima não é libertada no vinho durante a colagem, precipitando com a albumina sob a acção do tanino.

A albumina de ovo diminui a adstringência, pois remove compostos fenólicos de vinhos tintos. É muito usada em tratamento de vinhos tintos de qualidade superior. Deve ser unicamente usada depois de o vinho estar limpo. Não deve ser usada em vinhos brancos.

### **2.3. Antocianinas**

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

Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos deve-se a esta família de compostos que se encontram nas grainhas, na polpa e na película das uvas. De todos eles, as antocianinas, os flavano-3-ol e as proantocianidinas, principais responsáveis pela cor dos vinhos, são quantitativamente os mais importantes.

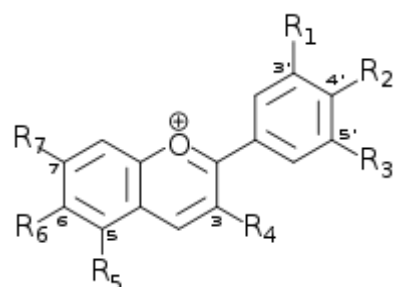
Os flavonóides podem encontrar-se no estado livre ou polimerizados com outros flavonóides, açúcares, não flavonóides, ou ainda em combinações dos anteriores.

As antocianinas são os pigmentos vermelhos das uvas. Sem sombra de dúvida, estes são os compostos mais importantes no que se refere à cor dos vinhos e das uvas. As antocianinas representam uma parte muito importante, quer quantitativamente, quer qualitativamente dos flavonóides das uvas das castas tintas. Elas localizam-se na película e nas três ou quatro primeiras camadas da hipoderme, e excepcionalmente na polpa das castas tintureiras.

A designação genérica “antocianinas” é empregue para designar as agliconas (antocianidinas), ou as suas formas heterósidas (antocianinas). A sua estrutura, compreende dois anéis benzénicos unidos por um heterociclo oxigenado insaturado e catiónico, catião flavílio. É a carga deste heterociclo e a capacidade de os electrões se moverem de um anel para o outro, uma das principais razões, que confere a coloração destas moléculas (Browyer, 2002). Distinguem-se, na uva e no vinho, consoante a substituição do radical lateral, cinco moléculas de antocianidinas definidas, com dois ou três substitutos (Ribéreau Gayon *et al.*, 1998) distinguindo-se entre si pelo grau de hidroxilação e metoxilação do anel benzénico B.

De cerca de duas centenas e meia de antocianinas conhecidas (Hrazdina, 1981), foram detectadas na uva e no vinho as seguintes antocianinas: os 3-glucósido da malvidina, da petunidina, da delphinidina, da cianidina e da peonidina. E muito recentemente, em estudos feitos em uvas da casta Granacha Tintoreira, foi detectada mais uma antocianina, a pelargonidina (Castillo-Munõz *et al.*, 2009).

As antocianinas constituem os heterósidos das antocianidinas. São elas que existem no estado natural na uva e no vinho, visto ser a glicosilação que confere solubilidade e estabilidade à molécula. A glicosilação na posição 3 estabiliza a molécula, sendo a aglicona facilmente transformada em cetona ou chalcona, com perda irreversível de cor (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2001).



**Ião flavílio**

Antocianidina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Coloração	Fonte
Aurantidinina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH		
Cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	Vermelha	Cereja, jamelão, uva, morango, amora, figo, cacau, açai
Delfinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH		Beringela, romã, maracujá, uva
Europinidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH		
Luteolinidina	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH		
Pelargonidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	Vermelha-alaranjada	Morango, bananeira, acerola, pitanga, gerânio, amora, ameixa
Malvidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH	Violeta	Uva, feijão, acerola
Peonidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	Púrpura	Cereja, Jabuticaba, uva
Petunidina	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH	Violeta	Uva, petúnia
Rosinidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>		

**Figura 1- Estrutura das antocianidinas existentes na natureza.**

A glicosilação dá-se em C3 ou C3 e C6 da molécula de antocianidina, sendo a glucose o açúcar identificado. A ligação do açúcar faz-se pelo seu oxidrilo na posição 1 (Harborne, 1964). Também foram identificadas, na uva e no vinho, antocianinas aciladas pelos ácidos acético, p-cumárico e cafeíco (Wulf e Nagel, 1978), estando os grupos acilo geralmente esterificados em C3 ou C6 da molécula de glucose, e menos frequentemente em C4 (Harborne, 1964) (Figura 4).

A hidroxilação é um dos factores da cor. As antocianinas mono-hidroxiladas são

geralmente vermelho-alaranjado ou rosa (pelargonidina), as di-hidroxiladas ou di-substituídas são vermelhas (cianidina) e as tri-hidroxiladas ou tri-substituídas são vermelho vinoso ou azuis (delfinidina) (Heredia *et al.*, 1998). A ausência do grupo OH na posição 3 confere uma cor amarela.

A hidroxilação conduz, portanto, a um aumento da influência da cor azul (Ribéreau-Gayon, 1968).

As numerosas possibilidades de substituição do anel B conferem às antocianinas propriedades específicas, concretamente diferenças na cor e estabilidade. O aumento do número de hidróxilos no anel B conduz ao deslocamento da máxima absorção até comprimentos de onda mais elevados (efeito batocrômico), o que se traduz numa modificação da cor da molécula, que muda de laranja para vermelho.

Também se pode alterar pelo nível de metoxilação, cujo aumento conduz a compostos mais violetas, como a malvidina-3-glucósido, muito abundante na uva (Mazza e Miniati, 1993).

Cada uma das antocianinas pode apresentar quatro estruturas diferentes em função do pH do meio: catião flavílio (AH), base anidra (A), base carbinol (B) e chalcona (C).

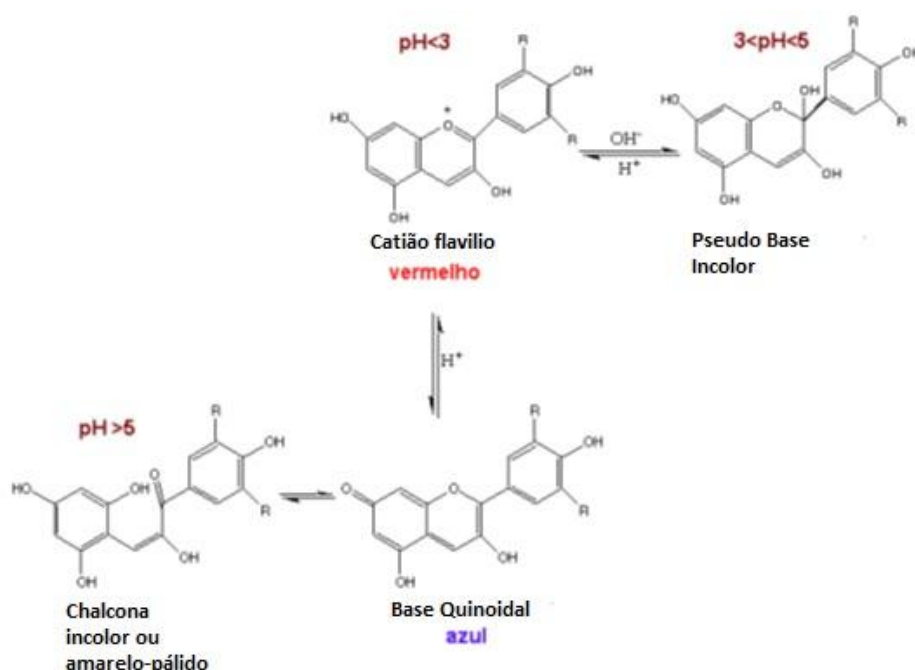
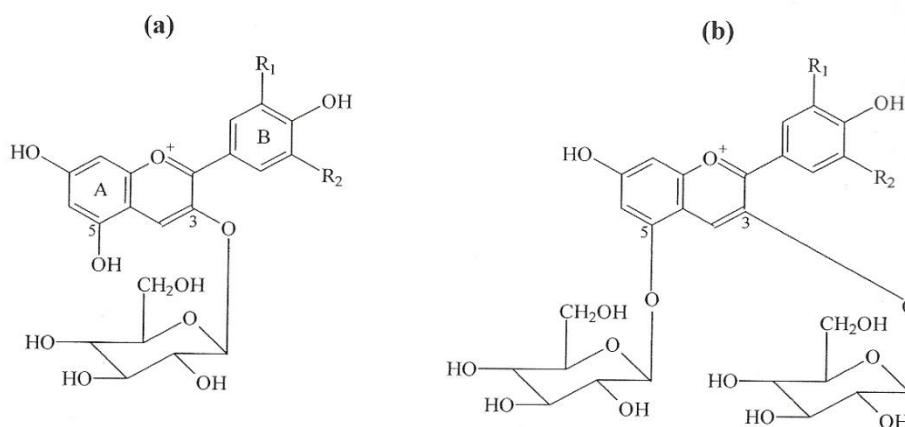


Figura 2 – Equilíbrio das antocianidinas em função do pH.

Estudos realizados em soluções aquosas de 3-glucósido da malvidina em meio ácido a 25°C, por meio de técnicas baseadas na espectroscopia, termodinâmica e cinética, concluíram que as quatro estruturas estão em equilíbrio entre si (Brouillard e Dubois, 1977; Brouillard e Delaporte, 1977). Assim, o catião flavílio (AH<sup>+</sup>) (coloração vermelha) está em equilíbrio ácido-base com a base anidra (A) (coloração azul); a base carbinol (B) forma-se por hidroxilação do catião flavílio e está em equilíbrio tautomérico com a chalcona (C) (formas incolores).

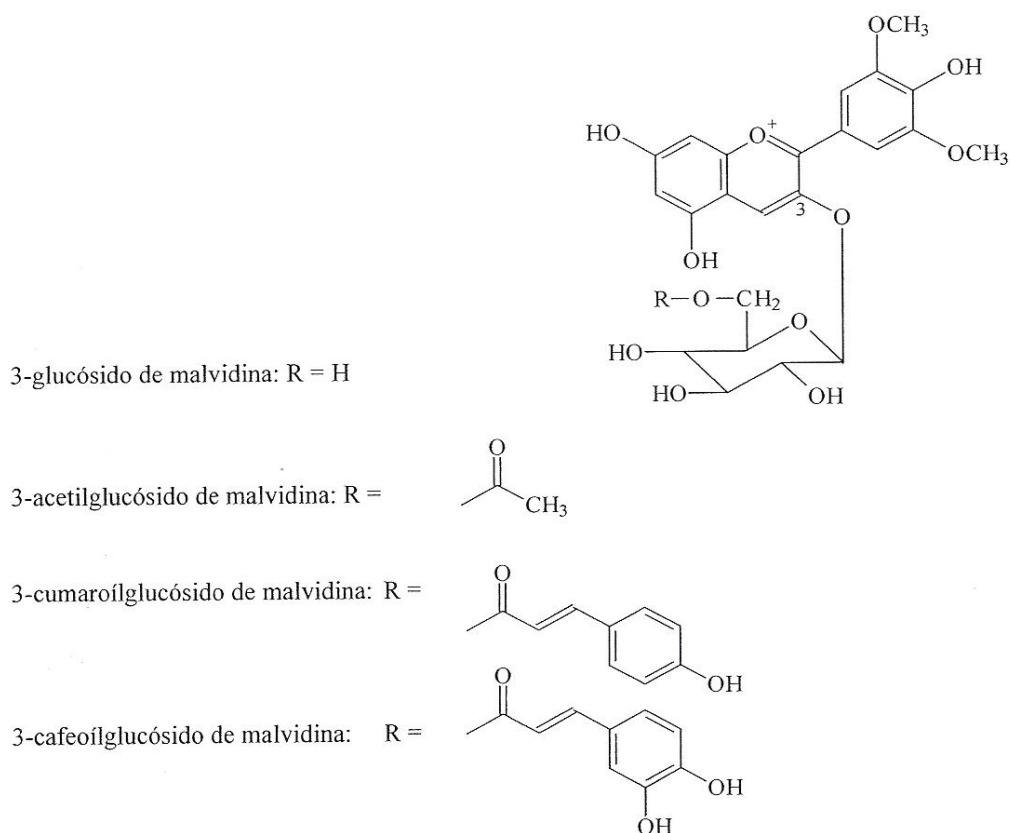
A cor das antocianinas está também relacionada com a possibilidade dos fenóis formarem complexos, geralmente azuis, com os metais pesados, como o ferro, alumínio e magnésio (Jurd e Geissman, 1956).



**Figura 3 – Estrutura de : (a) 3-glucósidos de antocianidinas; (b) 3,5-diglucósidos de antocianidinas**

Na natureza tanto quanto se sabe, as antocianinas não se encontram na forma livre (antocianidinas), mas ligadas a açúcares sob a forma de heterósidos, as antocianinas. Na espécie *Vitis vinifera*, os açúcares mais frequentes são monossacáridos, como a glucose, galactose, ramnose e a arabinose. A glucose é, no entanto, o açúcar mais comum. Normalmente a ligação ocorre entre o grupo hidroxilo da posição 1 de uma molécula de glucose e o carbono 3 de uma antocianidina (figura 3a). A presença de antocianinas di-glucósido em quantidades importantes é específica de outras espécies *Vitis*, como a *Vitis riparia* e a *Vitis rupestris*, apesar de Roggero *et al.* (1984) ter encontrado quantidades vestigiais em *Vitis vinifera*, ocorrendo as ligações nas posições O-3 e O-5 (figura 3b). A glicosilação confere uma maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). As diferentes estruturas das antocianinas podem ser estabilizadas por fenômenos físico-químicos, tais como a auto-associação ou a copigmentação com outros compostos fenólicos. Também podem ocorrer outras ligações, como a esterificação em C6 da

glucose combinada à antocianidina com os ácidos cumárico, acético e cafeíco (figura 4). Estes fenômenos originam variações no espectro do visível das antocianinas e nos seus valores de absorvência.



**Figura 4 – Estruturas da malvidina 3-glucósido e respectivos ésteres acilados (adaptado de Mateus,2002)**

A copigmentação, que resulta de fenômenos de condensação, em geral com ligações de baixa energia entre antocianinas e antocianinas ou entre antocianinas e outras formas de compostos fenólicos, é desfavorecida com a presença de álcool. As antocianinas aciladas desaparecem rapidamente alguns meses após a vinificação, só permanecem cinco monoglucósidos, com uma forte predominância da malvidina. A concentração destes monoglucósidos varia muito com a idade dos vinhos e com a casta, podendo variar de 100 mg/l (Pinot Noir) a 1500 mg/l (Syrah, Cabernet Sauvignon) após a vinificação, e diminuir rapidamente durante os primeiros anos, durante o estágio e envelhecimento dos vinhos, atingindo um valor limite da ordem dos 0 a 50 mg/l (Ribéreau Gayon *et al.*, 1998).

Para a cor dos vinhos muito contribui a copigmentação, principalmente dos vinhos jovens, onde este fenômeno é responsável por 30 a 50% da cor global

(Boulton, 2001).

A maior parte destes pigmentos, condensa-se com taninos do vinho para formar outra classe de moléculas de cor mais estável. Outra parte das antocianinas, relativamente pequena, desaparece por fenómenos de degradação provocados por agentes exteriores (temperatura, luz, oxigénio), ou então, por precipitações da matéria corante coloidal, levando à diminuição da cor e à consequente deterioração da qualidade do vinho (Ribéreau Gayon *et al.*, 1998).

### **2.3.1. Factores que influenciam a estabilidade das antocianinas**

As antocianinas por reacção com o dióxido de enxofre descoram. Para a cor dos vinhos muito contribui a copigmentação, principalmente dos vinhos jovens, onde este fenómeno é responsável por 30 a 50% da cor global (Boulton, 2001).

As reacções de oxi-redução também jogam um papel importante na cor das antocianinas. Por redução as antocianinas descoram.

As antocianinas também podem ser destruídas pelo calor (possivelmente por condensação entre as moléculas de antocianinas), ou por acção enzimática (Huang, 1955).

Spranger-Garcia *et al.* (1990), verificaram que a temperatura é um factor que influencia directamente a velocidade de polimerização das antocianinas. Os mesmos autores constataram o efeito negativo da luz na estabilidade das antocianinas.

Ao estudarem a copigmentação das antocianinas com a quercetina, Asen *et al.* (1972) referem que a copigmentação ocorre tanto com as antocianinas na forma de catião flavílio como de base anidra, sendo o aumento da absorvência provavelmente devido à estabilização da base anidra.

A formação dos complexos de antocianinas-flavonóides é sobretudo devida à formação de ligações de hidrogénio entre o grupo carbonilo das antocianinas na forma de base anidra e os oxidrilos aromáticos dos flavonóides, sendo, no entanto, um factor importante na formação do complexo, a insaturação C2-C3 do heterociclo do flavonóide (Chen e Hrazdina, 1981; Laureano, 1988).

Por outro lado, a presença de substituintes oxidrilos traduz-se num ligeiro efeito hipsocrómico (até comprimentos de onda mais curtos) e aumenta a estabilidade das moléculas antociânicas (Flanzy, 2000).

