



**João Carlos Lagarto de  
Brito Calvão**

**Efeito da poda e de produtos enológicos na  
evolução da cor do vinho tinto.**



**João Carlos Lagarto de  
Brito Calvão**

**Efeito da poda e de produtos enológicos na  
evolução da cor do vinho tinto**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica - ramo bioquímica alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Nunes do departamento de Química da Universidade de Aveiro, co-orientação do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação da Doutora Ana Maria Lopes Rodrigues Macena, responsável pelo Departamento de Investigação da Dão Sul, Sociedade Vitivinícola, S.A.

## **o júri**

presidente

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo  
Professor associado com agregação do Departamento de Química  
Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço  
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de  
Aveiro

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes  
Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de  
Aveiro (orientador)

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva  
Professor associado com agregação do Departamento de Química  
Universidade de Aveiro (co-orientador)

Doutora Ana Maria Lopes Rodrigues Macena  
Responsável pelo Departamento de Investigação da Dão Sul, Sociedade  
Vitivinícola, S.A. (co-orientador)

## **Agradecimentos**

Agradecimento especial à Dr<sup>a</sup> Cláudia Nunes pela motivação, disponibilidade e orientação dada ao longo do trabalho e ao Prof. Manuel A. Coimbra por todo o conhecimento teórico-prático e dedicação ao longo dos anos. A todo o pessoal do laboratório, destacando a Dr<sup>a</sup> Elisabete Coelho e o Mickael Santos. Ao Dr. Fernando Gonçalves pelo esforço e disponibilidade nas análises realizadas na Escola Superior Agrária de Viseu.

Ao Eng<sup>o</sup> Osvaldo e à Dr<sup>a</sup> Ana Rodrigues pela oportunidade dada e por todos os ensinamentos do dia a dia. Um agradecimento especial a todas as pessoas da Dão Sul (destaque para a equipa de enologia) que durante estes meses, partilharam a sua sabedoria e experiência. Ao Prof. Rogério de Castro e à sua filiação à Dão Sul, determinantes no trabalho desenvolvido.

A todos os que me rodeiam e que são importantes para mim.

## Palavras-Chave

Vinho tinto, poda mínima, antocianinas, cor, enzimas de maceração, taninos

## Resumo

A poda mínima (Pmin) das videiras é uma prática vitícola que surge como alternativa à poda manual (Pman). A Pmin aumenta a produção da vinha e necessita de menos mão de obra, representando vantagens económicas à indústria vitivinícola. A adição de produtos enológicos com o objetivo de melhorar as características cromáticas dos vinhos é uma prática comum numa empresa vitícola. A influência das práticas vinícolas e a eficiência da adição dos produtos enológicos na composição dos vinhos ainda não se encontra completamente esclarecida.

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a influência da Pmin em vinhos produzidos a partir das castas tintas Alfrocheiro (Alf) e Touriga Nacional (TN) da região Dão. Foi também avaliada a eficiência da adição de produtos enológicos, enzimas e/ou taninos, na evolução da composição fenólica e cor dos vinhos Alf de Pmin e Pman.

Os vinhos de Pmin, em relação aos da Pman para ambas as castas, apresentaram menor teor alcoólico e maior acidez total. Estes vinhos continham menor conteúdo fenólico, nomeadamente antocianinas totais, poliméricas e livres. Estes resultados traduziram-se na menor intensidade de cor e maiores valores dos parâmetros do CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) dos vinhos de Pmin. A prova organoléptica não evidenciou grandes diferenças entre os vinhos de Pmin e Pman na casta TN, ao contrário dos vinhos Alf em que os da Pmin tiveram pior classificação. A adição de enzimas e taninos isoladamente aos vinhos da Pmin e Pman da casta Alf não alterou a evolução da composição fenólica e cor dos vinhos. No entanto, a adição de ambos os produtos enológicos em conjunto levou ao aumento das antocianinas poliméricas no vinho da Pmin, assim como a uma menor diminuição da intensidade de cor ao longo do envelhecimento. A análise sensorial demonstrou a preferência pelos vinhos em que tinham sido adicionados ambos os produtos enológicos.

