

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ALERGÊNICOS DE
COADJUVANTES ENOLÓGICOS EM VINHOS

Fernanda Rodrigues Spinelli

Caxias do Sul
2020

Fernanda Rodrigues Spinelli

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ALERGÊNICOS DE
COADJUVANTES ENOLÓGICOS EM VINHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando à obtenção do grau de doutora em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Regina Vanderlinde

Caxias do Sul

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S757d Spinelli, Fernanda Rodrigues

Determinação de resíduos alergênicos de coadjuvantes enológicos em
vinhos [recurso eletrônico] / Fernanda Rodrigues Spinelli. – 2020.
Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: Regina Vanderlinde.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Vinho e vinificação. 2. Alérgenos. I. Vanderlinde, Regina, orient. II.
Título.

CDU 2. ed.: 663.25

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

Fernanda Rodrigues Spinelli

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS ALERGÊNICOS DE
COADJUVANTES ENOLÓGICOS EM VINHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

TESE APROVADA EM 14 DE AGOSTO DE 2020.

Orientador: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini

Prof. Dr. Vitor Manfroí

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

*Dedico essa tese às pessoas mais especiais da minha vida:
meus pais Tânia e Charles, meu irmão Fábio,
meu marido Rodrigo Bonho,
e meus avós
Ruth e Monte Alvar Rodrigues (in memoriam) e
Lourdes e Paulo Spinelli.*

AGRADECIMENTOS

Penso que todas as pessoas com quem convivemos ou cruzamos durante a nossa trajetória possuem sua devida importância, valor esse que é imensurável. Somos “mutantes”, colecionamos experiências de vida e estamos em constante construção, em busca do aprendizado e da evolução como seres humanos.

✓ Agradeço a Deus, aos meus guias e ao meu anjo da guarda, por iluminarem e guiarem meus pensamentos e caminhos. Pela minha saúde e força diária.

✓ Aos meus pais, Charles e Tânia e ao meu irmão, Fábio, pelo carinho e incentivo, assim como a todos os familiares. Em especial aos meus pais, que sempre me deram amor, exemplo e atenção, incondicionalmente. Proporcionaram estrutura e base para a minha formação acadêmica e em todos os sentidos da vida.

✓ Ao meu esposo, Rodrigo Bonho, pelo amor, suporte, incentivo e companheirismo.

✓ À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Vanderlinde, que abriu as portas para o meu início no fascinante mundo do vinho. Pela orientação, pela amizade, pelos ensinamentos, pela confiança e pelas oportunidades de crescimento desde a minha iniciação científica. Minha sincera gratidão e admiração.

✓ Agradeço aos professores da banca de acompanhamento, Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva e Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna, e da banca examinadora, Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini e Prof. Dr. Vitor Manfroi, por disponibilizarem tempo e conhecimentos para o aprimoramento deste trabalho.

✓ À Universidade de Caxias do Sul e aos demais professores do PPGBIO, em especial ao Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon pelos conselhos e incentivo. Assim como aos funcionários, especialmente a Lucimara Serafini Rech, sempre muito atenciosa e cordial.

✓ Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP), financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

✓ Ao meu padrinho, Prof. Dr. Renato Rombaldi, pelas conversas e reflexões.

✓ À Agilent Technologies, em especial ao Leonardo Valentin, a Simone Nascimento, ao Celso Blatt e a Mariana Baptistão, pela atenção, discussões e conhecimentos compartilhados. Por me receberem e auxiliarem no desenvolvimento do método.

✓ À Organização Internacional da Vinha e do Vinho pela bolsa de pesquisa, e aos seus especialistas que revisaram e compartilharam sugestões valiosas para este trabalho.

✓ A todos os amigos, ex e atuais colegas e gestores do Laboratório de Referência Enológica (LAREN) e da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR), que, de forma direta ou indireta, auxiliaram no desenvolvimento deste estudo e pelos bons momentos compartilhados. Em especial a Ana Paula Drehmer, pelo imensurável auxílio em todas as etapas analíticas. Meu sincero agradecimento.

✓ Aos meus colegas e amigos Susiane Leonardelli e Gilberto João Cargnel, que compartilharam comigo nos últimos anos diversos momentos, de estudo, de trabalho, de conversas, reflexões e descontração. Susi, obrigada pela parceria nessa trajetória e pelo auxílio na parte estatística. Giba, obrigada pela revisão e sugestões.

✓ Agradeço aos gestores da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande Sul (SEAPDR) e do Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), pela disponibilidade de equipamentos, materiais e instalações.

✓ Às empresas AEB, na pessoa do Bem-hur Rigoni, e a Vêneto Mercantil, na pessoa do Laércio Spadari, que disponibilizaram materiais e conhecimentos.

✓ A todos os profissionais do setor vitivinícola que contribuíram para este trabalho.

✓ Aos meus amigos, que me apoiaram e dividem comigo momentos essenciais de vida.

A todos, o meu sincero e profundo, Muito Obrigada!

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL	22
3.1 A VITIVINICULTURA BRASILEIRA	22
3.2 VINIFICAÇÃO.....	23
3.2.1 Vinificação de vinhos brancos.....	24
3.2.2 Vinificação de vinhos tintos	25
3.3 COADJUVANTES DE TECNOLOGIA EM VINHOS	27
3.3.1 Coadjuvantes de tecnologia derivados de alimentos alergênicos	27
3.3.2 Coadjuvantes de tecnologia derivados de alimentos alergênicos – Legislação.....	31
3.3.3 Utilização de proteínas na clarificação de vinhos.....	31
3.3.3.1 Albumina.....	35
3.3.3.2 Caseína	36
3.3.4 Conservadores.....	38
3.3.4.1 Lisozima	38
3.4 PRESENÇA DE PROTEÍNAS ALERGÊNICAS EM VINHOS	40
3.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO E/OU QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS EM VINHOS.....	41
3.5.1 Ensaios imunoenzimáticos para análises de proteínas.....	45
3.5.2 Espectrometria de massas para análises de proteínas	47
3.5.2.1 Preparo das amostras para análise por Espectrometria de Massas.....	47

3.5.2.2	Análises por Espectrometria de Massas	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	CAPÍTULO I	53
4.2	CAPÍTULO II	64
4.3	CAPÍTULO III	69
4.4	CAPÍTULO IV	85
5	DISCUSSÃO GERAL	92
6	CONCLUSÕES FINAIS	96
7	PERSPECTIVAS	97
8	BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais proteínas do leite bovino.....	37
Tabela 2 - Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e recuperação de alguns métodos de análises de proteínas derivadas de leite e ovos em vinhos por imunoensaios e cromatografia.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais alimentos que causam alergias alimentares e devem ser obrigatoriamente declarados seguindo os requisitos estabelecidos na RDC nº 26, de 02 de julho de 2015.....	28
Quadro 2 - Coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos, condições de uso e limites permitidos.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pictogramas que representam a presença de resíduos de produtos que contenham dióxido de enxofre, leite e ovos, de acordo com o Regulamento 33/2019 (UNIÃO EUROPEIA, 2019).	31
Figura 2 - Diagrama explicativo dos métodos de ELISA.	46
Figura 3 - Etapas básicas do preparo de amostras de vinhos para a análise de proteínas por EM.....	47
Figura 4 - Desnaturação de proteínas. (a) O processo de desnaturação (b) O modo de ação dos detergentes, onde R^+ é uma cadeia lateral carregada positivamente e R_{NP} é uma cadeia lateral apolar (c) O modo de ação da uréia.....	48
Figura 5 - Esquema de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo com MRM (Multiple Reaction Monitoring).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Associação de Analistas Químicos Oficiais

CE - Comunidade Europeia

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CO₂ - Dióxido de Carbono

COMEX - Comitê Executivo

DTT - Ditiotreitól

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EM - Espectrometria de Massas

ESI - Ionização por Eletropulverização

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

FCC – Código dos Produtos Químicos Alimentares

FIVS - Federação Internacional de Vinhos e Bebidas Espirituosas

FML - Fermentação Malolática

IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho

IAM - Iodoacetamida

JECFA - Comitê da FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares

LC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização por Eletropulverização

Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

m/z - massa/carga

mhl - Milhões de Hectolitros

MA - Métodos de Análises

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas

MS - Espectrometria de Massas

MS/MS - Espectrometria de Massas Sequencial

OENO - Resoluções de Enologia

OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RS - Rio Grande do Sul

SCAN - Varreduras de Íons de Produtos

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SEAPDR - Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural

SRM - Monitoramento de Reação Seleccionada

UCS - Universidade de Caxias do Sul

WHO - Organização Mundial da Saúde

RESUMO

Durante a vinificação são utilizados coadjuvantes de tecnologia como auxiliares de processo. Esses compostos têm importantes propriedades enológicas, no entanto, se forem derivados de alimentos alergênicos, como leite e ovos, a presença de seus resíduos pode representar riscos para as pessoas que possuem predisposição a esses alimentos. A utilização de clarificantes como a albumina (proteína obtida da clara do ovo) e a caseína (proteína obtida do leite), é realizada com a função de coagular e sedimentar impurezas. Outra prática utilizada na enologia é o controle da fermentação malolática, através da utilização da lisozima (proteína extraída da clara do ovo). Visto que o vinho é uma matriz complexa do ponto de vista analítico e possíveis resíduos destes coadjuvantes podem estar presentes em concentrações residuais no vinho engarrafado, é necessária a aplicação de métodos analíticos sensíveis para a identificação e quantificação desses compostos alergênicos. Diferentes métodos analíticos são propostos na literatura para quantificar resíduos de alergênicos em vinhos, baseados em técnicas de imunoensaios e espectrometria de massas, porém, muitos deles estão em discussão, como é o caso dos imunoensaios, no que se refere à repetibilidade e exatidão analítica. Os métodos de espectrometria de massas permitem a determinação de proteínas alergênicas em baixas concentrações nos vinhos, porém o preparo da amostra é um desafio devido a todas as etapas necessárias para recuperação dos analitos. Portanto, o objetivo geral deste trabalho, apresentado em forma de artigos científicos, foi determinar a presença de resíduos de coadjuvantes enológicos potencialmente alergênicos em vinhos através do desenvolvimento de um método para análise de proteínas por LC-MS/MS, em uma mesma leitura. Não foram identificados resíduos das proteínas nos vinhos experimentais tratados com as diferentes quantidades de albumina, caseinato de potássio e lisozima, assim como nas doze amostras comerciais analisadas. Estes resultados evidenciam a ausência de resíduos de

albumina, caseína e lisozima nas concentrações testadas nos vinhos, se forem seguidas boas práticas de tratamento recomendadas pela OIV e pelos respectivos fabricantes dos produtos enológicos. Um procedimento de preparo de amostras com tempo e etapas reduzidos, menor volume de amostra necessário e com recuperação analítica satisfatória, foi validado. Os limites de detecção e quantificação deste método atendem às leis vigentes para as quatro proteínas estudadas, albumina, alfa-caseína, beta-caseína e lisozima, sendo até inferiores ao critério mínimo de referência da OIV. Os valores do limite de detecção foram 0,05 mg.L⁻¹, 0,10 mg.L⁻¹, 0,10 mg.L⁻¹ e 0,005 mg.L⁻¹, e para o limite de quantificação foram 0,10 mg.L⁻¹, 0,25 mg.L⁻¹, 0,25 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹, respectivamente. Em relação à recuperação analítica média, os resultados atendem aos limites recomendados pela AOAC (2016), sendo 96,7%, 101,2%, 100,5% e 96,2% para albumina, alfa-caseína, beta-caseína e lisozima, respectivamente. Neste trabalho foi desenvolvido um método de análise de albumina, caseína e lisozima de forma simultânea por LC-MS/MS, que pode ser utilizado para fins de inspeção e rotulagem de vinhos.

Palavras-chave: coadjuvantes tecnológicos, albumina, caseinato de potássio, lisozima, LC-MS/MS.

ABSTRACT

During winemaking, technology aids are used as processing aids. These compounds have important oenological properties; however, if derived from allergenic foods, such as milk and eggs, the presence of their residues can represent risks to people who are predisposed to these foods. The use of clarificants such as albumin (protein obtained from egg white) and casein (protein obtained from milk), is performed with the function of coagulating and sedimenting impurities. Another practice used in oenology is the control of malolactic fermentation, through the use of lysozyme (extracted from egg white). Since wine is a complex matrix from an analytical point of view and possible residues of these processing aids may be present in very low concentrations in bottled wine, it is necessary to apply analytical methods that are sensitive to identify and quantify these allergenic compounds. Different analytical methods are proposed in the literature to quantify allergenic residues in wines, based on immunoassay and mass spectrometry techniques, however, many of them are under discussion, as is the case of immunoassays, with regard to analytical repeatability and accuracy. Mass spectrometry methods allows the determination of allergenic proteins in low concentrations in wines, however the preparation of the sample is a challenge due to all the necessary steps for the recovery of the analytes. Therefore, the general objective of this work, presented in the form of scientific articles, was to determine the presence of residues of potentially allergenic processing aids in wines through the development of a method for protein analysis by LC-MS/MS, in a single run. Protein residues were not identified in the experimental wines treated with different amounts of albumin, potassium caseinate and lysozyme, as well as in the twelve commercial samples analyzed. These results demonstrate the absence of caseinate, albumin and lysozyme residues in the concentrations tested in wines, if good treatment practices recommended by the OIV and the respective manufacturers of oenological products are

followed. A sample preparation procedure with reduced time and steps, less sample volume required and with satisfactory analytical recovery, was validated. The limits of detection and quantification of this method meet the current laws for the four proteins studied, albumin, alpha-casein, beta-casein and lysozyme, even being below the minimum reference criteria of the OIV. The detection limit values were 0.05 mg.L⁻¹, 0.10 mg.L⁻¹, 0.10 mg.L⁻¹ and 0.005 mg.L⁻¹, and for the limit of quantification were 0.10 mg.L⁻¹, 0.25 mg.L⁻¹, 0.25 mg.L⁻¹ and 0.01 mg.L⁻¹, respectively. Regarding the average analytical recovery, the results meet the limits recommended by AOAC (2016), with 96.7%, 101.2%, 100.5% and 96.2% for albumin, alpha-casein, beta-casein and lysozyme, respectively. In this work it was developed a method of analysis of albumin, casein and lysozyme simultaneously by LC-MS/MS, which can be used for the purposes of wine inspection and labeling.

Keywords: processing aids, albumin, potassium caseinate, lysozyme, LC-MS/MS.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da videira e a elaboração de vinhos possuem importante repercussão socioeconômica para o Brasil. Histórica e estruturalmente, a vitivinicultura constitui-se em uma atividade agrícola fixadora do homem a terra, com característica marcante de produção familiar em propriedades de pequenas áreas.

Nos últimos anos, o setor vitivinícola nacional tem aumentado seu potencial de produção e reconhecimento. Aliado à grande extensão de terras e a diversidade de clima do país, é possível ampliar e inovar os conceitos de regiões produtoras de uvas e vinhos. Por sua vez, o emprego de tecnologias avançadas permite conquistar espaço no mercado competitivo. Desta forma, também, se abrem perspectivas cada vez mais amplas de exportação da produção brasileira, devido à qualidade e tipicidade de seus vinhos.

A elaboração de vinhos é realizada em várias etapas, iniciando pela colheita da uva até o engarrafamento. Durante todas estas etapas são utilizados coadjuvantes de tecnologia como auxiliares de processo. A clarificação dos vinhos é utilizada na enologia com o intuito de tornar o vinho mais límpido e estável, tanto do ponto de vista químico como físico. A concentração dos clarificantes utilizados varia de acordo com as características do vinho e das propriedades dos mesmos.

A utilização de clarificantes como a albumina (proteína da clara do ovo) e a caseína (proteína do leite), é realizada com a função de coagular e sedimentar as impurezas responsáveis pela turbidez do vinho. Outra prática utilizada na enologia é o controle da fermentação malolática, através da utilização da lisozima (proteína extraída da clara do ovo), principalmente em vinhos brancos. Estes compostos apresentam ótimas propriedades

enológicas, porém, os resíduos dos mesmos podem representar riscos às pessoas alérgicas a esses tipos de proteínas.

Os compostos alergênicos estão diretamente relacionados com a segurança alimentar do consumidor e as reações alérgicas a estes compostos representam um problema de saúde crescente mundialmente. Embora afetem apenas uma parcela da população, as implicações na saúde devem ser consideradas, gerando atenção dos consumidores, fabricantes e autoridades de saúde pública.

A União Europeia estabeleceu os Regulamentos 89/2003 (UNIÃO EUROPEIA, 2003), 579/2012 (UNIÃO EUROPEIA, 2012) e a versão mais recente 33/2019 (UNIÃO EUROPEIA, 2019), que contêm uma lista de substâncias alimentares alergênicas incluindo derivados de ovo e leite. Conforme esses regulamentos é mandatória a informação na rotulagem dos vinhos quando houverem resíduos de alérgenos acima do limite analítico mínimo definido pela Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV), de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$, conforme a resolução OIV-COMEX 502-2012 (OIV, 2012). Na atual legislação brasileira não são definidos legalmente limites de resíduos destes compostos, portanto a presença deve ser declarada no rótulo de alimentos e bebidas.

Em um consumidor alérgico, a ingestão de miligramas e/ou até mesmo microgramas de alergênicos pode desencadear uma reação adversa alimentar, e, não é possível prever o nível dose-resposta, nem o nível de gravidade da reação alérgica. Portanto, é necessária a realização de estudos a respeito da presença dos coadjuvantes empregados na enologia, verificando as doses utilizadas e a existência ou não de resíduos destes produtos, garantindo assim uma rotulagem adequada e a segurança alimentar do consumidor. Em estudos prévios, além dos vinhos, outras matrizes alimentares foram abordadas, como biscoitos, cereais, alimentos infantis, entre outros, através de determinados métodos analíticos. Em particular, a

espectrometria de massas foi aplicada com sucesso para a detecção de alvos multialérgicos, porém, é necessário que sejam realizadas mais pesquisas a fim de aprimorar a etapa de extração das proteínas.

Alguns pré-requisitos essenciais devem ser levados em consideração ao projetar métodos confiáveis para monitorar alérgenos alimentares, entre eles: a escolha do analito-alvo e o uso dos respectivos materiais de referência; a seleção de marcadores peptídicos adequados; a otimização dos protocolos de digestão para garantir um método reprodutível e robusto, e a validação do método. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar a presença de resíduos de coadjuvantes enológicos potencialmente alergênicos em vinhos através do desenvolvimento de um método para análise de proteínas por LC-MS/MS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença de resíduos de coadjuvantes enológicos potencialmente alergênicos em vinhos através do desenvolvimento de um método para análise de proteínas por LC-MS/MS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de resíduos de albumina e lisozima, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, em vinhos brancos experimentais tratados com diferentes concentrações desses coadjuvantes;
- Avaliar a presença de resíduos de albumina e caseína, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, em tintos experimentais tratados com diferentes concentrações desses coadjuvantes;
- Otimizar o preparo amostral, desenvolver e validar um método analítico para determinação de albumina, alfa-caseína, beta-caseína e lisozima em uma mesma análise por LC-MS/MS com fonte de ionização por eletropulverização;
- Verificar a presença destes resíduos alergênicos em vinhos comerciais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

De acordo com dados da Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV), em 2019 a viticultura mundial totalizou, aproximadamente, 7,4 milhões de hectares, onde foram produzidos em torno de 260 mhl de vinhos. Na safra de 2019, a produção de vinhos no Brasil representou em torno de 0,8 % do total da produção mundial, com um total de aproximadamente 2 mhl, sendo 34% inferior à quantidade produzida em 2018 (3,3 mhl). O consumo mundial no ano de 2019 foi em torno de 244 mhl de vinhos, quantidade similar à quantidade observada em 2018 (OIV, 2020).

3.1 A VITIVINICULTURA BRASILEIRA

Atualmente, a viticultura no Brasil ocupa uma área aproximada de 82 mil hectares, com vinhedos divididos principalmente entre seis regiões. São mais de 1,1 mil vinícolas espalhadas pelo país, a maioria instalada em pequenas propriedades (média de dois hectares por família). O país se consolidou como o quinto maior produtor da bebida no Hemisfério Sul e é um dos mercados que cresce mais rapidamente do mundo (IBRAVIN, 2019).

Em 2019 foram processados 614,3 milhões de Kg de uvas no Rio Grande do Sul, sendo que 11,5 % foram uvas viníferas e 88,5 % foram uvas americanas/híbridas. Em relação às uvas viníferas processadas, 59,5 % foram uvas brancas e 40,4 % uvas tintas (IBRAVIN/MAPA/SEAPDR-RS, 2019a).

De acordo com dados do Cadastro Vinícola (IBRAVIN/MAPA/SEAPDR-RS, 2019b), em 2019 foram elaborados 403,61 milhões de litros de vinhos e derivados no Rio Grande do

Sul, sendo 10,3 % vinhos viníferas, 35,8 % vinhos de mesa e os demais 53,9 % representados por outros derivados da uva e do vinho.

Em 2018 foram industrializados 664,4 milhões de kg de uvas no Rio Grande do Sul. Entre as uvas viníferas tintas (27,1 milhões de Kg) a variedade mais produzida foi a Merlot (6,3 milhões de kg) seguida pela Cabernet Sauvignon (6 milhões de kg). Em relação às uvas viníferas brancas (38,7 milhões de kg) a variedade Moscato Branco foi a mais produzida (11,2 milhões de kg) seguida pela variedade Chardonnay (6,1 milhões de kg). Neste mesmo ano, do total de vinhos elaborados no Rio Grande do Sul (RS), foram comercializados 15,4 milhões de litros de vinhos finos e 192,1 milhões de litros de vinhos de mesa (CADASTRO VINÍCOLA, 2018).

3.2 VINIFICAÇÃO

De acordo com a legislação brasileira (Lei nº 7678, de 1988) vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988). Portanto, o vinho deve ser elaborado com uvas maduras, frescas, sadias e isentas de resíduos de pesticidas e de metais pesados. No entanto, alguns vinhos especiais são elaborados com uvas atacadas por um fungo chamado *Botrytis cinerea*, agente responsável pelo dessecamento do grão, fenômeno conhecido como podridão-nobre. Em geral, é fundamental que a uva seja processada logo após a colheita, para que não sofra nenhum processo de oxidação devido ao esmagamento e início de fermentação alcoólica, aspectos prejudiciais à qualidade do vinho.

Na elaboração do vinho tinto, a maceração é uma das etapas mais importantes desse processo. Já no caso do vinho branco, as etapas pré-fermentativas, como extração e clarificação do mosto, são fundamentais (RIZZON; DALL'AGNOL, 2009).

Para a elaboração dos vinhos em geral, inicialmente é realizada a separação da ráquis e esmagamento da uva. Neste momento, normalmente, adiciona-se o conservante metabissulfito de potássio em dose que varia de acordo com o estado sanitário da uva (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007; RIZZON; DALL'AGNOL, 2009).

3.2.1 Vinificação de vinhos brancos

Para a elaboração dos vinhos brancos, após as etapas de separação da ráquis, esmagamento e adição do metabissulfito de potássio, pode-se realizar a clarificação do mosto. A maneira mais simples é utilizando o processo estático, pela sedimentação natural das borras, seguida de decantação. Além dessa maneira, podem ser utilizados agentes clarificantes. Este processo pode ser realizado em temperatura baixa durante 18 a 24 horas. Após esse período, o mosto límpido é cuidadosamente transferido para os tanques de aço inox onde ocorrerá a fermentação alcoólica (RIZZON; DALL'AGNOL, 2009).

A fim de garantir o início rápido da fermentação alcoólica, adicionam-se as leveduras selecionadas, evitando assim, problemas de parada de fermentação e a possível formação de componentes prejudiciais à qualidade do vinho. Na fermentação alcoólica, através da ação das leveduras e da degradação anaeróbica da glicose e da frutose da uva, ocorre a transformação do açúcar do mosto em álcool, gás carbônico e outros compostos secundários como os compostos voláteis.

Na maioria dos processos de elaboração dos vinhos são utilizadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, pois estas produzem fermentações mais rápidas e de qualidade, além de evitarem contaminações microbianas e formação excessiva de espuma. Após concluída a fermentação alcoólica, para vinhos brancos com acidez elevada, é importante se proceder à fermentação malolática. Porém, para vinhos brancos com baixa acidez, ou que

apresentem acidez equilibrada, não se recomenda esse tipo de fermentação, pois ela reduz os aromas frutados e florais que contribuem com qualidade aromática desses vinhos. O efeito principal da fermentação malolática é a transformação do ácido málico em láctico e a consequente redução da acidez total. Além dessa transformação, também ocorrem reações secundárias, como o desprendimento de dióxido de carbono, além do aumento da acidez volátil e do pH do vinho (RIZZON & DALL'AGNOL, 2009).

Após a fermentação e antes do engarrafamento, normalmente é realizada mais uma filtração ou clarificação, para total sedimentação de substâncias proteicas, borras e ácido tartárico. Esta limpeza pode ser realizada através de trasfegas, estabilização a frio, uso de agentes clarificantes ou filtração (RIZZON & DALL'AGNOL, 2009).

3.2.2 Vinificação de vinhos tintos

Na elaboração dos vinhos tintos, após as etapas de separação da ráquis, esmagamento e adição do metabissulfito de potássio, o início do processo fermentativo é chamado de fermentação tumultuosa, por causa de sua intensidade, e coincide com o período de maceração.

A maceração corresponde ao período em que o mosto permanece em contato com a parte sólida da uva, especialmente a película e a semente. Essa etapa da vinificação diferencia o processo de elaboração do vinho branco e do tinto. O tinto é um vinho de maceração, ao passo que na elaboração do branco ela é evitada. É a fase mais importante da vinificação em tinto. É nela que os compostos da película passam para o mosto e atribuem cor (antocianinas) e estrutura (taninos, minerais, substâncias nitrogenadas, polissacarídeos), ao vinho. A quantidade desses compostos que passam para o mosto é determinada pelo tempo de maceração, pela temperatura de fermentação e remontagens realizadas. No processo de

vinificação tradicional, a maceração ocorre juntamente com a fermentação alcoólica, no qual a formação do etanol e a elevação da temperatura contribuem para a dissolução dos constituintes da parte sólida da uva.

Após, é realizada a descuba, que consiste na separação do mosto do restante da parte sólida e determina o fim do período de maceração. Após, o vinho é conduzido para um recipiente equipado com uma válvula na parte superior para permitir a saída do dióxido de carbono. Nesse local, deve ocorrer a transformação, pelas leveduras, dos últimos gramas de açúcar. A conclusão do processo fermentativo é atingida quando cessar o desprendimento do dióxido de carbono. Uma vez concluída essa etapa, recomenda-se fazer uma trasfega para separar o vinho límpido da parte superior do recipiente, do depósito precipitado (borra) na parte inferior. Uma vez concluída a fermentação alcoólica, é de fundamental importância que se realize a fermentação malolática no vinho tinto.