### 2.3.2. Antocianinas no vinho

Segundo vários autores, a cor dos vinhos tintos jovens surge originalmente das antocianinas, pigmentos contidos nas películas de uvas tintas. As diferentes técnicas de vinificação permitem a extracção destas moléculas nos primeiros quatro a seis dias de maceração. A sua concentração nos vinhos tintos obtidos de uvas de castas de *Vitis vinifera* varia entre 350 mg/l e 1100 mg/l (Leone *et al.*, 1984).

Após a fermentação, o conteúdo de antocianinas diminui devido a reacções químicas e bioquímicas no complexo meio do vinho (Mirabel *et al.*, 1999).

Mazza *et al.* (1999) verificaram que as antocianinas aumentam no início da maceração/fermentação alcoólica, atingindo o máximo 2 a 3 dias após o início desta, diminuindo durante a fermentação maloláctica, e diminuindo lentamente durante o subsequente armazenamento.

As moléculas das antocianinas são instáveis e altamente susceptíveis à degradação. A estabilidade da cor das antocianinas é influenciada pelo pH, temperatura, presença de enzimas, luz, estrutura e concentração das antocianinas, e da presença de compostos complexantes, tais como outros flavonóides, ácidos fenólicos e metais (Markakis, 1982; Mirabel *et al.*, 1999).

As antocianinas não são naturalmente vermelhas, mas mostram a cor vermelha quando estão numa solução ácida, como o vinho. Quando um copigmento é adicionado a uma solução aquosa ácida de antocianinas, produz-se um aumento na intensidade de cor devido à formação de agregados corados (Baranac *et al.*, 1996, 1997; Brouillard *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 1993; Liao *et al.*, 1992; Mistry *et al.*, 1991).

Aparentemente existe uma concentração mínima de antocianinas (cerca de 35 µM) para que seja detectável uma significativa copigmentação. Isto corresponde a 18,5 mg/L de malvidina 3-glucósido, por isso é esperado que a maioria dos vinhos tintos (300 a 500 mg/L) pertença ao intervalo de concentração de copigmentação significativa, enquanto que a maioria dos vinhos rosé não (5 a 50 mg/L) (Boulton, 2001).

### **2.3.3. A cor dos vinhos**

A cor dos vinhos é um aspecto muito importante, mais a mais que sensorialmente é o primeiro atributo que se observa. A tonalidade e a intensidade da cor podem dar informação sobre possíveis defeitos ou qualidades de um vinho, tendo sempre em atenção que a cor é um atributo da visão e, portanto, corresponde a uma sensação psíquica (Hernández-Agero *et al.*, 1993).

A cor dos vinhos é um atributo sensorial. Estando principalmente relacionada com os compostos fenólicos presentes nos vinhos, também a cor varia com as características das uvas, com as técnicas de vinificação e com as numerosas reacções que têm lugar durante o seu armazenamento.

No caso particular dos vinhos tintos, a cor varia constantemente durante a vinificação e armazenamento, com consequentes alterações organolépticas. Todas estas modificações são inevitáveis devido à reactividade dos compostos fenólicos, e ocorrem mais rapidamente durante o primeiro ano (Somers e Evans, 1974).

A cor dos vinhos tintos não depende só do teor em antocianinas, mas está intimamente dependente das características físico-químicas dos pigmentos e do meio onde eles se encontram (Ribéreau-Gayon, 1970) (Timberlake e Bridle, 1976).

### **3. Objectivos**

O trabalho de investigação que se apresenta em seguida tem por objectivo estudar o efeito das colas de origem proteica vegetal e microbiológica na composição físico-química, nomeadamente, no teor em antocianinas de dois vinhos provenientes das castas Touriga Nacional e Trincadeira, comparando o seu efeito com os resultados obtidos com a utilização da bentonite e da albumina de ovo.

### **4. Materiais e Métodos**

Os vinhos utilizados neste trabalho correspondem à vindima de 2011 de duas castas existentes na Tapada da Ajuda, a Trincadeira e a Touriga Nacional. As colas usadas são comerciais cedidas pela Enartis (Plantis – feita à base de proteína de ervilha – E; Pluxbenton N – feito à base de Bentonite -Bent ), pela AEB Group (Ve-Gel - feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura – E+L), pela Ecofiltra (Biolees – feita à base de envelopes celulares de leveduras - L), pela Proenol (Ovocol Pó – feita à base de Albumina de Ovo Atomizada - Alb).

Os ensaios foram realizados em separado, sendo que, em cada semana, se ensaiava uma cola em duas concentrações (C1 e C2), feitas em duplicado, com a excepção do ensaio em branco, para as duas castas. Procedia-se à determinação dos parâmetros da cor e aos cromatogramas.



**Figura 5 – Fotografia com ensaio de colagem em garrafa**

No quadro seguinte apresenta-se a concentração usada nos ensaios para cada cola.

**Quadro 3– Colas comerciais com as concentrações usadas nos ensaios**

Cola	Concentração menor C1 (g.hL <sup>-1</sup> )	Concentração maior C2 (g.hL <sup>-1</sup> )
Biolees- <b>L</b>	20	40
Plantis- <b>E</b>	10	30
Ve-Gel- <b>E+L</b>	10	50
Ovocol- <b>Alb</b>	5	10
Pluxbenton N - <b>Bent</b>	0,3	0,6

Foram testados dois métodos de determinação dos taninos. Foi feita a fidelidade dos dois métodos: método da Metilcelulose e o método Bath Smith (hidrólise ácida). Em ambos os métodos foram feitos 10 repetições, sendo efectuada a alteração das condições de medição, o dia do ensaio (diferentes dias de ensaio para ambos os métodos), mantendo iguais os restantes como mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes.

Para os métodos Bath Smith e da Metilcelulose obtiveram-se os seguintes resultados de repetibilidade (r) e reprodutibilidade (R):

**Quadro 4– Resultados dos ensaios de Repetibilidade (r) e Reprodutibilidade (R) para os métodos de determinação de taninos totais**

Método de Bath Smith		
	r	R
1º dia	0,5101545	
2º dia	0,8812949	
		0,8380309
Método da Metil celulose		
	r	R
1º dia	0,3856157	
2º dia	0,6235177	
		0,7199009

O método da Metilcelulose deu resultados onde a repetibilidade e a reprodutibilidade deram valores mais fidedignos, onde a dispersão é menor.

Perante estes resultados, foi usado este método na determinação dos taninos nos vinhos usados no ensaio.

#### **4.1. Determinações Analíticas**

##### **4.1.1. Caracterização Geral**

As análises químicas foram todas efectuadas no Laboratório de Enologia do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Numa primeira fase, fizeram-se os parâmetros base de caracterização de um vinho tinto. Determinaram-se então os seguintes parâmetros: Massa Volúmica, Acidez Volátil, Acidez total, pH, Teor alcoólico volumétrico, Anidrido Sulfuroso livre, Anidrido Sulfuroso total, Anidrido Sulfuroso combinado e Turbidez. Métodos descritos pelo OIV (OIV, 1990). No quadro 4 encontra-se a descrição protocolar de cada determinação analítica.

**Quadro 5 - Determinações analíticas e Métodos utilizados.**

Determinação Analítica	Princípio do método utilizado	Norma
Massa Volúmica	Areometria	NP-2142
Acidez Volátil	Destilação por arrastamento numa corrente de vapor de água, seguida de titulação	NP- 2140
Acidez total	Titulação acidimétrica	NP-2139
pH	Potenciometria	OIV
Teor alcoólico volumétrico	Destilação e areometria	NP-2143
Anidrido Sulfuroso livre, total, combinado	Titulação iodométrica	NP – 2220
Turbidez	Nefelometria	OIV – resolução OENO 4/2000

A avaliação da turbidez está relacionada com a estimacão da turvacão, sendo funcão do número e da dimensão das partículas em suspensão.

A turvacão de um líquido resulta, pois, de um fenómeno óptico devido à presenca de partículas em suspensão que desviam a luz do seu trajecto normal e a difundem noutras direcções diferentes da do raio incidente. Este fenómeno é conhecido por efeito de Tyndall. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

A medição objectiva da luz difusa numa dada direcção pode ser efectuada com um equipamento óptico, denominado turbidímetro; se a medição se faz numa direcção perpendicular à do raio incidente, o aparelho designa-se nefelómetro. Os resultados são expressos em NTU (Nephelometric Turbidity Units; ou Unidades de Turbidez Nefelométrica), uma unidade (1 NTU) corresponde à medida da radiação difundida por uma suspensão padrão de formazina, sob ângulo de 90° relativamente à direcção do feixe incidente.

Para a avaliação da turbidez foi utilizado um nefelómetro WTWturbe 550 IR, com cuvetes de 25 ml. Foi feita a medição após sete dias de ensaio de colagem.

#### **4.1.2. Determinações Específicas**

Neste ensaio realizaram-se as seguintes determinações aos vinhos de todas as

modalidades:

Composição Fenólica: Caracterização da cor (Intensidade da Cor e Tonalidade da Cor, Pigmentos Poliméricos, Pigmentos Totais e Índice de Polimerização dos Pigmentos, Antocianinas Totais, Antocianinas Coradas) e Taninos Condensados Totais.

#### **4.1.2.1. Caracterização da Cor e composição fenólica**

Seguidamente descrevem-se os princípios dos métodos de caracterização da cor dos vinhos utilizados neste trabalho.

##### **Intensidade da cor**

Para este parâmetro utilizou-se o método rápido aprovado pelo OIV que define a cor como a soma das absorvências a 420nm, 520nm e 620nm (OIV, 1990).

$$A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

##### **Tonalidade da Cor**

A tonalidade da cor corresponde ao quociente entre a absorvência a 420nm e a absorvência a 520nm (Sudraud, 1958).

$$A_{420}/A_{520}$$

##### **Pigmentos Poliméricos**

Esta determinação foi feita de acordo com o método de Somers (1971). Este considera que ao pH do vinho o ião bissulfito apenas descora as antocianinas monoméricas e não os pigmentos poliméricos. Assim os pigmentos poliméricos foram medidos no comprimento de onda de 520nm na presença do ião.

$$A_{520SO2}$$

##### **Pigmentos Totais**

Esta determinação baseia-se no método proposto por Somers & Evans (1977). Baseia-se na leitura da absorvência a 520nm da amostra acidificada com ácido clorídrico, pois para valores desta ordem quase todas as antocianas estão na forma de catião flavílio, sendo por seu lado os pigmentos poliméricos muito pouco afectados para valores de pH baixo (Somers & Evans 1977). Os resultados são expressos em

unidades de absorvência, pois são referidos a 1cm de percurso óptico e têm de ser multiplicados por um factor que tem em conta a diluição do vinho.

**A<sub>520</sub>HCL**

### **Índice de Polimerização dos Pigmentos**

De acordo com Somers & Evans (1977), o Índice de Polimerização dos Pigmentos representa a proporção de cor devida aos pigmentos poliméricos. É dado pela razão entre A<sub>520</sub>SO<sub>2</sub> e a A<sub>520</sub>HCL.

**A<sub>520</sub>SO<sub>2</sub>/ A<sub>520</sub>HCL \*100%**

### **Antocianas Totais**

As antocianas totais foram calculadas de acordo com o método de Somers & Evans (1977), que identifica as antocianas totais com a diferença de absorvências a 520nm da amostra em ácido, antes e depois de descolorada com bissulfito. Permite determinar a totalidade das antocianas descoráveis, sejam estas coradas ou incolores.

**A<sub>520</sub>HCL - A<sub>520</sub>SO<sub>2</sub>**

### **Antocianas Coradas**

Determinadas através do método de Somers & Evans (1977), que calcula este parâmetro pela diferença entre as absorvências a 520nm da amostra do vinho antes e depois da descoloração pelo ião HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### **Quantificação dos Taninos condensados totais por precipitação com metil celulose**

Esta determinação tem por base a medição da absorvência a 280 nm de duas soluções aquosas (com duas repetições cada) com a amostra de vinho (diluída) e sulfato de amónio, onde numa delas é adicionado metil celulose, após centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos.

Efectuou-se as medições das absorvências a 280 nm de soluções aquosas de catequina com concentrações de 10 a 100 mg/L, calculada a curva de calibração com R<sup>2</sup> superior a 0,99. Apresenta-se graficamente a curva padrão.

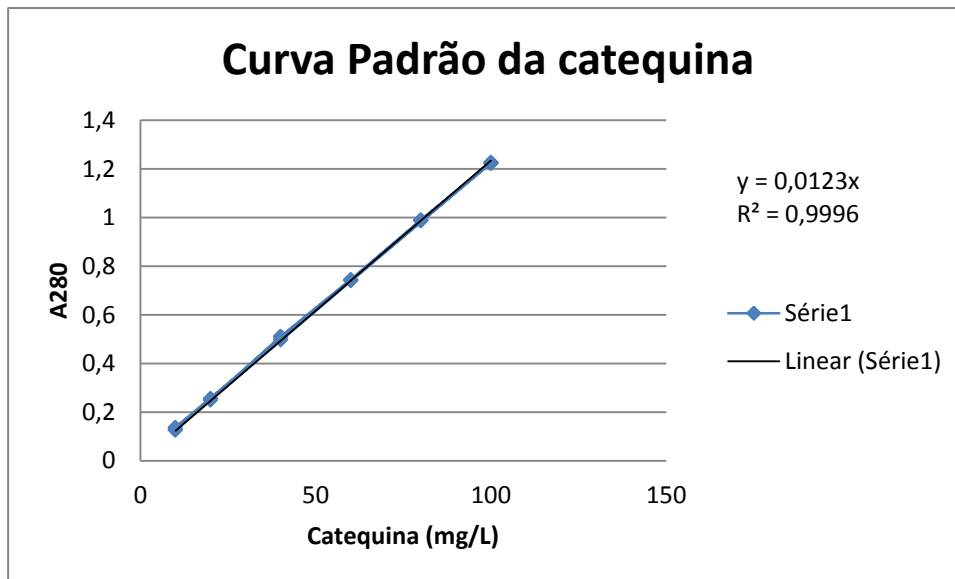


Figura 6 – Curva de Calibração da catequina

O cálculo da concentração de taninos condensados na amostra é obtida pela subtração das absorvâncias a 280 nm das duas: do sobrenadante da solução com a metil celulose e do sobrenadante da solução sem a metil celulose (branco):

$$A_{280}(\text{taninos condensados}) = A_{280}(\text{branco}) - A_{280}(\text{com metil celulose})$$

$$\text{Concentração de taninos (mg/L catequina eq.)} = [A_{280}(\text{taninos condensados}) / 0,0123] \times F$$

$$F (\text{factor de diluição}) = 100$$

Os valores apresentados são em g/L, sendo feita a redução de mg/L para g/L dividindo por 1000.

#### Quantificação dos Taninos pelo método de Bath Smith

O procedimento requer a preparação de duas amostras (num tubo de ensaio), cada uma com 4 ml de vinho diluído a 1/50, 2 ml de água destilada e 6 ml de ácido clorídrico (HCl puro 12N). Uma das amostras é aquecida a 100°C num banho maria, com refrigerante durante 45 minutos. Depois de arrefecer 10 minutos em água fria, adicionar em cada tubo de ensaio 1 ml de álcool etílico (EtOH) para solubilizar, permitindo o aparecimento da cor vermelha. Na amostra que não foi aquecida também

se adiciona 1 ml de álcool etílico. Mede-se a absorvância a 550 nm. A diferença ( $\Delta D$ ) da absorvância do ensaio sem aquecimento ( $D_2$ ) e do ensaio com aquecimento ( $D_1$ ) .

A concentração é calculada com base na seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de taninos (g/L)} = 19,33 \times \Delta D$$

Este método foi apenas usado nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos de doseamento de taninos.

#### **4.2.2. Doseamento de Antocianinas individuais por HPLC.**

Os vinhos são injectados directamente, após serem filtrados.

As antocianinas individuais dos vinhos foram analisadas nas condições descritas por Dallas e Laureano (1994). Recorreu-se a um HPLC Hewlett Packard 1050 equipado com uma bomba quaternária, um detector de comprimento de onda variável e um injector com uma ansa de 20  $\mu$ l, acoplado a um sistema de obtenção e tratamento de dados com o software Konikrom (Instrumentos Konikrom, Koni-Tech Barcelona, Espanha). Utilizou-se uma coluna de fase reversa Superpher 100 C18 (Merck, Alemanha) com 5  $\mu$ m de compactação, 4 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento. O solvente A era ácido fórmico a 40%, o solvente B era acetonitrilo e o solvente C era água bidestilada. As condições iniciais eram 25% do solvente A, 6% do solvente B e 69% do solvente C durante 15 minutos, seguido de um gradiente linear até 25% de A, 25,5% de B e 49,5% de C durante 70 minutos, mantendo estas proporções durante 20 minutos. O fluxo era de 0,7 mL/min e a detecção foi feita a 520nm. A concentração das antocianinas monoméricas foi quantificada pelo método do padrão externo usando o cloreto de malvidina-3-glucósido (Extrasynthese, França), tendo cada padrão sido injectado duas vezes. As áreas dos picos foram convertidas em mg/L de malvidina-3-glucósido, usando a curva padrão preparada com diferentes concentrações do cloreto de malvidina-3-glucósido em metanol a 0,1% de HCl. A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção e da ordem de eluição com outros cromatogramas obtidos nas mesmas condições. Todos os vinhos foram injectados em duplicado.