**Keywords**

Red wine, minimal pruning, anthocyanins, colour, maceration enzymes, tannins

**Abstract**

Minimal pruned vines (Pmin) are a growing practice emerging as an alternative to manually pruned vines (Pman). The Pmin increases the productivity of the vineyard and reduces labour, representing economic benefits to wine's industry. On the other hand, the addition of oenological products in order to improve the chromatic characteristics of the wines is also a common practice in an oenology company. The influence of vine practice and the impact of the addition of oenological products in the chemical composition of wine are not completely understood.

The aim of this study was to evaluate the influence of Pmin in wines produced from red grapes Alfrocheiro (Alf) and Touriga Nacional (TN) of the Dão region. It was also evaluated the impact of oenological products, enzymes and/or tannins, in the evolution of the phenolic composition and colour of wines obtained with Pmin and Pman of Alfrocheiro.

Pmin wines, in relation to Pman, for both varieties had lower alcohol content and higher acidity. These wines contained less phenolic content, including total, polymeric and free anthocyanins. These results were reflected in the lower colour intensity and higher CIELab values ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) of Pmin wines. Sensorial test showed no major differences between Pmin and Pman TN wines, whereas Pmin's wine of Alf had the lower scores. The addition of enzymes and tannins alone to the wines of Alf variety did not changed the phenolic composition and evolution of colour wine along aging. However, the addition of both oenological products together led to an increase of polymeric anthocyanins in Pmin wine, as well as a smaller decrease in colour intensity during aging. Sensory analysis showed also a preference for wines that had been treated with both oenological products.

# Índice

1 - Revisão bibliográfica .....	1
1.1 - Impacto da cor dos vinhos tintos .....	3
1.2 - A composição fenólica das uvas tintas e a sua contribuição para a cor dos vinhos tintos. ....	4
1.2.1 - Flavonóides .....	6
1.2.2 - Não flavonóides .....	12
1.3 - Evolução da cor ao longo do processo de vinificação e envelhecimento dos vinhos tintos	14
1.3.1 - Extração dos compostos fenólicos durante a fermentação alcoólica .....	14
1.3.2 - Fatores que influenciam a cor dos vinhos tintos .....	16
1.3.3 - Reações das antocianinas .....	17
1.4 - Práticas enológicas que melhoram a cor dos vinhos tintos .....	24
1.4.1 - Enzimas de maceração .....	24
1.4.2 - Aplicação de taninos enológicos .....	25
2 - Contextualização do trabalho.....	27
2.1 - Dão Sul .....	29
2.2 - Castas tintas da zona do Dão .....	29
2.3 - Poda mínima .....	30
2.4 - Objetivo do trabalho .....	33
3 - Metodologia .....	35
3.1 - Vinificação.....	38
3.1.1 - Produtos enológicos .....	42
3.2 - Análises físico-químicas .....	43
3.2.1 - Mosto .....	43
3.2.2 - Vinhos .....	43
3.3 - Determinação da composição fenólica .....	45
3.3.1 - Densidade ótica a 280 nm. ....	45
3.3.2 - Compostos fenólicos totais .....	45
3.3.3 - Atividade antioxidante .....	45
3.3.4 - Antocianinas totais, poliméricas e monoméricas .....	46
3.3.5 - Antocianinas livres.....	46
3.4 - Determinação da cor. ....	47
3.4.1 - Método de Somers .....	47
3.4.2 - CIELab .....	48

3.5 - Análise sensorial .....	48
4 - Resultados e discussão .....	50
4.1 - Efeito da poda mínima na evolução da cor do vinho tinto .....	52
4.1.1 - Uvas .....	52
4.1.2 - Evolução dos parâmetros físico-químicos.....	53
4.1.3 - Evolução dos compostos fenólicos .....	58
4.1.4 - Evolução da cor.....	65
4.1.5 - Análise sensorial .....	68
4.2 - Utilização de produtos enológicos nos ensaios de vinho da casta Alfrocheiro.....	71
4.2.1 - Evolução dos compostos fenólicos .....	72
4.2.2 - Evolução da cor.....	84
4.2.3 - Análise sensorial .....	90
5 - Conclusão.....	93
6 - Bibliografia .....	97
7 - Anexos .....	107