Concluídas a fermentação alcoólica e a fermentação malolática o vinho ainda não está pronto para ser engarrafado, pois não apresenta a limpidez e a estabilidade necessárias para ser conservado adequadamente. O vinho novo possui em suspensão grande número de partículas sólidas de diversos tamanhos, formas e pesos específicos. As partículas mais volumosas e com maior peso específico precipitam antes e formam as borras no fundo do recipiente e as menores e mais leves demoram mais para sedimentar. No caso dos vinhos tintos a presença de tanino favorece a precipitação das proteínas, substâncias responsáveis pela turvação dos vinhos brancos. Entre as alternativas para alcançar a clarificação e a estabilidade dos vinhos estão as trasfegas, o frio, aplicação de agentes clarificantes, amadurecimento em barricas de madeira de carvalho, entre outros. Para os vinhos que não são submetidos ao envelhecimento na garrafa, o engarrafamento é a etapa final do processo de elaboração (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007).

3.3 COADJUVANTES DE TECNOLOGIA EM VINHOS

Durante a elaboração dos vinhos é permitido o uso de coadjuvantes de tecnologia de fabricação que, segundo a Portaria nº 540/1997, de 27 de outubro de 1997 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997), são substâncias empregadas intencionalmente na elaboração de produtos por razões tecnológicas, durante o tratamento ou fabricação dos mesmos. Deverão ser eliminados ou inativados, podendo admitir-se no produto final a presença de traços da substância, ou de seus derivados. Conforme a RDC nº 123, de 04 de novembro de 2016 (ANVISA, 2016), que dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos, os coadjuvantes de tecnologia devem atender às especificações mais atuais do Codex Enológico Internacional da OIV, e caso este não possua especificação, devem ser adotadas as diretrizes mais recentes estabelecidas pelo JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ou pelo FCC (Food Chemicals Codex).

3.3.1 Coadjuvantes de tecnologia derivados de alimentos alergênicos

Segundo a RDC nº 26, de 02 de julho de 2015 (ANVISA, 2015), que dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares (**Quadro 1**), alérgeno alimentar é qualquer proteína, incluindo proteínas modificadas e frações proteicas, derivadas dos principais alimentos que causam alergias alimentares.

1. Trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas.
2. Crustáceos.
3. Ovos.
4. Peixes.
5. Amendoim.
6. Soja.
7. Leites de todas as espécies de animais mamíferos.
8. Amêndoa (<i>Prunus dulcis</i> , sin.: <i>Prunus amygdalus</i> , <i>Amygdalus communis</i> L.).
9. Avelãs (<i>Corylus</i> spp.).
10. Castanha-de-caju (<i>Anacardium occidentale</i>).
11. Castanha-do-brasil ou castanha-do-pará (<i>Bertholletia excelsa</i>).
12. Macadâmias (<i>Macadamia</i> spp.).
13. Nozes (<i>Juglans</i> spp.).
14. Pecãs (<i>Carya</i> spp.).
15. Pistaches (<i>Pistacia</i> spp.).
16. Pinoli (<i>Pinus</i> spp.).
17. Castanhas (<i>Castanea</i> spp.).
18. Látex natural.

Quadro 1 - Principais alimentos que causam alergias alimentares e devem ser obrigatoriamente declarados seguindo os requisitos estabelecidos na RDC nº 26, de 02 de julho de 2015.

Fonte: ANVISA, 2015.

As alergias alimentares são reações adversas reprodutíveis mediadas por mecanismos imunológicos específicos que ocorrem em indivíduos sensíveis após o consumo de determinado alimento (ANVISA, 2015). Ou seja, em contraste com a intolerância alimentar, a alergia alimentar é a resposta imune inadequada e exagerada, onde uma substância normalmente inofensiva é percebida como uma ameaça pelo sistema de defesa imunológica do corpo (STOCKLEY; JOHNSON, 2015).

A incidência de alergias alimentares é superior nos primeiros anos de vida, afetando cerca de 6% das crianças com menos de três anos de idade. Na fase adulta, a porcentagem de pessoas com alergias alimentares diminui para apenas 2% (RONA et al., 2007; LIDON;

SILVESTRE, 2010) e são mais observadas alergias ao leite do que em relação aos ovos (RONA et al., 2007). Essa situação se justificada em função de a barreira intestinal das crianças com esta idade ainda ser deficiente, permitindo a passagem de macromoléculas (proteínas) para o interior do organismo sem digestão prévia (LIDON; SILVESTRE, 2010). Porém, alguns autores afirmam que a razão exata que explica a prevalência de alergia alimentar é desconhecida (RONA et al., 2007, SICHERER; SAMPSON, 2010).

Fatores como a idade, os hábitos alimentares e predisposição genética, bem como diferentes procedimentos diagnósticos, tornam difícil estimar com precisão a incidência real da incidência de alergias alimentares (SICHERER; SAMPSON, 2009). O valor limiar para induzir uma reação adversa em um indivíduo alérgico depende de vários fatores incluindo a sensibilidade do indivíduo bem como as propriedades do alérgeno específico (HOURIHANE; KNULST, 2005).

De acordo com o estudo de Asero *et al.* (2009a, 2009b) realizado em 17 centros alergológicos italianos, a porcentagem de indivíduos que sofrem de alergias alimentares e alergias específicas ao leite entre adultos é, respectivamente, 2% e 0,06%; além disso, no caso de alergia ao leite a frequência de anafilaxia é muito rara. Porém, atualmente, não existe tratamento clínico ou cura, portanto, as pessoas devem evitar os alimentos dos quais possuem predisposição e contar com uma rotulagem nutricional apropriada (NITRIDE et al., 2019).

O vinho é por vezes considerado responsável por reações adversas e as mais comumente relatadas incluem rubor da pele, coceira e congestão nasal. Porém, são limitados os trabalhos científicos que relatem verdadeiras reações alérgicas após a ingestão de vinho (STOCKLEY; JOHNSON, 2015). Segundo Stockley & Johnson (2015) os vinhos produzidos com os tradicionais auxiliares proteicos de processamento, de acordo com as boas práticas de fabricação, representam pouco risco para a saúde dos consumidores adultos que apresentam

alergias alimentares. Existem estudos sobre resíduos de coadjuvantes alergênicos realizados em vinhos comerciais, entre eles vinhos italianos, nos quais não foram observados resíduos de alergênicos (RESTANI et al., 2012; MATTAROZZI et al., 2014). Por outro lado, no estudo de Pavón-Pérez *et al.* (2020), foram observados resíduos de caseína e albumina em amostras de vinhos chilenos comerciais. Em geral, as pesquisas ainda são escassas e não existem trabalhos realizados em vinhos brasileiros.

Devido às reações negativas dos consumidores perante a indicação de proteínas animais em rótulos de vinhos, foram investigadas estratégias para avaliar a possibilidade de receber isenção permanente de rotulagem na Europa. Porém, para evitar a rotulagem dos vinhos tratados com proteínas alergênicas, é necessária uma verificação rigorosa dos resíduos. Produtos de origem vegetal foram propostos como alternativa aos derivados de animais, como proteínas de ervilha, de batata (PEÑAS et al., 2015; KANG et al., 2019; SEGADE et al., 2020) e de milho (SIMONATO et al., 2009). Porém, além destes coadjuvantes vegetais não apresentarem a mesma eficácia que os de origem animal, as proteínas vegetais também podem ser alergênicas e, como a lista de alérgenos passa por revisões periódicas, é possível que algumas dessas proteínas sejam incluídas nessa lista no futuro, portanto, pode surgir o mesmo problema enfrentado com as proteínas de origem animal (MARANGON et al., 2019). Ainda, apesar do esforço realizado por grupos de pesquisa em relação ao uso de proteínas vegetais como agentes de clarificação de vinhos, poucas foram comercializadas até o presente, pois ainda carecem de estudos que apresentem resultados menos contraditórios (SEGADE et al., 2020).

3.3.2 Coadjuvantes de tecnologia derivados de alimentos alergênicos – Legislação

Conforme RDC nº 26, de 02 de julho de 2015 (ANVISA, 2015), se os coadjuvantes alergênicos utilizados não forem completamente removidos, deve ser declarada a presença intencional de derivado do alimento alergênico. O prazo para promover as adequações necessárias na rotulagem dos produtos abrangidos por esta resolução foi 02 de julho de 2016. Os resíduos de derivados de ovos e de leite se enquadram nesta resolução brasileira, assim como na europeia. Conforme o regulamento da União Europeia 33/2019 (UNIÃO EUROPEIA, 2019), é mandatória a informação na rotulagem dos vinhos quando houverem resíduos de alérgenos acima do critério analítico mínimo definido pela OIV, de 0,25 mg.L⁻¹, conforme a resolução OIV-COMEX 502-2012 (OIV, 2012). Além disto, é opcional inserir pictogramas (**Figura 1**) para destacar a presença dos alérgenos, permitindo melhorar, em um contexto multilíngue, a legibilidade das informações dadas aos consumidores, bem como dar-lhes melhores garantias.



Figura 1 – Pictogramas que representam a presença de resíduos de produtos que contenham dióxido de enxofre, leite e ovos, de acordo com o Regulamento 33/2019 (UNIÃO EUROPEIA, 2019).

3.3.3 Utilização de proteínas na clarificação de vinhos

O processo de clarificação de vinhos é uma das diferentes técnicas utilizadas para clarificar e estabilizar os vinhos (VAN DO et al., 2005). Este processo remove substâncias

que podem gerar turbidez e causar acidez e adstringência indesejáveis. Uma grande variedade de agentes clarificantes tem sido utilizada para elaboração de vinhos, entre eles: albumina, caseína, caseinatos do leite, cola de peixe, gelatina, algas e argilas (RESTANI et al., 2014).

Conforme a Portaria nº 540/1997, de 27 de outubro de 1997 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997), agente de clarificação é a substância que tem a propriedade de clarificar e auxiliar na filtração de alimentos, facilitando a absorção de impurezas e sua remoção no momento da filtração. Os coadjuvantes tecnológicos albumina, caseína e caseinato de potássio são aprovados para utilização em vinhos conforme a resolução RDC nº 123 de 04 de novembro de 2016, de acordo com o **Quadro 2**.

Nome	Uso autorizado	Recomendações
Albumina de ovo	vinho	—
Alginato de cálcio	vinho	Na segunda fermentação do vinho espumante só é permitido o uso de alginato de potássio.
Alginato de potássio		
Alginato de sódio		
Bentonita	mosto e vinho	—
Carvão ativado	mosto e vinho	Não pode ser aplicado sucessivamente no mosto e no vinho. A quantidade máxima de carbono seco usada deve ser menor que 0,1 g/100 ml.
Caolin	vinho	—
Caseína	mosto e vinho	—
Caseinato de potássio	mosto e vinho	—
Celulose	mosto e vinho	—
Citrato de cobre	vinho	Adição máxima permitida de 0,001 g/100 ml.
Cloreto de prata	vinho	Adição máxima permitida de 0,001 g/100 ml. O limite máximo de resíduo não pode ser superior a 0,01 mg/100 ml, expresso em prata.
Dióxido de silício	mosto e vinho	Utilização no mosto, somente quando associado à gelatina.
Extrato protéico de levedura	no mosto	Adição máxima permitida de 0,03 g/100 ml.
	vinho	Adição máxima permitida de 0,06 g/100 ml para vinho tinto e 0,03 g/100 ml para vinho branco e rosé.
Ferrocianeto de potássio	mosto e vinho	—
Fitato de cálcio	mosto e vinho	—
Gelatina	mosto e vinho	—
Ictiocola	vinho	—
Leite desnatado	vinho	—
Proteína de origem vegetal	mosto e vinho	—
Perlita	mosto e vinho	—
Quitina-glucana	mosto	Adição máxima permitida de 0,1 g/100 ml.
	vinho	Adição máxima permitida de 0,1 g/100 ml. Adição máxima permitida de 0,1 g/100 ml para redução do nível de metais pesados, principalmente ferro, chumbo, cádmio, níquel, cobre e para prevenir turvação por ferro e cobre. Adição máxima permitida de 0,5 g/100 ml para redução de possíveis contaminantes, especialmente ocratoxina A.
Quitosana	mosto	Adição máxima permitida de 0,1 g/100 ml.
	vinho	Adição máxima permitida de 0,1 g/100 ml. Adição máxima permitida de 0,1 g/100 ml para redução do nível de metais pesados, principalmente ferro, chumbo, cádmio, níquel, cobre e para prevenir turvação por ferro e cobre. Adição máxima permitida de 0,5 g/100 ml para redução de possíveis contaminantes, especialmente ocratoxina A.
Taninos	mosto e vinho	—
Terra diatomácea	mosto e vinho	—
Sulfato de cobre pentahidratado	vinho	Adição máxima permitida de 0,001 g/100 ml.
Tartarato de cálcio	vinho	Adição máxima permitida de 0,2 g/100 ml.
Tartarato monopotássico, tartarato ácido de potássio	vinho	—
Tartarato dipotássico, tartarato de potássio	vinho	—

Quadro 2 - Coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos, condições de uso e limites permitidos.

Fonte: Adaptado de ANVISA (2016).

Em 2014 a OIV adotou um Código de Boas Práticas de Clarificação de Vinhos (OIV, 2014), para aplicação na utilização de agentes clarificantes de origem proteica potencialmente alergênicos (Resolution OIV-OENO 520-2014), especificando os passos para realizar o processo de clarificação e filtração, evitando que resíduos de agentes de clarificação estejam

presentes no produto final. Conforme esta resolução, os objetivos de adicionar agentes de clarificação em vinhos podem ser divididos em: reduzir adstringência ou amargor; clarificar e remover proteínas capazes de gerar turbidez e/ou estabilizar e reduzir cor através da absorção e precipitação de compostos fenólicos polimerizados e taninos.

Os agentes de clarificação interagem com os componentes dos vinhos física ou quimicamente, para formar um novo complexo que pode ser separado do vinho. Estes agentes interagem com as substâncias através de:

- Interação elétrica: quando o agente clarificante e as substâncias a serem removidas têm cargas opostas se unem formando partículas maiores;
- Formação de ligações: quando uma ligação química é formada entre as substâncias a serem removidas e o agente de clarificação;
- Absorção e/ou adsorção: quando as substâncias a serem removidas são capturadas dentro da estrutura do agente de clarificação, e/ou ligam-se à superfície do mesmo.

Os vinhos apresentam composições diferentes e, portanto, reagem de formas diversas com o mesmo agente de clarificação. Assim, a eficácia do agente de clarificação dependerá do produto utilizado, das preparações, do método de adição, da dosagem, do pH, do conteúdo de metais, da temperatura, do nível de CO₂ dissolvido e dos tratamentos prévios realizados nos vinhos (OIV, 2014).

Os agentes de clarificação agem com base no princípio de que todas as partículas responsáveis pela turbidez dos vinhos têm uma carga elétrica, que atrai o agente de clarificação, formando partículas insolúveis. A clara de ovo forma um precipitado floculante no vinho que remove compostos de turbidez, coloides e adstringência através de precipitação e adsorção. O sedimento compacto precipitado é removido por trasfega e/ou filtração do vinho antes do engarrafamento ou posterior maturação. A concentração final da proteína de

clara de ovo no vinho é, portanto, significativamente menor do que a concentração adicionada devido à remoção de precipitados através do processo de clarificação (STOCKLEY; JOHNSON, 2015).

3.3.3.1 Albumina

A albumina do ovo, também chamada de ovalbumina, contém massa atômica de 42,9 KDa (UNIPROT, 2019), é obtida pela dessecação da clara de ovo fresco, encontrada na forma de pó fino, branco e leve, não completamente solúvel em água, mas solúvel em certas soluções alcalinas, sendo precipitada por taninos. É vendida em pó ou em spray, e também pode ser usada diretamente na forma de albumina de ovos frescos ou esterilizados (OIV, 2019a).

A clara do ovo é constituída de 88,5% de água e 10,5% de proteínas, vitaminas do complexo B (Riboflavina – B2) e traços de gorduras (FAO, 2010). Considerada mais alergênica do que a gema, uma vez que é nessa fração que se encontram as maiores proteínas alergênicas deste alimento: a ovomucoide, a albumina, a conalbumina e a lisozima, as quais representam 11%, 54%, 12% e 3,4% da clara de ovo, respectivamente (SHOJI, 2010).

A albumina é utilizada principalmente para a clarificação de vinhos tintos devido à sua natureza coloidal e sua carga positiva que atrai taninos negativamente carregados que podem produzir adstringência indesejada (RESTANI et al., 2014). É eficaz principalmente na remoção dos taninos verdes e ásperos, tornando o vinho mais redondo e macio na textura (FIVS, 2019).

Conforme o Código de Boas Práticas da OIV, para vinhos tintos, a concentração normalmente utilizada é de 30 a 150 mg.L⁻¹ (OIV, 2014). A sua utilização é permitida para

uso em vinhos na África do Sul, Austrália, Brasil, Canadá, Chile, Estados Unidos, Geórgia, Índia, Japão, Quênia, Tanzânia, União Europeia e Uruguai (FIVS, 2019).

3.3.3.2 Caseína

A caseína, proteína que contém fósforo, é encontrada no leite na forma de sal de cálcio. É insolúvel em água pura e obtida por coagulação do leite desnatado. É o agente de clarificação indicado para o tratamento de oxidações no vinho e só pode ser usado em água alcalina com carbonato de potássio ou bicarbonato de potássio. A caseína adsorve polifenóis, em particular os oxidados (CURVELO-GARCIA; BARROS, 2015; OIV, 2019b). É caracterizada por sequências de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, resultando em carácter anfifílico com propriedades de formação de micelas (WEBER et al., 2007).

A caseína é de difícil dissolução no mosto ou vinho, uma vez que é insolúvel em soluções ácidas, portanto deve ser misturada em água com um valor de pH superior à 8,0 antes da sua adição. O caseinato de potássio, ou uma mistura de caseína ácida com carbonato ou bicarbonato de potássio, é usualmente utilizado preferencialmente à caseína, uma vez que pode ser dissolvido diretamente em água (OIV, 2014).

O caseinato de potássio é obtido do leite desnatado fresco ou pasteurizado por coagulação ácida da caseína, neutralização com hidróxido de potássio e, após, seco através de um secador de spray (OIV, 2019b). É um agente clarificante solúvel em água (RESTANI et al., 2012; CURVELO-GARCIA; BARROS, 2015), principalmente utilizado para clarificação de vinhos brancos. Devido ao pH ácido dos vinhos, quando o caseinato de potássio é adicionado ocorre a floculação, pois ele se liga com os compostos responsáveis pela turbidez, permitindo sua remoção (RESTANI et al., 2012). Também pode ser utilizado como substituto da gelatina para redução dos taninos em vinhos tintos (FIVS, 2019).

O leite bovino contém seis tipos de proteínas (Tabela 1). Quatro tipos de caseína (alfa-S1, alfa-S2, Beta e Kappa), que representam 80% da proteína total do leite bovino. A outra fração compreende a proteína do soro de leite com dois tipos (alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina) (SANTOS; RODRIGUES, 2013).

Tabela 1. Principais proteínas do leite bovino.

Proteína	Quantidade no leite (g/L)	Peso molecular (KDA)
Caseínas	24 - 28	—
αs1	12 - 15	22,1 - 23,7
αs2	3 - 4	25,2 - 25,4
β	9 - 11	23,9 - 24,1
κ	3 - 4	19
Proteínas do soro	5 - 7	—
β-lactoglobulina	2 - 4	18,3
α-lactalbumina	1 - 1,5	14,2
Albumina sérica	0,1 - 0,4	66
Imunoglobulinas	0,6 - 1,0	146 - 1030
Lactoferrina	~ 0,1	80
Proteína da membrana dos glóbulos de gordura	~ 0,4	13 - 200
Total de proteínas do leite	30 - 35	—

Fonte: Adaptada de Livney (2010).

Uma vez que os mostos e os vinhos diferem na sua composição e no seu nível de oxidação, não existe uma dose certa estabelecida sobre a quantidade de caseína a ser utilizada na clarificação. Do ponto de vista enológico, é importante que pouca ou nenhuma das proteínas exógenas permaneça no vinho após o tratamento. A presença de quantidades relativamente grandes de clarificantes irá formar precipitados de proteínas que necessitam de processos corretivos adicionais. A adição excessiva de caseína pode conferir aos vinhos o aroma dos produtos lácteos.

Conforme o Código de Boas Práticas da OIV, para vinhos tintos, a concentração normalmente utilizada é de 50 à 250 mg.L⁻¹ para vinhos tintos e, para vinhos brancos, de 50 à 500 mg.L⁻¹ (OIV, 2014). Este clarificante é aprovado para utilização em vinhos na África do

Sul, Austrália, Brasil, Canadá, Chile, Estados Unidos, Geórgia, Índia, Japão, Nova Zelândia, Quênia, Taiwan, Tanzânia, União Europeia e Uruguai (FIVS, 2019).

3.3.4 Conservadores

A Portaria nº 540/1997, de 27 de outubro de 1997 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997) define que conservador é a substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas. O uso da lisozima como conservador está previsto na resolução RDC nº 123 de 04 de novembro de 2016 (ANVISA, 2016), assim como o uso de ácido sórbico, sorbato de potássio, dióxido de enxofre, metabissulfito de potássio e bissulfito de potássio.

3.3.4.1 Lisozima

A lisozima é uma enzima conhecida como muramidase, obtida a partir da clara de ovo, amplamente utilizada como agente antimicrobiano natural na indústria de alimentos e bebidas, como na produção de vinhos (SONNI et al., 2011; LIBURDI; BENUCCI; ESTI, 2014), queijos (SCHNEIDER et al., 2011), carnes (ZIMPOCH-KORZYCKA; JARMOLUK, 2015) e cervejas (SILVETTI et al., 2010). Na enologia, é utilizada para inibir o crescimento e atividade das bactérias lácticas, responsáveis pela fermentação malolática (FML) dos vinhos. Além disso, é utilizada para reduzir a quantidade de dióxido de enxofre, o qual apresenta alguns inconvenientes quando utilizado em doses altas (fermentação lenta, diminuição da intensidade de cor dos vinhos e odor desagradável) (VENTURINI et al., 2005). Nos vinhos tintos, proteínas do ovo, incluindo lisozima, ligam taninos por interações eletrostáticas e evitam a perda de cor (PEÑAS et al., 2015).

Quando adicionada aliada ao dióxido de enxofre, resulta em vinhos mais estáveis (OIV, 2019b). A lisozima é um polipeptídeo natural composto por 129 aminoácidos: 21 ácidos aspárticos, 5 ácidos glutâmicos, 12 alaninas, 11 argininas, 8 cisteínas, 3 fenilalaninas, 12 glicina, 6 isoleucinas, 1 histidina, 8 leucinas, 6 lisinas, 2 prolina, 2 metioninas, 10 serinas, 3 tirosinas, 7 treoninas, 6 triptofanos e 6 valinas. Possui massa molecular de 14,7 KDa (OIV, 2019b). A lisozima usada na produção de vinho é isolada da clara de ovo e é designada como o alérgeno do ovo Gal4 e pode desencadear, mesmo em pequenas quantidades, reações alérgicas em pessoas sensíveis aos ovos (TITOIU et al., 2019).

A lisozima não tem efeito adverso sobre o crescimento da levedura e pode ser utilizada durante a fermentação alcoólica (SONNI et al., 2011). A FML é desejável em vinhos tintos e em poucos vinhos brancos, portanto, sua ocorrência deve ser controlada em todos os outros tipos de vinhos. A lisozima exibe atividade antimicrobiana seletiva com base na hidrólise de constituintes de parede celular do peptidoglicano em bactérias acidoláticas (LIBURDI, BENUCCI; ESTI, 2014). Existem estudos que identificaram reações alérgicas devido à presença de lisozima nos alimentos. Para evitar este problema, tem sido eficaz a imobilização da enzima em suportes insolúveis, permitindo que a enzima seja removida (LIBURDI; BENUCCI; ESTI, 2014).

Conforme a OIV (OIV, 2019b) e a RDC nº 123, de 04 de novembro de 2016 (ANVISA, 2016), a dose de adição recomendada é que não exceda 500 mg.L^{-1} de lisozima (dose acumulativa total caso seja adicionada no mosto e no vinho).

O uso deste coadjuvante é aprovado em vinhos: na África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Chile, China, Estados Unidos, Filipinas, Geórgia, Hong Kong, Indonésia, Nova Zelândia, Nigéria, Quênia, Tanzânia, Tailândia, União Europeia e Vietnam (FIVS, 2019).

3.4 PRESENÇA DE PROTEÍNAS ALERGÊNICAS EM VINHOS

Segundo Vassilopoulou *et al.* (2011), os traços de caseína, ictiocola e albumina nos vinhos que passaram por clarificação, apresentam um risco baixo para os consumidores alérgicos à estas proteínas e a rotulagem pode ter um impacto negativo tanto para os consumidores não alérgicos como para os alérgicos.

Conforme Deckart *et al.* (2014), devido à falta de dados científicos suficientes, a presença de resíduos de agentes de clarificação no produto final não pode ser desconsiderada. Estes autores investigaram a presença de resíduos de clarificantes alergênicos em vinhos após determinados tratamentos tecnológicos aplicados. Os resultados desse estudo demonstraram que os vinhos brancos clarificados com ovalbumina podem reter alérgenos. Porém, o uso de certos procedimentos tecnológicos durante o processamento dos vinhos leva a resultados diferentes. O tratamento com bentonite seguido por filtrações fazem com que a presença de resíduos de clarificantes alérgenos seja inferior ao limite de detecção dos mesmos. Carstens *et al.* (2014) analisaram, através de testes de ELISA indireto (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), vinhos que passaram por oito diferentes procedimentos enológicos para remoção de resíduos de lisozima. Foram empregados tratamentos por diferentes tipos de filtração, com e sem utilização de membranas e aplicação de bentonite. Foi observado que todos os tratamentos apresentaram redução nos resíduos de lisozima, porém, somente o tratamento com bentonite reduziu significativamente os resíduos alergênicos.

Por outro lado, no estudo de Tolin *et al.* (2012a) que aplicaram bentonite em vinhos clarificados com coadjuvantes a fim de analisar a capacidade de retenção de proteínas, os resultados são controversos. Foi observado que nos experimentos que analisaram os resíduos de proteínas de ovos por LC-MS/MS, os resultados dos peptídeos identificados e dos sinais

cromatográficos revelaram que as quantidades de ovalbumina residual em ambas as amostras de vinho (tratadas e não tratadas com 50 mg.L⁻¹ de bentonite) eram comparáveis. Neste estudo, o tratamento com bentonite, nas doses utilizadas (mesma dose que o coadjuvante de clarificação), não eliminou as proteínas residuais de clarificação dos vinhos tratados com clara de ovo (produto comercial Albuclar®).

Restani *et al.* (2012) analisaram através de testes imunoquímicos elaborados especificamente para vinhos, 16 vinhos experimentais tratados com 200 a 500 mg.L⁻¹ de caseinato de potássio (com e sem uso de bentonite) e 64 vinhos comerciais italianos (brancos e tintos) tratados com 200 a 400 mg.L⁻¹ de caseinato de potássio (com e sem uso de bentonite), e não detectaram a presença de resíduos alergênicos, tanto nos vinhos experimentais quanto nos vinhos comerciais. O limite de detecção (LD) foi de 0,28 mg.L⁻¹ e o limite de quantificação (LQ) de 0,76 mg.L⁻¹. Após a publicação deste estudo, durante a Assembleia Geral Extraordinária da OIV, de 17 de março de 2012, foi determinado através da resolução OIV-COMEX 502-2012 (OIV, 2012) a revisão do limite de detecção e do limite de quantificação relativos a resíduos potencialmente alergênicos de proteínas de agentes clarificantes no vinho, diminuindo os mesmos para 0,25 e 0,50 mg.L⁻¹, respectivamente. Antes da publicação desta resolução os limites os mesmos eram 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹, respectivamente, de acordo com a resolução OIV/OENO 427/2010 (OIV, 2010).