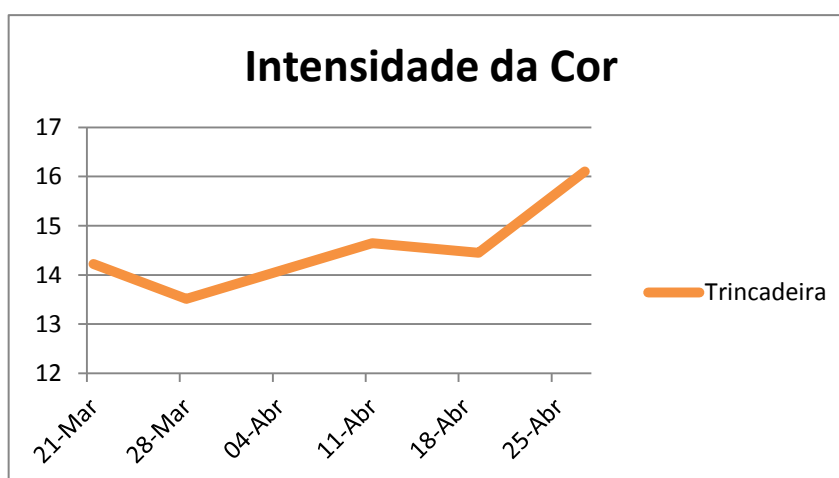
## 5. Resultados e Discussão

No quadro 5 apresentam-se as características gerais dos dois vinhos usados no ensaio de colagem.

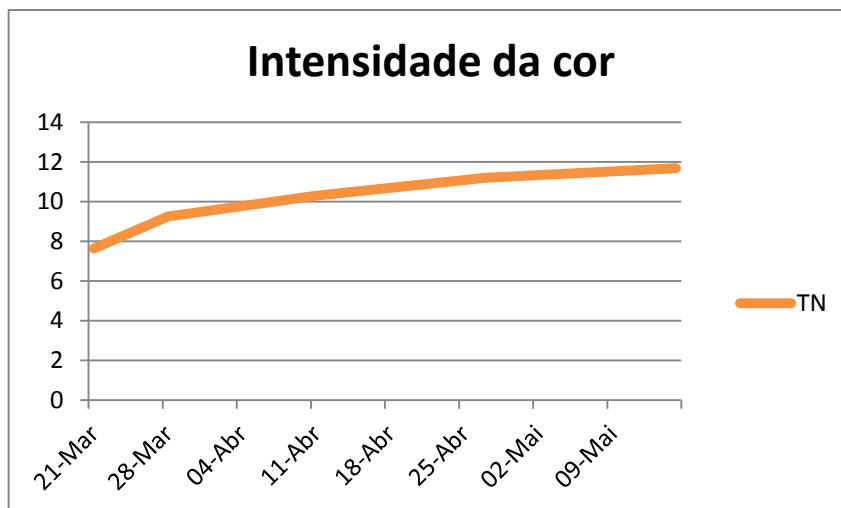
**Quadro 6 - Resultados da análise corrente aos vinhos das castas Trincadeira e Touriga Nacional**

	Trincadeira	Touriga Nacional
Massa Volúmica (g/l)	996,29	992,59
Acidez Volátil (g/l expresso em ácido acético)	0,78	0,58
Acidez total (g/l expresso em ácido tartárico)	7,83	4,73
pH	3,54	3,69
Teor alcoólico (%)	16,3	13,2
Anidrido Sulfuroso livre (mg/l)	19,2	51,2
Anidrido Sulfuroso total (mg/l)	96	156,8

Ao longo dos ensaios foram feitas medições nas testemunhas dos cinco ensaios de modo a observar a evolução dos parâmetros analisados. Estão representados graficamente neste trabalho.



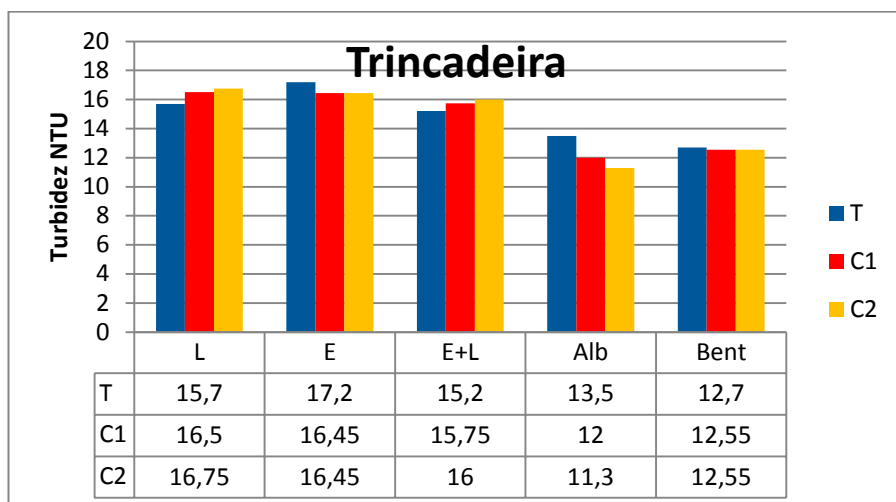
**Figura 7– Evolução ao longo do tempo da Intensidade da cor nos ensaios testemunha para a casta Trincadeira.**



**Figura 8– Evolução ao longo do tempo da Intensidade da Cor nos ensaios testemunha para a casta Touriga Nacional.**

Verificou-se um ligeiro aumento nos parâmetros medidos nos ensaios de colagem, daí a pertinência de se usar uma testemunha para cada ensaio, podendo levar a conclusões erradas, se só se considerasse uma única testemunha para os cinco ensaios de colagem. A explicação para este fenómeno pode ser dada pela oxidação dos pigmentos conduzindo a um aumento nos valores medidos da absorvência a 520nm e 620nm. Esta oxidação dá-se pelo facto de os ensaios terem sido feitos em garrafas pequenas, tendo um maior contacto com o oxigénio do meio (apesar de todos os cuidados tidos nos ensaios, colocando parafilme após a adição da cola).

Apresenta-se graficamente os resultados obtidos na turbidez do vinho para as cinco colas usadas.

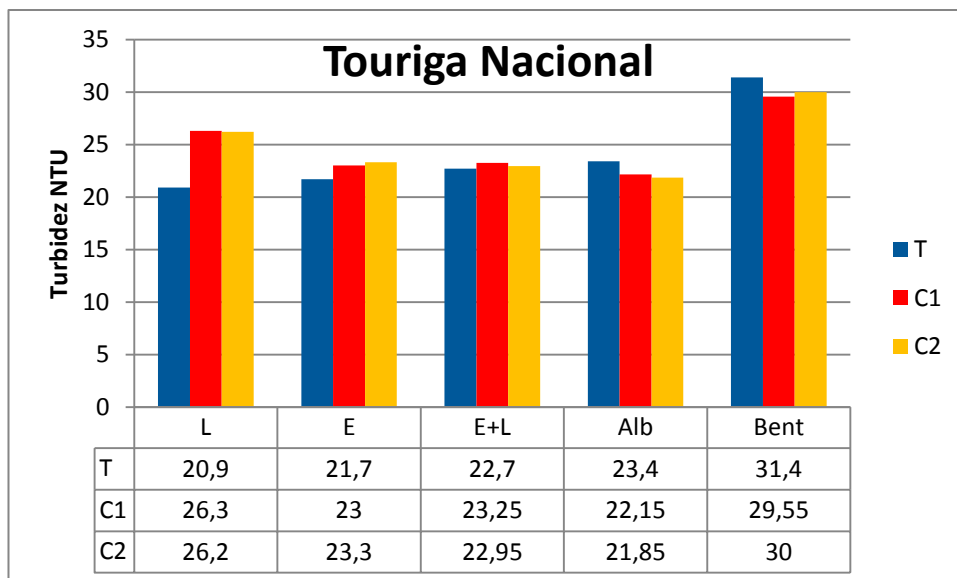


Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent – cola feito à base de Bentonite.

**Figura 9 - Valores da turbidez média para a casta Trincadeira na testemunha (T) e nas concentrações mais baixa (C1) e mais elevada (C2).**

A turbidez tem tendência a decrescer com a aplicação das colas. Estes resultados parecem confirmar a eficácia clarificante das proteínas, pois faz reduzir o número de partículas em suspensão com a sua aplicação. No caso da Albumina de ovo e da Bentonite, a turbidez média diminui com a aplicação das colas em ambas as castas. No caso da casta Trincadeira, as colas que têm extracto de levedura na sua composição (E+L e L) verifica-se um ligeiro aumento dos valores médios de turbidez, que poderá ser explicada pela natureza da cola produzida à base de cápsulas ou extracto de levedura, com menores capacidades de aumentar a limpidez do vinho, principalmente, ao fim dos sete dias do ensaio. A cola produzida a partir de proteína de ervilha (E) reduz ligeiramente o valor de turbidez médio, menos pronunciado do que no caso da proteína de origem animal (Alb).

Na figura seguinte estão graficamente representados os resultados obtidos para a casta Touriga Nacional.



Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

**Figura 10 - Valores da turbidez média para a casta Touriga Nacional na testemunha (T) e nas concentrações mais baixa (C1) e mais elevada (C2).**

Nesta casta obtiveram-se os resultados idênticos ao da casta Trincadeira para as colas L, Alb e Bent. A turbidez aumenta com a aplicação da cola para as de origem proteica e de extrato de levedura e diminui com a cola albumina de ovo e bentonite. A diferença de resultados pode ser devido às características do vinho ou, eventualmente, ao facto da cola não ter precipitado totalmente. Por isso, na maior parte dos casos é recomendado a adição de bentonite.

As proteínas apresentam diferenças na sua composição em aminoácidos, específica da espécie botânica, com diferentes hidrofobicidades entre si e com valores de ponto isoeléctrico provavelmente diferentes. Se por um lado, estas características bioquímicas das proteínas são responsáveis pelas interações com os compostos fenólicos do vinho, originando floculação e a clarificação, por outro lado, tratamentos como a hidrólise parcial das proteínas ou desaminação influenciam nos resultados de clarificação (Marchal *et al.* 2002).

Os quadros 7 a 13 são referentes aos valores médios obtidos por duplicação do ensaio e é dado o valor do desvio padrão. Calculou-se a percentagem de decréscimo para melhor se analisar o efeito de cada cola (comparando o valor na Testemunha com cada uma das concentrações do ensaio).

Apresenta-se no quadro seguinte os resultados obtidos no caso da Intensidade da Cor e da Tonalidade para as duas castas, comparando com as diferentes colas usadas.

**Quadro 7 -Intensidade da Cor e Tonalidade para a casta Trincadeira**

Cola	Intensidade				Tonalidade		
	Amostra	média	sdt	% decres.	Média	Sdt	% decres.
L	T	14,6	0,007		0,68	0,002	
	C1	14,4	0,085	-2%	0,68	0,002	0%
	C2	14,2	0,124	-3%	0,68	0,002	0%
E	T	14,2	0,721		0,69	0,022	
	C1	13,7	0,300	-4%	0,69	0,028	1%
	C2	13,4	0,345	-6%	0,69	0,024	0%
E+L	T	13,5	0,233		0,68	0,003	
	C1	13,7	0,107	2%	0,69	0,003	1%
	C2	13,4	0,312	-1%	0,69	0,010	2%
Alb	T	14,5	0,410		0,68	0,019	
	C1	13,7	0,390	-5%	0,71	0,015	3%
	C2	13,5	0,182	-6%	0,71	0,016	4%
Bent	T	16,1	0,198		0,66	0,004	
	C1	15,5	0,404	-4%	0,69	0,014	4%
	C2	15,3	0,373	-5%	0,68	0,012	3%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2–concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb– cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite.

Na casta Trincadeira verificou-se que, no parâmetro Intensidade da Cor e em todas as colas usadas, existe um ligeiro decréscimo, com a excepção da cola produzida à base de proteína de ervilha e cápsulas de levedura para a concentração mais baixa (E+L). Este resultado poderá ser explicado pelo desvio padrão mais elevado na testemunha (T) em relação ao obtido na concentração mais baixa (C1). No caso da Tonalidade verifica-se um ligeiro aumento. Tratando-se de um parâmetro que entra com a relação das absorvências a 420 nm e a 520 nm, verificou-se em alguns casos, nas leituras da testemunha, valores ligeiramente inferiores aos obtidos para os vinhos colados.

No quadro seguinte encontram-se os dados para a Touriga Nacional no que respeita aos mesmos parâmetros. Para a casta Touriga Nacional e para o parâmetro Intensidade de Cor verificou-se um decréscimo com a aplicação das colas, principalmente, naquela que foi feita à base de albumina de ovo. A Tonalidade da cor tem um ligeiro aumento, com a excepção da cola produzida à base de levedura onde

se verifica o inverso, na concentração mais alta. Os resultados obtidos nestes ensaios são idênticos aos obtidos em ensaios feitos e publicados por outros autores (Mira *et al.*, 2006). No caso dos autores (Iturmendi *et al.*, 2010) que fizeram ensaios com extractos de levedura combinados com bentonite onde a redução nos valores da Intensidade e Tonalidade da cor eram menos acentuados do que noutras colas usadas como a gelatina (que não foi usada no presente estudo). Estes autores verificaram a redução ou decréscimo, tal como se verificou nos ensaios feitos neste estudo.

**Quadro 8 - Intensidade da Cor e Tonalidade para a casta Touriga Nacional**

Cola	Amostra	Intensidade			Tonalidade		
		média	sdt	% decres.	média	Sdt	% decres.
L	T	7,64	0,311		0,78	0,026	
	C1	7,72	0,102	1%	0,77	0,008	0%
	C2	7,59	0,114	-1%	0,77	0,016	-1%
E	T	9,25	0,290		0,69	0,022	
	C1	8,99	0,429	-3%	0,69	0,028	1%
	C2	8,75	0,440	-5%	0,69	0,024	0%
E+L	T	10,30	0,255		0,68	0,003	
	C1	10,29	0,185	0%	0,69	0,003	1%
	C2	10,30	0,180	0%	0,69	0,010	2%
Alb	T	11,19	0,311		0,68	0,019	
	C1	10,27	0,575	-8%	0,71	0,015	3%
	C2	9,67	0,190	-14%	0,71	0,016	4%
Bent	T	11,68	0,028		0,66	0,004	
	C1	11,50	0,090	-2%	0,69	0,014	4%
	C2	11,39	0,092	-2%	0,68	0,012	3%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

Em relação a estes parâmetros, verifica-se uma tendência para um menor efeito na diminuição da intensidade da cor nas colas não tradicionais em relação à cola proteica clássica (de origem animal). Os valores percentuais de decréscimo são mais elevados na albumina do que nas colas não tradicionais como a produzida à base de envelopes celulares de levedura (L) ou a feita à base de proteína de ervilha (E).

Apresenta-se os quadros para os parâmetros Pigmentos totais, Pigmentos polimerizados da casta Trincadeira e da casta Touriga Nacional.

Quer para o parâmetro Pigmentos totais, quer para os Pigmentos Polimerizados, verifica-se um decréscimo com a aplicação das colas. No caso da Bentonite e para os Pigmentos Totais é onde essa redução é mais acentuada. Este parâmetro é dado pela absorvência a 520nm com HCl, traduzindo uma maior acção das colas sobre os Pigmentos totais durante o processo de colagem. Foi a cola mineral a que demonstrou um maior decréscimo, facto esse esperado pela natureza desta cola. As colas proteicas demonstram uma actuação menos agressiva para os parâmetros da cor do vinhos. No caso dos Pigmentos Polimerizados não há qualquer alteração para a Bentonite, verificando-se uma redução nas restantes colas proteicas. Este comportamento repete-se na casta Touriga Nacional.

**Quadro 9 - Parâmetros Pigmentos Totais e Polimerizados para a casta Trincadeira**

Cola	Amostra	Pigmentos Totais			Pigmentos Polimerizados		
		média (UA)	Sdt	% decres.	média (UA)	Sdt	% decres.
L	T	31,3	0,00		5,0	0,01	
	C1	31,2	0,07	0%	4,6	0,01	-8%
	C2	30,5	0,21	-3%	4,6	0,16	-8%
E	T	34,0	1,14		4,4	0,55	
	C1	32,6	0,07	-4%	4,1	0,16	-5%
	C2	32,1	0,00	-6%	4,1	0,30	-6%
E+L	T	23,2	0,57		4,4	0,00	
	C1	22,4	1,14	-3%	4,5	0,28	2%
	C2	22,4	0,79	-4%	4,4	0,02	-1%
Alb	T	24,0	1,21		3,8	0,04	
	C1	22,8	0,36	-5%	3,7	0,02	-3%
	C2	23,3	0,21	-3%	3,7	0,01	-2%
Bent	T	26,3	0,64		4,0	0,07	
	C1	24,5	0,50	-7%	4,0	0,20	0%
	C2	23,2	0,86	-12%	4,0	0,09	0%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

Na casta Trincadeira, a albumina reduz menos os pigmentos totais do que as colas não tradicionais, verificando-se o inverso na casta Touriga Nacional.