# Índice de figuras

Figura 1: Exemplo de garrafas de vinhos branco, rosé e tinto. ....	3
Figura 2: Estrutura de ressonância do anel benzénico.....	5
Figura 3: Distribuição dos compostos fenólicos nas uvas .....	6
Figura 4: Esqueleto carbonado C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> dos flavonóides. ....	7
Figura 5: Equilíbrio de ressonância das antocianinas dependente do pH e a nomenclatura da forma de catião flavílico e respetivo $\lambda$ max. ....	9
Figura 6: Estrutura dos flavanóis monoméricos da série da (+)-catequina e (-)epicatequina. ....	10
Figura 7: Estrutura das proantocianidinas através de ligação C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub> oligoméricas (2≤n≤5) ou poliméricas (n≥6). R <sub>1</sub> =-H e R <sub>2</sub> =-OH: procianidinas; R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =-OH: prodelfinidinas. ....	11
Figura 8: Estrutura do ácido gálico.....	13
Figura 9: Produtos da condensação entre a forma oxidada do ácido cafeioriltartárico (R <sub>1</sub> =-OH) e ácido p-cumaroiltartárico.....	16
Figura 10: Compostos formados na condensação de antocianina→tanino. ....	19
Figura 11: Cor dos complexos formados na condensação de tanino→antocianina. ....	20
Figura 12: Complexos formados a partir da condensação indireta de tanino-antocianina mediada por acetaldéido. ....	21
Figura 13: Equilíbrio de piranoantocianidinas formadas a partir da ligação entre a malvidina-3-glucosídeo e 4-vinilfenol (R= -H) ou 4-vinilguaiacol (R=-OCH <sub>3</sub> ). ....	22
Figura 14: Estrutura do ácido elágico e elagitaninos.....	23
Figura 15: Ensaio realizado para a casta Alfrocheiro.....	38
Figura 16: Ensaio realizado para a casta Touriga Nacional. ....	39
Figura 17: Esquema geral da vinificação e dos tratamentos efetuados nos ensaios ao longo da vinificação.....	41
Figura 18: Teores alcoólicos dos vinhos de Pmin e Pman das castas Alf e TN.....	54
Figura 19: Dióxido de enxofre livre (expresso em ppm) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	55

Figura 20: Evolução da acidez volátil (expressa em g/L eq. ácido acético) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	56
Figura 21: Evolução da acidez total (expressa em g/L eq. ácido tartárico) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	57
Figura 22: Evolução da densidade ótica a 280 nm dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo das 34 semanas do envelhecimento após a fermentação alcoólica.....	58
Figura 23: Evolução dos compostos fenólicos totais (expressos em g/L eq. ácido gálico) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	59
Figura 24: Evolução da atividade antioxidante (expresso em mM eq. trolox) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	61
Figura 25: Evolução das antocianinas totais (expressas mM) dos vinhos de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	61
Figura 26: Evolução das antocianinas poliméricas (expresso mM) dos vinhos obtidos a partir dos vinhos de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.....	62
Figura 27: Evolução das antocianinas livres (expresso mM) dos vinhos obtidos a partir dos vinhos de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.....	63
Figura 28: Evolução da intensidade de cor dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	65
Figura 29: Evolução da tonalidade dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	66
Figura 30: Evolução do L*, a* e b* dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica. ....	68
Figura 31: Análise sensorial dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN.....	69
Figura 32: Teores alcoólicos dos ensaios de Pmin e Pman da casta Alf que sofreram a adição de produtos enológicos. ....	72

Figura 33: Evolução da absorvância a 280 nm ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos. ....	73
Figura 34: Evolução da absorvância a 280 nm ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos. ....	73
Figura 35: Evolução dos compostos fenólicos totais ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos. ....	75
Figura 36: Evolução dos compostos fenólicos totais ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos. ....	75
Figura 37: Evolução da concentração de antocianinas totais (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios Pmin com a adição de produtos enológicos. ....	77
Figura 38: Evolução da concentração de antocianinas poliméricas (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos. ....	77
Figura 39: Evolução da concentração de antocianinas livres (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos. ....	78
Figura 40: Evolução da concentração de antocianinas totais (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos. ....	79
Figura 41: Evolução da concentração de antocianinas poliméricas (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos. ....	80
Figura 42: Evolução da concentração de antocianinas livres (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos. ....	81
Figura 43: Evolução da intensidade de cor (expressas UA) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor. ....	85