3.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO E/OU QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE PROTEÍNAS EM VINHOS

Diferentes métodos analíticos são propostos pela literatura para detectar e/ou quantificar resíduos de proteínas em vinhos, baseados em técnicas de imunoensaios e

espectrometria de massas (EM) (WEBER et al., 2007; ROLLAND et al., 2008; WEBER et al., 2009; D'AMATO et al., 2010; MONACI et al., 2010; LACORN et al., 2011; MONACI et al., 2011; SIMONATO et al., 2011; RESTANI et al., 2012; TOLIN et al., 2012a; TOLIN et al., 2012b; MONACI et al., 2013; MATTAROZZI et al., 2014 e PAVÓN-PÉREZ et al., 2019).

A grande maioria desses estudos foi aplicada a vinhos brancos, uma vez que a formação de turbidez proteica é típica destes vinhos. Além disso, a análise de proteínas em vinhos tintos é mais complexa devido à presença de grandes quantidades de compostos interferentes, como polifenóis e polissacarídeos (MORENO-ARRIBAS; PUEYO; POLO, 2002).

Restani *et al.* (2014) validaram um teste de ELISA comercial para detectar resíduos de alergênicos em vinhos clarificados com albumina e caseína. Neste estudo, relatam que o teste de ELISA é um dos métodos analíticos mais usuais aplicados para detectar alergênicos em alimentos e pode ser aplicado na maioria dos laboratórios que realizam controle de qualidade.

Por outro lado, segundo Mattarozzi *et al.* (2014), os imunoensaios têm a vantagem de ser rápidos e simples de realizar, porém, não são tão precisos como os ensaios realizados por espectrometria de massas. Os testes de ELISA apresentam algumas desvantagens decorrentes da presença de compostos interferentes na matriz (WEBER et al., 2009), como os polifenóis nos vinhos tintos, que interagem com as proteínas e os anticorpos (WEBER et al., 2007).

Para evitar esses problemas, métodos para a detecção direta de alérgenos alimentares por espectrometria de massas foram desenvolvidos (TOLIN et al., 2012a). Devido à alta sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, a técnica de espectrometria de massas permite a detecção de traços de proteínas e torna a identificação independente da estrutura dos alérgenos

(KIRSCHNER et al., 2009). Além desses fatores, deve-se destacar o conhecido desempenho de sistemas de cromatografia e espectrometria de massas, bem como o desenvolvimento de novos protocolos de preparo de amostras (MÜLLER; WINTER, 2017).

Conforme Kaul *et al.* (2007), a espectrometria de massas supera as limitações das abordagens imunológicas clássicas não apenas em termos de sensibilidade, mas também porque os imunoenaios são afetados pela integridade da estrutura tridimensional das proteínas, enquanto os métodos de espectrometria de massas dependem de dados baseados na identidade química das proteínas, isto é, a sequência de aminoácidos. Ainda, conforme Faisal *et al.* (2019), a eficiência do isolamento, purificação e caracterizações adequadas de proteínas em LC/MS está diretamente relacionada à seleção da coluna analítica apropriada e às respectivas fases móveis. Além disso, o ajuste da vazão e da concentração da amostra são outras etapas cruciais para alcançar uma melhor separação dos picos de proteínas.

A Tabela 2 apresenta valores de LD, LQ e recuperação analítica de alguns métodos de análises de proteínas derivadas de leite e ovos em vinhos por imunoenaios e análises cromatográficas.

Tabela 2. Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e recuperação analítica de alguns métodos de análises de proteínas derivadas de leite e ovos em vinhos por imunoenaios e cromatografia.

Proteína	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)	Recuperação (%)	Método	Referência
Albumina	0,02	0,10	114 -130	ELISA	Weber et al. 2007
	0,50	1,00	80 - 105	ELISA	RESOLUTION OENO 427/2010
	0,25	0,50	—	ELISA	RESOLUTION COMEX 502-2012
	0,06	0,16	—	ELISA	Uberti et al. 2014
	0,06	0,16	94 -108 (vinho tinto)	ELISA	Restani et al. 2014
	0,40 - 1,10	—	—	LC/HRMS	Monaci et al. 2013
	0,80	2,00	73	LC-ESI-MS/MS	Mattarozzi et al. 2014
	0,19	—	—	LIT	Pilolli et al. 2014
	0,30	—	—	Orbitrap	Pilolli et al. 2014
	5.10 ⁻³ - 8.10 ⁻³	0,01-0,02	86 - 108	LCMS/MS	Pavón-Pérez et al. 2019
Caseína	0,33	1,00	85 - 113	ELISA	Weber et al. 2007
	0,10	1,00	80 - 83	ELISA	Weber et al. 2007
	0,50	1,00	80 - 105	ELISA	RESOLUTION OENO 427/2010
	0,25	0,50	—	ELISA	RESOLUTION COMEX 502-2012
	0,50	1,00	—	ELISA	Restani et al. 2012
	0,15	0,38	86 -120 (vinho branco)	ELISA	Restani et al. 2014
	0,40 - 1,10	—	—	LC/HRMS	Monaci et al. 2013
	0,5 α-caseína; 0,01 β-caseína	1 α-caseína; 0,03 β-caseína	99 (α-caseína); 109 (β-caseína)	LC-ESI-MS/MS	Mattarozzi et al. 2014
	0,20	—	—	LIT	Pilolli et al. 2014
	0,30	—	—	Orbitrap	Pilolli et al. 2014
Lisozima	5.10 ⁻³ - 8.10 ⁻³	0,01-0,02	86 - 108	LCMS/MS	Pavón-Pérez et al. 2019
	—	0,10	—	ELISA	Weber et al. 2007
	0,5	1,00	80 - 105	ELISA	RESOLUTION OENO 427/2010
	0,25	0,50	—	ELISA	RESOLUTION COMEX 502-2012
	0,06	0,16	—	ELISA	Uberti et al. 2014
	0,18	0,59	—	HPLC/FLD	RESOLUTION OENO 8/2007
	0,49	1,62	—	HPLC/FLD	RESOLUTION OENO 458/2014
	0,40 - 1,10	—	—	LC/HRMS	Monaci et al. 2013
	0,19	—	—	LIT	Pilolli et al. 2014
	0,18	—	—	Orbitrap	Pilolli et al. 2014

3.5.1 Ensaios imunoenzimáticos para análises de proteínas

Os ensaios imunoenzimáticos apresentam vantagens em relação à simplicidade e rapidez analítica, porém, geralmente são realizados em um único alvo e são passíveis reações cruzadas (interação indesejadas) e baixa precisão analítica, o que minimiza sua eficiência dependendo do analito de interesse (MATTAROZZI et al., 2014).

As análises de proteínas alergênicas podem ser realizadas através de testes ELISA, tanto comerciais (que apresentam limites de detecção geralmente menos sensíveis que o nível residual provável nos vinhos que não passaram por tratamentos adequados), como através de testes elaborados *in-house* (ROLLAND et al., 2008). Para isso, é desenvolvida uma curva de calibração com base na reação antígeno/anticorpo de uma concentração de proteína conhecida (FAISAL et al., 2019).

Weber *et al.* (2007) relataram dificuldades em realizar análises com resultados exatos de resíduos de proteínas em vinhos através de testes comerciais e avaliaram um teste de ELISA desenvolvido *in-house*. Este ensaio detectou uma baixa concentração de proteínas de ovos em quatro vinhos comerciais alemães, porém com valores inferior ao LQ de $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$, destacando a necessidade de uma investigação mais aprofundada e de um painel mais amplo de vinhos comerciais.

No Compêndio Internacional de Métodos de Análises de Vinhos e Mostos da OIV (OIV, 2019c), que tem por objetivo a harmonização internacional, existe um método que orienta sobre os “Critérios para os métodos de quantificação de resíduos potencialmente alérgicos de proteínas clarificantes em vinhos” (OIV-MA-AS315-23). A determinação de resíduos de proteínas alergênicas de agentes clarificantes em vinhos pode ser realizada através dos métodos de ELISA do tipo sanduíche, competitivo, direto e indireto (**Figura 2**). Porém,

os métodos imunoenzimáticos estão em discussão na OIV devido à reprodutibilidade dos resultados e aos limites de detecção e quantificação. Ainda não são prescritos métodos específicos para estas determinações, mas métodos de ELISA estão disponíveis e podem ser aplicados, desde que os laboratórios utilizem critérios de validação de acordo com os requisitos da OIV (OIV, 2019c). Já, para análise de lisozima, a OIV dispõe de um método por eletroforese capilar (OIV-MA-AS315-24) e outro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OIV-MA-AS-315-25) (OIV, 2019c).

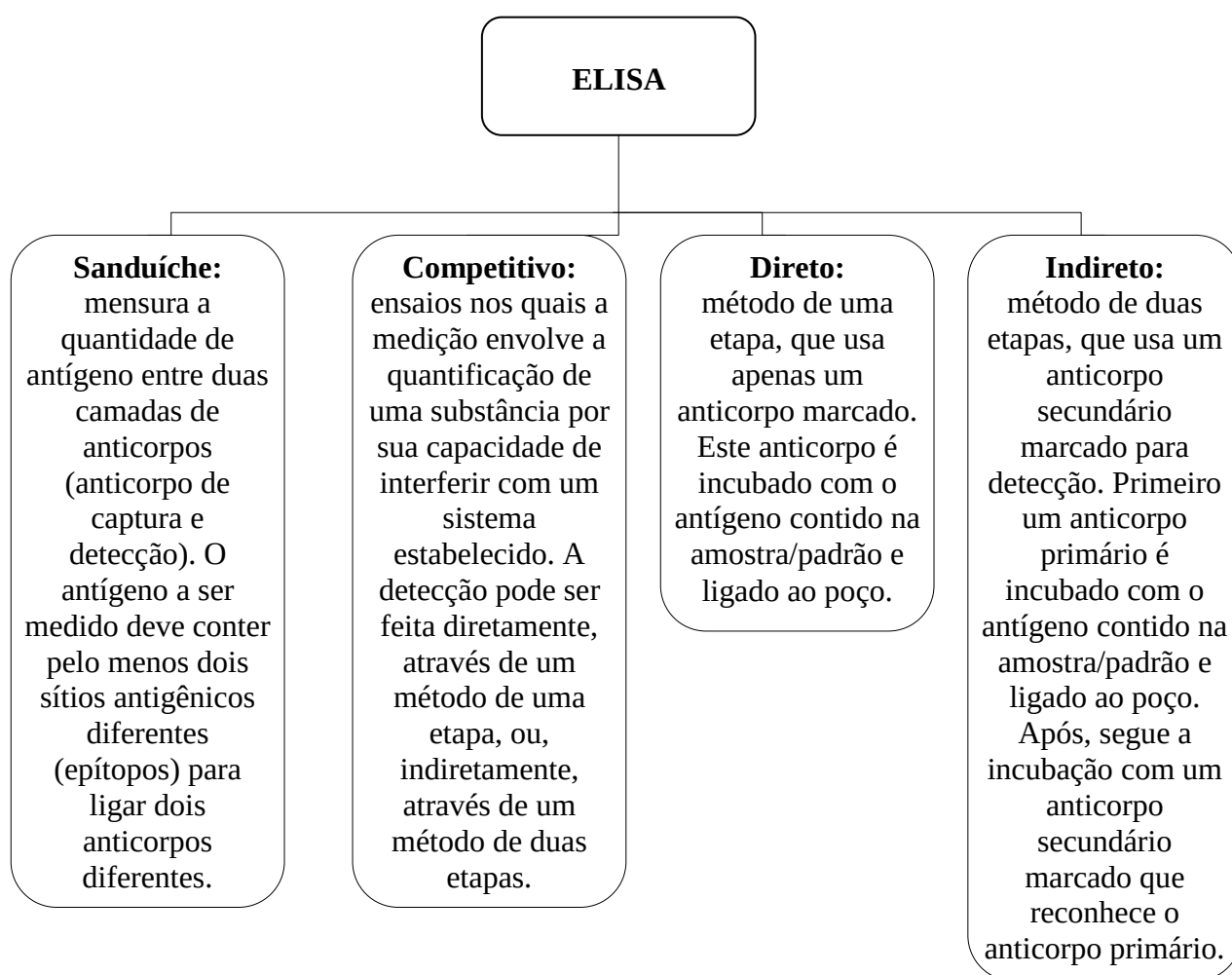


Figura 2 – Diagrama explicativo dos métodos de ELISA.

Fonte: elaborado pelo autor conforme documento de referência OIV-MA-AS315-23 (OIV, 2019c).

3.5.2 Espectrometria de massas para análises de proteínas

3.5.2.1 Preparo das amostras para análise por Espectrometria de Massas

O procedimento básico de preparo de amostras de vinhos para a análise de proteínas por EM se baseia em várias etapas (**Figura 3**), incluindo a digestão de proteínas para gerar peptídeos trípticos. Procedimentos de filtração e limpeza podem ser realizados para obtenção de uma amostra livre de interferentes analíticos.

A proteômica do tipo “bottom-up” é o método mais comum para identificação e caracterização de proteínas por espectrometria de massas, baseado na digestão enzimática de proteínas seguida pela análise subsequente de peptídeos proteolíticos (MÜLLER; WINTER, 2017).

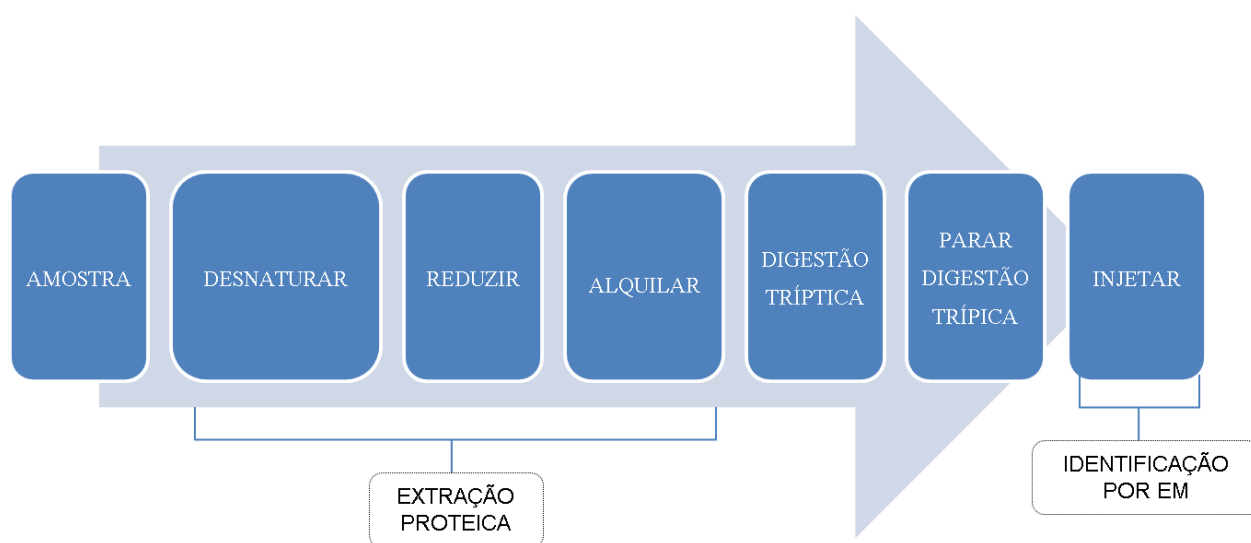


Figura 3 - Etapas básicas do preparo de amostras de vinhos para a análise de proteínas por EM. Fonte: Figura elaborada pelo autor com base no estudo de Müller & Winter (2017).

A desnaturação proteica, também conhecida como desdobramento (**Figura 4**), pode ser realizada de diferentes maneiras. Uma delas é através da aplicação de calor, pois o aumento de temperatura favorece vibrações no interior da molécula e a energia dessas

vibrações pode tornar-se grande o suficiente para desfazer a estrutura terciária. A ligação de detergentes, como dodecil sulfato de sódio (SDS) também desnatura proteínas, pois eles tendem a desfazer as ligações hidrofóbicas. Os outros reagentes como ureia e hidrocloreto de guanidina, formam pontes de hidrogênio com a proteína, que são mais fortes do que aquelas dentro dela. Esses reagentes também podem desfazer as ligações hidrofóbicas de uma maneira muito similar à dos detergentes (CAMPBELL, 2000).

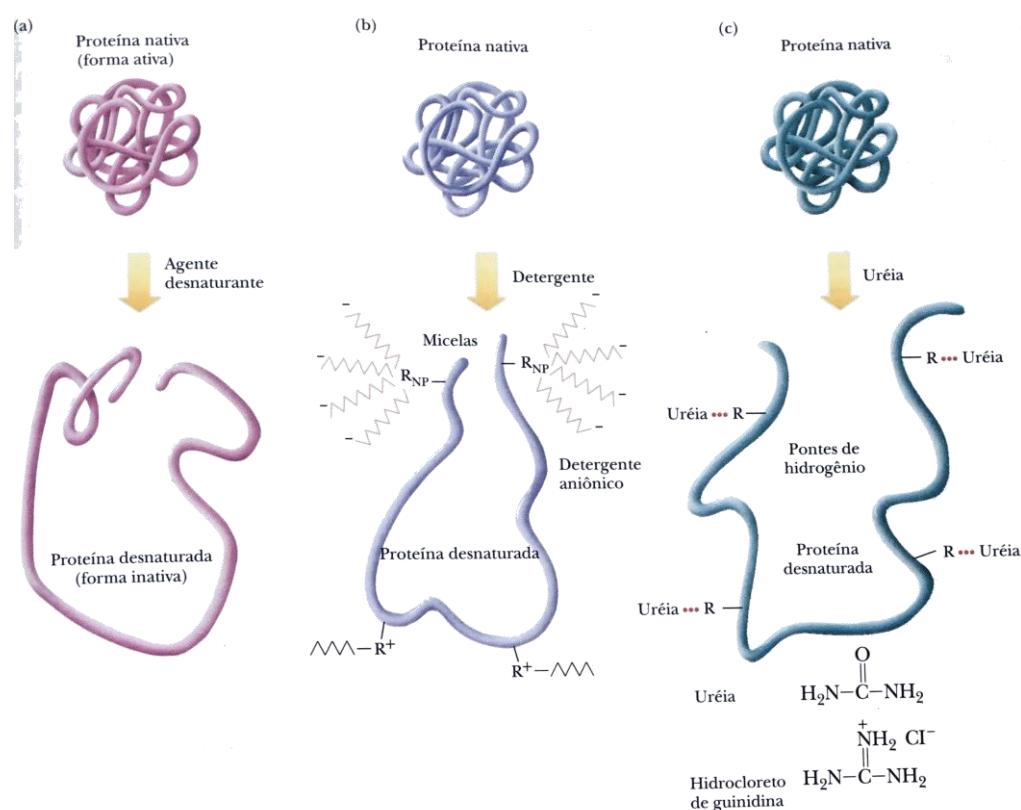


Figura 4 - Desnaturação de proteínas. (a) O processo de desnaturação (b) O modo de ação dos detergentes, onde R^+ é uma cadeia lateral carregada positivamente e R_{NP} é uma cadeia lateral apolar (c) O modo de ação da ureia (CAMPBELL, 2000, modificada).

Após a desnaturação, são realizadas as etapas de redução e alquilação das cisteínas, que fazem parte de praticamente todos os fluxos de trabalho proteômico. As proteínas são reduzidas para quebrar as ligações dissulfeto. O reagente redutor mais frequentemente utilizado é o ditioneitol (DTT), que foi introduzido em 1964 como alternativa mais estável e menos tóxica aos comumente utilizados na época (glutathione ou β -mercaptoetanol). Após, são

alquiladas normalmente com iodoacetamida (IAM), para modificar covalentemente os grupos sulfidrilos da cisteína, impedindo-os de formar novas ligações dissulfeto indesejadas (a combinação de DTT e IAM é a mais frequentemente utilizada no campo da proteômica baseada em espectrometria de massas). Finalmente, as proteínas são digeridas enzimaticamente resultando em peptídeos trípticos (MÜLLER; WINTER, 2017). A tripsina é a enzima mais utilizada, pois cliva exclusivamente resíduos básicos da arginina e da lisina, gerando peptídeos com faixa de massa adequada, o que facilita a detecção (LOZIUK et al., 2013). Após o término da digestão tríptica, pode-se fazer uma limpeza ou não do extrato e ir para a etapa final de identificação analítica.

3.5.2.2 Análises por Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada para o estudo de biomoléculas em geral, entre elas, as proteínas. Devido à necessidade de identificar, caracterizar e quantificar proteínas com maior sensibilidade e, em amostras complexas, surgiu uma ampla gama de novas plataformas analíticas baseadas em espectrometria de massas e estratégias experimentais (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Dois tipos de análise de espectrometria de massas fornecem dados importantes na detecção de proteínas. A primeira, conhecida como espectrometria de massas não direcionada, que permite a criação de perfis de misturas complexas de proteínas (PALI-SCHÖLL et al., 2018), porém a análise depende da existência de genomas sequenciados ou bibliotecas extensas de sequências de proteínas de um determinado organismo. A segunda, que fornece identificação, caracterização e quantificação inequívocas, é a espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Após a determinação inicial da massa, íons específicos são selecionados

e submetidos à fragmentação por colisão, para que as características estruturais detalhadas dos peptídeos possam ser inferidas a partir da análise das massas dos fragmentos resultantes (DOMON; AEBERSOLD, 2006; PALI-SCHÖLL et al., 2018).

O LC-MS/MS é um dos tipos de analisador utilizado na espectrometria de massas. Constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo (Q2) não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como célula de colisão (**Figura 5**). Nele ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte, e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3) (CHIARADIA et al., 2008).

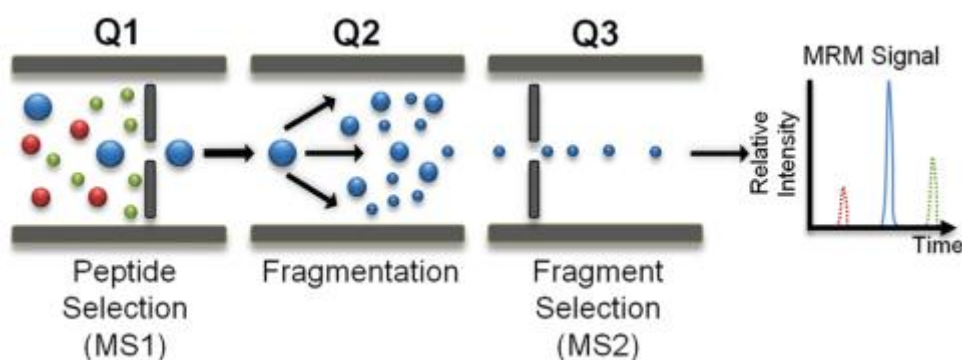


Figura 5 – Esquema de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo com MRM (Multiple Reaction Monitoring) (BOJA; RODRIGUEZ, 2011).

O LC-MS/MS permite análises quantitativas com alta sensibilidade no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), que consiste em uma série de experiências curtas em que um íon precursor e um fragmento específico característico para esse precursor são selecionados por Q1 e Q3, respectivamente. Normalmente, o instrumento percorre uma série de transições e grava o sinal em função do tempo (eluição cromatográfica). Portanto, o MRM é principalmente utilizado para a detecção de um analito específico com propriedades de fragmentação conhecidas em amostras complexas (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Analitos conhecidos ou prováveis podem ser detectados e/ou quantificados com alta sensibilidade e seletividade. A alta seletividade resulta do monitoramento de um par de íons precursores e fragmentos característicos de um peptídeo único. Além disso, os dois níveis de seleção de massas em MRM resultam em um aumento substancial da sensibilidade, pois o primeiro filtro de massa transmite apenas uma pequena população de íons. A célula de colisão fragmenta os íons derivados do precursor, e a natureza de não rastreamento desta técnica (high dwell time) aumenta a sensibilidade em grande magnitude quando comparada com o limite de detecção (LD) alcançado por varreduras de íons de produtos (SCAN) (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

As vantagens oferecidas pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial aumentam a eficácia na identificação das proteínas e a análise de múltiplos alvos. A harmonização e a validação de métodos baseados na EM para detecção de múltiplos alérgenos é uma prioridade atual de organismos internacionais de padronização como a AOAC (PALI-SCHÖLL et al., 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão divididos em quatro capítulos e, neste item, estão descritos os títulos dos artigos. As informações mais específicas referentes aos mesmos estão detalhadas em seus respectivos artigos.

CAPÍTULO I - Vinho: uma revisão sobre resíduos alergênicos de coadjuvantes de tecnologia.

CAPÍTULO II - Analysis of allergenic residues in wines by triple quadrupole LCMS.

CAPÍTULO III - Absence of allergenic residues of milk and egg white in commercial Brazilian Chardonnay wines.

CAPÍTULO IV - Development of a sample preparation approach for the analysis of fining agents in wines by liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

4.1 CAPÍTULO I

Vinho: uma revisão sobre resíduos alergênicos de coadjuvantes de tecnologia

Publicado na Revista Brasileira de Viticultura e Enologia em 29 de setembro de 2018.

Disponível em: <https://www.enologia.org.br/default/uploads/revista/revista->

81.pdf?b777b58003c4424db002db387930ec91



Gilmar Gomes

Vinho: uma revisão sobre resíduos alergênicos de coadjuvantes de tecnologia

Fernanda Rodrigues Spinelli^{1,2}

Regina Vanderlinde¹

¹UCS - Instituto de Biotecnologia
95070-560 Caxias do Sul, RS

²Laboratório de Referência Enológica
Evanir da Silva - IBRAVIN/SEAPI
95084-470 Caxias do Sul, RS

Autor correspondente:
fernanda.laren@ibravin.org.br

RESUMO

Coadjuvantes de tecnologia são comumente utilizados no processo de vinificação para clarificar e estabilizar os vinhos. Com origens diferentes (animal, vegetal ou mineral), são adicionados aos vinhos, a fim de remover compostos indesejáveis, assim como melhorar aspectos físicos e químicos. Estes coadjuvantes não estarão presentes no produto final se forem utilizados tratamentos adequados para sua remoção durante o processo de vinificação, caso contrário, é possível que existam traços residuais dos mesmos nos vinhos. A confirmação da presença ou ausência desses compostos pode ser realizada através de análises laboratoriais específicas. A preocupação com a presença de proteínas residuais exógenas é a predisposição de indivíduos alérgicos a determinadas proteínas derivadas de alimentos alergênicos, como os ovos, leite e peixes. Portanto, esta revisão tem como objetivo elucidar alguns coadjuvantes de tecnologia (derivados de alimentos alergênicos) utilizados durante a vinificação e realizar um apanhado dos estudos já realizados sobre a detecção de resíduos dos mesmos nos vinhos.

Palavras-chave: clarificação, estabilização, alergia.