**Quadro 10 - Parâmetros Pigmentos Totais e Polimerizados para a casta Touriga Nacional**

Cola	Amostra	Pigmentos Totais			Pigmentos Polimerizados		
		média (UA)	sdt	% decres.	média (UA)	sdt	% decres.
L	T	26,9	1,07		2,2	0,01	
	C1	26,2	1,00	-3%	2,2	0,03	-1%
	C2	25,5	0,00	-5%	2,2	0,07	-2%
E	T	26,3	1,14		2,5	0,55	
	C1	26,3	0,07	0%	2,5	0,16	0%
	C2	25,8	0,00	-2%	2,4	0,30	-4%
E+L	T	18,4	0,57		2,7	0,00	
	C1	17,7	1,14	-4%	2,8	0,28	4%
	C2	17,3	0,79	-6%	3,0	0,02	11%
Alb	T	20,4	1,21		2,6	0,04	
	C1	18,7	0,36	-8%	2,5	0,02	-4%
	C2	18,5	0,21	-9%	2,4	0,01	-8%
Bent	T	19,1	0,64		2,9	0,07	
	C1	18,0	0,50	-6%	3,0	0,20	3%
	C2	18,7	0,86	-2%	3,0	0,09	3%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

Nos dois quadros seguintes encontram-se os valores médios e respectivo desvio padrão para as Antocianinas Totais, Antocianinas coradas e Índice de Polimerização.

Comparando os resultados das antocianinas coradas nas colas proteicas ensaiadas verificou-se que a albumina retira mais antocianinas do que as colas não tradicionais, como a cola L e a cola E, sendo mais evidente na Touriga Nacional que na Trincadeira. Estes resultados são concordantes com os obtidos para a intensidade da cor. Para estes parâmetros verificam-se decréscimos em todas as colas. Nas antocianinas totais não se observam diferenças entre as duas castas e para as colas ensaiadas. Os resultados obtidos neste ensaio são semelhantes aos obtidos em ensaios de outros autores que usaram colas proteicas de origem vegetal e produzidas à base de extracto de levedura. (Mira *et al*, 2004; Iturmendi *et al.*, 2010). Nesses ensaios as colas proteicas foram usadas em isolado e com a adição de bentonite e foram comparadas com colas proteicas de origem animal. Verifica-se o decréscimo nos parâmetros de cor avaliados nesses ensaios. Esses resultados são confirmados com o presente ensaio, com a excepção da Tonalidade, cujos valores não decrescem.

**Quadro 11 - Antocianinas Totais, Antocianinas Coradas e Índice de Polimerização para a casta Trincadeira**

Cola	Amostra	Antocianinas Totais (mg/L)			Antocianinas Coradas (mg/L)			Índice Polimerização %		
		média (UA)	Sdt	% decres.	média (UA)	Sdt	% decres.	média	sdt	% decres.
L	T	459	0,2		54	0,4		16	0,0	
	C1	469	1,0	2%	58	0,3	8%	15	0,0	-7%
	C2	457	9,7	-1%	57	2,0	6%	15	0,6	-6%
E	T	536	41,2		62	1,4		13	2,1	
	C1	516	3,8	-4%	60	4,8	-2%	13	0,5	-2%
	C2	505	10,1	-6%	58	0,8	-6%	13	0,9	0%
E+L	T	318	11,4		54	2,1		19	0,5	
	C1	298	13,4	-6%	53	4,2	-1%	20	0,2	6%
	C2	303	15,0	-5%	53	0,6	-2%	19	0,6	2%
Alb	T	354	25,7		76	6,9		16	1,0	
	C1	333	6,4	-6%	69	0,7	-10%	16	0,2	2%
	C2	344	4,0	-3%	66	3,5	-14%	16	0,1	1%
Bent	T	393	15,2		92	1,7		15	0,6	
	C1	356	16,6	-9%	82	3,4	-11%	16	1,2	8%
	C2	330	14,1	-16%	81	1,3	-12%	17	0,2	14%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

**Quadro 12 - Antocianinas Totais, Antocianinas Coradas e Índice de Polimerização para a casta Touriga Nacional**

Cola	Amostra	Antocianinas Totais (mg/L)			Antocianinas Coradas (mg/L)			Índice Polimerização %		
		média (UA)	Sdt	% decres.	média	sdt	% decres	média	Sdt	% decres
L	T	538	21,4		30	3,8		8	0,4	
	C1	524	20,0	-3%	31	2,3	4%	8	0,4	2%
	C2	511	0,0	-5%	31	0,8	2%	9	0,3	3%
E	T	536	41,2		62	1,4		13	2,1	
	C1	516	3,8	-4%	60	4,8	-2%	13	0,5	-2%
	C2	505	10,1	-6%	58	0,8	-6%	13	0,9	0%
E+L	T	318	11,4		54	2,1		19	0,5	
	C1	298	13,4	-6%	53	4,2	-1%	20	0,2	6%
	C2	303	15,0	-5%	53	0,6	-2%	19	0,6	2%
Alb	T	354	25,7		76	6,9		16	1,0	
	C1	333	6,4	-6%	69	0,7	-10%	16	0,2	2%
	C2	344	4,1	-3%	66	3,5	-14%	16	0,1	1%
Bent	T	393	15,2		92	1,7		15	0,6	
	C1	356	16,6	-9%	82	3,4	-11%	16	1,2	8%
	C2	330	14,1	-16%	81	1,3	-12%	17	0,2	14%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

Verifica-se, no parâmetro Taninos, um decréscimo bastante mais acentuado em termos percentuais do que nos parâmetros da cor, facto esse explicado pelo mecanismo de actuação das colas ser mais efectivo nos compostos responsáveis pela adstringência do vinho. Verifica-se que neste parâmetro as colas não tradicionais retiram mais taninos do que a albumina. A colagem tem como objectivo amaciar um vinho e daí se verificarem estes resultados com maior taxa de incidência. Estes resultados foram observados em experiências efectuadas por outros autores, com a aplicação de colas proteicas como Mira (2004), Cosme *et al.* (2007) e com a aplicação de colas produzidas a partir de extracto de levedura, Iturmendi *et al.* (2010). Estes autores verificaram que a aplicação de colas proteicas vegetais reduzem os taninos no vinho como a gelatina (cola proteica de origem animal). No caso dos ensaios feitos com colas produzidas a partir de extracto de levedura, foram feitas, em simultâneo, com a aplicação de bentonite, daí que não se possa fazer uma comparação directa por se ter usado no presente estudo a cola individual ou combinada com proteína vegetal (ervilha).

**Quadro 13 - Taninos para as castas Trincadeira e Touriga Nacional**

	Trincadeira			Touriga Nacional		
	Taninos (g/l)			Taninos (g/l)		
Cola	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.
L	1,5	0,06		1,7	0,02	
	1,4	0,51	-7%	1,2	0,11	-25%
	1,5	0,12	1%	1,2	0,08	-26%
E	1,6	0,20		1,3	0,20	
	1,5	0,17	-10%	0,8	0,83	-32%
	1,3	0,15	-18%	0,7	0,32	-45%
E+L	1,3	0,03		1,6	0,13	
	1,4	0,10	8%	1,2	0,36	-23%
	1,0	0,23	-22%	1,3	0,20	-16%
Alb	1,2	0,27		1,8	0,05	
	1,4	0,09	10%	1,5	0,13	-13%
	1,2	0,14	-8%	2,0	0,22	11%
Bent	2,4	0,17		1,6	0,10	
	1,3	0,12	-40%	1,3	0,09	-13%
	1,5	0,35	-35%	1,3	0,11	-6%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras; E – cola feita à base de proteína de ervilha; E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura; Alb – cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada; Bent - cola feito à base de Bentonite

Como conclusão temos que todos os parâmetros decrescem com a aplicação de todas as colas, principalmente, no caso da Bentonite e da Albumina de ovo, onde a percentagem de decréscimo é mais acentuado. É no caso dos Taninos onde esse decréscimo é mais acentuado, principalmente na casta Trincadeira, valores estes esperados e obtidos em ensaios efectuados por outros autores como Mira et al. (2004) Iturmendi et al. (2010) e Cosme et al. (2009).

No caso das colas produzidas à base de extracto de levedura, o seu uso é relativamente recente. As leveduras são usadas, tradicionalmente, para melhor controlar todo o processo fermentativo, na produção de compostos aromáticos, terpenos, tiois e fenóis voláteis. Existem leveduras especializadas consoante o tipo de vinho que se pretende. A partir dessas utilizações concluiu-se que a aplicação de leveduras no vinho trazia algumas melhorias sensoriais, como a sensação de aveludado (Delfini et al. 2001).

Em anexo apresentam-se os quadros que relacionam os parâmetros acima descritos para cada cola comparando as duas castas estudadas. Nesses quadros verifica-se que o comportamento da cola é semelhante para os parâmetros da cor nas duas castas. Só se observa uma ligeira diferença nos taninos, especificamente, na bentonite que é mais eficaz na redução destes compostos na casta Trincadeira.

Esta cola é a que tem resultados mais acentuados em termos de decréscimo em relação à testemunha, mais notória na concentração mais elevada e para a casta Trincadeira.

Nos quadros em anexo apresentam-se os resultados obtidos após o cálculo da média, desvio padrão e percentagem de decréscimo para as duas castas estudadas e para as cinco colas usadas no presente estudo.

Foi feita uma repetição da medição dos parâmetros da cor e taninos totais, assim como os cromatogramas para o ensaio da cola produzida à base de extracto de levedura (cola L), por indicação de ficha técnica, ao fim de dois meses.

Apresenta-se em anexo as tabelas com os resultados obtidos. Os valores da testemunha são superiores aos obtidos no ensaio de sete dias. Este facto foi explicado anteriormente, quando comparadas as testemunhas de todos os ensaios de colagem.

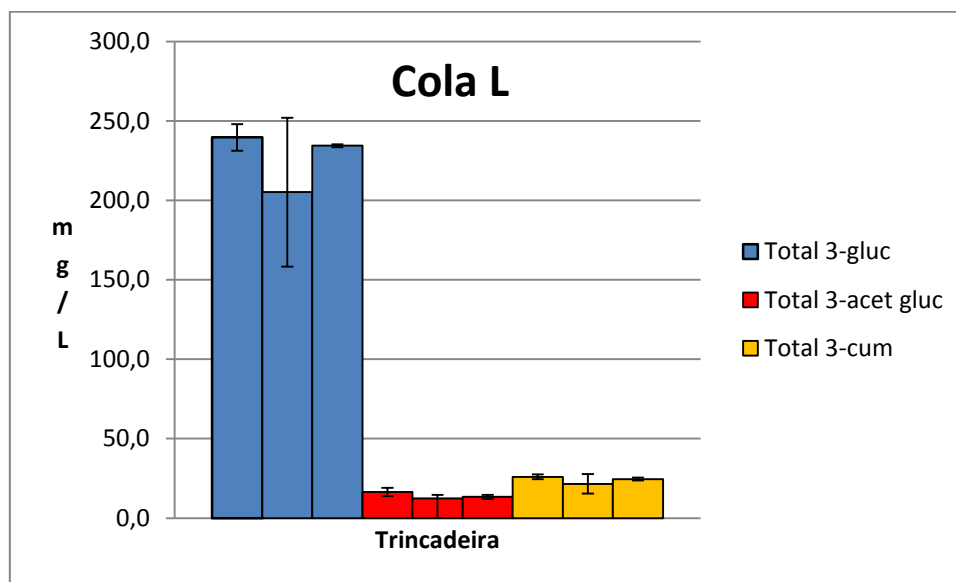
Comparando os parâmetros da cor, como intensidade, tonalidade, pigmentos polimerizados, pigmentos totais, antocianas coradas e antocianas totais, entre os dois ensaios verifica-se que, na casta Touriga Nacional, há um decréscimo mais acentuado no ensaio de dois meses. Na casta Trincadeira, a percentagem de decréscimo não é tão evidente, mas verifica-se um decréscimo mais acentuado do que o verificado no ensaio ao fim de sete dias. No caso dos Taninos verifica-se um comportamento diferenciado para as duas castas. Na casta Trincadeira existe um maior decréscimo no caso do ensaio dos dois meses sendo o inverso para a casta Touriga Nacional. Tratando-se da mesma cola, poderá ser explicado pelo facto de estar perante duas castas com composição fenólica diferente.

Relativamente aos cromatogramas foram feitas a média e desvio padrão para cada antociana, em cada ensaio de colagem. Em todos se verificou um decréscimo na concentração, nas antocianas, esperado pelos resultados obtidos nos parâmetros físico-químicos da cor (intensidade da cor, antocianas totais, antocianas coradas). Quando se faz a leitura para a percentagem de decréscimo, observa-se um valor mais expressivo nas antocianas acetiladas e cumariladas.

**Quadro 14 - Valores médios das antocianinas na casta Trincadeira para a cola à base de cápsulas de leveduras (L)**

Cola L	T valor médio mg/L	Desvio padrão	C1 valor médio mg/L	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio mg/L	Desvio padrão	% Decres
Df 3 –gluc	18,7	0,34	15,8	2,64	-15%	19,6	0,65	5%
Cy 3- gluc	4,5	0,08	3,3	1,19	-26%	3,6	0,16	-22%
Pt 3-gluc	27,0	1,94	23,4	6,42	-13%	26,9	0,75	0%
Pe 3-gluc	40,4	2,11	34,4	7,93	-15%	39,9	0,47	-1%
Mv 3-gluc	149,0	3,93	128,2	28,67	-14%	144,3	0,16	-3%
<b>Total 3-gluc</b>	<b>239,6</b>	<b>8,41</b>	<b>205,1</b>	<b>46,84</b>	<b>-14%</b>	<b>234,3</b>	<b>0,94</b>	<b>-2%</b>
Cy 3- acet gluc	0,9	1,28	0,0	0,00	-100%	0,0	0,00	-100%
Pt 3-acet gluc	4,9	0,44	3,8	0,05	-22%	3,1	0,24	-38%
Pe 3-acet gluc	1,5	0,24	1,3	0,01	-13%	1,4	0,00	-8%
Malv 3-acet gluc	9,1	0,67	7,2	2,24	-20%	8,9	1,55	-2%
<b>Total 3-acet gluc</b>	<b>16,4</b>	<b>2,63</b>	<b>12,4</b>	<b>2,18</b>	<b>-25%</b>	<b>13,4</b>	<b>1,31</b>	<b>-19%</b>
Df 3-cum gluc	4,1	0,79	3,1	1,16	-25%	3,3	0,15	-20%
Pe 3-cum gluc	4,9	0,02	4,1	1,14	-17%	4,7	0,12	-4%
Malv 3-cum gluc	16,9	0,66	14,3	3,83	-15%	16,6	0,58	-2%
<b>Total 3-cum</b>	<b>26,0</b>	<b>1,47</b>	<b>21,5</b>	<b>6,13</b>	<b>-17%</b>	<b>24,6</b>	<b>0,84</b>	<b>-5%</b>

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; cola L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras.