Figura 44: Evolução da tonalidade ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.....	85
Figura 45 Evolução da intensidade de cor ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.....	86
Figura 46: Evolução da tonalidade ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos.....	87
Figura 47: Evolução do L*, a* e b* ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos. ....	88
Figura 48: Evolução do L*, a* e b* ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos. ....	89
Figura 49: Análise sensorial dos vinhos engarrafados de Pmin com a adição de produtos enológicos.....	90
Figura 50: Análise sensorial dos vinhos engarrafados de Pman com a adição de produtos enológicos.....	92
Figura 51: Folha utilizada na prova organolética dos vinhos.....	110
Figura 52: Evolução da massa volúmica do mosto (expressa em mg/mL) durante a fermentação alcoólica dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN. ....	110
Figura 53: Evolução da massa volúmica do mosto (expressa em mg/mL) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor. ....	110
Figura 54: Evolução da massa volúmica do mosto (expressa em mg/mL) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor. ....	111
Figura 55: Evolução do SO <sub>2</sub> (expressa em ppm) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica. ....	112
Figura 56: Evolução do SO <sub>2</sub> (expressa em ppm) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica. ....	113
Figura 57: Evolução da acidez volátil (expressa em g/L eq. ácido acético) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica. ....	113

Figura 58: Evolução da acidez volátil (expressa em g/L eq. ácido acético) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica. ....	114
Figura 59: Evolução da acidez total (expressa em g/L eq. ácido tartárico) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica. ....	114
Figura 60: Evolução da acidez total (expressa em g/L eq. ácido tartárico) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica. ....	115

# Índice de tabelas

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos das uvas dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN. ....	52
Tabela 2: Antocianinas monoméricas dos vinhos engarrafados Pmin e Pman das castas Alf e TN.....	64
Tabela 3: Antocianinas monoméricas dos vinhos engarrafados Pmin com a adição de produtos enológicos.....	82
Tabela 4: Antocianinas monoméricas dos vinhos engarrafados de Pman com a adição de produtos enológicos.....	84

## **Lista de abreviaturas:**

**Alf:** Alfrocheiro

**manE:** ensaio poda manual com adição de enzima de maceração

**manETa:** ensaio poda manual com adição de enzima de maceração e tanino de estabilização de cor

**manT:** ensaio poda manual sem qualquer adição enológica

**manTa:** ensaio poda manual com adição de tanino de estabilização de cor

**minE:** ensaio poda mínima com adição de enzima de maceração

**minETa:** ensaio poda mínima com adição de enzima de maceração e tanino de estabilização de cor

**minT:** ensaio poda mínima sem qualquer adição enológica

**minTa:** ensaio poda mínima com adição de tanino de estabilização de cor

**Pman:** poda manual

**Pmin:** poda mínima

**TN:** Touriga Nacional







# **1 - Revisão bibliográfica**



## **Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto**



## 1.1 - Impacto da cor dos vinhos tintos

A qualidade de um vinho relaciona o conjunto de sensações que este origina no seu consumidor, sendo as mais importantes as percebidas pela visão, olfato e paladar. Durante a produção de um vinho, estes fatores organoléticos são tomados em conta de forma a equilibrar o conjunto das diferentes sensações provocadas no consumidor.

A percepção visual é o primeiro contacto que o consumidor tem com um vinho, sendo este um fator decisivo na sua preferência (1). Na sua imagem estão incluídas as características intrínsecas de cor e turbidez bem como as características extrínsecas de embalagem e rótulo. A cor é uma característica muito importante nos vinhos. Das diferentes formas de os categorizar, a referência à sua cor é a mais vulgar, separando-os em vinhos brancos, tintos e rosés (**Fig.1**). Estes não diferem entre si apenas na coloração. De facto existem grandes diferenças nas restantes propriedades organoléticas, porém trata-se da forma mais simples e imediata de os identificar.