ABSTRACT

Wine: a review on allergenic residues of technology coadjuvants

Technology coadjuvants are commonly used in the winemaking process to clarify and stabilize wines. With different origins (animal, vegetable or mineral), they are added to the wines in order to remove undesirable compounds and to improve physical and chemical aspects. These coadjuvants will not be present in the final product if suitable treatments have been used for their removal during the winemaking process, otherwise it is possible the presence of trace residues of them in the wines. The confirmation of the presence or absence of these compounds can be performed through specific laboratory analyzes. The concern with the presence of exogenous residual proteins is the predisposition of allergic individuals to certain proteins derived from allergenic foods, such as eggs, milk and fish. Therefore, this review aims to elucidate some technology coadjuvants (derived from allergenic foods) used during winemaking and to go over previous studies on the detection of residues of them in wines.

Key words: fining, stabilization, allergy.

Introdução

A cultura da videira e a elaboração de vinhos apresentam constante ascensão no Brasil. O setor vitivinícola tem aumentado seu potencial de produção e importância no país. Aliado à grande extensão de terras e à diversidade de clima do país, permite-se ampliar e inovar os conceitos de regiões produtoras de uvas e vinhos. Por sua vez, o emprego de tecnologias avançadas permite conquistar espaço no mercado competitivo. Dessa forma, também se abrem perspectivas cada vez mais amplas de exportação, devido à qualidade e tipicidade de seus vinhos.

A elaboração de vinhos é realizada em várias etapas, iniciando pela colheita da uva até o engarrafamento. Durante essas etapas são utilizados coadjuvantes de tecnologia como auxiliares de processo. A clarificação dos vinhos é utilizada na enologia com o intuito de tornar o vinho límpido e estável, tanto do ponto de vista químico como físico. A concentração dos clarificantes varia de acordo com as características do vinho e de suas propriedades.

A utilização de clarificantes como a albumina (proteína da clara do ovo), a caseína (proteína do leite) e ictiocola (cola de peixe), é realizada com função de coagular e sedimentar as impurezas responsáveis pela turbidez do vinho. Outra prática utilizada na enologia é o controle da fermentação malolática, através da utilização da lisozima (enzima extraída da clara do ovo), principalmente em vinhos brancos. Esses compostos apresentam ótimas propriedades enológicas e são eliminados durante as etapas de elaboração dos vinhos, se forem aplicadas práticas como adição de bentonite e filtração. Caso contrário, podem existir resíduos nos vinhos, predispondo pessoas alérgicas a essas proteínas.

Os compostos alergênicos estão diretamente relacionados com a segurança dos alimentos. Embora afetem apenas uma parcela da população (estima-se 2% dos adultos), as implicações na saúde devem ser consideradas, gerando atenção dos consumidores, fabricantes e autoridades de saúde pública. Para vinhos, de acordo com o Regulamento da UE 1308/2013 (EUROPEAN UNION, 2013) em combinação com o OIV-COMEX 502-2012 (OIV, 2012), uma quantidade de alérgenos acima de

0,25 mg.L⁻¹ requer rotulagem. Na atual legislação brasileira não são definidos legalmente limites de resíduos desses compostos. Se presentes nos vinhos após a elaboração, a presença deve ser declarada no rótulo, conforme a RDC nº 26/2015 (ANVISA, 2015).

Levando em consideração que, para um consumidor alérgico, a ingestão de miligramas de alergênicos pode desencadear uma reação adversa alimentar e que não é possível prever o nível dose-resposta, nem o nível de gravidade da reação alérgica, é necessária a realização de estudos dos coadjuvantes utilizados na enologia, verificando as doses utilizadas e a existência ou não de resíduos desses produtos, garantindo, assim, uma rotulagem adequada e a segurança alimentar do consumidor. Portanto, neste trabalho estão apresentados e serão discutidos estudos sobre resíduos de coadjuvantes tecnológicos alergênicos em vinhos.

Alergias Alimentares

De acordo com a RDC nº 26/2015 (ANVISA, 2015), as alergias alimentares são reações adversas reprodutíveis mediadas por mecanismos imunológicos específicos, que ocorrem em indivíduos sensíveis após o consumo de determinado alimento.

A prevalência de alergias alimentares é superior nos primeiros anos de vida, afetando cerca de 6% das crianças com menos de três anos de idade. Na fase adulta, a percentagem de pessoas com alergias alimentares diminui para apenas 2% (LIDON; SILVESTRE, 2010; RONA et al., 2007) e são mais observadas alergias ao leite, em relação aos ovos e peixes (RONA et al., 2007). Essa situação é justificada pelo fato de a barreira intestinal das crianças com esta idade ainda ser deficiente, permitindo a passagem de macromoléculas (proteínas) para o interior do organismo sem digestão prévia (LIDON; SILVESTRE, 2010).

Conforme a RDC nº 26/2015 (ANVISA, 2015), se essa substância alergênica utilizada como aditivo não for completamente removida, deve ser declarada a presença intencional de derivado

do alimento alergênico. O prazo para promover as adequações necessárias na rotulagem dos produtos abrangidos por esta Resolução foi 02 de julho de 2016. Os resíduos de derivados de ovos, leite e peixes enquadram-se nessa Resolução brasileira. Já no Regulamento UE 1308/2013 (EUROPEAN UNION, 2013) em combinação com o OIV-COMEX 502-2012 (OIV, 2012) é obrigatória a rotulagem quando existir presença de resíduos de ovos ou leite acima do limite ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$). Além disso, conforme o Regulamento de Execução (UE) N° 579/2012 (EUROPEAN UNION, 2012), pode-se utilizar termos ou um pictograma para destacar a presença dos alérgenos.

Clarificação de vinhos

O processo de clarificação é uma das diferentes técnicas utilizadas para garantir a limpidez e estabilização dos vinhos (VAN DO et al., 2005). Esse processo remove substâncias que podem gerar turbidez e causar acidez e adstringência indesejáveis. Uma grande variedade de agentes clarificantes tem sido utilizada para elaboração de vinhos, entre eles: albumina, caseinatos do leite, cola de peixe, gelatina, algas e argila (RESTANI et al., 2014).

Conforme a Portaria nº 540/1997 (BRASIL, 1997), agente de clarificação é a substância que tem a propriedade de clarificar e auxiliar a filtração de alimentos, facilitando a absorção de impurezas e sua remoção no momento da filtração. Os coadjuvantes albumina, caseína e ictiocola são aprovados para utilização em vinhos conforme a Resolução RDC nº 123 de 04 de novembro de 2016 (ANVISA, 2016). Além desses, são permitidos como agentes de filtração e/ou clarificação: quitosana, taninos, gelatina, entre outros.

A OIV adotou em 2014 um Código de Boas Práticas de clarificação de vinhos, para aplicação na utilização de agentes clarificantes de origem protéica potencialmente alergênicos (Resolution OIV-OENO 520-2014), especificando os passos para realizar o processo de clarificação e filtração, evitando que resíduos de agentes de clarificação, com potencial efeito alergênico, possam estar presentes.

Conforme essa Resolução, os objetivos de

adicionar agentes de clarificação em vinhos podem ser separados em: reduzir adstringência ou amargor; clarificar e remover proteínas capazes de gerar turbidez e/ou estabilizar e reduzir cor através da absorção e precipitação de compostos fenólicos polimerizados e taninos.

Devido aos vinhos apresentarem composições diferentes, eles reagem diferentemente com um mesmo agente de clarificação. Portanto, a eficácia do agente de clarificação dependerá do produto utilizado, das preparações, do método de adição, dosagem, pH, conteúdo de metais, temperatura, nível de CO_2 dissolvido e tratamentos prévios realizados nos vinhos (Resolution OIV-OENO 520-2014).

Conforme Vassilopoulou et al. (2011), os possíveis traços de caseína, ictiocola e ovos (ovalbumina) nos vinhos que passaram por clarificação, apresentam baixo risco para os consumidores alérgicos a essas proteínas, e a rotulagem pode gerar um impacto negativo tanto para os consumidores não alérgicos como para os alérgicos. Conforme este autor, se um indivíduo alérgico à albumina ingerir um litro de vinho, considerando limite de detecção desta proteína, estaria consumindo menos de 0,06 mg de clara de ovo.

Albumina

A albumina do ovo é obtida pela dessecação da clara de ovo fresco, encontrada na forma de pó fino, branco e leve, não completamente solúvel em água, mas solúvel em certas soluções alcalinas, sendo precipitada por taninos (OIV, 2016a). A clara de ovo é mais alergênica que a gema, uma vez que é nessa fração que se encontram as maiores proteínas alergênicas deste alimento: ovomocóide, albumina, conalbumina e lisozima, que representam 11%, 54%, 12% e 3,4% da clara de ovo, respectivamente (SHOJI, 2010).

A albumina tem sido utilizada principalmente para clarificação de vinhos tintos devido à sua natureza coloidal e seu carregamento positivo, que atrai taninos negativamente carregados, que podem produzir adstringência indesejada (RESTANI et al., 2014). Conforme o Código de Boas Práticas, da OIV, para vinhos tintos, a concentração normalmente utilizada é de 30 a 150 mg.L^{-1} (RESOLUTION OIV-OENO 520-2014).

Caseína

A caseína, uma proteína contendo fósforo, encontrada no leite no estado de sal de cálcio, é obtida por coagulação do leite desnatado (OIV, 2016b). É caracterizada por sequências de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, resultando em carácter anfílico com propriedades de formação de micelas (WEBER et al., 2007).

É um agente clarificante solúvel em água (RESTANI et al., 2012; CURVELO-GARCIA; BARROS, 2015), principalmente utilizado para vinhos brancos. Devido ao pH ácido dos vinhos, quando adicionada, floccula, ligando os compostos responsáveis pela turbidez, permitindo sua remoção (RESTANI et al., 2012). O caseinato de potássio é obtido a partir do leite desnatado, fresco ou pasteurizado, por coagulação ácida da caseína, neutralização com hidróxido de potássio e secagem por atomização (CURVELO-GARCIA; BARROS, 2015).

Uma vez que os mostos e os vinhos diferem na sua composição e no seu nível de oxidação, não existe uma dose exata estabelecida sobre a quantidade de caseína a ser utilizada na clarificação. Do ponto de vista enológico, é importante que pouca ou nenhuma das proteínas permaneça no vinho após o tratamento. A presença de quantidades relativamente grandes de clarificante irá formar precipitados de proteínas que necessitam de processos corretivos adicionais. A adição excessiva de caseína pode conferir aos vinhos o aroma dos produtos lácteos.

Conforme o Código de Boas Práticas da OIV, para vinhos tintos, a concentração normalmente utilizada é de 50 a 250 mg.L⁻¹ e, para vinhos brancos, de 50 a 500 mg.L⁻¹ (RESOLUTION OIV-OENO 520-2014).

Ictiocola

A cola de peixe é feita a partir da bexiga natatória e brânquias de certos peixes, incluindo esturção (OIV, 2016a), contendo alto conteúdo de colágeno do Tipo I (WEBER et al., 2010). É produzida sob a forma de folhas incolores ou ligeiramente amareladas, em forma de tiras com aparência de pergaminho seco ou na forma de um pó seco ou vermiculado. É utilizada para a clarificação de

vinhos brancos e rosados (OIV, 2016a).

De acordo com a Efsa (2007b), nos países onde a ictiocola é produzida, as bexigas natatórias dos peixes são limpas, abertas e imersas em água quente. É realizada a retirada do músculo externo e vasos sanguíneos, para posterior secagem das bexigas. Após granulação, lavagens e esterilização mediante a aplicação de peróxido de hidrogênio, é possível a obtenção de um pó fino ou uma pasta hidratada por tratamento mecânico.

O colágeno da cola de peixe forma uma solução coloidal carregada de forma positiva ao nível de pH do vinho, sendo que a colagem ocorre mediante a neutralização das partículas carregadas de forma negativa que se encontram em suspensão no vinho, que se agregam e sedimentam (EFSA, 2007c). A ictiocola tem sido utilizada desde o século XVIII em vinhos e apresenta uma vantagem importante, que é a pouca tendência para que ocorra o fenómeno denominado *overfining*. Essa colagem em excesso é mais frequente em vinhos brancos e o que acontece é que algumas proteínas que foram adicionadas para clarificar o vinho acabam por não flocular (RIBÉREAU-GAYON et al., 2002).

Segundo Weber et al. (2010), em geral, nenhum resíduo de cola de peixe deveria ser detectado nos vinhos, se as boas práticas de fabricação forem realizadas em combinação com filtração completa. Porém, o não uso de bentonite ou filtração adicional pode ocasionar presença de resíduos. Atualmente, não existe dose recomendada pela OIV.

A alergia ou intolerância a peixes foi relatada como afetando até 2,2% da população em países europeus (EFSA, 2007a). Diferentes vinhos precisam de diferentes quantidades de tratamento. O uso típico indicado por fabricantes é entre 10 e 25 mg.L⁻¹ em vinhos brancos. A ictiocola é adicionada geralmente após a fermentação, frequentemente aplicada em conjunto com a bentonite (EFSA, 2007a).

Agente de controle de microrganismos

Conforme a Portaria nº 540/1997 (BRASIL, 1997), agente de controle de microrganismos é

substância que tem a propriedade de controlar e/ou inibir o desenvolvimento de microrganismos em determinada fase do processo de fabricação do alimento.

O uso da lisozima como conservador está previsto na resolução RDC nº 123 de 04 de novembro de 2016 (ANVISA, 2016), assim como ácido sórbico, sorbato de potássio, dióxido de enxofre, anidrido sulfuroso, metabissulfito de potássio e bissulfito de potássio.

Lisozima

A lisozima, uma enzima muramidase obtida a partir de clara de ovo, é amplamente utilizada como agente antimicrobiano na indústria alimentar (LIBURDI et al., 2014; SONNI et al., 2011). Na enologia, é utilizada para inibir o crescimento e atividade da bactéria láctica, responsável pela fermentação malolática (FML) dos vinhos, assim como para a redução da utilização de dióxido de enxofre, o qual apresenta alguns inconvenientes quando utilizado em doses altas (fermentação lenta, diminuição da intensidade de cor dos vinhos e odor desagradável) (VENTURINI FILHO, 2005).

Quando adicionada, aliada ao dióxido de enxofre, resulta em vinhos mais estáveis (OIV, 2016a). Não tem efeito adverso sobre o crescimento da levedura e pode ser utilizada durante a fermentação alcoólica (SONNI et al., 2011). A FML é desejável em vinhos tintos e em poucos vinhos brancos, portanto, precisa ser controlada em todos os outros tipos de vinho. A lisozima exibe atividade antimicrobiana seletiva com base na hidrólise de constituintes de parede celular do peptidoglicano em bactérias acidoláticas (LIBURDI et al., 2014). Além disso, apresenta atividade de quitinase, ou seja, quebra a ligação glicosídica da quitina presente na parede fúngica (RUAS, 2010). Conforme a OIV (OIV, 2016a) e a RDC nº 123, de 04 de novembro de 2016 (ANVISA, 2016), a dose de adição recomendada é que não exceda de 500 mg.L⁻¹ de lisozima (dose cumulativa caso seja adicionada no mosto e no vinho).

Carstens et al. (2014) avaliaram por kits de ELISA, a eficiência de procedimentos enológicos para remover a lisozima dos vinhos. Entre os procedimentos testados, a bentonite provou ser

capaz de reduzir significativamente os resíduos alergênicos.

Métodos de quantificação e resultados de resíduos de alergênicos em vinhos

Diferentes métodos analíticos são propostos pela literatura para quantificar resíduos de alergênicos em vinhos, baseados em técnicas de imunossaios e espectrometria de massas (WEBER et al., 2007; 2009; ROLLAND et al., 2008; D'AMATO et al., 2010; MONACI et al., 2010; 2011; 2013; LACORN et al., 2011; SIMONATO et al., 2011; RESTANI et al., 2012; TOLIN et al., 2012; MATTAROZZI et al., 2014).

Restani et al. (2012) analisaram através de testes imunológicos 16 vinhos elaborados experimentalmente (200 - 500 mg.L⁻¹ de caseinato com e sem bentonite) e 63 vinhos comerciais italianos (brancos e tintos) tratados com 20 - 400 mg.L⁻¹ de caseinato (com e sem bentonite), e não detectaram resíduos alergênicos tanto nos vinhos experimentais quanto nos vinhos comerciais. O limite de detecção (LD) foi de 0,28 mg.L⁻¹ e o limite de quantificação (LQ) 0,76 mg.L⁻¹.

Weber et al. (2010) desenvolveram um método de ELISA indireto para detecção de resíduos de gelatina e cola de peixe, aplicável para análises em vinhos brancos, apresentando limite de quantificação de 0,11 mg.L⁻¹. Nenhum resíduo de gelatina ou cola de peixe foi encontrado em vinhos comercialmente disponíveis, assim como em vinhos experimentais tratados. Níveis de 0,33 mg.L⁻¹ foram encontrados em alguns vinhos brancos experimentais não tratados com bentonite.

Segundo Mattarozzi et al. (2014), os imunossaios têm a vantagem de serem rápidos e simples de realizar, porém, não são tão precisos como os ensaios realizados por espectrometria de massas. Os testes de ELISA apresentam algumas desvantagens decorrentes da presença de compostos interferentes na matriz (WEBER et al., 2009), como os polifenóis nos vinhos tintos, que interagem com as proteínas e os anticorpos (WEBER et al., 2007).

Para evitar esses problemas, métodos para

a detecção direta de alérgenos alimentares por espectrometria de massas (MS) foram desenvolvidos (TOLIN et al., 2012). Devido à alta sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, a espectrometria de massas permite a detecção de vestígios de proteínas e torna a identificação independente da estrutura dos alérgenos (KIRSCHNER et al., 2009).

Conforme Kaul et al. (2007), a espectrometria de massas supera as limitações das abordagens imunológicas clássicas não apenas em termos de sensibilidade, mas também porque os imunoenaios são afetados pela integridade da estrutura 3D das proteínas, enquanto os métodos MS dependem de dados baseados da identidade química das proteínas, isto é, a sequência de aminoácidos.

No Compêndio de Métodos Internacionais de Análises de Vinhos e Mostos da OIV (2018) existe metodologia para análise de resíduos alergênicos de clarificantes enológicos derivados de proteínas por ELISA (OIV-MA-AS315-23) e de análise de lisozima por HPLC (OIV-MA-AS-315-25) (Tabela 1). Ainda não consta a análise destas proteínas exógenas por LCMS. Pode-se verificar na Tabela 1 as doses recomendadas para utilização de albumina, caseína, ictiocola e lisozima em vinhos, assim como os limites de detecção e quantificação e respectivos métodos.

Conclusão

1. Diversos estudos realizados mostram que não existem resíduos detectáveis de coadjuvantes alergênicos se os vinhos forem tratados adequadamente.

2. Para uma afirmação mais consistente, é necessária a realização de testes com diferentes concentrações de coadjuvantes e posteriores análises.

3. É necessária uma padronização dos métodos de análises de coadjuvantes alergênicos, assim como a realização de estudos interlaboratoriais.

Agradecimentos

Ao CNPq, à Organização Internacional da Uva e do Vinho, ao Instituto Brasileiro do Vinho, à Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul e à Universidade de Caxias do Sul.

Tabela 1. Coadjuvantes, doses recomendadas, limites, método e referência.

Coadjuvante	Dose recomendada (mg.L ⁻¹)	Referência	Limite de detecção (mg.L ⁻¹)	Limite de quantificação (mg.L ⁻¹)	Método	Referência
Albumina	30 - 150 (vinhos tintos)	OIV	0,25	0,50	ELISA	OIV (2012)
			0,8	2	LC-ESI-MS/MS	MATTAROZZI et al., 2014
Caseína	50 - 250 (vinhos tintos)/ 50 - 500 (vinhos brancos)	OIV	0,25	0,50	ELISA	OIV (2012)
			0,01	0,03	LC-ESI-MS/MS	MATTAROZZI et al., 2014
Ictiocola	10 - 25 (vinhos brancos)	EFSA	0,11	-	ELISA	WEBER et al., 2010
Lisozima	Máximo 500	OIV	0,18	0,59	HPLC/FLD	Resolution Oeno 8/2007
			0,49	1,62	HPLC/FLD	Resolution OIV-OENO 458/2014

Referências

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº 26, de 02 de julho de 2015. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. *Diário Oficial da União*, 3 jul. 2015. Seção 1, p.52.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº 123, de 04 de novembro de 2016. Dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos. *Diário Oficial da União*, 7 nov. 2016. Seção 1, p.56.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 28 out. 1997.
- CARSTENS, C.; DECKWART, M.; WEBBER WITT, M.; SCHAFER, V.; EICHORN, L.; BROCKOW, K.; FISCHER, M.; CHRISTMANN, M.; PASCHKE-KRATZIN, A. Evaluation of the efficiency of enological procedures on lysozyme depletion in wine by an indirect ELISA method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.62, v.26, p. 6247-6253, 2014.
- CURVELO-GARCIA, A.S.; Barros, P. *Química Enológica - métodos analíticos*. Porto, PT: Publindústria, 2015, 283p.
- D'AMATO, A.; KRAVCHUK, A.V.; BACHI, A.; RIGHETTI, P.G. Noah's nectar: the proteome content of a glass of red wine. *Journal of Proteomics*, n.73, v.12, p.2370-2377, 2010.
- EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from WFA and AWRI on casein and potassium caseinate used in the manufacture of wine pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC - for permanent exemption from labelling. *The EFSA Journal*, v.531, p.1-6, 2007a.
- EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from WFA and AWRI on fish products (isinglass) used in the manufacture of wine pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC - for permanent exemption from labelling. *The EFSA Journal*, v.533, p.1-8, 2007c.
- EUROPEAN UNION. Commission implementing regulation (EU) nº 579, of 29 June 2012. Amending Regulation (EC) Nº 607/2009 laying down certain rules for the implementation of Council Regulation (EC) Nº 479/2008 as regards protected designations of origin and geographical indications, traditional terms, labelling and presentation of certain wine sector products. *Official Journal of the European Union*, Brussels, EN, 29 June 2012. L 171, p.4-7.
- EUROPEAN UNION. Regulation (EU) Nº 1308/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013. Establishing a common organization of the markets in agricultural products and repealing Council Regulations (EEC) Nº 922/72, (EEC) Nº 234/79, (EC) Nº 1037/2001 and (EC) Nº 1234/2007. *Official Journal of the European Union*, Brussels, EN, 20 Dec. 2013. L 347-671, p.671-854.
- KAUL, S.; LÜTTKOPF, D.; KASTNER, B.; VOGEL, L.; HÖLTZ, G.; VIETHS, S.; HOFFMANN, A. Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization. *Clinical and Experimental Allergy*, v.37, p.141-150, 2007.
- KIRSCHNER, S.; BELLONI, B.; KUGLER, C.; RING, J.; BROCKOW, K. Allergenicity of wine containing processing aids: a double-blind, placebo-controlled food challenge. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, v.19, p.210-217, 2009.

LACORN, M.; GÖZWEIN, C.; IMMER, U. Determination of residual egg white proteins in red wines during and after fining. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.62, p.382-385, 2011.

LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; ESTI, M. Lysozyme in wine: an overview of current and future applications. *Food Science and Food Safety*, v.13, p.1062-1073, 2014.

LIDON, F.; SILVESTRE, M. Nutrição e saúde - alergia aos alimentos. In: F. Lidon, M. Silvestre (Ed.). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*, Escolar Editora, 2010, p.445-455, 2010.

MATTAROZZI, M.; MILIOLI, M.; BIGNARDI, C.; ELVIRI, L.; CORRADINI, C.; CARERI, M. Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin fortified red wine. *Food Control*, v.38, p.82-87, 2014.

MONACI, L.; LOSITO, I.; PALMISANO, F.; VISCONTI, A. Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p.4300-4305, 2010.

MONACI, L.; LOSITO, I.; PALMISANO, F.; GODULA, M.; VISCONTI, A. Towards the quantification of residual milk allergens in caseinate-fined white wines using HPLC coupled with single-stage Orbitrap mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, v.28, p.1304-1314, 2011.

MONACI, L.; LOSITO, I.; DE ANGELIS, E.; PILOLLI, R.; VISCONTI, A. Multi-allergen quantification of fining-related egg and milk proteins in white wines by high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.27, p.2009-2018, 2013.

OIV. International Organization of Vine and Wine. Standards and technical documents. Methods of analysis. *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts* (2 vol.) **Quantification of potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine** (OENO 427-2010 modified by OIV). Paris, FR: OIV, n.502, 2012. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/2400/oiv-ma-as315-23.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2012.

OIV. International Organization of Vine and Wine. Standards and technical documents. Methods of analysis. *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts* (2 vol.). Paris, FR: OIV, 2018. Disponível em: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol>>. Acesso em: 16 fev. 2018.

OIV. International Organization of Vine and Wine. Standards and technical documents. Oenological Practices. *International Code of Oenological Practices*. (OENO 10/97). Disponível em: <<http://www.oiv.org/en/technical-standards-and-documents/oenological-practices/international-code-of-oenological-practices>>. Acesso em: 4 mar. 2016a.

OIV. International Organization of Vine and Wine. Standards and technical documents. Oenological Products. **Update to the monograph on casein. International Oenological Codex: casein** (OIV-OENO 555-2015). Disponível em: <http://www.oiv.org/en/technical-standards-and-documents/oenological-products/international-oenological-codex>. Acesso em: 4 de mar. 2016b.

RESTANI, P.; UBERTI, F.; DANZI, R.; BALLABIO, C.; PAVANELLO, F.; TARANTINO, C. Absence of allergenic residues in experimental and commercial wines fined with caseinates. *Food Chemistry*, v.134, p.1438-1445, 2012.

RESTANI, P.; UBERTI, F.; TARANTINO, C.; BALLABIO, C.; GOMBAC, F.; BASTIANI, E.; BOLOGNINI, L.; PAVANELLO, F.; DANZI, R. Collaborative interlaboratory studies for the validation of ELISA methods for the detection of allergenic fining agents used in wine according to the criteria of OIV Resolution 427-2010 modified by OIV - Comex 502-2012. *Food Analytical Methods*, v.7, p.706-72, 2014.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. *Tratado de Enología: química del vino estabilización y tratamientos*. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur, 2002. Tomo 2.