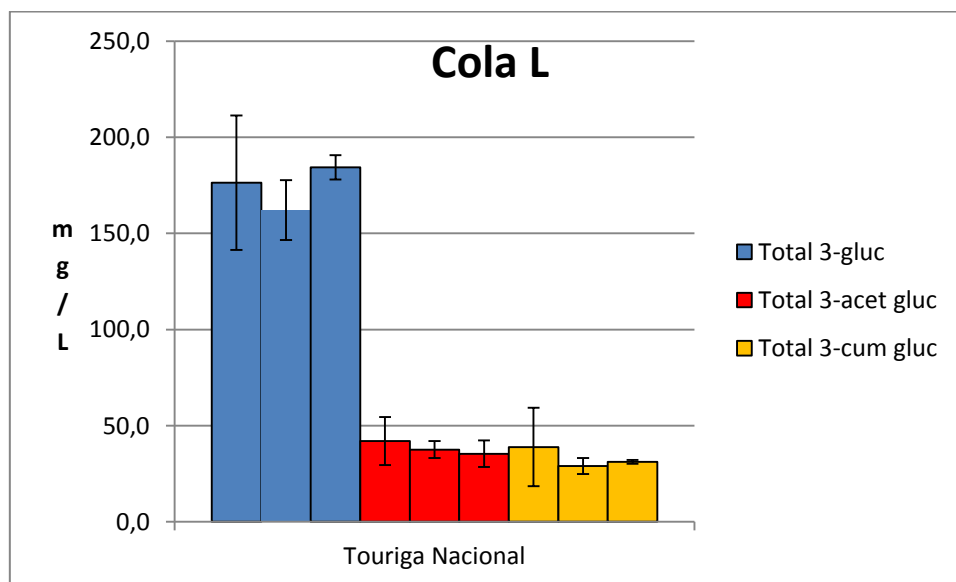


**Figura 11 – Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola L para a casta Trincadeira**

**Quadro 15 - Valores médios das antocianinas na casta Touriga Nacional para a cola à base de cápsulas de leveduras (L)**

Cola L	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3- gluc	6,8	0,91	5,3	0,88	-21%	5,6	0,02	-17%
Cy 3- gluc	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt 3- gluc	12,5	2,80	10,8	1,75	-13%	11,8	0,36	-6%
Pe 3- gluc	20,9	4,71	18,0	2,86	-14%	19,6	0,73	-6%
Mv 3- gluc	136,2	27,40	127,9	10,03	-6%	147,4	5,18	8%
<b>Total 3- gluc</b>	<b>176,4</b>	<b>34,91</b>	<b>162,1</b>	<b>15,53</b>	<b>-8%</b>	<b>184,3</b>	<b>6,29</b>	<b>5%</b>
Cy 3- acet gluc	1,7	0,17	1,5	0,02	-14%	1,5	0,07	-15%
Pt 3- acet gluc	3,9	1,27	3,0	0,56	-24%	3,7	0,17	-7%
Pe 3- acet gluc	1,4	0,09	1,2	0,01	-14%	1,1	0,06	-23%
Malv 3- acet gluc	34,9	10,98	31,9	5,02	-9%	29,2	7,06	-16%
<b>Total 3- acet gluc</b>	<b>42,0</b>	<b>12,51</b>	<b>37,6</b>	<b>4,45</b>	<b>-11%</b>	<b>35,4</b>	<b>6,88</b>	<b>-16%</b>
Df 3- cum gluc	12,8	10,06	7,0	0,80	-45%	8,2	0,32	-36%
Pe 3- cum gluc	6,3	1,44	6,0	0,90	-6%	6,1	0,02	-3%
Malv 3- cum gluc	19,8	8,86	16,0	2,52	-19%	16,9	0,67	-15%
<b>Total 3- cum gluc</b>	<b>38,9</b>	<b>20,36</b>	<b>29,0</b>	<b>4,22</b>	<b>-26%</b>	<b>31,2</b>	<b>0,97</b>	<b>-20%</b>

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; cola L – cola feita à base de envelopes celulares de leveduras.



**Figura 12– Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola L para a casta Touriga Nacional**

Na cola L, para a concentração mais baixa, todas as antocianinas decrescem, existindo um decréscimo mais pronunciado nas acetiladas. Este comportamento é idêntico para as duas castas usadas no presente estudo. Para a concentração C2 (mais elevada) não é tão evidente esta diminuição, mas verifica-se para as antocianinas acetiladas em ambas as castas (Figura 11 e 12).

Quadro 16 - Valores médios das antocianinas na casta Trincadeira para a cola à base da proteína de ervilha (E)

<b>Cola E</b>	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decresci mo	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decresci mo
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3 -gluc	19,1	0,05	13,8	3,49	-28%	18,7	0,45	-2%
Cy 3- gluc	4,4	0,43	3,2	1,26	-27%	3,1	1,49	-30%
Pt 3-gluc	28,4	0,16	26,9	2,96	-5%	20,4	3,66	-28%
Pe 3-gluc	43,3	0,63	41,1	5,40	-5%	29,2	1,22	-33%
Mv 3-gluc	165,2	3,11	156,6	17,77	-5%	108,8	2,83	-34%
Total 3- gluc	260,4	3,53	241,6	23,91	-7%	180,2	9,65	-31%
Cy 3- acet gluc	2,0	0,10	1,7	0,02	-14%	1,5	0,04	-27%
Pt 3-acet gluc	4,4	0,58	3,5	0,82	-22%	2,8	0,92	-36%
Pe 3-acet gluc	1,8	0,18	1,5	0,08	-18%	1,4	0,01	-22%
Malv 3- acet gluc	9,7	0,19	9,0	1,82	-7%	6,3	0,25	-34%
Total 3- acet gluc	17,9	0,11	15,7	2,74	-12%	12,1	1,22	-33%
Df 3-cum gluc	4,4	0,28	4,1	1,20	-6%	2,7	0,67	-38%
Pe 3-cum gluc	4,6	0,04	4,6	0,69	-1%	3,4	0,12	-26%
Malv 3- cum gluc	16,6	0,03	16,3	2,42	-2%	12,0	0,39	-28%
Total 3- cum gluc	25,7	0,29	25,0	4,31	-3%	18,2	0,16	-29%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2–concentração mais elevada; cola E – cola feita à base de proteína de ervilha

Os resultados para a cola E têm uma expressão diferente para as duas concentrações usadas e para as duas castas. Na casta Touriga Nacional o decréscimo é idêntico em ambas as concentrações e para todas as antocianinas, tanto as glucosiladas como as aciladas.

Com a casta Trincadeira, a cola tem um comportamento diferente nas duas concentrações. Na concentração mais baixa (C1) o decréscimo é mais acentuado nas acetiladas e cumariladas, enquanto que na concentração mais elevada, o comportamento é semelhante ao obtido na casta Touriga Nacional (todas as antocianinas têm a mesma expressão em termos de diminuição de concentração de pigmento detectado).

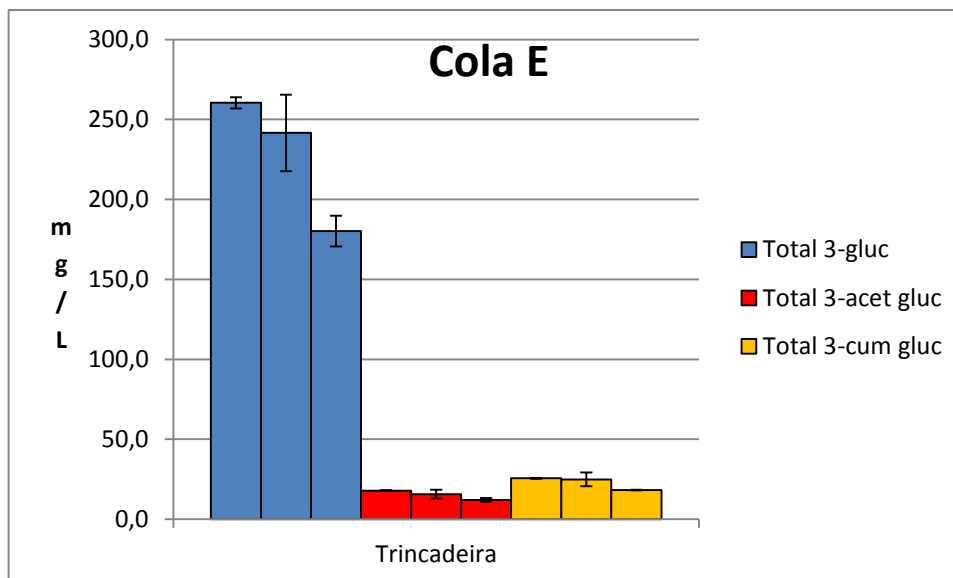


Figura 13– Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Trincadeira

Quadro 17 - Valores médios das antocianinas na casta Touriga Nacional para a cola à base de proteína de ervilha (E)

Cola E	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3- gluc	6,4	0,27	9,0	4,94	42%	4,8	0,29	-24%
Cy 3- gluc								
Pt 3- gluc	11,3	0,83	13,3	2,51	17%	10,6	0,93	-6%
Pe 3- gluc	17,7	2,80	21,8	4,15	23%	16,8	0,39	-5%
Mv 3- gluc	161,2	16,47	127,2	9,15	-21%	119,0	3,55	-26%
Total 3- gluc	196,6	13,11	171,3	2,46	-13%	151,3	5,17	-23%
Cy 3- acet gluc	2,0	0,63	2,0	0,29	0%	1,8	0,12	-12%
Pt 3- acet gluc	5,9	0,48	5,4	1,17	-8%	4,3	0,90	-27%
Pe 3- acet gluc	3,2	0,10	2,4	0,08	-27%	2,0	0,16	-39%
Malv 3- acet gluc	36,3	5,81	32,0	4,74	-12%	30,5	1,54	-16%
Total 3- acet gluc	47,4	5,56	41,8	6,27	-12%	38,5	2,40	-19%
Df 3- cum gluc	8,6	0,43	6,6	0,45	-23%	7,2	0,34	-17%
Pe 3- cum gluc	7,2	0,82	5,8	0,30	-20%	5,4	0,28	-24%
Malv 3- cum gluc	19,3	2,67	15,0	1,21	-22%	14,3	0,70	-26%
Total 3- cum gluc	35,1	3,92	27,4	1,95	-22%	27,0	1,32	-23%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; cola E – cola feita à base de proteína de ervilha

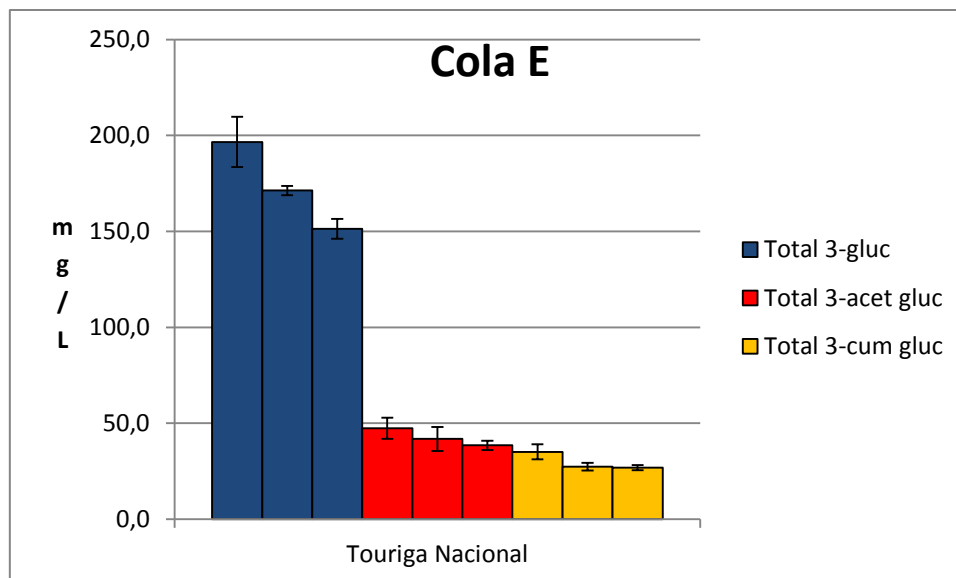


Figura 14 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Touriga Nacional

Quadro 18 - Valores médios das antocianinas na casta Trincadeira para a cola à base de proteína de ervilha e de proteína de levedura. (E + L)

Cola E+L	Testemunha	Desvio	C1	Desvio	% Decres	C2	Desvio	% Decres
	valor médio	padrão	valor médio	padrão		valor médio	padrão	
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3 -gluc	20,5	2,03	19,3	0,60	-6%	18,0	0,59	-12%
Cy 3- gluc	4,3	0,03	4,2	0,33	-3%	3,6	0,03	-17%
Pt 3-gluc	29,1	1,53	28,3	0,44	-3%	26,1	1,31	-10%
Pe 3-gluc	42,7	1,32	41,3	0,32	-3%	37,5	2,55	-12%
Mv 3-gluc	169,0	0,49	164,5	2,44	-3%	149,5	11,02	-12%
Total 3-gluc	265,7	5,39	257,6	0,74	-3%	234,8	15,45	-12%
Cy 3- acet gluc	1,4	0,09	1,2	0,03	-10%	1,1	0,09	-20%
Pt 3-acet gluc	5,6	0,13	5,6	0,51	0%	5,0	0,57	-11%
Pe 3-acet gluc	1,6	0,31	1,4	0,09	-11%	1,5	0,20	-6%
Malv 3- acet gluc	10,9	0,64	9,3	0,22	-14%	9,2	0,87	-15%
Total 3- acet gluc	19,4	0,13	17,6	0,80	-10%	16,8	0,60	-13%
Df 3-cum gluc	5,1	0,06	4,2	0,78	-17%	4,6	0,91	-9%
Pe 3-cum gluc	5,7	0,52	4,9	0,16	-14%	4,4	0,55	-22%
Malv 3- cum gluc	20,2	1,98	17,3	0,15	-14%	16,0	1,73	-20%
Total 3- cum gluc	30,9	2,56	26,4	1,10	-15%	25,1	3,19	-19%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; cola E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura.

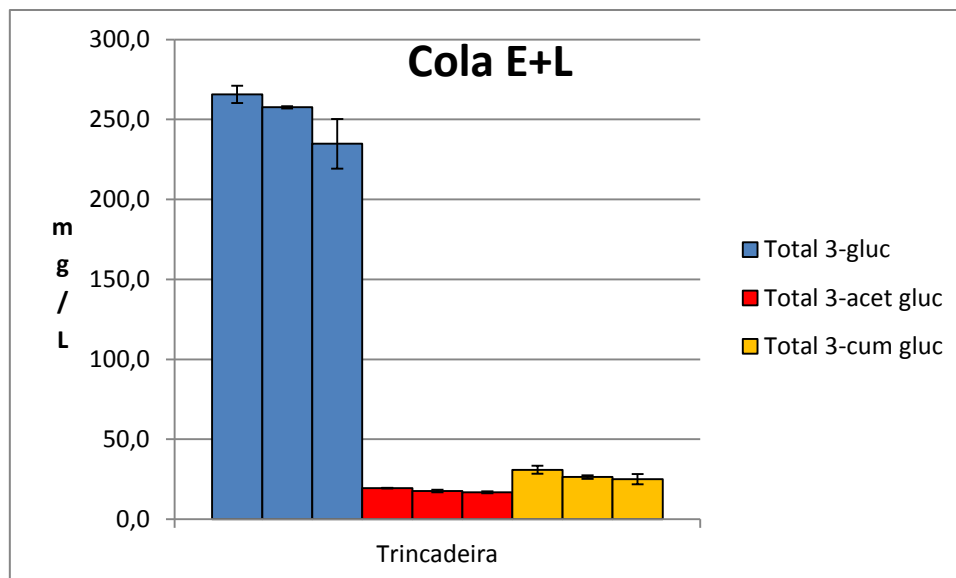


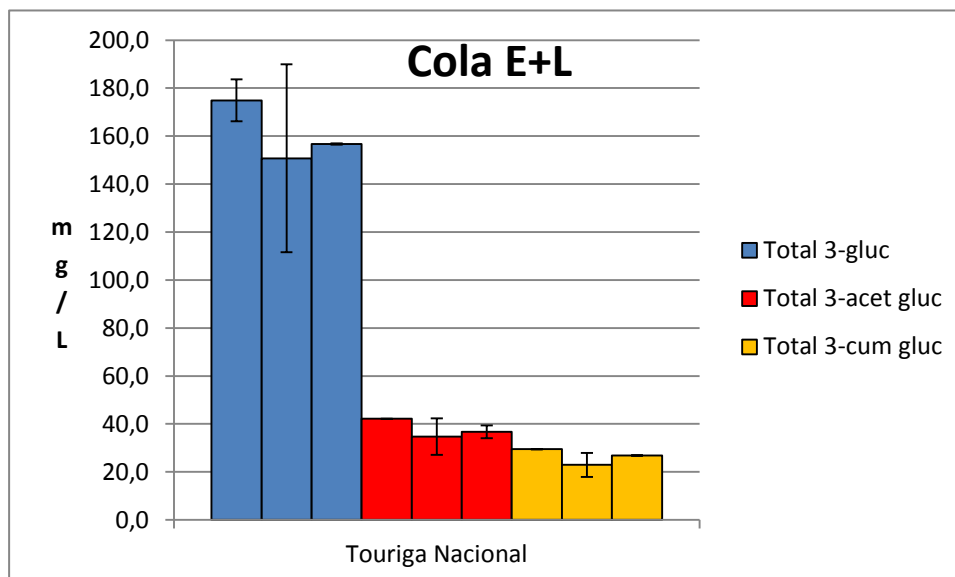
Figura 15 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Trincadeira

Quadro 19 - Valores médios das antocianinas na casta Touriga Nacional para a cola à base de proteína de ervilha e de proteína de levedura. (E + L)

Cola E+L	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3- gluc	6,5	0,37	5,6	2,02	-14%	5,8	0,74	-10%
Cy 3- gluc								
Pt 3- gluc	11,9	0,17	10,7	2,51	-10%	11,5	0,39	-3%
Pe 3- gluc	17,1	1,66	16,6	4,03	-3%	17,3	0,32	1%
Mv 3- gluc	139,4	6,89	117,9	30,57	-15%	122,1	1,13	-12%
Total 3- gluc	174,9	8,75	150,7	39,13	-14%	156,7	0,32	-10%
Cy 3- acet gluc	2,3	0,14	1,6	0,16	-31%	1,7	0,09	-27%
Pt 3- acet gluc	5,0	0,39	4,3	1,32	-14%	4,7	0,35	-6%
Pe 3- acet gluc	2,6	0,00	2,4	0,08	-8%	2,1	0,09	-16%
Malv 3- acet gluc	32,3	0,15	26,5	6,05	-18%	28,2	2,11	-13%
Total 3- acet gluc	42,1	0,38	34,7	7,60	-18%	36,7	2,64	-13%
Df 3- cum gluc	7,6	0,10	6,3	1,61	-16%	6,7	0,38	-11%
Pe 3- cum gluc	6,2	0,04	4,4	0,90	-28%	5,9	0,51	-5%
Malv 3- cum gluc	15,7	0,17	12,1	2,48	-23%	14,3	0,01	-9%
Total 3- cum gluc	29,5	0,11	22,9	4,98	-22%	26,9	0,14	-9%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; cola E+L – cola feita à base de proteína de ervilha e proteína de levedura.