**Figura 1: Exemplo de garrafas de vinhos branco, rosé e tinto.**

A cor poderá antecipar alguma informação sobre o aroma e sabor, especialmente nos vinhos tintos (2), visto o tipo de moléculas responsáveis pela cor e pelas restantes propriedades organoléticas apresentarem similaridades e a sua ocorrência ser a mesma, para além da sua interação. A cor dos vinhos pode também identificar a sua região e a sua identidade ao nível de castas utilizadas (3). Poderá também fornecer informações sobre outras características dos vinhos como o nível de oxidação e outros defeitos, estrutura,



condições de conservação, idade, entre outros. A avaliação da cor dos vinhos tintos é essencial para a avaliação qualitativa de um vinho (4).

A composição química que determina a cor dos vinhos tintos engloba várias famílias de compostos fenólicos, destacando-se as antocianinas e as proantocianidinas ou taninos condensados. Estas moléculas encontram-se nas partes sólidas (película e grainhas) das uvas. A sua presença nos produtos finais depende dos processos enológicos adotados que, para além da própria identidade molecular da casta, determinam os seus teores finais e influência na cor do vinho. Devido à sua elevada reatividade, encontram-se envolvidos em inúmeras reações químicas ao longo das várias etapas de vinificação e envelhecimento dos vinhos tintos. Dessa forma se explica a evolução natural da cor dos vinhos tintos cujo aspeto inicial é muito diferente daquele passados alguns anos de envelhecimento.

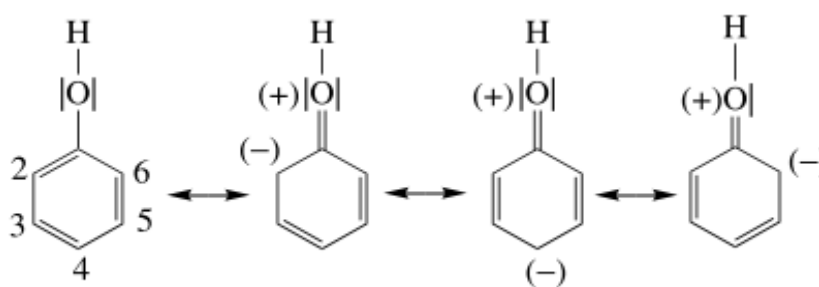
## **1.2 - A composição fenólica das uvas tintas e a sua contribuição para a cor dos vinhos tintos.**

A composição química das uvas varia com as condições ambientais a que são sujeitas durante a sua maturação e crescimento bem com as práticas de cultura utilizadas. A humidade, calor, exposição ao sol, nutrientes, entre outros, são fatores que têm impacto nas características físico-químicas das uvas e conseqüentemente nos vinhos (5).

O metabolismo pode ser definido como o conjunto de reações químicas que ocorrem num organismo vivo. Existem reações químicas comuns a todos os seres vivos, envolvidas em processos vitais como crescimento e desenvolvimento, e reações específicas de cada espécie que dependem das suas condições de sobrevivência. O conjunto deste segundo tipo de reações químicas é apelidado de metabolismo secundário, cujos os metabolitos constituem a grande diversidade molecular existente na natureza. Estes apresentam funções na sinalização celular, defesa contra predadores e patogénicos, proteção contra o stress oxidativo, entre outros. Na natureza encontram-se englobados nos metabolitos secundários os compostos fenólicos. A presença dos compostos corados ou/que intervêm na cor das uvas, e posteriormente dos seus vinhos, é uma consequência do metabolismo secundário das uvas, mais propriamente da composição em compostos fenólicos e das suas subfamílias de compostos (6).