- ROLLAND, J.M.; APOSTOLOU, E.; DE LEON, M.P.; STOCKLEY, C.S.; O'HEIR, R.E. Specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for analysis of residual allergenic food proteins in commercial bottled wine fined with egg white, milk, and nongrape-derived tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.349-354, 2008.
- RONA, R.J.; KEIL, T.; SUMMERS, C.; GISLASON, D.; ZUIDMEER, L.; SODERGREN, E.; SIGURDARDOTTIR, S.T.; LINDNER, T.; GOLDHAHN, K.; DAHLSTROM, J.; MCBRIDE, D.; MADSEN, C. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.120, n.3, p.638-646, 2007.
- RUAS, G.W. *Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas*. Dissertação de Mestrado em Fármaco e Medicamentos. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, São Paulo, 2010.
- SHOJI, M. Egg Allergen Detection. In: Popping, B.; Díaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Ed). *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2010. Cap. 16, p.315-317.
- SIMONATO, B.; MAINENTE, F.; TOLIN, S.; PASINI, G. Immunochemical and mass spectrometry detection of residual proteins in gluten fined red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, n.7, p.3101-3110, 2011.
- SONNI, F.; CHINNICI, F.; NATALI, N.; RIPONI, C. Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. *Food Chemistry*, v.29, n.3, p.1193-1200, 2011.
- TOLIN, S.; PASINI, G.; SIMONATO, B.; MAINENTE, F.; ARRIGONI, G. Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. *Food Control*, v.28, n.2, p.321-326, 2012.
- VAN DO, T.; ELSAYED, S.; FLORVAAG, E.; HORDVIK, I.; ENDRESEN, C. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.116, n.6, p.1314-1320, 2005.
- VASSILOPOULOU, E.; KARATHANOS, A.; SIRAGAKIS, G.; GIAVI, S.; SINANIOTIS, A.; DOULADIRIS, N.; Fernandez-Rivas, M.; Clausen, M.; Papadopoulos, N.G. Risk of allergic reactions to wine, in milk, egg and fish-allergic patients. *Clinical and Translational Allergy*, v.1, p.1-10, 2011.
- VENTURINI FILHO, W.G. *Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado*. São Paulo, SP: Editora Edgard Blüchen, 2005.
- WEBER, P.; STEINHART, H.; PASCHKE, A. Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.8, p.3127-3133, 2007.
- WEBER, P.; STEINHART, H.; PASCHKE, A. Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, Western Blot and Immunostaining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.18, p.8399-8405, 2009.
- WEBER, P.; STEINHART, H.; PASCHKE, A. Characterization, antigenicity and detection of fish gelatine and isinglass used as processing aids in wines. *Food Additives and Contaminants. Part A*, v.27, n.3, p.273-282, 2010.

4.2 CAPÍTULO II

Analysis of allergenic residues in wines by triple quadrupole LCMS

Apresentado na reunião da Subcomissão de Métodos de Análises da OIV em março de 2018,

Paris – França.

Apresentado durante o 41º Congresso Mundial da Uva e do Vinho em novembro de 2018,

Punta del Este – Uruguai.

Publicado na Revista BIO Web of Conferences em fevereiro de 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191204012>

Analysis of allergenic residues in wines by triple quadrupole LCMS

F.R. Spinelli^{1,2,a}, G.J. Cargnel², A.P. Drehmer^{1,2}, C. Blatt^{3,b}, M. Baptista^{3,c}, and R. Vanderlinde¹

¹ University of Caxias do Sul, Institute of Biotechnology, Rua Francisco Gettlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

² Brazilian Wine Institute (IBRAVIN) – LAREN/SEAPI – Laboratory of Oenologic Reference Evanir da Silva, Av. da Vindima, 1855 Caxias do Sul, RS, Brazil

³ Agilent Technologies Brazil, Alameda Araguaia, 1142, Barueri 06455-940, SP Brazil

Abstract. During the winemaking are used technology coadjuvants, between them: albumin, caseinates and lysozyme. These compounds have great oenological properties, however, the presence of their residues can represent risks to people who are allergic to them because they are derived from eggs and milk. Mass spectrometry methods enables unambiguous determination of allergenic proteins at low levels in wines. Therefore, the aim of this study was to determine the concentrations of ovalbumin, alpha-casein, beta-casein and lysozyme in experimental wines treated with different concentrations of them by triple quadrupole liquid chromatography mass spectrometry with Jet Stream Electrospray Ionization (ESI). The wines were elaborated and treated with different concentrations of albumin, lysozyme and potassium caseinate. Bentonite and decantation were used for the removal of the fining agents. The quantification limits (LOQ) for ovalbumin, a-casein, b-casein and lysozyme were: 0.002 mg/L, 0.24 mg/L, 0.75 mg/L and 0.04 mg/L, respectively. Non residues of the proteins were identified in the experimental wines treated with the different amounts of potassium caseinate, albumin and lysozyme, analyzed in this study. These results provide an evidence of the absence of residues of caseinate, albumin and lysozyme in the concentrations tested in the wines if good treatment practices are followed.

1. Introduction

In EU Regulation 1308/2013 [1] in combination with OIV-COMEX 502-2012 [2] labeling is mandatory when there is presence of egg or milk residues above the limit (0.25 mg/L); in addition, according to the Commission Implementing Regulation (EU) N° 579/2012 [3], terms or a pictogram can be used to highlight the presence of allergens.

The OIV adopted in 2014 a Code of good fining practices for wine to be applied in the use of proteinaceous wine fining agents with allergenic potential (casein and egg white) (Resolution OIV-OENO 520-2014) [4], specifying the steps to carry out the clarification and filtration process, avoiding residues of fining agents, with potential allergenic effect, which may be present. Because the wines have different compositions, they react differently with the same clarifying agent. Therefore, the efficacy of the fining agent will depend on the product used, the preparations, the method of addition, the dosage, pH, metal content, temperature, dissolved CO₂ level and previous treatments in wines.

According to [5], the possible traces of casein, isinglass and eggs (ovalbumin) in clarified wines presents a low

risk for consumers allergic to these proteins and labeling can generate a negative impact both for non- allergic consumers as well as for the allergic ones. According to this author, if a person allergic to albumin ingest a liter of wine, considering limit of detection of this protein, would be consuming less than 0.06 mg of egg white.

Different analytical methods are proposed in the literature to quantify allergenic residues in wines based on immunoassay techniques and mass spectrometry [6–16].

According to [16], immunoassays have the advantage of being quick and simple to perform, however, they are not as accurate as mass spectrometric assays. ELISA tests have some disadvantages due to the presence of interfering compounds in the matrix [8], such as polyphenols in red wines, which interact with proteins and antibodies [6].

To avoid these problems, methods for the direct detection of food allergens by mass spectrometry (MS) were developed [14]. Due to the high sensitivity, precision and reproducibility, mass spectrometry allows the detection of traces of proteins and makes identification independent of the structure of allergens [17].

Thus, this study aims to determine the presence of residues of allergenic oenological coadjuvants in experimental wines treated with different concentrations of casein, albumin and lysozyme, by a triple quadrupole (QQQ) ESI-LCMS.

^a e-mail: frespine@ucs.br, fernanda.laren@ibravin.org.br

^b e-mail: celso.blatt@agilent.com

^c e-mail: mariana.baptista@agilent.com

2. Material and methods

2.1. Reagents, standards, glassworks and materials

All reagents used in this work were purchased from the brand Sigma-Aldrich, as well as the certified analytical standards for alpha-casein, beta-casein and ovalbumin. The analytical standard of lysozyme was purchased from Worthington Biochemical Corporation.

2.2. Experimental wines

The elaboration of experimental wines was carried out at the Laboratory of Oenologic Reference Evanir da Silva (LAREN) of the Secretariat of Agriculture, Livestock and Irrigation of the State of Rio Grande do Sul (SEAPI), linked to the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN) located in Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

2.2.1. Red wine elaboration

The microvinifications were performed in duplicates, in stainless steel tanks with a capacity of 10 liters. The grape samples (115 kg) of Merlot variety, from the city of Antônio Prado – RS – Brazil, were destemmed and crushed, totaling 14 tanks, containing approximately 8 kg of grapes each one. The grapes were microvinified by the traditional process with maceration of the film. After destemming, sulfur dioxide was added to the must at a concentration of 40 mg/L and after 30 minutes *Saccharomyces cerevisiae* (Maurivin brand) yeast was added at a concentration of 300 mg/L. The removal of the peels was determined by the relative density (approximately 1020), and the wine finished the fermentation in 4.5 L glass bottles, closed with Muller's valve. The wine undergoes spontaneous malolactic fermentation. After the end of the alcoholic and malolactic fermentation, the wines were transferred to another glass bottle and corrected to 40 mg/L of free sulfur dioxide for preservation. The tartaric stabilization was carried out at 0 °C for 20 days and then a new transfer for the removal of bitartrate crystals. After, different concentrations of albumin (30, 150 and 200 mg/L) and potassium caseinate (50, 125 and 250 mg/L) of the brand AEB Improvement Through Biotechnology were added in the bottles. A week after, bentonite was added for the removal of the fining agents and the wines decanted during four days, followed by a new transfer to 750 ml bottles (totaling 4 bottles per experiment), remaining stored in ideal conditions for subsequent analysis.

2.2.2. White wine elaboration

Chardonnay grape samples (120 kg) from the city of Antônio Prado were destemmed and crushed. The extraction of the must was carried out in press, not taking part of the peels in the fermentation. Microvinifications were performed in duplicates in 4.5 liter capacity glass bottles, totaling 14 bottles containing approximately 8.5 kg of must. Sulfur dioxide was added to the must at 40 mg/L and after 30 minutes the albumin and lysozyme (brand AEB Improvement Through Biotechnology) were added, at the concentrations of 200, 400 and 600 mg/L and 200, 400 and 500 mg/L, respectively. After an hour and

30 minutes, *Saccharomyces cerevisiae* (Maurivin brand) yeast was added at a concentration of 400 mg/L. The wine finished the fermentation in 4.5 L bottles, closed with Muller valve. After the alcoholic fermentation, the wines were transferred and the free sulfur dioxide was corrected to 40 mg/L. Subsequently, the bentonite was added for the removal of the fining agents and the tartaric stabilization (and decantation) was performed at 0 °C for 20 days. After, the wines were bottled in 750 mL bottles (totaling four bottles for each type of treatment), remaining stored in ideal conditions of temperature and humidity, for subsequent analysis.

2.3. Analysis

The analyses were performed according to the adaptation of the methods of [14] and [16]. The treatment of the wines prior to the analysis was done in the Laboratory of Oenologic Reference (Caxias do Sul – RS – Brazil), following the method of [14] with some adaptations and the analysis were performed in a triple quadrupole ESI-LCMS at Agilent Technologies laboratory, in Barueri – São Paulo – Brazil.

2.3.1. Treatment of samples

Day 1: Proteins were recovered by the Potassium Dodecyl Sulfate (KDS) method [18], starting from 50 mL of wine. 10% SDS was added to the wine at a final concentration of 0.2%. Samples were heated at 100 °C for 10 minutes. After cooling, 10 mL of 2M KCL were added and the samples were gently mixed for 45 minutes at 4 °C. Protein pellets were recovered by centrifugation at 4300 rpm for 60 minutes at 4 °C, the supernatant was discarded and the pellets were maintained in 1 mL of 20% trichloroacetic acid overnight.

Day 2: Samples were centrifuged at 4300 rpm for 60 min, the supernatants were discarded and, to further remove the SDS, the protein pellets were washed with cold acetone three times (5 mL of acetone each time). Samples were centrifuged at 4300 rpm for 30 min, supernatants were discarded and the protein pellets were let dry. Protein pellets were dissolved in 1 mL of NH_4HCO_3 50 mM containing 8M of urea. For reduction step, dithiothreitol (DTT) was added to a final concentration of 10 mM and mixture was incubated at 37 °C for an hour. For alkylation step, iodoacetamide (IAM) was added to a final concentration of 30 mM and the mixture was left an hour at room temperature, in the dark. 1 µg of sequencing grade modified trypsin was added after the dilution of the samples with 50 mM NH_4HCO_3 to reach a final concentration of 0.4 M of urea, and digestion was carried out overnight at 37 °C.

Day 3: The samples were desalted with C18 cartridges (Econo-Pac 10DG Columns, Bio-rad) and the extracted peptides were dissolved in 40 µL of 10% formic acid to stop the digestion reaction before the analysis.

2.3.2. Triple quadrupole ESI-LCMS parameters

The analysis were performed in a 6400 Series Triple Quadrupole LCMS (Agilent Technologies) using a Jet Stream Electrospray Ionization (ESI) and the software Mass Hunter. LC separation was performed in a HPLC 1260 series using a 50 mm × 2.1 mm, C18

Table 1. Precursor ion, product ion, collision energy and polarity for each peptide.

Protein	Precursor ion	Product ion	Collision energy (V)	Polarity
Alpha-casein	692.9	295.1	26	Positive
		267*	38	
Beta-casein	1054.7	1151.7*	45	Positive
		648.7	45	
Albumin	635.7	235	42	Positive
		207*	50	
Lysozyme	715	804.6	30	Positive
		249.1*	30	

* Most abundant.

Poroshell 1120 column, thermostated at 45 °C and a flow rate of 0.400 mL/min. Water/formic acid 0.1% and acetonitrile/formic acid 0.1% were used as eluents A and B, respectively. The chromatographic separation was achieved under the following optimized gradient: solvent B was initially set at 5% for 1 min, delivered by a linear gradient from 5% to 10% in 5 min, and then 3 min of rebalance for the next sample injection. Each sample was loaded 10 µL. Mass spectrometric conditions were set as follows: electrospray voltage 4 kV; gas temperature of 300 °C, gas flow 9 L/min, sheath gas heater and sheath gas flow set to 250 and 11 arbitrary units. The system was operated in positive ion mode. All analysis were performed in triplicates.

3. Results and discussion

Before the analysis of the wines, the conditions of the method were optimized and the precursor ions and their respective products were investigated. Both full scan and multiple reaction monitoring acquisition (MRM) modes were performed. Most abundant ions of each protein were selected as protein markers to investigate the presence of the protein residues.

For lysozyme, the precursor ion found was the same used in the study of [16], as well as for alpha-casein, the same precursor ion as the study of [10]. For the other proteins (beta-casein and albumin), the ions found in this research are distinct from those reported in some studies [14,16]. The precursor ion and the product ion MRM transition monitored for each peptide are reported in Table 1.

The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were calculated on blank and on wine and were expressed as the concentration of the analyte giving a signal that is 3s and 10s above the mean blank signal, respectively, where is the standard deviation of the blank signal obtained from independent blank measurements.

Regarding the limits of detection and quantification, satisfactory values were found when compared with other studies that presented values between 0.4–50 mg/L [10,19], except for the beta-casein that the LOQ was considered higher than expected. As expected, differences were observed in limits calculated on the blank matrix and the wine matrix. To assess recovery, a Merlot wine and a Chardonnay wines, without any protein treatment, were fortified with alpha and beta-casein, albumin and lysozyme

Table 2. Proteins curve correlations, LOD and LOQ.

Protein	R ²	LOD (mg/L)		LOQ (mg/L)	
		Blank	Wine	Blank	Wine
Alpha-casein	0.9901	0.04	0.07	0.12	0.24
Beta-casein	0.9780	0.16	0.22	0.54	0.75
Albumin	0.9976	6.10 ⁻³	7.10 ⁻⁴	0.02	2.10 ⁻³
Lysozyme	0.9999	0.02	0.01	0.07	0.04

Table 3. Recovery of proteins in wines.

Protein	Concentration added (mg/L)	Average Recovery (%)
Alpha-casein	5.00	167
Beta-casein	5.00	114
Albumin	0.65	63
Lysozyme	5.00	158

before sample extractions and measurements were carried out by monitoring the most abundant transition for the peptide (Table 3).

A peak displacement was observed when addition tests were performed on wines, when comparing with the standards retention times. This displacement was attributed to the possible existence of SDS residues in the samples. As cited by [20], SDS dissolves proteins and prevents interactions (e.g., with phenols) that could occur during protein concentration. The addition of potassium ions induces the protein-detergent insolubilization and allows their recovery. KDS method has been proven useful for protein recovery from fermented beverages. Detergent addition, such as urea or SDS might help protein recovery, but chaotropic agents persist in the samples and could affect further analyses. The SDS could co-elute with the analyte of interest, potentially causing ion suppression. Therefore, calibration curves should be performed in the matrix.

Finally, applying the method to the experimental wines elaborated in this work, non-residues of alpha-casein, beta-casein, albumin and lysozyme were identified. The results of this study are in accordance with the results obtained by [13] that analyzed, by ELISA test, experimental wines elaborated with the addition of 200–500 mg/L of caseinate and did not detect the presence of allergenic residues in the experimental wines.

4. Conclusion

Non-residues of the proteins were identified in the experimental wines treated with the different amounts of potassium caseinate, albumin and lysozyme, analyzed in this study. These results provide an evidence of the absence of residues of potassium caseinate, albumin and lysozyme in the concentrations tested in the wines if good treatment practices are followed. As perspectives of this work, tests will be carried out in the preparation of the samples to optimize the recovery of the proteins.

This study was part of an OIV Grant Research, therefore the authors thanks the OIV for supporting and funding this study. Also, the Brazilian Wine Institute, the Secretariat of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul and the Coordination of

Improvement Higher Level Personnel (CAPES) for their financial support. To the University of Caxias do Sul and to the company Agilent Technologies.

References

- [1] Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 establishing a common organization of the markets in agricultural products and repealing Council Regulations (EEC) N.922/72 (EEC) N. 234/79 (EC) N. 1037/2001 and (EC) No 1234/2007
- [2] OIV-COMEX 502-2012 Revision of the limit of detection and limit of quantification related to potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine
- [3] Commission Implementing Regulation (EU) No 579/2012 of 29 June 2012 amending Regulation (EC) No 607/2009 laying down certain detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards protected designations of origin and geographical indications, traditional terms, labelling and presentation of certain wine sector products
- [4] OIV/OENO 520/2014. Code of good fining practices for wine to be applied in the use of proteinaceous wine fining agents with allergenic potential (casein and egg white)
- [5] E. Vassilopoulou, A. Karathanos, G. Siragakis, S. Giavi, A. Sinaniotis, N. Douladiris, M. Fernandez-Rivas, M. Clausen, N.G. Papadopoulos, Clin. Transl. Allergy. **1**, 10 (2011)
- [6] P. Weber, H. Steinhart, A. Paschke, J. Agric. Food Chem. **55**, 3127 (2007)
- [7] J.M. Rolland, E. Apostolou, M.P. De Leon, C.S. Stockley, R.E. O’Hehir, J. Agric. Food Chem. **56**, 349 (2008)
- [8] P. Weber, H. Steinhart, A. Paschke, J. Agric. Food Chem. **57**, 8399 (2009)
- [9] A. D’Amato, A.V. Kravchuk, A. Bachi, P.G. Righetti, J. Proteomics **73**, 2370 (2010)
- [10] L. Monaci, I. Losito, F. Palmisano, A. Visconti, J. Chromatogr. A **1217**, 4300 (2010)
- [11] M. Lacorn, C. Gosswein, U. Immer, Am. J. Enol. Vitic. **62**, 382 (2011)
- [12] B. Simonato, F. Mainente, S. Tolin, G. Pasini, J. Agric. Food Chem. **59**, 3101 (2011)
- [13] P. Restani, F. Uberti, R. Danzi, C. Ballabio, F. Pavanello, C. Tarantino, Food Chem. **134**, 1438 (2012)
- [14] S. Tolin, G. Pasini, B. Simonato, F. Mainente, G. Arrigoni, Food Control **28**, 321 (2012)
- [15] L. Monaci, I. Losito, E. De Angelis, R. Pilolli, A. Visconti, Rapid Commun. Mass Spectrom. **27**, 2009 (2013)
- [16] M. Mattarozzi, M. Milioli, C. Bignardi, L. Elviri, C. Corradini, M. Careri, Food Control **38**, 82 (2014)
- [17] S. Kirschner, B. Belloni, C. Kugler, J. Ring, K. Brockow, J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. **19**, 210 (2009)
- [18] S. Vincenzi, S. Mosconi, G. Zoccatelli, C. Dalla Pellegrina, G. Veneri, R. Chignola, A. Peruffo, A. Curioni, C. Rizzi, Am. J. Enol. Vitic. **56**, 182 (2005)
- [19] L. Monaci, A. Visconti, Trends Analyt. Chem. **28**, 581 (2009)
- [20] F. Mainente, C. Rizzi, G. Zoccatelli, R. Chignola, B. Simonato, G. Pasini, Eur. Food Res. Technol. **242**, 1803 (2016)

4.3 CAPÍTULO III

Absence of allergenic residues of milk and egg white in commercial Brazilian

Chardonnay wines

Artigo que se encontra nas normas na revista Food Additives & Contaminants: Part B.

Absence of allergenic residues of milk and egg white in commercial Brazilian Chardonnay wines

Fernanda Rodrigues SPINELLI^{a,b}, Ana Paula DREHMER^{a,b}, Gilberto João CARGNEL^a,

Regina VANDERLINDE^{a*}

^aUniversity of Caxias do Sul / Biotechnology Institute. Street: Francisco Getúlio Vargas, 1130; Zipcode 95070-560, Petrópolis, Caxias do Sul, RS, Brazil. E-mail: frespine@ucs.br, apdrehmer@ucs.br, gilbertocargnel@gmail.com, rvanderl@ucs.br* (corresponding author).

^bOenological Reference Laboratory Evanir da Silva (LAREN/SEAPDR). Avenida da Vindima, 1855; Zipcode 95084-470, Exposição, Caxias do Sul, RS, Brazil.

Abstract

Fining and stabilization agents often used for clarification and optimization of organoleptic properties of wine are of animal and vegetal origin. Considering the potential allergenic risk of animal proteins for sensitive people, and their more frequent use when compared to vegetable proteins, this study investigated the possible presence of allergenic residues, derived from eggs and milk, in twelve samples of Brazilian commercial Chardonnay wines, from different wineries. To the best of our knowledge, the present work reports for the first time allergenic protein analyses in Brazilian wines. Proteins were precipitated with organic solvents, digested with trypsin and desalted in gravity flow columns. The samples were analyzed by a triple quadrupole mass spectrometer (LCMS/MS), applying a method that has already been reported by our group. Considering the limits of quantification for lysozyme, alpha-casein and beta-casein (0.04 mg L⁻¹, 0.24 mg L⁻¹ and 0.75 mg L⁻¹, respectively), no residues were found in any of the samples.

Keywords: processing aids, alpha-casein, beta-casein, lysozyme, mass spectrometry.

Introduction

During winemaking a wide variety of processing aids such as caseinates and lysozyme are often used (Spinelli et al. 2018). Casein, a heteroprotein containing phosphorus, is found in milk in the state of a calcium salt (OIV 2019b). It is often used to promote interactions with undesirable compounds, responsible for bitterness or browning in wine (Pavón-Pérez et al. 2019). Lysozyme, an edible egg white extract from hens (OIV 2019b), is used as a microbial stabilizing agent, mostly for white wines (Carstens et al. 2014). Due to its antibacterial activity it can be used as a fermentation controller against spoilage and to support lower sulphite dosage (OIV 2019a).

The routine methods used to detect residual allergens in wines are mostly enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based (Lacorn et al. 2011). The difficulties in detecting proteins in a wine with the ELISA method have given rise to search for alternative methods that can overcome the limitations as low recovery, sensitivity and accuracy (Tolin et al. 2012). Systems like liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) have become the most suitable technique for protein analysis (Lamberti et al. 2016). Mass spectrometry (MS) offers a possible solution for the quantification of multiple allergens in a single analysis. The capability of MS to simultaneously quantify more than one peptide from a complex protein digestion is well known (Nitride et al. 2019).

A method based on the recovery and identification of proteins by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), has been recently described by our group (Spinelli et al. 2018) for the detection of residual milk and egg white proteins in wines, by adapting the methods of Mattarozzi et al. (2014) and Tolin et al. (2012). In the previous study, except for the beta-casein, the limits of detection and quantification were satisfactory when compared to the European Union Regulation 1308/2013 that, in combination with OIV-

COMEX 502-2012, established a limit of 0.25 mg L⁻¹, exempting labelling wines with lower values. However, the proposed method had not yet been applied to commercial wines.

Although there are studies on commercial wines from Chile (Pavón-Pérez et al. 2019), Italy (Losito et al. 2013; Restani et al. 2012; Tolin et al. 2012), Australia (Rolland et al. 2008), among other few countries, there is a lack of scientific data about possible allergenic proteins residues in Brazilian commercial wines. Under the current Brazilian legislation if residues are detected (even in trace amounts), the presence must be stated on the wine label (ANVISA 2015). Therefore, the aim of the present study was the application of an LC-MS/MS method to detect potential residual milk and egg white proteins in twelve commercial Brazilian white wines.

Materials and Methods

Twelve aleatory Brazilian Chardonnay white wines of seven wineries (from Serra Gaúcha, the biggest Brazilian winemaking region) were purchased from local specialty wine shops. The analysis were carried out in 2019, at the Oenological Reference Laboratory Evanir da Silva (LAREN/SEAPDR), located in Caxias do Sul, state of Rio Grande do Sul, Brazil.

All the reagents and the analytical standards of alpha-casein and beta-casein were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The analytical standard of lysozyme was acquired from Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA).

The samples were prepared according to the procedure described in Figure 1 bellow (adapting the method described by Tolin et al. 2012) [*Figure 1 near here*]:

The analysis were performed by the application of our previously optimized LC-MS/MS method (Spinelli et al. 2018) in a 6400 Series Triple Quadrupole LCMS system (Agilent Technologies - Santa Clara, CA, USA), using Jet Stream Electrospray Ionization (ESI) and

the Agilent Mass Hunter software, version B.08.00. The liquid chromatography separation was fulfilled in a HPLC 1260 series using a C18 Poroshell 1120 column (50 mm x 2.1 mm), at 45°C, with binary solvent gradient. A solution of 0.1% water/formic acid was used as solvent A and a solution of 0.1% acetonitrile/formic acid was used as solvent B. The gradient used for the chromatographic separation was: solvent B initially set at 5% for 1 minute then by a linear gradient to 10% over 5 minutes, followed by plus 3 minutes of rebalance before the injection of the next sample. Each sample was loaded at 10 µL and eluted at a constant flow rate of 0.4 mL/min. The system was operated in positive ion mode. The mass spectrometric conditions were: electrospray voltage 4 KV, gas temperature of 300°C, drying gas flow 9 L/min, sheath gas heater to 250°C and sheath gas flow at 11 L/min, dwell of 30 and nebulizer 45 psi. The precursor ions and the product ions transitions (MRM mode) for each peptide are reported in Table 1 *[Table 1 near here]*. All analyses were made in triplicates.

As published in the previous study (Spinelli et al. 2018), the LOD for lysozyme, alpha-casein and beta-casein and were 0.01 mg L⁻¹, 0.07 mg L⁻¹ and 0.22 mg L⁻¹, and the LOQ were 0.04 mg L⁻¹, 0.24 mg L⁻¹ and 0.75 mg L⁻¹, respectively.

Results and Discussion

Our investigation showed no detectable allergenic residues of lysozyme, alpha-casein and beta-casein in the twelve wines analyzed. Chromatograms of the 10 mg L⁻¹ standards of lysozyme, alpha-casein and beta-casein, in both transitions for each peptide, are shown in Figures 2, 3 and 4. An overlap of sample 1 and a 10 mg L⁻¹ standard of the proteins is shown as example, in Fig. 5 *[Figures 2, 3, 4 and 5 near here]*. The results were all below the limits of quantification for lysozyme, alpha-casein and beta-casein (0.04 mg L⁻¹, 0.24 mg L⁻¹ and 0.75 mg L⁻¹, respectively).

These results are similar with those obtained by Mattarozzi et al. (2014) who analysed twenty commercial red wines by LCMS/MS and found no traces of the fining agents in the samples. Restani et al. (2012) also analyzed commercial wines using ELISA kits and did not find milk residues in those wines (all treated with caseinates); however, they had an LOD of 0.28 mg L⁻¹ and LOQ of 0.76 mg L⁻¹. The current analytical method holds the advantage over the immunological tests as it does not require the use of specific antibodies to show the presence of a targeted fining agent.