Na cola E+L, para a casta Trincadeira, verifica-se um decréscimo mais acentuado nas antocianinas acetiladas e cumariladas. Na casta Touriga Nacional observa-se uma diminuição em todas as antocianinas. O efeito desta cola conduz um decréscimo idêntico para todos os pigmentos. Este facto é confirmado nos gráficos.



**Figura 16 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola E para a casta Touriga Nacional**

Os resultados obtidos na colagem com a cola combinada (proteína de ervilha e extracto de levedura) apresenta resultados semelhantes ao da cola com extracto de levedura.

Na cola albumina de ovo, na casta Trincadeira, verifica-se uma diminuição mais evidente nas antocianinas acetiladas. Para a casta Touriga Nacional, tal como em outras colas, todas diminuíram a sua concentração com a aplicação da albumina de ovo.

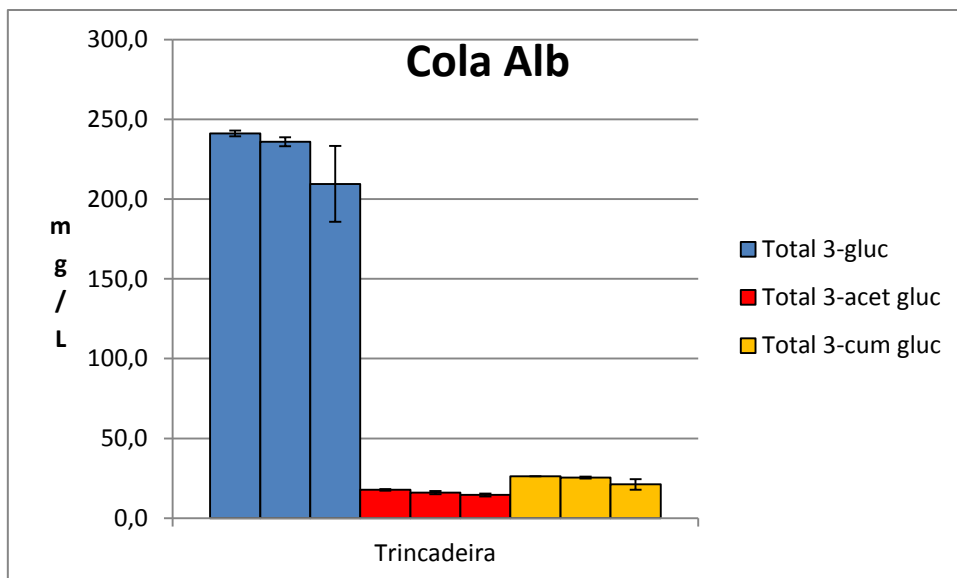


Figura 17 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Alb para a casta Trincadeira

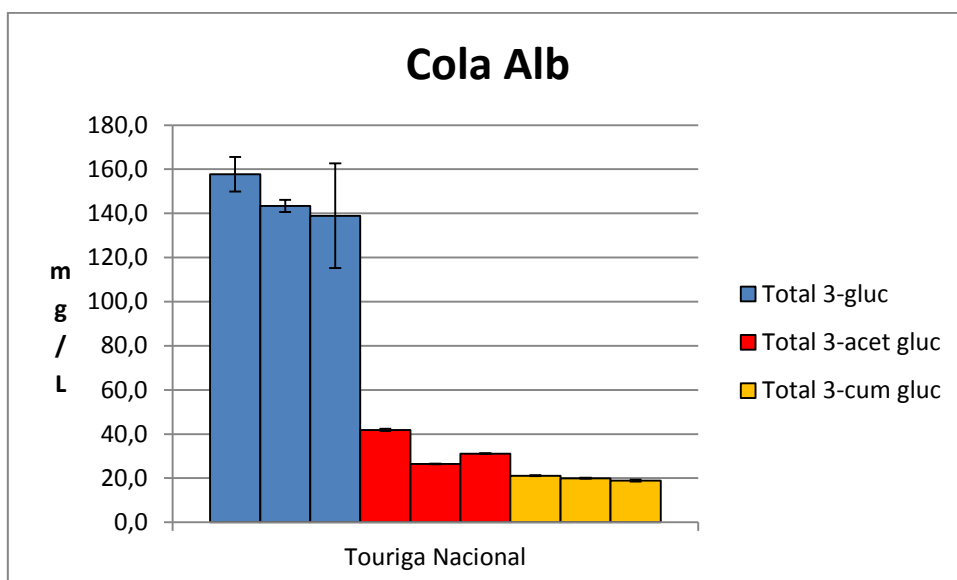


Figura 18- Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Alb para a casta Touriga Nacional

**Quadro 20 - Valores médios das antocianas na casta Trincadeira para a cola à base de albumina de ovo atomizada. (Alb)**

Cola Alb	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3 -gluc	19,6	0,11	18,6	0,28	-5%	16,1	2,43	-18%
Cy 3- gluc	4,0	0,44	3,8	0,04	-3%	3,5	0,39	-13%
Pt 3-gluc	27,4	1,28	26,5	0,22	-3%	23,1	3,60	-16%
Pe 3-gluc	38,8	1,10	37,5	0,21	-3%	34,5	3,48	-11%
Mv 3-gluc	151,3	0,96	149,4	2,00	-1%	132,3	13,82	-13%
Total 3-gluc	241,1	1,75	235,9	2,75	-2%	209,5	23,72	-13%
Cy 3- acet gluc	2,2	0,16	1,6	0,02	-27%	1,3	0,04	-39%
Pt 3-acet gluc	4,7	0,12	4,5	0,01	-3%	4,2	0,47	-9%
Pe 3-acet gluc	1,7	0,00	1,5	0,24	-12%	1,3	0,09	-26%
Malv 3-acet gluc	9,2	0,28	8,4	0,80	-9%	7,7	0,48	-15%
Total 3-acet gluc	17,7	0,56	16,0	1,06	-10%	14,6	0,89	-18%
Df 3-cum gluc	4,4	0,14	3,8	0,75	-14%	3,4	0,47	-23%
Pe 3-cum gluc	4,7	0,11	4,6	0,09	-2%	3,6	0,96	-23%
Malv 3-cum gluc	17,2	0,00	17,1	0,05	-1%	14,2	2,81	-17%
Total 3-cum gluc	26,3	0,03	25,4	0,60	-3%	21,2	3,30	-19%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2–concentração mais elevada; cola Alb– cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada

**Quadro 21 - Valores médios das antocianas na casta Touriga Nacional para a cola à base de albumina de ovo atomizada. (Alb)**

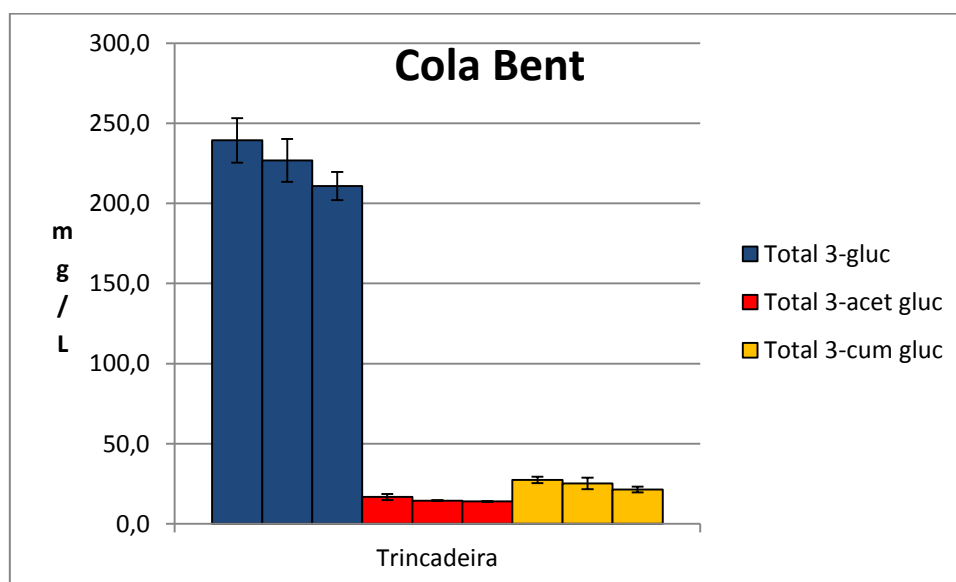
Cola Alb	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3 -gluc	10,6	0,10	9,8	0,20	-7%	6,5	0,18	-39%
Cy 3- gluc								
Pt 3-gluc	14,9	0,23	10,4	0,26	-30%	10,7	0,05	-28%
Pe 3-gluc	19,2	7,03	16,5	0,04	-14%	15,5	0,37	-19%
Mv 3-gluc	112,9	0,92	106,7	2,82	-6%	106,2	0,36	-6%
Total 3-gluc	157,7	7,82	143,4	2,84	-9%	138,9	0,97	-12%
Cy 3- acet gluc	2,3	1,10	1,5	0,25	-34%	2,1	0,46	-6%
Pt 3-acet gluc	3,0	0,19	2,1	1,22	-29%	2,2	0,07	-25%
Pe 3-acet gluc	1,7	0,02	1,3	0,08	-26%	1,0	0,02	-40%
Malv 3-acet gluc	34,9	0,37	21,6	1,52	-38%	25,7	0,45	-26%
Total 3-acet gluc	41,9	0,94	26,5	0,14	-37%	31,1	0,10	-26%
Df 3-cum gluc	5,4	0,36	4,8	0,50	-11%	4,1	0,28	-24%
Pe 3-cum gluc	4,2	0,10	4,1	0,24	-1%	3,7	0,21	-12%
Malv 3-cum gluc	11,5	0,06	11,0	0,02	-4%	11,0	0,38	-4%
Total 3-cum gluc	21,1	0,19	20,0	0,25	-5%	18,9	0,46	-11%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2–concentração mais elevada; cola Alb– cola feita à base de Albumina de Ovo Atomizada

**Quadro 22 - Valores médios das antocianinas na casta Trincadeira para a cola feito à base de Bentonite**

Cola Bent	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3 -gluc	18,7	1,00	17,0	0,44	-9%	17,5	0,15	-6%
Cy 3- gluc	3,8	0,12	3,6	0,02	-4%	4,2	0,73	
Pt 3-gluc	36,7	12,37	34,3	12,34	-7%	24,6	0,94	-33%
Pe 3-gluc	35,8	1,69	35,6	0,11	-1%	34,4	1,63	-4%
Mv 3-gluc	144,4	0,94	136,1	1,55	-6%	130,1	6,83	-10%
Total 3- gluc	239,3	13,88	226,7	13,36	-5%	210,8	8,83	-12%
Cy 3- acet gluc	1,4	0,09	1,2	0,03	-11%	1,1	0,11	-20%
Pt 3-acet gluc	4,5	0,40	4,2	0,64	-8%	3,6	0,30	-21%
Pe 3-acet gluc	1,8	0,65	1,5	0,25	-15%	1,5	0,29	-19%
Malv 3- acet gluc	9,0	1,00	7,5	0,05	-16%	7,8	0,27	-14%
Total 3- acet gluc	16,7		14,5	0,31	-14%	13,9	0,14	-17%
Df 3-cum gluc	4,9	0,22	3,8	0,94	-23%	3,1	0,14	-37%
Pe 3-cum gluc	4,8	0,48	4,6	0,51	-4%	3,9	0,28	-17%
Malv 3- cum gluc	17,8	1,79	16,9	2,14	-5%	14,5	1,38	-19%
Total 3- cum gluc	27,4		25,2	3,58	-8%	21,5	1,80	-22%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; cola Bent - cola feito à base de Bentonite

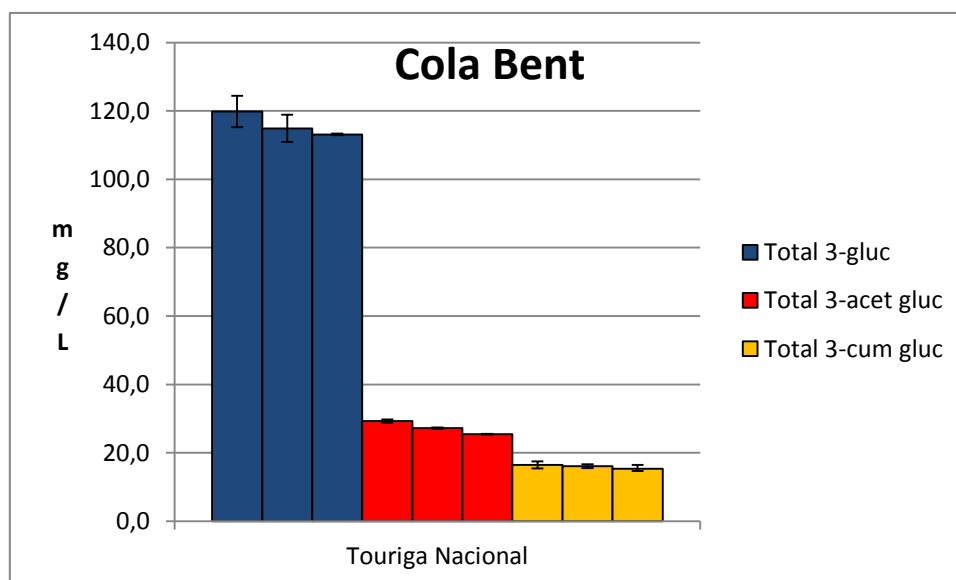


**Figura 19 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Bent para a casta Trincadeira**

**Quadro 23 - Valores médios das antocianinas na casta Touriga Nacional para a cola feito à base de Bentonite**

Cola Bent	Testemunha valor médio	Desvio padrão	C1 valor médio	Desvio padrão	% Decres	C2 valor médio	Desvio padrão	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Df 3- gluc	4,7	0,00	4,6	0,02	-3%	4,5	0,00	-6%
Cy 3- gluc								
Pt 3- gluc	8,3	0,34	7,9	0,31	-5%	7,7	0,01	-7%
Pe 3- gluc	13,2	0,85	12,5	0,62	-5%	12,5	0,25	-5%
Mv 3- gluc	93,6	3,40	89,9	3,06	-4%	88,5	0,02	-5%
Total 3- gluc	119,8	4,59	114,9	3,96	-4%	113,1	0,27	-6%
Cy 3- acet gluc	3,7	0,26	3,6	0,14	-1%	2,9	0,32	-22%
Pt 3- acet gluc	3,4	0,40	3,2	0,49	-4%	2,6	0,22	-23%
Pe 3- acet gluc	1,7	0,09	1,4	0,06	-19%	1,4	0,05	-20%
Malv 3- acet gluc	20,6	0,12	19,0	0,37	-8%	18,6	0,03	-9%
Total 3- acet gluc	29,3	0,46	27,2	0,19	-7%	25,4	0,12	-13%
Df 3- cum gluc	4,3	0,85	4,2	0,77	-1%	3,7	0,25	-13%
Pe 3- cum gluc	3,3	0,07	3,3	0,02	-2%	3,1	0,31	-6%
Malv 3- cum gluc	8,9	0,09	8,6	0,16	-3%	8,5	1,09	-4%
Total 3- cum gluc	16,5	1,00	16,1	0,59	-2%	15,3	1,15	-7%

Legenda: T – testemunha; C1 – concentração mais baixa; C2 – concentração mais elevada; cola Bent - cola feito à base de Bentonite



**Figura 20 - Valores médios totais das antocianinas 3-glucósido, 3-acetilglucósido e 3-cumarilglucósido na cola Bent para a casta Touriga Nacional**

No caso da Bentonite e tratando-se de uma cola de origem mineral verifica-se um decréscimo mais acentuado, principalmente, na concentração mais elevada para todas as antocianas. Este resultado é idêntico nas duas castas estudadas.

Comparando os cromatogramas para os dois ensaios (sete dias e dois meses para a cola L) observaram-se os seguintes resultados (quadros 24 e 25):

-Na casta Trincadeira existe um maior decréscimo nas antocianas acetiladas no ensaio de sete dias, sendo o decréscimo mais acentuado nas antocianas cumariladas no ensaio de dois meses.