Os compostos fenólicos são uma família de compostos cujo interesse tem vindo a aumentar muito nos últimos anos devido às suas atividades biológicas e ao impacto que a sua presença tem nas características sensoriais e qualidade dos vinhos (7). Estruturalmente, os compostos fenólicos contêm um anel benzénico substituído por um ou mais grupos hidroxilo e que, consoante o seu esqueleto carbonado poderão ser flavonóides ou não-flavonóides (8). Este tipo de compostos é muito reativo devido ao deslocamento dos pares de eletrões do grupo benzénico cuja conjugação com os dupletos livres do grupo hidroxilo poderá levar à formação de uma carga positiva no oxigénio (eletrofílico) e uma carga negativa num dos carbonos em posição *orto* ou no carbono em posição *para* em relação ao grupo hidroxilo, facilmente atuando como agente nucleofílico (**Fig.2**). É esta característica de ressonância típica dos compostos fenólicos a responsável pelo poder antioxidante desta família de compostos e pela sua reatividade ao longo do envelhecimento dos vinhos com impacto nas suas propriedades organoléticas (9).



**Figura 2: Estrutura de ressonância do anel benzénico (8).**

O aclamado paradoxo francês (10), um estudo feito em habitantes franceses que relacionou o menor impacto de doenças cardiovasculares em consumidores regulares de vinho, despertou o interesse neste tema. Nos últimos anos as áreas de investigação de química alimentar, nutricional e mesmo o próprio consumidor têm procurado aumentar o seu conhecimento sobre esta família de metabolitos presentes nos vinhos e nos alimentos em geral e o efeito biológico provocado pelo seu consumo (11–14).

A composição fenólica das uvas é constituída pelos flavonóides e pelos não flavonóides. Estes encontram-se distribuídos de forma desigual nas diferentes partes da uva. Os flavonóides estão presentes maioritariamente nas partes sólidas. As proantocianidinas são encontradas tanto nas grainhas como na película. As antocianinas e



os flavonóis apenas estão presentes na película assim como os ácidos fenólicos e estilbenos. Os estilbenos estão também presentes na polpa (5).

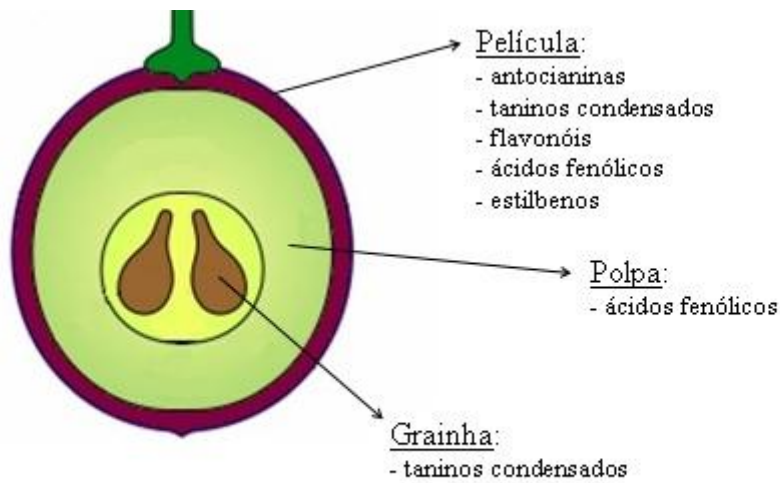


Figura 3: Distribuição dos compostos fenólicos nas uvas (5).

### 1.2.1 - Flavonóides

Os flavonóides constituem a grande maioria dos compostos fenólicos presentes no vinho tinto e apresentam um contributo importante na cor, aroma, sabor e adstringência das uvas (8,15,16). Apesar do próprio nome, do latim *flavus* que significa amarelo, indicar que a sua presença representa um contributo na cor, convém desde já ressaltar que nem todos os flavonóides apresentam coloração amarela.

A estrutura dos flavonóides (fig.4) é caracterizada como sendo tricíclica, definida por  $C_6-C_3-C_6$  contendo dois anéis benzénicos (anéis A e B) ligados por 3 carbonos na forma heterocíclica oxigenada em anel pirano (anel C). O estado de oxidação do anel pirano permite dividir os flavonóides em diferentes subfamílias. Nestas, as diferenças estruturais encontradas são devidas ao número/localização dos grupos hidroxilo ou metoxilo no anel B o que lhes garante diferentes propriedades e atividades. Os flavonóides podem ser também encontrados na forma *O*-glicosilada, cujo glicosídeo pode conter um grupo acilo. A presença destes grupos diminui a sua reatividade e aumenta a polaridade, traduzindo-se no aumento da solubilidade de forma a serem armazenados nos vacúolos das



células vegetais. Os flavonóides podem ainda ser encontrados na forma de monómeros (forma livre) ou polimerizados com outros flavonóides ou não flavonóides (7,17).