We assumed that the commercial white wines analyzed in this study would have been subjected to fining and good practices treatments, if caseinates or lysozyme were applied for their filtration and/or stabilization. On the other side, our results were different from those described by Tolin et al. (2012), who found remaining residual allergenic proteins used during the winemaking in commercial Italian wines. However, in their study, they did qualitative analysis without residues quantification, and the LOD and LOQ were not calculated. Besides that, we need to take into account that the quantity of fining agents or processing aids used, as well as the steps used to remove those products, can interfere with the presence of residues.

In 2014 the OIV adopted a Code of good wine fining practices to be applied when using proteinaceous wine fining agents with allergenic potential (Resolution OIV-OENO 520-2014). The code recommends steps to perform the clarification and filtration process in order to avoid the residual presence of clarifying agents with potential allergenic effects. As already published by other authors (Deckwart et al. 2014), the use of certain technological procedures during wine processing also leads to different results in relation to processing aids residues. In our previous study (Spinelli et al. 2018), the addition of different concentrations of albumin, casein and lysozyme, followed by bentonite treatment and racking (as recommended by the Resolution OIV-OENO 520-2014) also showed no detectable protein residues in experimental

genuine wines, in the tested doses (50, 125 and 250 mg L⁻¹ of potassium caseinate and 200, 400 and 500 mg L⁻¹ of lysozyme).

The next crucial step will be to optimize the analytical method, focusing in reduce the sample preparation time, protein recovery and to simplify it for performing routine analyses. Taking into account that protecting allergic consumers from accidental exposure to hidden allergens is of importance, the application of these analyses to a larger number of Brazilian samples is also important.

Conclusion

No detectable allergenic residues of lysozyme, alpha-casein and beta-casein were found in any of the twelve commercial samples analysed by LC-MS/MS. These results are particularly important in view of consumer safety and, particularly, the current assessment by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA 2015) considering wine labelling requirements. Although we could not detect any residual amounts in the samples analysed, and considering the effective winemaking practices to remove these compounds, it remains crucial to screen commercial red and white Brazilian wines to manage the risk in future.

Acknowledgements

The authors wish to thank the OIV, the Brazilian Wine Institute, Secretariat of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul and CAPES Foundation and the University of Caxias do Sul.

Funding: This work was supported by the International Organisation of Vine and Wine (OIV) Research Grant; the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation) under Grant\Award Number: 88887.149168/2017-00; the University of

Caxias do Sul (UCS); the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN); the Secretariat of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul (SEAPDR) and the company Agilent Technologies.

References

- [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2015. RDC nº 26, de 02 de julho de 2015. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. [accessed 2020 Feb 27]. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2694583/RDC_26_2015_.pdf/b0a1e89b-e23d-452f-b029-a7bea26a698c
- Carstens C, Deckwart M, Webber-Witt M, Schäfer V, Eichhorn L, Brockow K, Fischer M, Christmann M, Paschke-Kratzin A. 2014. Evaluation of the efficiency of enological procedures on lysozyme depletion in wine by an indirect ELISA method. *J. Agric. Food Chem.* 62(26): 6247–6253.
- Deckwart M, Carstens C, Webber-Witt M, Schäfer V, Eichhorn L, Schröter F, Fischer M, Brockow K, Christmann M, Paschke-Kratzin A. 2014. Impact of wine manufacturing practice on the occurrence of fining agents with allergenic potential. *Food Addit Contam Part A.* 31(11): 1805-1817.
- [EU] European Union. 2013. Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 establishing a common organisation of the markets in agricultural products and repealing Council Regulations (EEC) N.922/72, (EEC) N. 234/79, (EC) N. 1037/2001 and (EC) No 1234/2007.
- Lacorn M, Gößwein C, Immer U. 2011. Determination of residual egg white proteins in red wines during and after fining. *Am J Enol Viticult.* 62 (3), 382-385.

- Lamberti C, Acquadro E, Corpillo D, Giribaldi M, Decastelli L, Garino C, Arlorio M, Ricciardi C, Cavallarin L, Giuffrida MG. 2016. Validation of a mass spectrometry-based method for milk traces detection in baked food. *Food Chem.* 199, 119–127.
- Losito I, Inrona B, Monaci L, Minella S, Palmisano F. 2013. Development of a method for the quantification of caseinate traces in Italian commercial white wines based on liquid chromatography–electrospray ionization–ion trap–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12436–12444.
- Mattarozzi M, Milioli M, Bignardi C, Elviri L, Corradini C, Careri M. 2014. Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin fortified red wine. *Food Control.* 38, 82-87.
- Nitride C, Nørgaard J, Omar J, Emons H, Estes MM, O'Connor G. 2019. An assessment of the impact of extraction and digestion protocols on multiplexed targeted protein quantification by mass spectrometry for egg and milk allergens. *Anal Bioanal Chem.* 411, 3463–3475.
- [OIV] International Organisation of Vine and Wine. 2012. OIV-COMEX 502-2012. Revision of the limit of detection and limit of quantification related to potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine. [accessed 2020 March 10]. <http://oiv.int/public/medias/2154/oiv-comex-502-2012-en.pdf>.
- [OIV] International Organisation of Vine and Wine. 2014. Resolution OIV-OENO 520-2014. Code of good fining practices for wine to be applied in the use of proteinaceous wine fining agents with allergenic potential (casein and egg white). [accessed 2020 March 20]. <http://oiv.int/public/medias/1645/oiv-oeno-secsan-520-2014-en.pdf>.
- [OIV] International Organisation of Vine and Wine. 2019a. International Code of Oenological Practices. [accessed 2020 March 13]. <http://oiv.int/public/medias/6558/code-2019-en.pdf>.

[OIV] International Organisation of Vine and Wine. 2019b. International Oenological Codex. [accessed 2020 Jan 23].

Pavón-Pérez J, Henriquez-Aedo K, Aranda M. 2019. Mass Spectrometry Determination of Fining-Related Allergen Proteins in Chilean Wines. *Food Anal Methods*. 12, 827–837.

Restani P, Uberi F, Danzi R, Ballabio C, Pavanello F, Tarantino C. 2012. Absence of allergenic residues in experimental and commercial wines fined with caseinates. *Food Chem*. 134, 1438-1445.

Rolland JM, Apostolou E, de Leon MP, Stockley CS, O’Hehir RE. 2008. Specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for analysis of residual allergenic food proteins in commercial bottled wine fined with egg white, Milk, and nongrape-derived tannins. *J. Agric. Food Chem*. 56, 349–354.

Spinelli FR, Cargnel GJ, Drehmer AP, Blatt C, Baptistão M, Vanderlinde R. 2018. Analysis of allergenic residues in wines by triple quadrupole LCMS. *BIO Web of Conferences*. 12, 1-4.

Tolin S, Pasini G, Simonato B, Mainente F, Arrigoni G. 2012. Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. *Food Control*. 28, 321-326.

Day 1

- Starting with 50 mL of wine;
- 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added and homogenized;
- Heated for 10 minutes at 100°C;
- After cooling, 10 mL of potassium chloride 2M was added and the samples were slowly agitated for 45 minutes at 4°C;
- Recovery of the protein pellets by centrifugation at 4300 rpm for 1 hour at 4°C;
- The supernatant was discarded and the pellets were retained overnight in 1 mL of 20% trichloroacetic acid.

Day 2

- Samples were centrifuged at 4300 rpm for 1 hour;
- Supernatant was discarded and the protein pellets were rinsed with 5 mL of cold acetone three times;
- Samples were then centrifuged at 4300 rpm for half an hour,
- The supernatant was discarded and the protein pellets were left to dry for 2h;
- The dried protein pellets were dissolved in 1 mL of ammonium bicarbonate 50mM dissolved with 8M of urea;
- For reduction, dithiothreitol was added to a final concentration of 10 mM and the mixture was incubated for an hour at a controlled temperature of 37°C;
- For the alkylation, iodoacetamide was added to a final concentration of 30 mM and sample was protected from light for one hour, at room temperature;
- One microgram of sequencing grade modified trypsin was added after the dilution of the sample with 50mM ammonium bicarbonate;
- The sample digestion was performed overnight at 37°C.

Day 3

- The samples were filtered with desalting Prepacked Gravity Flow Columns (Econo-Pac 10DG, Bio-Rad, Hercules, CA, USA);
- The extracts were dissolved in 40 µL of 10% formic acid to stop the digestion reaction before the LC-MS/MS analysis.

Fig. 1. Sample preparation procedure applied in the current study.

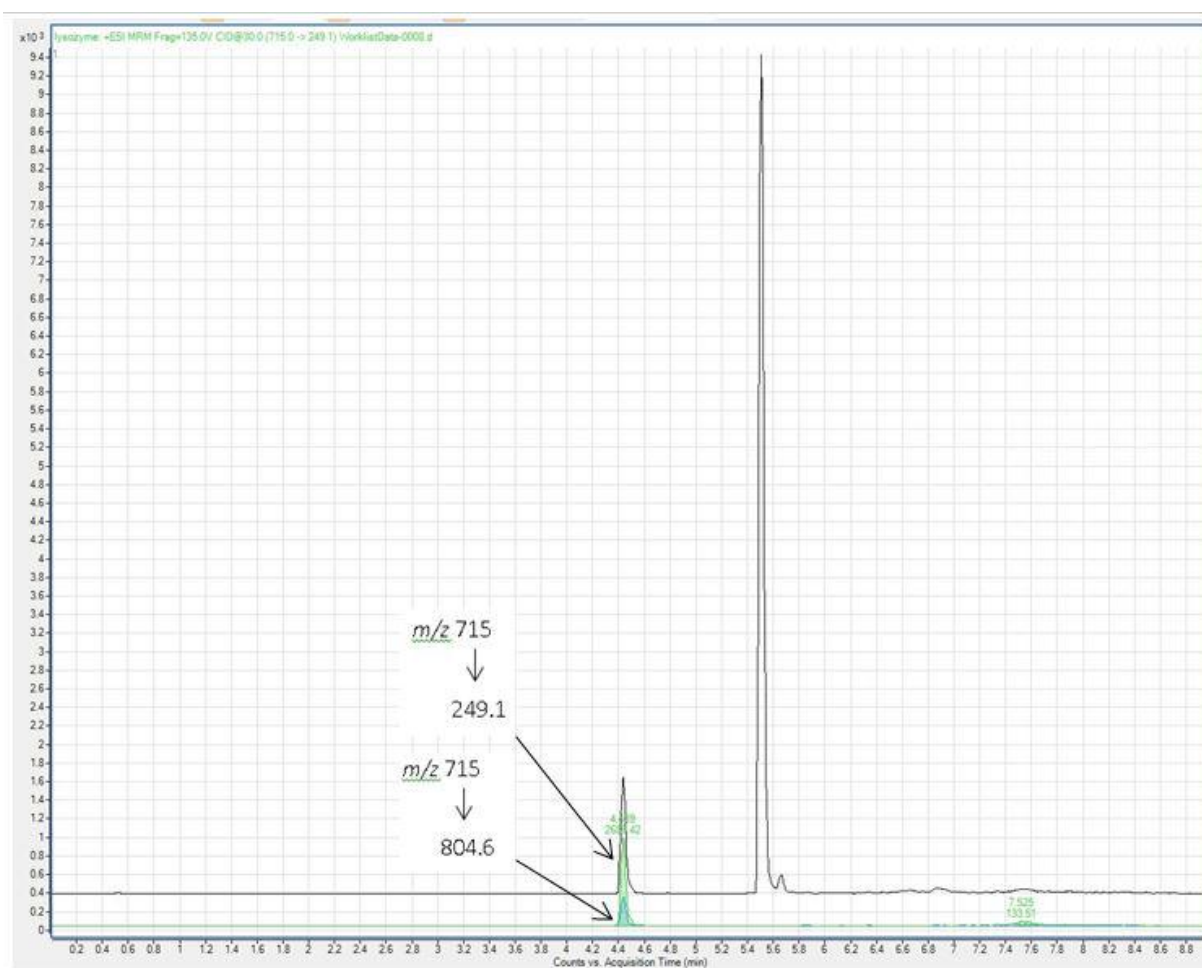


Fig. 2 Chromatogram obtained of the standard solution of 10 mg L^{-1} of lysozyme, at the transitions of 715- $\rightarrow$ 249.1* and 715- $\rightarrow$ 804.6.

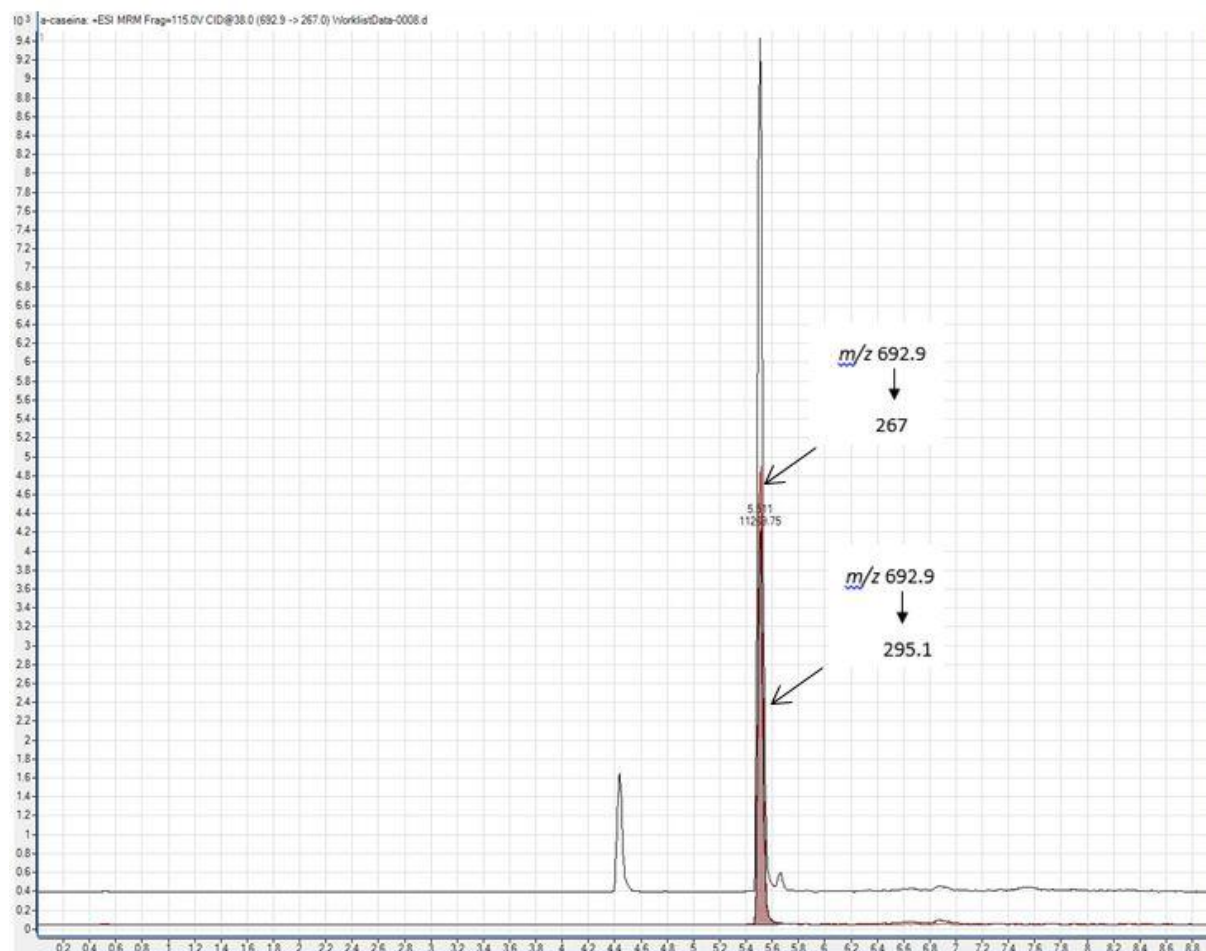


Fig. 3. Chromatogram of the 10 mg L⁻¹ standard of alpha-casein, in the transitions of 692.9 $\rightarrow$ 267* and 692.9 $\rightarrow$ 295.1.

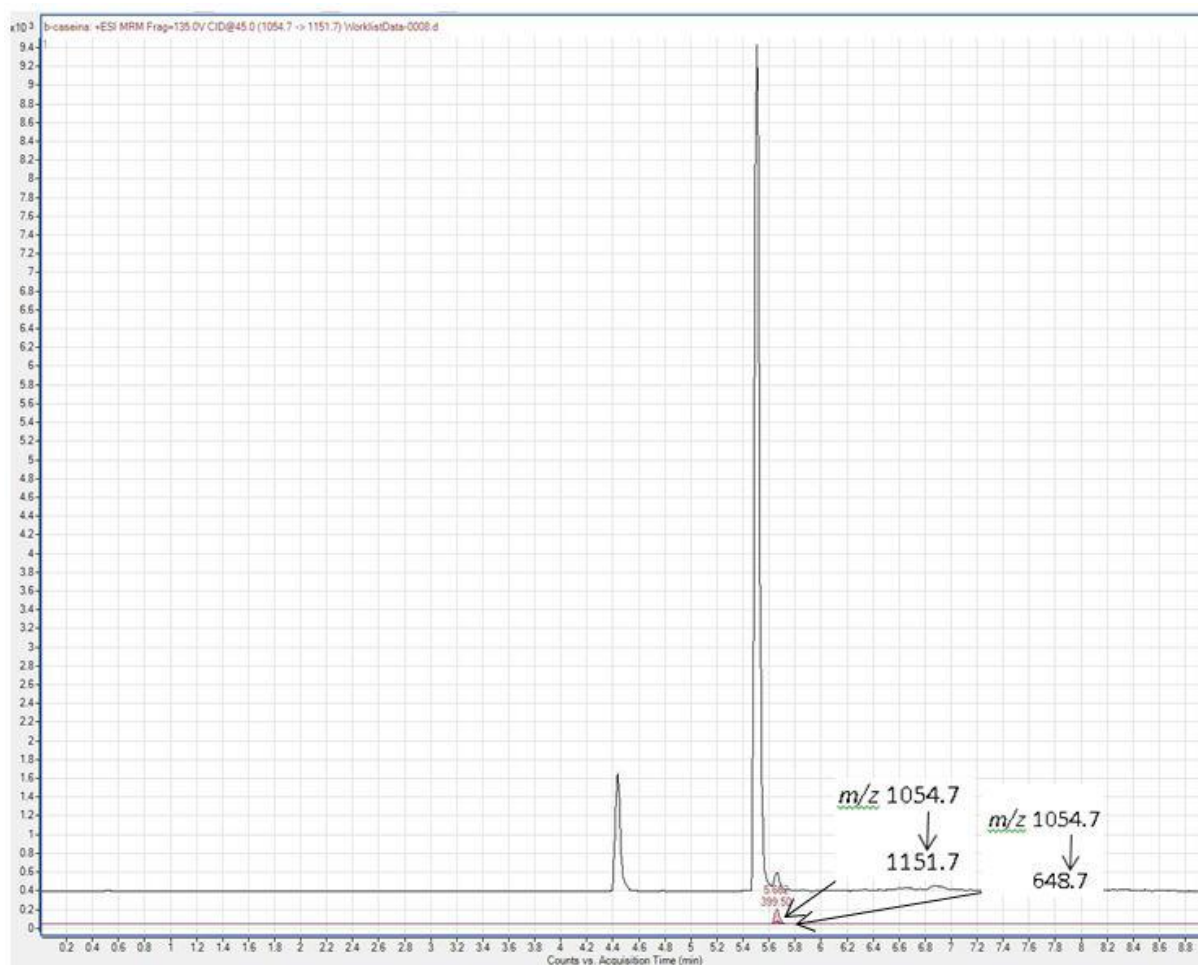


Fig. 4. Chromatogram of the 10 mg L⁻¹ standard of beta-casein, in the transitions of 1054.7->1151.7* and 1054.7-> 648.7.

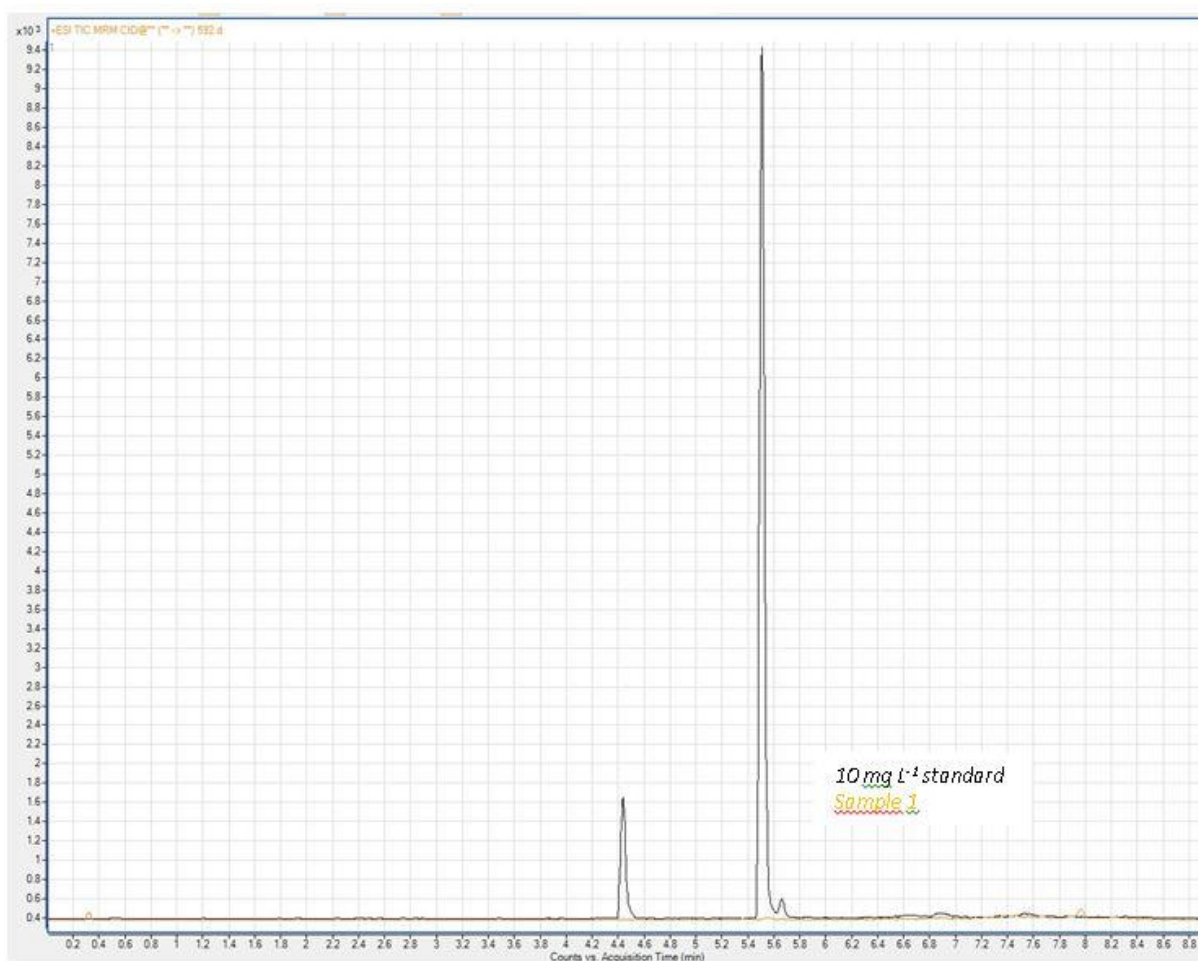


Fig. 5. Total Ion Chromatogram (TIC) of a wine sample 1 and the 10 mg L⁻¹ standard of lysozyme, alpha-casein and beta-casein.

Table 1 – Protein precursor ion, product ions and collision energy used for the analysis of lysozyme, alpha-casein and beta-casein peptides in the current study.

Protein	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)
Lysozyme	715	249.1*	30
		804.6	
Alpha-casein	692.9	267*	38
		295.1	
Beta-casein	1054.7	1151.7*	45
		648.7	

* Quantification ion.

4.4 CAPÍTULO IV

**Development of a sample preparation approach for the analysis of fining agents in wines
by liquid chromatography with tandem mass spectrometry**

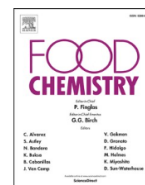
Publicado na Revista Food Chemistry em fevereiro de 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129198>



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Development of a sample preparation approach for the analysis of fining agents in wines by liquid chromatography with tandem mass spectrometry

Fernanda Rodrigues Spinelli^{a,b}, Ana Paula Drehmer^{a,b}, Leonardo Valentin^c,
Simone Nascimento^c, Mariana Baptista^c, Regina Vanderlinde^{a,*}

^a University of Caxias do Sul (UCS)/Biotechnology Institute, St Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^b Laboratory of Oenologic Reference (LAREN/SEAPDR), Avenida da Vindima, 1855, 95084-470 Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Agilent Technologies Brazil, St Alameda Araguaia, 1142 064555-940 Barueri, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Protein digestion
Allergenic residues
Mass spectrometry
Wines

ABSTRACT

During winemaking a wide variety of processing aids such as albumin, caseinates and lysozyme are often used. These proteins are considered allergenic and could become a human health risk in susceptible individuals. In our knowledge, there are no methods published for the analysis of these three proteins simultaneously by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, with electrospray ionization. Therefore, in this work, a sample preparation approach for the analysis of α -casein, β -casein, albumin and lysozyme, in a single run, was performed and compared with published data. Through a pH adjustment, combining the use of cellulose ester membranes, a precipitation with organic solvents and a final concentration/clean-up, we achieved recovery values from 90.7 to 108.6%. The method was validated, showing determination coefficients $R^2 \geq 0.99$. This method was able to quantify proteins even at lower levels (limits of quantification from 0.01 to 0.25 mg/L) than the current legal limits.

1. Introduction

A large variety of products has been used on the elaboration of wines as fining agents. Among them, egg whites (mainly ovalbumin and lysozyme) and milk caseinates (mainly α -casein and β -casein) are frequently used. The wines clarification or fining is performed in order to remove undesired substances, mainly phenols and tannins, to avoid the turbidity, the bitterness and the astringency of the wines (Restani et al., 2014).

The use of animal derived proteins may trigger allergic reactions in sensitive individuals; therefore, their occurrence in wines could become a human health risk. Mainly when their presence (even in trace amounts) is not reported on the label (Pavón-Pérez, Henriquez-Aedo, & Aranda, 2019). It is known there are studies that confirm reports of individuals who suffer from allergic reactions after wine consumption, such as Wigand, Blettner, Saloga, and Decker (2012), Vassilopoulou et al. (2011), Armentia (2008).

According to the Commission Delegated Regulation (EU) 2019/33 of 17 October 2018 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council (European Union, 2019), wines

with allergenic protein residual concentration higher than the analytical limit defined by the International Organization of Vine and Wine (OIV), in its Resolution OIV-COMEX 502-2012 (OIV, 2012), must declare its presence on the label. The OIV criteria for the enzyme-linked immunosorbent assay is the detection and quantification limits of 0.25 mg/L and 0.50 mg/L, respectively.

In recent years, different sample treatment protocols have been developed for the analysis of potential processing aids residues, based on egg and milk proteins. Due to its high sensitivity, precision and reproducibility, the liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) allows the detection of traces of proteins and makes the identification independent of the structure of the allergens (Kirschner, Belloni, Kugler, Ring, & Brockow, 2009). The advantages offered by mass spectrometry technology, when compared to other kinds of analysis (as immunoenzymatic methods), are the effective protein extraction protocol and multi-target analysis. Furthermore, it is known that the harmonization and validation of methods based on mass spectrometry for multiple allergen detection is a current priority of international standardization bodies like the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (Pali-Schöll et al., 2019) and the OIV.