- Na casta Touriga Nacional existe um maior decréscimo nas antocianas cumariladas no ensaio de sete dias, sendo o decréscimo mais acentuado nas antocianas acetiladas no ensaio de dois meses. É o inverso do verificado na casta Trincadeira.

**Quadro 24 – Valores médios das antocianas nas castas Trincadeira e Touriga Nacional para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) ao fim de 7 dias de ensaio.**

Trincadeira	T média	SDT	C1 média	SDT	% Decres	C2 média	SDT	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Total 3-gluc	239,6	8,41	205,1	46,84	-14%	234,3	0,94	-2%
Total 3-acet gluc	16,4	2,63	12,4	2,18	-25%	13,4	1,31	-19%
Total 3-cum	26,0	1,47	21,5	6,13	-17%	24,6	0,84	-5%
Touriga Nacional	T média	SDT	C1 média	SDT	% Decres	C2 média	SDT	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Total 3-gluc	176,4	34,91	162,1	15,53	-8%	184,3	6,29	5%
Total 3-acet gluc	42,0	12,51	37,6	4,45	-11%	35,4	6,88	-16%
Total 3-cum gluc	38,9	20,36	29,0	4,22	-26%	31,2	0,97	-20%

**Quadro 25 - Valores médios das antocianas nas castas Trincadeira e Touriga Nacional para a cola à base de cápsulas de leveduras (L) ao fim de 2 meses de ensaio.**

Trincadeira	T média	SDT	C1 média	SDT	% Decres	C2 média	SDT	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Total 3-gluc	134,9	7,33	115,7	16,43	-14%	126,0	2,48	-7%
Total 3-acet gluc	10,1	0,16	9,5	1,29	-5%	9,7	0,51	-4%
Total 3-cum gluc	14,2	2,64	11,4	1,65	-20%	12,5	1,13	-12%
Touriga Nacional	T média	SDT	C1 média	SDT	% Decres	C2 média	SDT	% Decres
	mg/L		mg/L			mg/L		
Total 3-gluc	108,3	13,55	105,6	7,94	-2%	105,6	4,10	-2%
Total 3-acet gluc	135,6	2,55	26,4	2,33	-81%	24,5	1,43	-82%
Total 3-cum gluc	16,5	0,78	14,9	0,97	-10%	15,3	0,13	-7%

## 6. Conclusões

Os ensaios de colagem efectuados com colas proteicas foram conduzidos em vinhos disponibilizados pelo Instituto Superior de Agronomia (Touriga Nacional e Trincadeira), tendo-se partido de vinhos que não tinham sofrido qualquer processo de clarificação, apenas o que ocorre naturalmente com o Inverno.

A clarificação do vinho pelas colas usadas foi seguida pela medição da turbidez, após sete dias de ensaio de colagem. A turbidez tem tendência a decrescer com a aplicação das colas. Estes resultados parecem confirmar a eficiência clarificante das proteínas, pois faz reduzir o número de partículas em suspensão com a sua aplicação. No caso da Albumina de ovo e da Bentonite, a turbidez diminui com a aplicação das colas. Esta diferença de resultados pode ser devido às características do vinho ou eventualmente, ao facto da cola não ter precipitado na totalidade. Contudo, os valores de turbidez são elevados (superiores a 10 NTU), não se considerando os vinhos cristalinos. Os resultados obtidos com a proteína de ervilha confirmam os resultados obtidos, anteriormente, por outros autores (Mira *et al.*, 2007). O aumento da turvação do vinho foi tanto maior, quanto o aumento da concentração da cola, o que poderá demonstrar, não terem aptidão para a clarificação do vinho tinto.

Para o caso das colas elaboradas à base de extracto de levedura, o seu comportamento é semelhante aos das colas proteicas vegetais.

Do ponto de vista físico-químico, estas colas afectaram com baixa percentagem de decréscimo, os parâmetros da cor analisados como a Tonalidade, Intensidade da cor. Contudo, este valor foi mais notório para os Taninos. Conclui-se que afecta mais o parâmetro associado a características organolépticas, distintas da cor, como a adstringência. Tratando-se de um dos objectivos da aplicação de colas nos vinhos tintos, este resultado só vem confirmar a sua eficácia.

Comparando os parâmetros da cor entre os dois ensaios verifica-se que, na casta Touriga Nacional, há um decréscimo mais acentuado no ensaio de dois meses. Na casta Trincadeira, a percentagem de decréscimo não é tão evidente mas verifica-se um decréscimo mais acentuado do que o verificado no ensaio ao fim de sete dias. No caso dos Taninos, verifica-se um comportamento diferenciado para as duas castas. Na casta Trincadeira existe um maior decréscimo no caso do ensaio dos dois meses, sendo o inverso para a casta Touriga Nacional. Tratando-se da mesma cola, poderá

ser explicado este facto por se estar perante duas castas com composição fenólica diferente.

No presente estudo pretendia saber quais as consequências, em termos de cor, para os vinhos. Nos cromatogramas analisados verificou-se um decréscimo global de todos os picos identificados. Este decréscimo foi mais acentuado em algumas colas e concentração em todas as antocianas. Verificou-se para certas colas um maior decréscimo nas antocianas acetiladas e cumariladas. Para a casta Touriga Nacional, no estudo feito com as colas E+L (proteína de ervilha e extracto de levedura) e E (proteína de ervilha) verifica-se um decréscimo para todas as antocianinas, tal como para a cola Alb (albumina de ovo atomizada). Na cola L (extracto de levedura), a diminuição é mais acentuada nas antocianinas acetiladas. Na casta Trincadeira e para a cola L temos o mesmo comportamento verificado na casta Touriga Nacional. No caso da cola E, verificou-se que, nas duas concentrações, os resultados não foram idênticos. Para a concentração mais baixa observou-se uma diminuição mais acentuada para as antocianinas aciladas, na concentração mais elevada encontrou-se um comportamento idêntico ao da Touriga Nacional, isto é, reduz para todas as antocianinas. Para a cola E+L verificou-se uma diminuição nas antocianinas acetiladas e cumariladas (aciladas) para as duas concentrações usadas. Com a cola Alb, a casta Touriga Nacional tem uma redução idêntica em todas as antocianinas. Na casta Trincadeira, o decréscimo é mais acentuado para as antocianinas acetiladas.

No caso da cola Bent, verifica-se um decréscimo mais acentuado na concentração mais elevada para as duas castas e para todas as antocianas.

Comparando os cromatogramas para os dois ensaios (sete dias e dois meses para a cola L) verifica-se o seguinte: na casta Trincadeira existe um maior decréscimo nas antocianas acetiladas no ensaio de sete dias, sendo o decréscimo mais acentuado nas antocianas cumariladas no ensaio de dois meses. Para a casta Touriga Nacional existe um maior decréscimo nas antocianas cumariladas no ensaio de sete dias, sendo o decréscimo mais acentuado nas antocianas acetiladas no ensaio de dois meses. É o inverso do verificado na casta Trincadeira.

No que se refere ao estudo das antocianinas presentes no vinho, verifica-se que estas colas actuam, sobretudo, sobre as antocianinas aciladas.

## 7. Bibliografia

- Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H. (1972). Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effects on color. *Phytochemistry*, **11**:1139-1144.
- Bath Smith, E. C. (1954). Adstringency in foods. *Food*, **23**, 124
- Bailou, C. E. (1982). em "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: life cycle and inheritance." (Strathern, J. N., Jones, E. W. e Broach, J. R. (Eds)). *Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour*, New York, 335-360
- Baranac J. M., Petranovic, N. A., Dimitric-Markovic, J. M. (1996). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 1333-1336.
- Baranac J. M., Petranovic, N. A., Dimitric-Markovic, J. M. (1997). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. II. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 1694-1697.
- Bobbio, P. A, Bobbio, F. Q. (2001). Química do Processamento de Alimentos. *Ed. Varela*. São Paulo.
- Bobbio, F. O., Bobbio, P. A. (2003) Introdução à química de alimentos. 3ª edição. *Ed. Varela* São Paulo.
- Boulet e Escudier (1998) citados por Flanzky (1998).
- Boulton R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**: 67-87.
- Bravo-Haro, S., Rivas-Gonzalo, J.C., & Santos-Buelga, C. (1991). Nota. Influencia de distintos clarificantes sobre las fracciones polifenólicas y el color en un vino tinto envejecido. *Revista Agroquímica Tecnología Alimentar* **31**: 584-590.
- Brouillard, R., Dubois, J.E. (1977). Mechanism of structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**: 1359-1364.
- Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M. (1989). Copigmentation reaction of anthocyanins: A microprobe for the structural study of aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**: 2604-2610.
- Browyer P. K. (2002) - Phenolics: a peek inside the pandora's box of organic chemistry. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, **461a**: 67-70.
- Brugirard, A. (1997). Aspects pratiques du collage des moûts et des vins. *Collection Avenir Oenologie. Oenoplurimedia. Chaintré*
- Cabib, E., Roberts, R. L. e Bowers, B. (1982). Synthesis of the yeast cell and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 763-793
- Caillet, M-M (1994). Stabilisation et clarification des vins par le collage. *Revue des Oenologues*, **74**: 15-18.

Calderone, R. A. e Braun, P.C. (1993) Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch. Med. Res.* **24**: 275-279

Casanova, M., Lopezribot, J. L, Martinez, J. P. e Sentandreu, R. (1992). Characterization of cell wall proteins of yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labeling with biotin: comparison with other techniques. *Infect. Immun.* **60**: 4898-4901

Cassone, A. (1989). Cell wall of *Candida albicans* functions and its impact on the host. *Curr. Top. Med. Mycol.* **3**: 248-314

Castillo-Munõz N., Fernández-González M., Gómez-Alonso S, García-Romero E, Hemosín-Gutiérrez I. (2009). Red-Color Related Phenolic Composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) Grapes and Red Wines. *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 7883-7891.

Chaffin, W. L, López-Ribot, J. L, Casanova, M., Gozalbo, M., Gozalbo, D., e Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar 1998, 130-180

Cheyrier, V., Moutounet, M., Darni-Machado, P. (1998). Les composés phénoliques in Oenologie. Fondements scientifiques et technologiques. Ed. Tec&Doc, Paris.

Chen L. J., Hrazdina, G. (1981). Structural properties of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochemistry*, **20**: 297-302.

Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (2007). Protein fining agents: Characterisation and red wine fining assays. *Italian Journal of Food Science* **19**: 39-56.

Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (2009). Effect of various Proteins on Different Molecular Weight Proanthocyanidin Fractions of Red Wine during Wine Fining. *American Journal of Enol. Vitic.* **60**: 74-81.

Cross, G. A. M. (1990). Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu.Rev. Cell Biol.* **6**: 1-39

Davies A. J., Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 716-720.

Delfini, C., Formica, J. V. (2001). *Wine Microbiology Science and Technology*. Ed. Marcel Dekker. 219-240.

Ferguson, M. A: J: e Williams, A. F. (1988). Cell surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.*, 57.285-320

Ferrarini, R., Celotti, E. & Zironi, R. (1996). Importance des charges électriques superficielles des adjuvants oenologiques, des particules et des colloïdes présent dans les mûts et les vins. *Rev. Franc. Oenol.*, **158**: 5-9.

Feuillat, M. (1980). Stabilisation des vins. *Vignes vin*, **291**: 12-20.

Feuillat, M. (1987). Stabilisation et clarification des vins: aspects colloïdaux. *Rev. Oenologues*, **45**: 7-17.

Feuillat, M. (1997). Techniques oenologiques d'aujourd'hui. *Rev. Franc. Oenol.*, **162**: 13-14.

Flanzy, C. (1998). Oenologie. Fondements scientifiques et technologiques. *Editions Techniques & Documentation*. Lavoisier. Paris.

Flanzy C, (2000). Enologia. Fundamentos científicos y tecnológicos. *Madri: Mundi-Prensa*: 784.

Flak, W., Tiefenbrunner, G., & Tscheik, G. (1990). Die Auswirkungen der Schönung mit frischem Hühnerweiß auf die phenolischen Inhaltsstoffe und das Geschmacksbild von Rotweinen. *Mitteilungen Klosterneuburg* **40**: 199-204.

Godon, B. (1996). Protéines végétales. *Editions Techniques & Documentation*. Lavoisier. Paris.

Hrazdina G. (1981). Anthocyanins and their role in food products. *Lebensmitt. Wiss. u. Technol.* **14**:283-286.

Haslam, E. (1974). Poliphenol – protein interaction. *Biochemistry Journal*, **139**: 285-288.

Harborne, J. B.; Simonds, N. W. (1964) —In: Biochemistry phenolic compounds. *Harborne J. B. (ed.), Academic Press*, New York.

Henschke, P. A. & Rose, A. H. (1991) - Plasma membranes. In A. H. Rose & J. S. Harrison (Eds.), *The Yeasts*. Volume 4. Yeast organelles. 2nd ed. *London: Academic Press*: 297-345.

Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect. *Food Chem.*, **63**: 491-498.

Huang H.T. (1955). Decoloration of anthocyanins by fungal enzymes. *J. Agricult. Food Chem.*, **3**: 141-1466.

Iturmendi, N., Durán, D., Marín-Arroyo, M. R. (2010). Fining of red wines with gluten or yeast extract protein. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**: 200-207.

Jurd, L., Geissman, T.A. (1956). Absorption spectra of metal complexes of flavanoid compounds. *J. Org.Chem.*, **21**: 1365-1401.

Kapteyn, J. C, Van Den Ende, H. e Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. et biophys. Acta* **1426**, 373-383

Kaufmann G. (1988). Gelatine ist nicht gleich Gelatine. *Weinwirtschaft-Technik* **1**: 25.

Konings, W. N. & Velkamp, H. (1983). Energy transduction and solute transport mechanisms in relation to environments occupied by microorganisms. *Microbes in their natural environments. Symp. Soc. General Microbiol.*, **34**: 153-186.

Konings, W. N., Lolkema, J. S. & Poolman, B. (1995). The generation of metabolic energy by solute transport. *Arch. Microbiol.*, **164**: 235-242.

Konings, W. N. (2006) - Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, **90**: 325-342.

Lagune, L., Glories, Y. (2001). Produits de clarification, une alternative rapidement exploitable: les derives de l'albumine d'oeuf. *Rev. Franç. Oenol.*, **191**: 27-33.

Lagune, L., Glories, Y. (2002). Les derives de l'albumine d'oeuf : les essais en cave. *Rev. Franç. Oenol.*, **194**: 18-24.

Lagune- Ammirati, L. & Glories, Y. (2001). Produits de clarification, une alternative rapidement exploitable: les dérives de l'albumine d'oeuf. *Rev. Franc. Oenol.*, **191**: 25-33.

Lagune- Ammirati, L., Lartigue, L. & Glories, Y. (1996). Apport récents à l'étude du collage des vins rouges. *Rev. Franc. Oenol.*, **161**: 17-28.

Lagune-Ammirati, L., & Glories, Y. (2001). Produits de clarification, une alternative rapidement exploitable: les dérivés de l'albumine d'oeuf. *Revue Française d'Oenologie* **191**: 25-33.

Laureano O. (1988). A matéria corante dos vinhos tintos. Relações com a cor e a origem dos vinhos. Dissertação apresentada às provas de acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Instituto Superior de Agronomia – UTL.

Lefebvre, S., Gerland, C., Maury, C. & Gazolla, M. (2000). Nouvelles colles végétales: origins, propriétés et performances. *Rev. Franc. Oenol.*, **184**: 28-32.

Lefebvre, S., Gerland, C., Scotti, B. & Bonni, G. (2002). Le collage aux protéines végétales: performance à l'échelle de la cave . *Rev. Franc. Oenol.*, **195**: 31-34.

Leone, A. M., La Notte, E., Gambacorta, G. (1984). Gli antociani nelle fasi di macerazione e di elaborazione del vino. L'influenza della tecnica diffusiva sulla loro estrazione. *Vignevini*, **4**: 17.

Liao, H., Cal, Y., Haslam, E. (1992). Polyphenol interactions. 6. Anthocyanins - Copigmentation and color changes in red wines. *J. Sd. Food Agric.*, **59**: 299-305.

Lipke, P. N. e Ovalle, R. (1998). Ceil wall architecture in yeast: new stucture and new challenges. *J. of Bacteriol.*, **180**: 3735-3740

Lipke, P. N., Wojciechwicz, D. e Kurjan, J. (1989). *AGcri* is the structural gene for *Saccharomyces cerevisiae* a-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell Biol.* **9**: 3155-3165a

Lovino R., Di Benedetto G., Suriano S. and Scazzariello M. (1999). L'influenza dei coadiuvanti enologici sui composti fenolici dei vini rossi. *L'Enotecnico* **4**:97.

Machado-Nunes, M., Laureano, O., & Ricardo-da-Silva, J.M. (1995). Influência do tipo de cola e metodologia de aplicação nas características físico-químicas e sensoriais do vinho. *Actas do 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, **2**: 99-115.