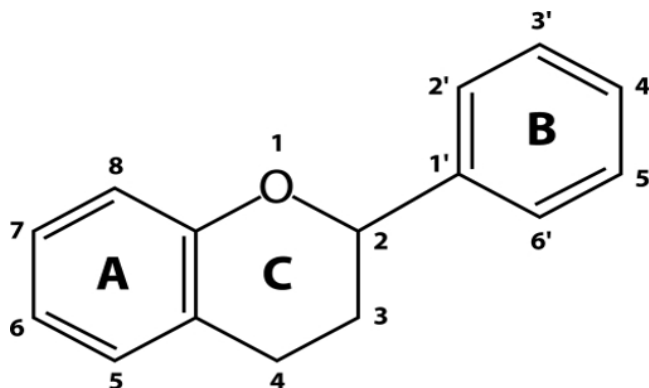


Figura 4: Esqueleto carbonado  $C_6-C_3-C_6$  dos flavonóides (17).

As antocianinas, flavan-3-óis e flavonóis são as famílias de flavonóides presentes em maiores quantidades nas uvas sendo também estas as mais importantes, por esta ordem, em relação à sua cor e dos seus vinhos. As flavonas e os flavanonois aparecem em quantidades vestigiais e não têm importância para a cor dos vinhos (7).

### 1.2.1.1 - Antocianinas

As antocianinas, do grego *anthos* que significa flor e *kianus* que significa azul, são o maior grupo de pigmentos polifenólicos e os grandes responsáveis pela coloração das uvas tintas e dos vinhos tintos jovens (18,19). Nas uvas, encontram-se exclusivamente nas películas das castas tintas (20) com exceção das castas do tipo *teinturier* onde são também encontradas na polpa (21). Ao contrário dos restantes flavonóides, as antocianinas por si só não contribuem para o aroma e adstringência dos vinhos. Porém, a sua interação com outros polifenóis poderá alterar as propriedades organolépticas.

Este grupo de compostos diferencia-se dos restantes flavonóides por apresentarem carga positiva a pH ácido. O seu anel heterocíclico oxigenado (anel C) encontra-se na forma insaturada conferindo-lhe carga positiva, sendo denominado de catião flavílico. O pH é determinante na estrutura das antocianinas monoméricas e na sua cor. Tanto nos vacúolos das células vegetais como nos vinhos são encontradas num equilíbrio dinâmico de 5 estruturas moleculares que incluem o catião flavílico, uma base quinoidal, uma



pseudobase carbinol, e as calconas *E* ou *Z* (**Fig.5**). Em soluções muito ácidas ( $\text{pH} < 2$ ) predomina a forma de catião flavílico que tem coloração vermelha. O aumento do pH leva a que as antocianinas na forma de catião flavílico sofram uma das duas reações seguintes: ácido base originando a base quinoidal azul violeta ou hidratação originando o carbinol incolor. Quando o pH é superior a 4, a cor que predomina varia entre o azul e púrpura. As antocianinas na forma de carbinol poderão ainda sofrer rearranjos com abertura do anel heterocíclico formando calconas de coloração amarelo pálidas (meios neutro-alcalinos). A  $20^\circ\text{C}$  e a pH 3.5 (o intervalo de pH nos vinhos tintos é 3-4), 12% das antocianinas livres estão na forma de catião flavílico (vermelho), 45% na forma da pseudobase carbinol (incolor), 15% na forma da base quinoidal (azul) e 28% na forma de calconas (amarelo pálido) (8,22).