* Corresponding author.

E-mail addresses: frespine@ucs.br (F. Rodrigues Spinelli), rvanderl@ucs.br (R. Vanderlinde).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129198>

Received 21 July 2020; Received in revised form 20 January 2021; Accepted 21 January 2021

Available online 6 February 2021

0308-8146/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In particular, previous studies focused mainly to the simultaneous detection and quantification of ovalbumin and casein residues (Matarozzi et al., 2014; Monaci, Losito, Palmisano, & Visconti, 2010; Pavón-Pérez et al., 2019; Pavón-Pérez, Henríquez-Aedo, Herrero, & Aranda, 2020; Pilolli, Chaudhari, Palmisano, & Monaci, 2017). The majority of these studies were applied to white wines. In addition, the analysis of proteins in red wines is more complex due to the presence of large amounts of interfering compounds, such as polyphenols, tannins, anthocyanins, polysaccharides and other molecules that make these analyzes challenging (Matarozzi et al., 2014; Moreno-Arribas, Pueyo, & Polo, 2002).

A method based on the identification and quantification of allergenic proteins in white and red wines has been recently described (Spinelli et al., 2018) following on the methods proposed by Matarozzi et al. (2014) and Tolín, Pasini, Simonat, Mainente, and Arrigoni (2012). However, the referenced method needs adjustments and optimizations in terms of the protocol of sample preparation and validation aspects. In the validation results, recovery values were not acceptable for validation aspects, being outside the range of 80 – 110%, following the AOAC (2016) recommendation for the evaluated concentrations.

The efficiency of proper isolation, purification and characterization of proteins using mass spectrometry is directly related to the optimization of the analytical parameters (Faisal, Vasiljevic, & Donkor, 2019). Therefore, to provide a reliable quantification of the proteins, the optimization of the extraction and digestion is fundamental (Nitride et al., 2019). In this study, a sample preparation approach was developed and applied to red and white wines, to quantify α -casein, β -casein, albumin and lysozyme residues by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, with electrospray ionization (LC-ESI-MS/MS). The method was validated and the data regarding the detection of allergen residues in wines were evaluated and compared with published data, in terms of protein recovery, limits of detection and limits of quantification.

2. Materials and methods

2.1. Wine samples

A Merlot and a Chardonnay experimental genuine wines, from a database elaborated at the Laboratory of Oenologic Reference Evanir da Silva (LAREN) of the Secretariat of Agriculture, Livestock and Rural Development of the State of Rio Grande do Sul (SEAPDR), were used for the conduction of the tests. The analytical characteristics of the wines are shown in Table 1. The elaboration of the wines was carried out by microvinification in 10 L tanks, without the use of casein, albumin or lysozyme.

2.2. Reagents and standards

The following reagents: dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAM), trypsin from bovine pancreas, formic acid, urea, sodium hydroxide (NaOH), and ammonium carbonate ((NH₄)₂CO₃), as well as the analytical standards of α -casein, β -casein and albumin, were acquired from Sigma Aldrich brand (St. Louis, MO, USA). The lysozyme analytical standard was purchased from Worthington Biochemical Corporation

Table 1

Analytical characteristics of the Chardonnay and Merlot wines elaborated by microvinifications for the study.

Sample	Vintage	TAS	SG	TA	VA	TDE
Chardonnay wine	2020	12.0	0.9921	81	6	22.1
Merlot wine	2020	13.5	0.9946	92	8	28.0

TAS = Total Alcoholic Strength (% v/v); SG = Specific Gravity; TA = Total Acidity (mEq/L);

VA = Volatile Acidity (mEq/L) and TDE = Total Dry Extract (g/L).

(Lakewood, NJ, USA). The reagent acetonitrile (LC grade) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.3. Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis

All protein analyzes were performed in a triple quadrupole LCMS system 6470 series (Agilent Technologies®, - Santa Clara, CA, USA), with electrospray ionization (ESI) in positive mode, Jet Stream (AJS), and the MassHunter Workstation software. The method parameters and the equipment conditions are shown in Table 2. The separation in the LC was performed in a HPLC 1260 series, equipped with a binary pump with a degasser unit (G7112B) and an autosampler (G7129A).

The software Skyline version 20.1 (MacCoss Lab Software) was used to predict MRM fragments formed from protein digestion, using trypsin as protease. The advantage of the application of multiple reaction monitoring (MRM) was to have a highly selective evaluation and quantification. From the data generated by the Skyline, with the candidates for fragments (peptides), a method was automatically generated and used in Masshunter acquisition version B.08.00. From the data generated, they were again uploaded to the Skyline for verification in terms of the peptide's presence and absence. Then, after confirmation, the method with the defined fragments was optimized in terms of voltage and collision energy. For this, the MassHunter Optimizer, version B.08.00 was used. Then, the most abundant precursor ions and their respective product ions were established (Table 3).

2.4. Sample preparation approach

A preparation approach developed by our own, based on analytical tests and the data already published, was applied to the samples of experimental Chardonnay and Merlot wines with the addition of proteins concentrations.

Each sample was neutralized with NaOH at pH 8. Then, 1 mL of the sample was filtered on 0.2 μ m cellulose membrane and dissolved in 1 mL of 0.4 M (NH₄)₂CO₃/8 M urea. An aliquot of 5 μ L of 100 mM DTT was added to 20 μ L of the filtered sample. The sample was incubated at 37 °C for 3 h. After cooling to room temperature (20 °C), 5 μ L of IAM at 400 mM was added to the sample. The sample was incubated for 15 min at room temperature, protected from light. Then, 130 μ L of ultrapure water was added to the sample and, after, the trypsin in the proportion of 1/50 (w/w) of enzyme/substrate was added for the tryptic digestion reaction. Afterwards, the sample was incubated at 37 °C for 16 h. Then, the reaction was stopped by the addition of 20 μ L of 10% formic acid. For the concentration/cleaning step two different cartridges were tested, the Bond Elut C18 and the SPEC C18AR/MP3, both from the brand Agilent Technologies®. The cartridge Bond Elut C18 showed better recovery rate, therefore it was chosen for the application of the method.

2.5. Method validation

The validation of the analytical method was performed according to Eurachem guidelines (Eurachem, 2014), on noncommercial Chardonnay and Merlot wines. The following parameters were evaluated: selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy, precision and robustness.

For the analysis of the matrix effect, the method selectivity was verified using the Fisher-Snedecor F test, through a comparison of the results obtained by the analysis of standard solutions with genuine wine samples spiked with the standard solutions. The Fisher-Snedecor F test was applied to check if the variance of the curves had significant differences. From the results of the detection and quantification limits (using signal-to-noise ratios (S/N) of 3 and 10, respectively) it was possible to establish the working ranges. The quantification limit was considered the lowest (first) point of the linear range. To assess recovery, the wines were fortified with ovalbumin, α -casein, β -casein and

Table 2

Method parameters and conditions used for the analysis of proteins in Chardonnay and Merlot wines.

	Parameter	Analytical condition
LC	Analytical column	Poroshell 120 EC-C18 (50 mm × 2.1 mm; 1.8 µm), connected to a guard column of the same chemistry,
	Analytical column temperature	45 °C
	Mobile phase	A: ultrapure water with 0.1% formic acid B: acetonitrile with 0.1% formic acid
	Mobile phase flow	0.400 mL/min
	Binary elution gradient	95% (A) and 5% (B) from 0 to 1 min 10% (A) and 90% (B) from 1 to 6 min 10% (A) and 90% (B) from 6 to 9 min 95% (A) and 5% (B) from 9 to 9.1 min 95% (A) and 5% (B) from 9.1 to 15 min
	Sample injection volume	5 µL
	Analysis total time	15 min
	Gas Temperature (°C)	300
	Gas Flow (L.min ⁻¹)	9
	Nebulizer (psi)	45
Ion source	Sheath Gas Heater (L.min ⁻¹)	250
	Sheath Gas Flow (L.min ⁻¹)	11
	Capillary (V)	4000
	Delta EMV	500 V
	Q1 and Q3 resolution (amu)	1.2/1.2 (wide/wide)
MRM	Cell Accelerator voltage	4 V
	Dwell time	25 msec
	Total MRMs	12
	Max concurrent MRMs	12

LC = Liquid Chromatography. MRM = Multiple reaction Monitoring. EMV = electron multiplier voltage.

Table 3Precursor ion, product ion, dwell time and collision cell energy used for the analysis of albumin, α -casein, β -casein and lysozyme in wines in the current study.

Protein	Precursor ion	Product ion	Dwell time	Collision cell energy (v)
Albumin	845	1331.7*	25	30
	930	1116.6	25	30
α -casein	692.9	295.1*	25	30
	692.9	267	25	30
β -casein	1054.7	1151.7*	25	30
	1054.7	648.7	25	30
Lysozyme	714.8	249.1*	25	30
	714.8	1065.5	25	30

* quantification transition.

lysozyme at three different concentration levels (1, 0.5 and 10 mg/L), before the initiation of the sample preparation approach. The spikes and extractions were made in triplicates and measurements were carried out by monitoring the most abundant MS/MS transition for the peptide providing the best sensitivity for each protein. The second peptide was used for confirmatory objects. The precision of the method was expressed quantitatively through repeatability. The samples were analyzed seven times for the calculation of the detection and quantification limits, as well as for the recovery and repeatability tests.

2.6. Statistical analysis

Curve calibrations with and without matrix were compared using F test. Peptide calibrations were established applying linear regression analysis and checked by Mandel fitting test. For the final method recovery parameters, data were evaluated using descriptive statistics [mean and standard deviation (SD)]. The robustness tests were performed with a significance level (α) of 0.05 using the software SPSS 21.0. for windows.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

Considering the complexity of the matrix, satisfactory results were

observed in terms of sensitivity (Table 4). The method proved to be selective for both white and red wine. The $F_{\text{calculated}}$ was 2.01, 2.14, 1.92 and 1.48 for α -casein, β -casein, albumin and lysozyme, respectively, lower than the $F_{\text{tabulated}}$ which is 3.79. That is, the treatments carried out on the samples are effective since the matrix has no important effect on the accuracy of the method in the concentration range under study.

Considering the results of the selectivity, it was verified that the linearity could be accomplished in both white and red wine. The results were satisfactory, as can be seen, all R^2 were above 0.99. The variance homogeneity assessment ($p > 0.05$) by the application of the Mandel fitting test was checked for each peptide. The detection and quantification limits were considered satisfactory, given the minimum limit required for labeling established by the European Union (2019). The limit of detection was 0.1 mg/L for α -casein and β -casein, 0.05 mg/L for albumin and 0.005 mg/L lysozyme. The limit of quantification was 0.25 mg/L for α -casein and β -casein, 0.1 mg/L for albumin and 0.01 mg/L for lysozyme. For albumin and lysozyme, the limit of quantification reached was 5 and 25 times lower than the quantification limit of the official immunoenzymatic methods recommended by the OIV (2019), a result considered very positive. In terms of precision, the analysis of seven readings of the standards along the linear range of the analytical curve were performed and considered satisfactory, since it meets the AOAC (2016) criteria (maximum variation coefficient of 10%, for the concentration analyzed). As for the accuracy, it was evaluated numerically by means of the tendency/recovery (Table 5), through the reading of

Table 4Validation data results (Linearity, Range, LOD, LOQ and Precision) of the method developed in the current study for the analysis of albumin, α -casein, β -casein and lysozyme in wines.

Parameter	Results			
	α -casein	β -casein	Albumin	Lysozyme
Linearity (R^2)	0.9968	0.9901	0.9918	0.9980
Linear Range (mg/L)	0.25–10	0.25–10	0.1–10	0.01–10
LOD (mg/L)	0.1	0.1	0.05	0.005
LOQ (mg/L)	0.25	0.25	0.1	0.01
Precision (%)	2.7	2.7	9.8	3.2

LOD = Limit of Detection; LOQ = Limit of quantification.

Table 5Means of the analytical recovery values at four concentrations of the proteins (albumin, α -casein, β -casein and lysozyme) analyzed in the current study.

Concentration (mg/L)	α -casein			β -casein			Albumin			Lysozyme		
	Mean (%)		SD	Mean (%)		SD	Mean (%)		SD	Mean (%)		SD
0.5 (α,β -casein) / 0.1 (albumin and lysozyme)	107.4	$\pm$	5.7	107.2	$\pm$	4.9	93.0	$\pm$	5.3	94.2	$\pm$	3.4
1	97.5	$\pm$	4.5	94.7	$\pm$	4.1	96.6	$\pm$	4.1	89.4	$\pm$	3.8
5	100.1	$\pm$	2.8	100.2	$\pm$	3.8	96.9	$\pm$	9.6	101.4	$\pm$	3.8
10	99.99	$\pm$	2.7	99.9	$\pm$	2.7	100.2	$\pm$	9.9	99.8	$\pm$	3.2
Average recovery	101.2	$\pm$	3.9	100.5	$\pm$	3.9	96.7	$\pm$	7.2	96.2	$\pm$	3.6

SD = Standard deviation.

seven replicates of each concentration of the analytical curve, for both Chardonnay and merlot wines. The general average and standard deviations were calculated, and all the results met the parameters established according to the AOAC (2016).

In the assessment of robustness, the energy of the collision cell was optimized, through analysis of analytical standards in the linear range of the method, in the energies of 10 V, 20 V, 30 V, 40 V and 60 V. Initially all results relative to the 5 energies were evaluated by One way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc test. Homogeneity of variances was checked by Kolmogorov Smirnov test and non-parametric Kruskal Wallis ANOVA was applied when necessary. A *p* value of 0.05 was adopted to reject the null hypothesis. A statistically significant difference was observed between the collision energies, confirming that the area varies according to the collision cell energy. Based on these results, the collision cell energy of 30 V was defined and fixed, which presented larger area results (except for beta-casein), as shown in Fig. 1 (as an example).

In general terms, this optimized method showed very satisfactory results in terms of validation when compared with other methods for the analysis of allergen proteins in wines by LCMS/MS. The average linear range is lower than reported by other studies, as Mattarozzi et al. (2014)

(50 to 200 mg/L). Recovery results (89.4 to 107.4%) are similar to those reported by Pavón-Pérez et al. (2019) (86.40 to 106.98%) and Mattarozzi et al. (2014) (82 to 105%). No sample recovery tests were reported for comparison in some other reference studies (for example, Tolin et al., 2012; Monaci et al., 2010).

3.2. Comparison, advantages and disadvantages of the different procedures

Different sample preparation procedures for protein digestion were investigated already by our group and other authors. The procedures normally involve the use of cut-off filters, denaturing agents, protein precipitation and/or purification cartridges by size exclusion, among others. In our study the treatment of the wines with active charcoal before starting the sample preparation was also tested, in order to remove possible analytical interferences. However, this step did not interfere in terms of analytical recovery, therefore in the final method the charcoal treatment was not applied. Trypsin from bovine pancreas is frequently used for tryptic digestion. It is the most used enzyme because it exclusively cleaves basic residues to arginine and lysine (Loziuk et al.,

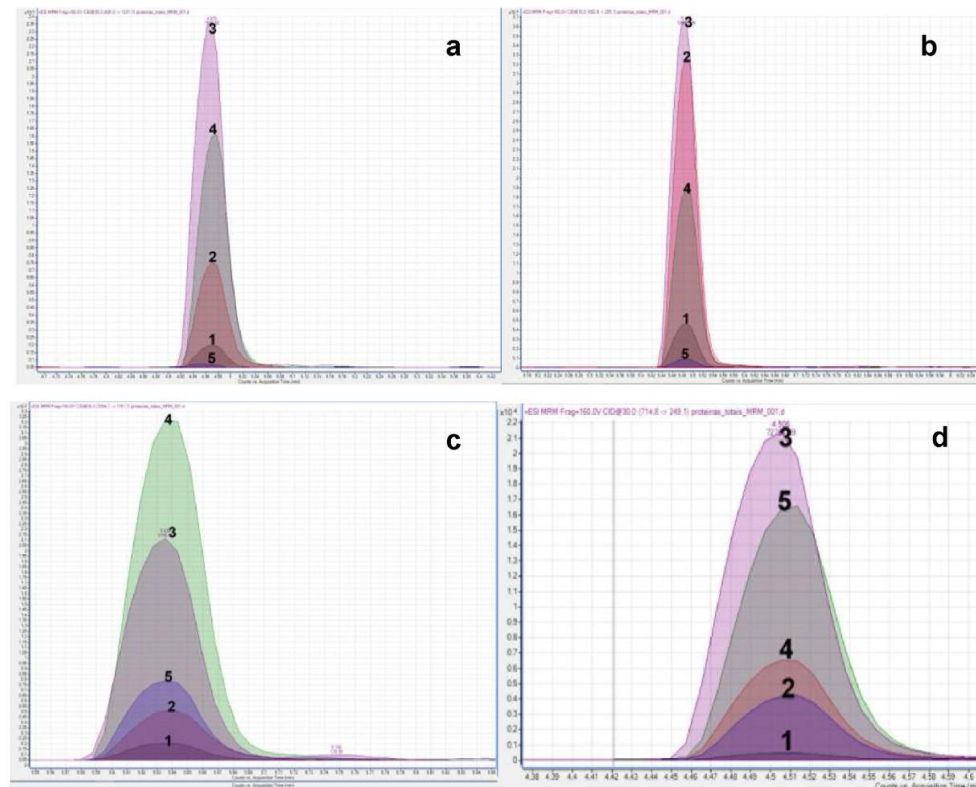


Fig. 1. Chromatograms of the 10 mg/L protein standards analyzed with the different collision cell energies (1–10 V; 2–20 V; 3–30 V; 4–40 V; 5–60 V) for the assessment of the method robustness. a albumin. b α -casein. c β -casein. d lysozyme.

2013), showing great specificity, generating peptides with an adequate mass range, which facilitate the sequence detection.

In the approaches that used the reagent SDS in the preparation of the samples (for example, Spinelli et al., 2018), the protein recovery was affected, generating peak's displacement and a possibly ionic suppression. According to Mainente et al. (2016), the addition of detergents, such as urea or SDS, helps in the recovery of proteins, but chaotropic agents persist in the samples and can interfere in the analysis. The SDS can co-elute with the analyte of interest, potentially causing ion suppression.

Besides that, some protocols seem to be quite long (for example the one used by Tolín et al. (2012), that takes approximately 60 h) and hardly adaptable for routine analysis of commercial wines.

In this approach carried out by our group after previous experiments, using a smaller sample volume (1 mL) and optimizing the preparation time, we observed very satisfactory results in relation to other procedures. A crucial step was the neutralization of the pH of the wine sample, by the use of NaOH to reach a pH of 8, after the spike of the wines with the proteins and the beginning of the extraction step. We observed that the pH also has an important direct influence on the digestion of proteins, which is in accordance with the observations of Pilolli et al. (2017). As well as the inclusion of a final stage of concentration/cleaning in solid phase extraction (SPE) using Bond Elut C18 cartridges (Agilent Technologies®), after protein digestion, which was more effective than using C18AR/MP3 cartridges (Agilent Technologies®). The application of SPE generally involves four steps: conditioning the packing; sample application (loading); washing the packing (for the removal of interferences) and, finally, the elution and recovery of the analyte (Agilent Technologies, 2013). In this study, the C18AR/MP3 cartridge did not show good results because it is a mixed ion exchange cartridge, besides being nonpolar, not allowing elution in the proposed method. The Bond Elut C18 cartridge showed inertia for the evaluated proteins, allowing the optimization of recoveries and the cleaning of the final extract (Fig. 2).

Besides showing the satisfactory results in terms of recovery, our approach involves less steps in handling samples before starting to reduce cysteines, when compared to other published studies. This fact possibly helps to minimize possible protein loss. Some other protocols involve four to ten steps before starting the reduction with DTT, and some still have the cleaning steps after stopping the tryptic digestion. Our preparation only involves an initial pH adjustment, filtration in cellulose ester membranes and the reduction stage already starts. Leaving the final stage of concentration and cleaning.

In respect to analysis time, some improvements were made to decrease the required time. A complete separation was achieved in less than 10 min, which is lower than the reported by other studies (Mat-tarozzi et al., 2014; Monaci et al., 2010; Pavón-Pérez et al., 2019; Tolín et al., 2012).

3.3. Final considerations

In order to obtain more information from the proposed method, it is necessary to apply it to a large scale of commercial samples. This would be useful in terms of food safety, reducing the possible risk to the health of sensitive individuals, as well as future health problems for wine importing and exporting countries.

4. Conclusion

In conclusion, an easy and rapid method for the detection of α -casein, β -casein, albumin and lysozyme, in a single run, by LC-ESI-MS/MS in wines was developed. The results showed that the validated method can give rise to a satisfactory recovery for all of the analytes under different fortification concentration levels. Besides that, it is important to mention the advantages of the present method, as it has a shorter time of sample preparation when compared to other studies, the small amount

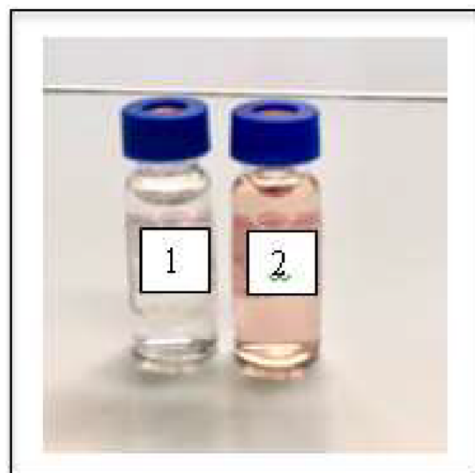


Fig. 2. Example of a red wine after (1) and before (2) the step of concentration/cleaning with the Bond Elut C18 cartridge, showing the color compounds removal. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of sample required and the shorter total time of the analysis. Furthermore, it was possible to quantify the proteins at levels even below the OIV criteria. Proving to be sensitive enough to identify and quantify allergens, taking into account that protecting allergic consumers from accidental exposure to hidden allergens is of extreme importance to decrease the risk and improve their quality of life.

Funding

This study was part of a Research Grant supported by the International Organization of Vine and Wine (OIV), and, has been supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation) by the Grant/Award Number: 88887.149168/2017-00, the University of Caxias do Sul (UCS), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN), the Secretariat of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul (SEAPDR) and the company Agilent Technologies.

CRediT authorship contribution statement

Fernanda Rodrigues Spinelli: Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Validation, Writing - original draft. **Ana Paula Drehmer:** Investigation, Data curation, Visualization, Validation. **Leonardo Valentin:** Investigation, Formal analysis. **Simone Nascimento:** Investigation, Formal analysis. **Mariana Baptistão:** Investigation, Formal analysis. **Regina Vanderlinde:** Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank the OIV, the University of Caxias do Sul, the company Agilent Technologies, the Secretariat of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul (SEAPDR), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation).

References

- Agilent Technologies. (2013). Sample preparation fundamentals for chromatography. 5991-3326EN.
- AOAC International. (2016). Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International.
- Armentia, A. (2008). Adverse reactions to wine: Think outside the bottle. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(3), 266–269. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3282fb110>.
- Eurachem. (2014). Eurachem Guide. The Fitness for purpose of analytical methods: A Laboratory Guide to method validation and related topics (2nd English ed.). Magnusson, B. and U. Örmemark (Ed.). Retrieved from <http://www.eurachem.org>. Accessed June 18, 2020.
- European Union. (2019). REGULATION (EU) No 2019/33 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 October 2018 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards applications for protection of designations of origin, geographical indications and traditional terms in the wine sector, the objection procedure, restrictions of use, amendments to product specifications, cancellation of protection, and labelling and presentation. Official Journal of the European Union, L 9/2.
- Faisal, M., Vasiljevic, T., & Donkor, O. N. (2019). A review on methodologies for extraction, identification and quantification of allergenic proteins in prawns. *Food Research International*, 121, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.040>.
- Kirschner, S., Belloni, B., Kugler, C., Ring, J., & Brockow, K. (2009). Allergenicity of wine containing processing aids: A double-blind, placebo-controlled food challenge. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 19(3), 210–217.
- Loziuk, P. L., Wang, J., Li, Q. Z., Sederoff, R. R., Chiang, V. L., & Muddiman, D. C. (2013). Understanding the role of proteolytic digestion on discovery and targeted proteomic measurements using liquid chromatography tandem mass spectrometry and Design of Experiments. *Journal of Proteome Research*, 12, 5820–5829. <https://doi.org/10.1021/pr4008442>.
- Mainente, F., Rizzi, C., Zoccatelli, G., Chignola, R., Simonato, B., & Pasini, G. (2016). Setup of a procedure for cider proteins recovery and quantification. *European Food Research and Technology*, 242(10), 1803–1811. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2724-y>.
- Mattarozzi, M., Milioli, M., Bignardi, C., Elviri, L., Corradini, C., & Careri, M. (2014). Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin in fortified red wine. *Food Control*, 38, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.015>.
- Monaci, L., Losito, I., Palmisano, F., & Visconti, A. (2010). Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4300–4305. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.035>.
- Moreno-Arribas, M. V., Pueyo, E., & Polo, M. C. (2002). Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 63–75. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01531-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01531-8).
- Nitride, C., Nørgaard, J., Omar, J., Emons, H., Esteso, M. J. M., & O'Connor, G. (2019). An assessment of the impact of extraction and digestion protocols on multiplexed targeted protein quantification by mass spectrometry for egg and milk allergens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 3463–3475. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01816-z>.
- OIV. (2012). Revision of the limit of detection and limit of quantification related to potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine. RESOLUTION OIV-COMEX 502-2012. <http://www.oiv.int>. Accessed 01 Sep 2019.
- OIV. (2019). Compendium of international methods of wine and must analysis. Criteria for the methods of quantification of potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine (OIV-Oeno 427-2010 modified by OIV-COMEX 502-2012).
- Pali-Schöll, I., Verhoeckx, K., Mafra, I., Bavaro, S. L., Mills, E. M., & Monaci, L. (2019). Allergenic and novel food proteins: State of the art and challenges in the allergenicity assessment. *Trends in Food Science and Technology*, 84, 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.007>.
- Pavón-Pérez, J., Henriquez-Aedo, K., & Aranda, M. (2019). Mass spectrometry determination of fining-related allergen proteins in Chilean wines. *Food Analytical Methods*, 12, 827–837. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-01416-0>.
- Pavón-Pérez, J., Henriquez-Aedo, K., Herrero, M., & Aranda, M. (2020). Occurrence of allergen proteins in wines from Chilean market. *Food Additives Contaminants: Part B*. <https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1769194>.
- Pilolli, R., Chaudhari, R., Palmisano, F., & Monaci, L. (2017). Development of a mass spectrometry immunoassay for unambiguous detection of egg allergen traces in wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 1581–1589. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0099-3>.
- Restani, P., Uberi, F., Tarantino, C., Ballabio, C., Gombac, F., Bastiani, E., ... Danzi, R. (2014). Collaborative interlaboratory studies for the validation of ELISA methods for the detection of allergenic fining agents used in wine according to the criteria of OIV Resolution 427–2010 modified by OIV – Comex 502–2012. *Food Analytical Methods*, 7, 706–772. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9741-2>.
- Spinelli, F. R., Cargnel, G. J., Drehmer, A. P., Blatt, C., Baptista, M., & Vanderlinde, R. (2018). Analysis of allergenic residues in wines by triple quadrupole LCMS. *BIO Web of Conferences*, 12, 1–4. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191204012>.
- Tolin, S., Pasini, G., Simonat, B., Mainente, F., & Arrigoni, G. (2012). Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. *Food Control*, 28, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.015>.
- Vassilopoulou, E., Karathanos, A., Siragakis, G., Giabi, S., Sinaniotis, A., Douladiris, N., ... Papadopoulos, N. G. (2011). Risk of allergic reactions to wine, in milk, egg and fish-allergic patients. *Clinical and Translational Allergy*, 1(10), 1–4. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-1-10>.
- Wigand, P., Blettner, M., Saloga, J., & Decker, H. (2012). Prevalence of wine intolerance: Results of a survey from Mainz, Germany. *Deutsches Ärzteblatt International*, 109(25), 437–444. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0437>.