Marchal, R., Sinet, C., & Maujean, A. (1993). Étude des gélatines oenologiques et du collage des vins de base champenois. *Bulletin O.I.V.*, **66**: 691-725.

Marchal R., Jeandet P., Bournérias P.Y., Valade J.-P. and Demarville D. (2000b). Utilisation de protéines de blé pour la clarification des moûts champenois. *Rev. Oenol.* **97**:19.

Marchal R., Marchal-Delahaut L., Lallement A. and Jeandet P. (2002) Wheat gluten used as a clarifying agent of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **50**:177.

Markakis, P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. Anthocyanins as Food Colours. *Academic Press Inc. London, UK*:163-180.

Mateus, N. (2002). Estudo da composição e dos mecanismos de transformação das antocianinas e dos flavonóis em uvas e vinhosda Região Demarcada do Douro. Características físico-químicas associadas à cor e ao sabor. Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto.

Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2001). Influence of fining with different molecular weight gelatines on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**, 140-145.

Maury, C., Sarni-Manchado P., Lefebvre S., Cheynier V., & Moutounet M. (2003). Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **54**: 105-111.

Mazza, G., Miniati, E. (1993). Grapes. In: Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. *CRC Press:Boca Raton*; 149-199.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Fanc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.*, **47**:4009-4017.

Mira, H.M. (2004). Influência da aplicação de resinas permutadoras de iões, PVI-PVP e proteínas vegetais nas características dos vinhos. *Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia*: 215-273.

Mira, H.M., Leite, P., Ricardo-da-Silva, J.M., Curvelo-Garcia, A.S. (2006). Plant Proteins in Wine Fining: Influence on Chemical and Sensory Characteristics. *Le Bulletin de L'OIV*, **79**: 277-296.

Mirabel, M., Saucier, C., Guerra, C., Glories, Y. (1999). Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**: 211-218.

Mistry, T. V., Cap, Y., Lilley, T. H., Haslam, E. (1991). Polyphenol interactions. Part 5. Anthocyanin co-pigmentation. *J. Chem. Soc. (Perkins Trans 2)*: 1287-1296.

Mrsa, V., Seidl, T., Gentsch, M. e Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145-1154

Nakayama, K. I., Fang, Y., Tanaka, A. e, Jigami, Y. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*

- OIV (1999). Resolução 7/99: Collage. Office International de la Vigne e du Vin.
- OIV (2004a). Resolução OENO 7/2004: Moûts – Collage à l'aide de matières protéiques d'origine végétale. Organisation International de la Vigne e du Vin, Viena.
- OIV (2004b). Resolução OENO 8/2004: Vins – Collage à l'aide de matières protéiques d'origine végétale. Organisation International de la Vigne e du Vin, Viena.
- OIV (2004c). Resolução OENO 9/2004: Vins – Modification de la fiche existante. Organisation International de la Vigne e du Vin, Viena.
- OIV (2004d). Resolução OENO 24/2004: Recherche de matières protéiques d'origine végétale dans les vins e les moûts. Organisation International de la Vigne e du Vin, Viena.
- OIV (2004e). Resolução OENO 28/2004: Codex - Matières protéiques d'origine végétale. Organisation International de la Vigne e du Vin, Viena.
- Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast wall and surface components, "*Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces, vol. 3. Cell cycle and cell biology*". (J. Pringle, J. Broach, e E. Jones (Eds.)) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y: 229-362.
- Ostergaard, S., Olsson, L. & Nielsen, J. (2000) - Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol.*, **64**: 34-50.
- Panero L., Bosso A., Gazzola M., Scotti B. and Lefebvre S. (2001). Primi risultati di esperienze di chiarifica con proteine di origine vegetale condotte su vini Uva di Troia. *Vigne e Vini*:**11**:117.
- Pastor, F. I: J., Valentin, E., Herrero, E. e Sentandreu, R. (1984). Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoproteins released by zymolase and their contribution to wall architecture. *Biochem. Biophys. Acta* **802**: 292-300
- Poinsaut, P., Hardy, G. (1995). Les bentonites: caractérisation des bentonites. *Revue des Oenologues*, **75**: 25-30.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les composés phenoliques des vegetaux, Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P. (1970). Les dosage de composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chim. Anal.* **52**: 627-631.
- Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, P. and Sudreau, P., (1977). Traité d'oenologie. *Sciences et Techniques du Vin*. Tome 4. Dunod, Paris.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D., (1998). Traité d'oenologie 2. Chimie du vin stabilization et traitements. *Dunod*, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2001). Handbook of enology. Volume 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments. *Wiley, West Sussex*.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. & Lonvaud, A. (2006) - Handbook of Enology, Volume 1 (The Microbiology of Wine and Vinifications), 2<sup>a</sup> edição, John Wiley & Sons.

Ricardo-da-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M., Cabanis, J. C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **57**: 111-125.

Rudiger & Mayr (1928 ). (Citado em Lagune- Ammirati, L., Lartigue, L. & Glories, Y. 1996).

Rudiger & Mayr (1929 ). (Citado em Lagune- Ammirati, L., Lartigue, L. & Glories, Y. 1996).

Salgues, M., Razzungles, A. (1983). Le colage des vins. *Vititechnique*, **64**: 32-35

Sanz, P. Herrero, E. e Sentandreu, R. (1989). Role of glycosylate in the incorporation of intrinsic mannoproteins into cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 265-270

Scotti, B. and Poinssaut, P. (1997). Le collage à la gélatine: entre science et traditions. *Rev. Oenol.* **85**: 41-47.

Sheperd, M. G., Poulter, R. T: M. e Sullivan, P. A. (1985). *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenecity. *Annu. Ver. Microbiol.* **39**: 579-614

Sheperd, M G. (1987). Cell envelope of *Candida albicans*. *Crit. Ver. Microbiol.* **15**: 7-25

Sims, C.A., Eastridge, J.S., & Bates, R.P. (1995). 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*, **46**: 155-158.

Somers, T.C.; Evans, M.E. (1974). Wine quality. Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *J. Sci. Food Agric.*, **25**: 1369-1379

Spranger-Garcia, M. I., Belchior, A. P., Leandro, M. C., Santos, C. (1990). Estabilidade físico-química e biológica de concentrados de pigmentos antociânicos obtidos de bagaços de uva. *Ciência Téc. Vitiv.*, **9**: 143-159.

Timberlake, C.F., Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **27**:97-105.

Toh-E, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T. and Matsui, Y. (1993). Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast*, **9**:481-494

Udenfriend, S., Micanovic, R. e Kodukula, K. (1991) Structural requirements of a nascent protein for processing to a PI-G anchored form: studies in intact cells and cell free systems. *Cell Biol. Intl. Ref.* **15**: 739-759

Usseglio-Tomasset, L. (1989). *Chimie Oenologique*. Editions Technique & Documentation, Lavoisier. Paris.

Valentin, E., Herrero, E., Pastor, F. I. J. e Sentandreu, R. (1984). Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. microbiol.* **130**: 1419-1428

Van Rinsum, J. e Van den Ende, H. (1991). Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 717-726

Vicenzi, R. (2000). *Química Industrial de Alimentos – UNIJUI - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - Capítulo 8 – Proteínas*.

Williams N. (1996) - Genome Projects: Yeast Genome Sequence Ferments New *Research.Science*, **272**: 481.

Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo, J. M., Narasimhan, M. L, Damsz, B., Lee, H., Abad, L. R., Paino D'urzo, M. e Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1997). Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 7082-7087

Zoecklein, B., Fugelsang, C., Gump, B., Nury, S. (1995). *Wine analysis and production*. The Chapman & Hall Enology Library. International Thompson Publishing.

## ANEXOS

Quadro 1– Cola produzida à base de extracto de levedura com as 2 castas

Casta		INTENSIDADE			TONALIDADE			PIGMENTOS TOTAIS			PIGMENTOS POLIMERIZADOS		
		média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.
Trincadeira	T	14,65	0,007		0,677	0,002		31,3			5,0		
	C1	14,36	0,085	-2%	0,680	0,002	0%	31,4	0,266	0%	4,6	0,183	-9%
	C2	14,18	0,124	-1%	0,679	0,002	0%	31,0	0,760	-1%	4,6	0,116	1%
Touriga Nacional	T	7,64	0,311		0,776	0,026		26,9	1,071		2,2	0,014	
	C1	7,72	0,102	1%	0,775	0,008	0%	25,9	1,150	-4%	2,2	0,047	1%
	C2	7,59	0,114	-2%	0,777	0,016	0%	25,6	0,208	-1%	2,2	0,055	-4%

Casta		ANTOCIANAS TOTAIS (mg/L)			ANTOCIANAS CORADAS (mg/L)			Ind. Polim %			TANINOS (g/l)		
		média	sdt	% decres.	média	Sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	Sdt	% decres.
Trincadeira	T	459,0			53,7			16			1,53	0,063	
	C1	474,5	6,676	3%	59,0	2,872	10%	15	0,559	-9%	1,43	0,512	-7%
	C2	464,3	16,046	-2%	56,6	1,371	-4%	15	0,563	3%	1,54	0,124	1%
Touriga Nacional	T	464,3	21,897		30,3	3,818		8	0,381		1,65	0,017	
	C1	442,5	24,204	-5%	30,2	1,932	0%	9	0,511	5%	1,24	0,112	-25%
	C2	439,1	5,510	-1%	30,4	1,204	1%	8	0,266	-3%	1,22	0,084	-26%

Legenda: T – testemunha C1 – concentração mais baixa C2–concentração mais elevada

Quadro 2– Cola produzida à base de proteína vegetal (ervilha) com as 2 castas

Cola E		INTENSIDADE			TONALIDADE			PIGMENTOS TOTAIS			PIGMENTOS POLIMERIZADOS		
Casta	Amostra	média	sdt	% decres.	média	Sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T	14,22	0,721		0,685	0,022		34,04	1,143		4,35	0,551543	
	C1	13,69	0,300	-4%	0,689	0,028	1%	32,65	0,266	-4%	4,12	0,127932	-5%
	C2	13,37	0,345	-2%	0,687	0,024	0%	32,07	0,580	-2%	4,09	0,240416	-1%
Touriga Nacional	T	9,25	0,290		0,670	0,005		26,31	0,214		2,45	0,070711	
	C1	8,99	0,429	-3%	0,688	0,022	3%	26,31	0,603	0%	2,46	0,122338	0%
	C2	8,75	0,440	-3%	0,709	0,036	3%	25,70	0,240	-2%	2,39	0,127932	-3%

		ANTOCIANAS TOTAIS (mg/L)			ANTOCIANAS CORADAS (mg/L)			Ind. Polim %			TANINOS (g/l)		
Casta	Amostra	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T	535,7	41,238		61,6	1,414		13	2,051		1,63	0,201	
	C1	515,8	3,538	-4%	60,4	3,778	-2%	13	0,323	-2%	1,47	0,172	-10%
	C2	505,0	8,555	-2%	58,0	1,766	-4%	13	0,619	1%	1,34	0,146	-18%
Touriga Nacional	T	444,5	1,928		47,9	0,990		9	0,193		1,25	0,201	
	C1	444,4	12,503	0%	45,1	2,973	-6%	9	0,506	0%	0,85	0,828	-32%
	C2	434,6	8,396	-2%	41,6	4,403	-8%	9	0,565	-1%	0,69	0,319	-45%

Legenda: T – testemunha C1 – concentração mais baixa C2–concentração mais elevada

Quadro 3– Cola produzida à base de proteína vegetal (ervilha) e extracto de levedura com as 2 castas

Cola E+L		INTENSIDADE			TONALIDADE			PIGMENTOS TOTAIS			PIGMENTOS POLIMERIZADOS		
Casta	Amostra	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T	13,52	0,233		0,684	0,003		23,23	0,571		4,41	0,000	
	C1	13,74	0,107	2%	0,692	0,003	1%	22,42	1,146	-3%	4,51	0,190	2%
	C2	13,41	0,312	-2%	0,694	0,010	0%	22,40	0,484	0%	4,35	0,042	-4%
Touriga Nacional	T	10,30	0,255		0,627	0,012		18,38	0,000		2,74	0,042	
	C1	10,29	0,185	0%	0,627	0,006	0%	17,65	0,172	-4%	2,80	0,076	2%
	C2	10,30	0,180	0%	0,636	0,004	1%	17,27	0,760	-2%	3,00	0,232	7%

		ANTOCIANAS TOTAIS (mg/L)			ANTOCIANAS CORADAS (mg/L)			Ind. Polim %			TANINOS (g/l)		
Casta	Amostra	média	Sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T	317,6	11,427		53,5	2,121		19	0,467		1,30	0,029	
	C1	298,1	23,242	-6%	52,9	2,740	-1%	20	1,269	6%	1,40	0,103	8%
	C2	302,9	9,422	2%	52,5	3,883	-1%	19	0,418	-4%	1,01	0,231	-22%
Touriga Nacional	T	276,3	1,414		55,8	2,828		15	0,231		1,57	0,132	
	C1	259,8	5,245	-6%	54,4	1,918	-3%	16	0,527	6%	1,20	0,362	-23%
	C2	245,3	10,572	-6%	49,5	6,115	-9%	17	0,904	10%	1,33	0,195	-16%

Legenda: T – testemunha C1 – concentração mais baixa C2–concentração mais elevada

Quadro 4 – Cola produzida à base de albumina de ovo atomizada com as 2 castas

Cola Alb		INTENSIDADE			TONALIDADE			PIGMENTOS TOTAIS			PIGMENTOS POLIMERIZADOS		
Casta	Amostra	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T	14,45	0,410		0,683	0,019		23,99	1,214		3,77	0,042	
	C1	13,69	0,390	-5%	0,706	0,015	3%	22,78	0,240	-5%	3,67	0,033	-3%
	C2	13,54	0,182	-1%	0,713	0,016	1%	23,33	0,993	2%	3,69	0,036	1%
Touriga Nacional	T	11,19	0,311		0,656	0,020		20,35	1,214		2,64	0,049	
	C1	10,27	0,575	-8%	0,644	0,038	-2%	18,74	0,631	-8%	2,41	0,049	-9%
	C2	9,67	0,190	-6%	0,658	0,017	2%	18,51	0,504	-1%	2,38	0,058	-1%

		ANTOCIANAS TOTAIS (mg/L)			ANTOCIANAS CORADAS (mg/L)			Ind. Polim %			TANINOS (g/l)		
Casta	Amostra	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T	354,1	25,696		76,3	6,930		16	0,974		1,24	0,270	
	C1	333,3	5,069	-6%	68,6	4,945	-10%	16	0,237	2%	1,37	0,086	10%
	C2	343,5	19,806	3%	65,6	3,684	-4%	16	0,675	-2%	1,15	0,136	-8%
Touriga Nacional	T	319,2	22,632		64,5	5,798		13	0,530		1,75	0,046	
	C1	294,4	11,340	-8%	60,9	8,802	-6%	13	0,271	-1%	1,52	0,126	-18%
	C2	291,0	10,408	-1%	54,1	3,031	-11%	13	0,478	0%	1,95	0,222	-12%

Legenda: T – testemunha C1 – concentração mais baixa C2 – concentração mais elevada

Quadro 5 – Cola produzida à base de bentonite com as 2 castas

Cola Bent		INTENSIDADE			TONALIDADE			PIGMENTOS TOTAIS			PIGMENTOS POLIMERIZADOS		
Casta	Amostra	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T	16,10	0,198		0,663	0,004		26,31	0,643		4,01	0,071	
	C1	15,47	0,404	-4%	0,687	0,014	4%	24,49	0,867	-7%	4,01	0,143	0%
	C2	15,31	0,373	-1%	0,684	0,012	0%	23,20	0,530	-5%	4,02	0,068	0%
Touriga Nacional	T	11,68	0,028		0,627	0,002		19,09	0,000		2,91	0,184	
	C1	11,50	0,090	-2%	0,606	0,007	-3%	18,00	0,543	-6%	3,00	0,064	3%
	C2	11,39	0,092	-1%	0,617	0,012	2%	18,66	0,476	4%	2,99	0,072	0%

		ANTOCIANAS TOTAIS (mg/L)			ANTOCIANAS CORADAS (mg/L)			Ind. Polim %			TANINOS (g/l)			
Casta	Amostra		média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	média	sdt	% decres.	media	sdt	% decres.
Trincadeira	T		526,2	12,855		92,0	1,697		15	0,641		2,39	0,167	
	C1		489,9	17,338	-7%	82,1	2,696	-11%	16	0,722	8%	1,30	0,121	-40%
	C2		464,1	10,609	-5%	80,8	3,950	-2%	17	0,307	6%	1,50	0,347	-35%
Touriga Nacional	T		381,8	0,000		67,2	4,525		15	0,963		1,64	0,103	
	C1		360,1	10,862	-6%	64,3	1,311	-4%	17	0,602	9%	1,35	0,095	-13%
	C2		373,2	9,528	4%	62,4	2,098	-3%	16	0,236	-4%	1,27	0,105	-6%

Legenda: T – testemunha C1 – concentração mais baixa C2 – concentração mais elevada