5 DISCUSSÃO GERAL

Durante a vinificação, diferentes coadjuvantes de tecnologia são empregados para auxiliar nas etapas envolvidas, como o afinamento dos vinhos. A caseína, o caseinato de potássio, a ovalbumina e a lisozima são proteínas de origem animal relacionadas a alérgenos e são frequentemente usados para clarificar e estabilizar vinhos brancos e tintos. Os complexos proteicos são normalmente removidos após o processo de clarificação e estabilização dos vinhos, embora baixas concentrações das proteínas possam ser encontradas no produto final se não forem seguidas as boas práticas de fabricação. A falta de informações da possível presença de resíduos de proteínas de origem animal na rotulagem dos vinhos tem sido motivo de preocupação nos últimos anos, devido à possibilidade de produzir efeitos adversos a consumidores suscetíveis.

Como alternativa existem os auxiliares de tecnologia de origem vegetal, porém, além da eficiência ser reduzida, também podem ser alergênicos e, ainda, são escassos os estudos sobre os mesmos. Com isso, ao longo dos anos a rotulagem de vinhos que passaram por tais tratamentos gerou a atual demanda por métodos analíticos sensíveis, para atender aos critérios estabelecidos por órgãos reguladores.

No Brasil, são poucos os laboratórios privados que realizam análises de resíduos de proteínas alergênicas em vinhos e, além disso, não é uma análise realizada por laboratórios governamentais, portanto, não existe um controle analítico oficial. Os métodos utilizados para as análises destas proteínas ainda necessitam de aprimoramentos. Atualmente, o método oficial para as análises de resíduos de albumina e caseína é por imunoensaios, de acordo com o método OIV-MA-AS315-23 (OIV, 2019c). Para a análise de lisozima, a OIV dispõe de um método por eletroforese capilar de alta resolução, OIV-MA-AS315-24 (OIV, 2019c) e outro por CLAE, OIV-MA-AS-315-25 (OIV, 2019c), ambos com limites de quantificação pouco

sensíveis. Visto isso, é necessário em nível nacional e internacional, e constitui uma demanda da OIV assim como de outros órgãos regulamentadores, o desenvolvimento de métodos mais avançados e precisos para tais análises, e que apresentem limites de detecção e quantificação inferiores aos atuais. Para isso, a busca de respostas analíticas rápidas e confiáveis é imprescindível, através de métodos analíticos que forneçam informações qualitativas e quantitativas detalhadas das amostras, com precisão e exatidão comprovada, garantindo a minimização de erros. Portanto, este trabalho teve por objetivo determinar a presença de resíduos de coadjuvantes enológicos potencialmente alergênicos em vinhos através do desenvolvimento de um método para análise de proteínas por LC-MS/MS.

No **Capítulo I** foi realizada uma revisão sobre resíduos alergênicos de coadjuvantes de tecnologia. Um artigo foi publicado em revista nacional, para estar disponível aos profissionais do setor vitivinícola brasileiro.

No **Capítulo II**, foram elaborados vinhos tintos da variedade Merlot e vinhos brancos da variedade Chardonnay, com diferentes concentrações dos auxiliares de processamento, seguindo as boas práticas de fabricação, para verificar a existência de resíduos nos vinhos prontos. Para estas análises, foram adaptados dois métodos de referência publicados em revistas internacionais. Este artigo fez parte de uma bolsa de pesquisa da OIV e passou por avaliação dos especialistas e delegados dos países membros dessa Organização, contribuindo para a continuidade dos estudos. O método utilizado neste artigo apresentou recuperação analítica fora da faixa estabelecida pela AOAC (2016), de 80 – 110%, sendo questionado o uso do surfactante dodecilsulfato de sódio, que pode ter causado supressão iônica analítica em alguns casos e pareamento de íons em outros. Apesar disso, os vinhos experimentais elaborados não apresentaram resíduos das proteínas analisadas.

No **Capítulo III** foram analisados doze vinhos brancos comerciais brasileiros através do método publicado no Capítulo II deste trabalho. Nos vinhos analisados, não foram observados resíduos detectáveis das proteínas de estudo. Devido à preocupação com a presença de resíduos nos vinhos e a rotulagem adequada, este estudo forneceu uma avaliação importante destes compostos visto que não existem na literatura, até o momento, resultados dessas análises em vinhos comerciais brasileiros. Já, em vinhos estrangeiros, são encontrados resultados, principalmente em vinhos italianos, assim como um estudo publicado recentemente em vinhos comerciais chilenos.

Após o estudo de protocolos de preparo de amostras para análise de proteínas, verificou-se a necessidade de otimizar esta etapa. Para isso, no **Capítulo IV** foi realizada a avaliação e comparação de quatro métodos analíticos publicados por outros autores para tais análises em vinhos e foi desenvolvido um método adaptado de própria autoria, após verificação de erros, acertos e ajustes necessários. O estudo foi voltado para a validação do método que se mostrou mais adequado em termos de recuperação analítica, podendo ser utilizado futuramente em análises de monitoramento e rotina. Dois pontos foram considerados cruciais no preparo das amostras: o ajuste do pH dos vinhos antes do início da desnaturação proteica e o acréscimo de uma etapa de limpeza/purificação do extrato final antes da injeção. Verificou-se que os métodos já publicados para estas análises por LC-MS/MS não contemplam os quatro analitos desse estudo (α -caseína, β -caseína, albumina e lisozima), e, parte dos métodos não apresentam resultados em termos de quantificação e recuperação analítica. Através desse trabalho foi verificado que o método desenvolvido possui uma recuperação analítica satisfatória para todos os analitos nas amostras estudadas, apresentando como vantagens a facilidade de operação e alta eficiência devido ao baixo uso de solventes e um processo de extração simples, obtendo assim resultados que atendem aos critérios de

validação de métodos estabelecidos por órgãos reguladores. A vantagem de usar espectrometria de massas de baixa resolução possibilitou a identificação inequívoca dos compostos-alvo, demonstrando as possibilidades quantitativas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial com uma fonte de ionização por eletropulverização para a análise de resíduos de proteínas alergênicas em vinhos. O método desenvolvido é capaz de quantificar proteínas em níveis inferiores aos limites legais atuais, se tornando uma ferramenta de quantificação de proteínas residuais alergênicas em vinhos.

6 CONCLUSÕES FINAIS

- Foi desenvolvido e validado um método analítico seletivo, capaz de detectar α -caseína, β -caseína, albumina e lisozima de forma simultânea, por LC-ESI-MS/MS, em níveis até inferiores ao limite europeu e estabelecido pela OIV.
- Foram investigados preparos amostrais envolvendo etapas de extração e digestão de proteínas e foi escolhido o mais eficiente em termos de recuperação analítica para a otimização e validação;
- A concentração/limpeza em fase sólida através de cartuchos após a digestão proteica permitiu a limpeza do extrato final das amostras, demonstrando ser muito eficaz para recuperação das proteínas.
- A otimização da extração e da digestão de proteínas é fundamental para fornecer uma quantificação confiável;
- Foram elaborados vinhos brancos e tintos experimentais, tratados com diferentes concentrações dos coadjuvantes tecnológicos, seguindo as boas práticas de elaboração, e não foram observados resíduos dos mesmos nos vinhos prontos;
- Não foram identificados resíduos de albumina, alfa-caseína, beta-caseína e lisozima nas amostras analisadas de vinhos comerciais brasileiros.; - O método analítico desenvolvido permite a análise em curto período de tempo, com menor número de etapas (reduzindo perdas), menor volume de amostra e capacidade de confirmação adequada, o que proporciona maior aplicabilidade em análises de rotina, sendo consequentemente mais econômico e ambientalmente mais adequado (redução do uso de solventes).

7 PERSPECTIVAS

- Realizar uma validação mais avançada do método, explorando a robustez na etapa de digestão trípica;
- Participar de ensaios bilaterais e/ou interlaboratoriais para avaliação dos resultados;
- Realizar análise de uma grande escala de vinhos comerciais, nacionais e importados;
- Propor este método como método oficial da OIV e do MAPA;

8 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Albert, A.Z. (2004). **O admirável novo mundo do vinho: e as regiões emergentes**. 2 ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo. 320p.

ANVISA (2015). RDC nº 26, de 02 de julho de 2015. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. **Disponível (online)**

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2694583/RDC_26_2015_.pdf/b0a1e89b-e23d-452f-b029-a7bea26a698c.

ANVISA (2016). RDC nº 123, de 04 de novembro de 2016. Dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos. **Disponível (online)**

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-123-de-4-de-novembro-de-2016.pdf/view>

AOAC (2016). International, Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International.

Asero, R.; Antonicelli, L.; Arena, A.; Bommarito, L.; Caruso, B.; Crivellaro, M.; De Carli, M.; Della Torre, E.; Della Torre, F.; Heffler, E.; Lodi, R.F.; Longo, R.; Manzotti, G.; Marcotulli, M.; Melchiorre, A.; Minale, P.; Morandi, P.; Moreni, B.; Moschella, A.; Murzilli, F.; Nebiolo, F.; Poppa, M.; Randazzo, S.; Rossi, G.; Senna, G.E. (2009a). EpidemAAITO: Feature of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: A multi-centre study. **Clin. Exp. Allergy**, 39: 547–555.

Asero, R., Antonicelli, L., Arena, A., Bommarito, L., Caruso, B., Colombo, G., Crivellaro, M.; De Carli, M.; Della Torre, E.; Della Torre, F.; Heffler, E.; Lodi, R. F.; Longo, R.,; Manzotti, G.,; Marcotulli, M.; Melchiorre, A.,; Minale, P.; Morandi, P.; Moreni, B.; Moschella, A.; Murzilli, F.; Nebiolo, F.; Poppa, M.; Randazzo, S.; Rossi, G.; Senna, G.E. (2009b). Cases of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi centre study. **Int. Arch.of Allergy Immunol.** 150: 271–277.

Boja, E.S.; Rodriguez, H. (2011). The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. **Korean J. Lab. Med.** 31: 61– 71.

BRASIL (1988). LEI Nº 7.678, DE 8 DE NOVEMBRO DE 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Disponível (online)** http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1980-1988/L7678.htm.

CADASTRO VINÍCOLA (2018). SEAPDR/IBRAVIN. **Disponível (online)** <http://www.sisdeclara.com.br>. (02 de setembro de 2019).

Campbell, M.K. (2000). **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 752p.

Carstens, C.; Deckwart, M.; Webber-Witt, M.; Schäfer, V.; Eichhorn, L.; Brockow, K.; Fischer, M.; Christmann, M.; Paschke-Kratzin, A. (2014). Evaluation of the efficiency of enological procedures on lysozyme depletion in wine by an indirect ELISA method. **J. Agr. Food Chem.** 62 (26): 6247-6253.

Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. (2008). O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova.** 31(3): 623-636.

Curvelo-Garcia, A. S.; Barros, P. (2015). **Química Enológica – métodos analíticos. Avanços recentes no controlo da qualidade dos vinhos e de outros produtos vitivinícolas.** Porto: Agrobook. 823p.

D'Amato, A.; Kravchuk, A.V.; Bachi, A.; Righetti, P.G. (2010). Noah's nectar: the proteome content of a glass of red wine. **J. Proteomics.** 73: 2370-2377.

Deckart, M.; Cartens, C.; Webber-Witt, M.; Schafer, V.; Eichhorn, L.; Schroter, F.; Fischer, M.; Brockow, K.; Christmann, M.; Paschke-Kratzin, A. (2014). Impact of wine manufacturing practice on the occurrence of fining agents with allergenic potential. **Food addit. Contam. Part A.** 31(11): 1805-1817.

Domon, B.; Aebersold, R (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. **Science.** 312: 212-217.

Faisal, M.; Vasiljevic, T.; Donkor, O.N. (2019). A review on methodologies for extraction, identification and quantification of allergenic proteins in prawns. **Food Res. Int.** 121: 307-318.

FAO (2010). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Agribusiness handbook: poultry meat & eggs. **Disponível (online)** <http://www.fao.org/docrep/012/al175e/al175e.pdf> (27 de março de 2020).

FIVS (2019). **Disponível (online)** <https://www.fivs.org/scientific-and-technical-expertise/fivs-apace/wine-making-substances/processing-aids/egg-albumin/> (14 de setembro de 2019).

Hourihane, J.O.; Knulst, A.C. (2005). Thresholds of allergenic proteins in foods. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 207: 152-156.

IBRAVIN (2019). **Disponível (online)** <http://www.ibravin.org.br/> (31 de agosto de 2019).

IBRAVIN/MAPA/SEAPDR-RS (2019a). **Disponível (online)** <https://ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1561748795.pdf> (31 de agosto de 2019).

IBRAVIN/MAPA/SEAPDR-RS (2019b). **Disponível (online)** <https://ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1564503491.pdf>. (31 de agosto de 2019).

Kang, W.; Muhlack, R.A.; Bindon, K.A.; Smith, P.A.; Niimi, J.; Bastian, S.E. (2019). Potato protein fining of phenolic compounds in red wine: a study of the kinetics and the impact of wine matrix components and physical factors. **Molecules**. 24: 1-13.

Kaul, S.; Lüttkopf, D.; Kastner, B.; Vogel, L.; Höltz, G.; Vieths, S.; S. Hoffmann A. (2007). Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization. **Clin. Exp. Allergy**. 37(1): 141-150.

Kirschner, S.; Belloni, B.; Kugler, C.; Ring, J.; Brockow, K. (2009). Allergenicity of wine containing processing aids: a double-blind, placebo-controlled food challenge. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.** 19 (3): 210-217.

Lacorn, M.; Gosswein, C.; Immer, U. (2011). Determination of residual egg white proteins in red wines during and after fining. **Am. J. Enol Viticult.** 62: 382-385.

Liburdi, K.; Benucci, I.; Esti, M. (2014). Lysozyme in wine: an overview of current and future applications. **Food Sci. F.** 13: 1062-1073.

Lidon, F.; Silvestre, M. (2010). Nutrição e Saúde – Alergia aos Alimentos. In: F. Lidon, M. Silvestre (Ed.) *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*, Escolar Editora, Lisboa, Portugal. pp 445-455.

Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. **Curr. Opin. Colloid.** 15: 73-83.

Loziuk, P.L.; Wang, J.; Li, Q.Z.; Sederoff, R.R.; Chiang, V.L.; Muddiman, D.C. (2013). Understanding the role of proteolytic digestion on discovery and targeted proteomic measurements using liquid chromatography tandem mass spectrometry and Design of Experiments. **J. Proteome. Res.** 12, 5820-5829.

Marangon, M.; Vincenzi, S.; Curioni, A. (2019). Wine fining with plant proteins. **Molecules**. 24(11), 1-16.

Mattarozzi, M.; Milioli, M.; Bignardi, C.; Elviri, L.; Corradini, C.; Careri, M. (2014). Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin fortified red wine. **Food Control**. 38: 82-87.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (1997). Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de outubro de 1997. **Disponível (online)** http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/PORTARIA_540_1997.pdf/3c55fd22-d503-4570-a98b-30e63d85bdad.

Monaci, L.; Losito, I.; Palmisano, F.; Visconti, A. (2010). Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**. 1217: 4300-4305.

Monaci, L.; Losito, I.; Palmisano, F.; Godula, M.; Visconti, A. (2011). Towards the quantification of residual milk allergens in caseinate-fined white wines using HPLC coupled with single-stage Orbitrap mass spectrometry. **Food Addit. Contam.** 28: 1304-1314.

Monaci, L.; Losito, I.; De Angelis, E.; Pilolli, R.; Visconti, A. (2013). Multi-allergen quantification of fining-related egg and milk proteins in white wines by high- resolution mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 27: 2009-2018.

Moreno-Arribas, M.V.; Pueyo, E.; Polo, M.C. (2002). Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. **Anal. Chim.** 458(1): 63-75.

Müller, T.; Winter, D. (2017). Systematic evaluation of protein reduction and alkylation reveals massive unspecific side effects by iodine-containing reagents. **Mol Cell Proteomics**, 16(7), 1173–1187. doi:10.1074/mcp.m116.064048

Nitride, C.; Nørgaard, J.; Omar, J.; Emons, H.; Estes, M.J.M.; Gavin O'Connor, G. (2019). An assessment of the impact of extraction and digestion protocols on multiplexed targeted protein quantification by mass spectrometry for egg and milk allergens. **Anal. Bioanal. Chem.** 411:3463-3475.

OIV (2010). Criteria for the methods of quantification of potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine. RESOLUTION OIV/OENO 427/2010. **Disponível (online)** <http://oiv.int/public/medias/1243/oiv-oeno-427-2010-en.pdf> (15 de julho de 2020).

OIV (2012). Revision of the limit of detection and limit of quantification related to potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine. RESOLUTION OIV-COMEX 502-2012. **Disponível (online)** <http://www.oiv.org> (01 de setembro de 2019).

OIV (2014). Code of good fining practices for wine to be applied in the use of proteinaceous wine fining agents with allergenic potential (casein and egg white). RESOLUTION OIV-OENO 520-2014. **Disponível (online)** <http://oiv.int/public/medias/1645/oiv-oeno-secsan-520-2014-en.pdf> (16 de junho de 2020).

OIV (2019a). International Code of Oenological Practices. (OENO 10/97). **Disponível (online)** <http://oiv.int/en/technical-standards-and-documents/oenological-practices/international-code-of-oenological-practices> (16 de julho de 2020).

OIV (2019b). International Oenological Codex. **Disponível (online)** <http://oiv.int/en/technical-standards-and-documents/oenological-products/international-oenological-codex> (16 de julho de 2020).

OIV (2019c). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. **Disponível (online)** <http://oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol> (03 de dezembro de 2019).

OIV (2020). State of the world vitivinicultural sector in 2019. **Disponível (online)** <http://oiv.int/js/lib/pdfjs/web/viewer.html?file=/public/medias/7298/oiv-state-of-the-vitivinicultural-sector-in-2019.pdf>. (10 de maio de 2020).

Pali-Schöll, I.; Verhoeckx, K.; Mafra, I.; Bavaro, S.L.; Mills, E.M.; Monaci, L. (2019). Allergenic and novel food proteins: State of the art and challenges in the allergenicity assessment. **Trends Food Sci. Tech.** 84: 45-48.

Pavón-Pérez, J.; Henriquez-Aedo, K.; Aranda, M. (2019). Mass spectrometry determination of fining-related allergen proteins in Chilean wines. **Food Anal. Methods.** 12: 827-837.

Pavón-Pérez, J.; Henriquez-Aedo, K.; Herrero, M.; Aranda, M. (2020). Occurrence of allergen proteins in wines from Chilean market. **Food Addit. Contam. B.** DOI: 10.1080/19393210.2020.1769194

Peñas, E.; di Lorenzo, C.; Uberti, F.; Restani, P. (2015). Allergenic proteins in enology: a review on technological applications and safety aspects. **Molecules.** 20: 13144-13164.

Pilolli, R.; De Angelis, E.; Godula, M.; Viscontia, A.; Monaci, L. (2014). Orbitrap™ monostage MS versus hybrid linear ion trap MS: application to multi-allergen screening in wine. **J. Mass Spectrom.** 49: 1254-1263.

Restani, P.; Uberti, F.; Danzi, R.; Ballabio, C.; Pavanello, F.; Tarantino, C. (2012). Absence of allergenic residues in experimental and commercial wines fined with caseinates. **Food Chem.** 134: 1438-1445.

Restani, P.; Uberti, F.; Tarantino, C.; Ballabio, C.; Gombac, F.; Bastiani, E.; Bolognini, L.; Pavanello, F.; Danzi, R. (2014). Collaborative interlaboratory studies for the validation of ELISA methods for the detection of allergenic fining agents used in wine according to the criteria of OIV Resolution 427-2010 modified by OIV – Comex 502-2012. **Food Anal. Methods.** 7: 706-72.

Rizzon, L.A.; Dall'agnol, I. (2007). **Vinho Tinto**. Coleção Agroindústria Familiar. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Uva e Vinho. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília.

Rizzon, L.A.; Dall'agnol, I. (2009). **Vinho Branco**. Coleção Agroindústria Familiar. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Uva e Vinho. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília.

Rolland, J.M.; Apostolou, E.; De Leon, M.P.; Stockley, C.S.; O'Hehir, R.E. (2008). Specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for analysis of residual allergenic food proteins in commercial bottled wine fined with egg white, milk, and nongrape-derived tannins. **J. Agr. Food Chem.** 56: 349-354.

Rona, R.J.; Keil, T.; Summers, C.; Gislason, D.; Zuidmeer, L.; Sodergren, E.; Sigurdardottir, S.T.; Lindner, T.; Goldhahn, K.; Dahlstrom, J.; McBride, D.; Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 120(3): 638-646.

Santos, J.F.; Rodrigues, J.A. (2013). Importância da caseína do leite, aspectos econômicos e nutricionais. Levantamento do teor de caseína no leite das propriedades do pool de leite ABC, APCBRH, PR. **Veterinária e Zootecnia**. 20(2): 151-152.

Sauvage, F.X.; Bach, B.; Moutounet, M.; Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. **Food Chem.**, 118, 26-34.

Schneider, N.; Werkmeister, K.; Becker, C.M.; Pischetsrieder, M. (2011). Prevalence and stability of lysozyme in cheese. **Food Chem.** 128(1):145-151.

Segade, S. R.; Paissoni, M.A.; Vilanova, M.; Gerbi, V.; Rolle, R.; Giacosa, S. (2020). Phenolic composition influences the effectiveness of fining agents in vegan-friendly red wine production. **Molecules**. 25, 1-20.

Shoji, M. (2010). **Egg Allergen Detection**. In: Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. **Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. pp 315-317.

Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. (2009). Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. **Annual Review of Medicine**. 60: 261-277.

Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. (2010). Food allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.** 125 (2): 116–125.

Silvetti, T.; Brasca, M.; Lodi, R.; Vanoni, L.; Chiolerio, F.; de Groot, M.; Bravi, A. (2010). Effects of lysozyme on the microbiological stability and organoleptic properties of unpasteurized beer. **J. Inst. Brew.** 116:33-40.

Simonato, B.; Mainente, F.; Suglia, I.; Curioni, A.; Pasini, G. (2009). Evaluation of fining efficiency of corn zeins in red wine: A preliminary study. **Ital. J. Food Sci.** 21:97-105.

Simonato, B.; Mainente, F.; Tolin, S.; Pasini, G. (2011). Immunochemical and mass spectrometry detection of residual proteins in gluten fined red wine. **J.Agric. Food Chem.** 59: 3101-3110.

Sonni, F.; Chinnici, F.; Natali, N.; Riponi, C. (2011). Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: Effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of White wines. **Food Chem.** 29: 1193-1200.

Stockley, C.S.; Johnson, D.L. (2015). Adverse food reactions from consuming wine. Australian **J. Grape Wine Res.** 21: 568-581.

Titoiu, A. M.; Porumb, R.; Fanjul-Bolado, P.; Epure, P.; Zamfir, M.; Vasilescu, A. (2019). Detection of allergenic lysozyme during winemaking with an electrochemical aptasensor. **Electroanal.** 31: 1-13.

Tolin, S.; Pasini, G.; Curioni, A.; Arrigoni, G.; Masi, A.; Mainente, F.; Simonato, B. (2012a). Mass spectrometry detection of egg proteins in red wines treated with egg white. **Food Control**. 23: 87-94.

Tolin, S.; Pasini, G.; Simonato, B.; Mainente, F.; Arrigoni, G. (2012b). Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. **Food Control**. 28: 321-326.

UNIÃO EUROPEIA (2003). DIRETIVA 2003/89/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 10 de Novembro de 2003 que altera a Diretiva 2000/13/CE relativamente à indicação dos ingredientes presentes nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L 308/15.

UNIÃO EUROPEIA (2012). REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) Nº 579/2012 DA COMISSÃO de 29 de junho de 2012 que altera o Regulamento (CE) nº 607/2009 que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) nº 479/2008 do Conselho no que respeita às denominações de origem protegidas e indicações geográficas protegidas, às menções tradicionais, à rotulagem e à apresentação de determinados produtos vitivinícolas. Jornal Oficial da União Europeia, L 171/4.

UNIÃO EUROPEIA (2019). REGULAMENTO DELEGADO (UE) 2019/33 DA COMISSÃO de 17 de outubro de 2018 que complementa o Regulamento (UE) nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante aos pedidos de proteção das denominações de origem, indicações geográficas e menções tradicionais no setor vitivinícola, ao procedimento de oposição, às restrições de utilização, às alterações do caderno de especificações, ao cancelamento da proteção e à rotulagem e apresentação. Jornal Oficial da União Europeia, L 9/2.

UNIPROT (2019). **Disponível (online)** <https://www.uniprot.org/uniprot/P01012> (14 de setembro de 2019).

Uberti, F.; Danzi, R.; Stockley, C.; Peñas, E.; Ballabio, C.; Di Lorenzo, C.; Tarantino, C.; Restani, P. (2014). Immunochemical investigation of allergenic residues in experimental and commercially-available wines fined with egg white proteins. **Food Chem**. 159: 343-352.

Van Do, T.; Elsayed, S.; Florvaag, E.; Hordvik, I.; Endresen, C. (2005). Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. **J. Allergy Clin. Immunol**. 116: 1314-1320.

Vassilopoulou, E.; Karathanos, A.; Siragakis, G.; Giabi, S.; Sinaniotis, A.; Douladiris, N.; Fernandez-Rivas, M.; Clausen, M. e Papadopoulos, N.G. (2011). Risk of allergic reactions to wine, in milk, egg and fish-allergic patients. **Clin. Transl. Allergy**. 1(10): 1-4.

Venturini Filho, V.G. (2005). **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado**. São Paulo: Edgard Blüchen. 550p.

Weber, P.; Steinhart, H.; Paschke, A. (2007). Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA. **J. Agric. Food Chem.** 55: 3127-3133.

Weber, P.; Steinhart, H.; Paschke, A. (2009). Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, Western Blot and Immunostaining. **J. Agric. Food Chem.** 57: 8399-8405.

Zimoch-Korzycka, A.; Jarmoluk, A. (2015). The use of chitosan, lysozyme, and the nano-silver as antimicrobial ingredients of edible protective hydrosols applied into the surface of meat. **J. Food Sci. Technol.** 52: 5996-6002.