As antocianinas na forma aglicona são denominadas de antocianidinas. Até à poucos anos pensava-se que a glicosilação apenas ocorresse em  $\text{C}_3$ . Porém, Os avanços analíticos permitiram isolar antocianidinas diglicosiladas encontradas em quantidades vestigiais em que a segunda glicosilação ocorre em  $\text{C}_5$  ou  $\text{C}_7$ . As antocianinas diglicosiladas apenas ocorrem em uvas de videiras não *Vitis vinifera L.*. As acilações que ocorrem no seu açúcar dão-se por esterificação com os ácidos acético, *p*-cumárico ou cafeico (23).

Estudos nas espécies *Vitis vinifera* permitiram identificar 6 tipos de antocianidinas 3-*O*-monoglicosiladas de diferentes comprimentos de onda máximos de absorção. Estas encontram-se em todos os tipos de castas, variando apenas a sua proporção relativa entre elas. A mais abundante é a malvidina-3-*O*-monoglucosídeo (50-90%) e a menos abundante a pelargonidina-3-*O*-monoglucosídeo (22) (**Fig.5**).



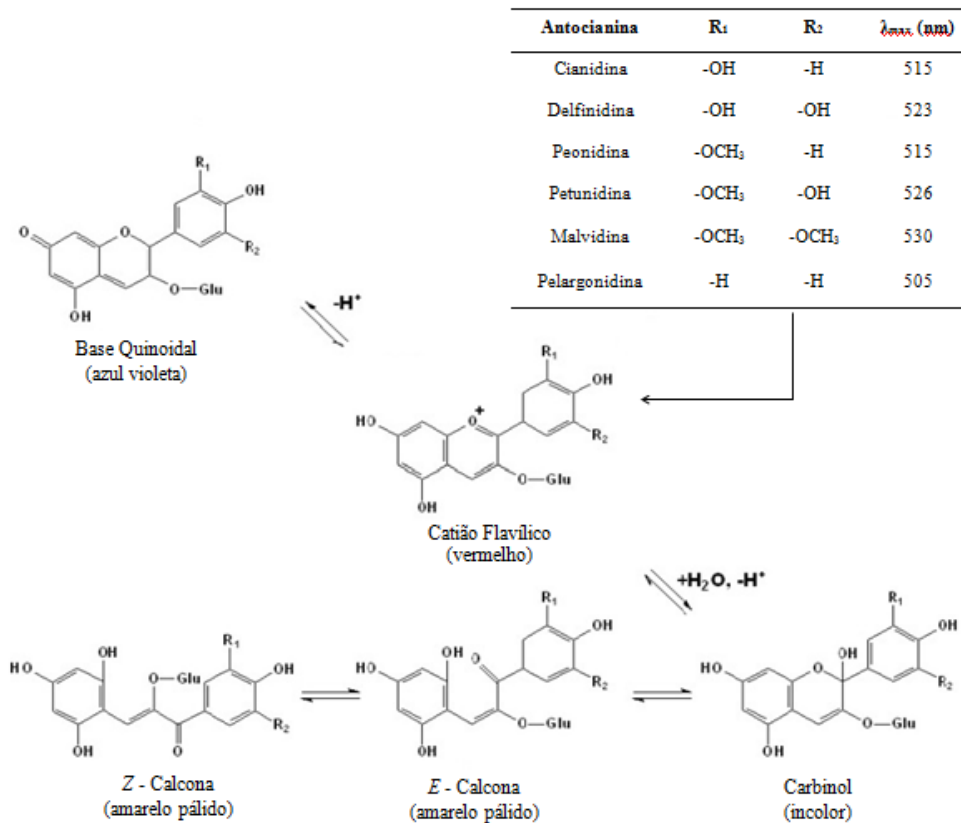


Figura 5: Equilíbrio de ressonância das antocianinas dependente do pH e a nomenclatura da forma de catião flavílico e respetivo  $\lambda$  max.

### 1.2.1.2 - Flavan-3-óis e taninos condensados

Os flavan-3-óis são flavonóides incolores presentes nas partes sólidas das uvas (película e grainha) na forma de monómeros, oligómeros e polímeros. Os oligómeros e polímeros são também denominados de proantocianidinas ou taninos condensados.

Tanto nas uvas como nos vinhos encontram-se descritas 4 formas monoméricas de flavan-3-óis: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina e (-)-epigalocatequina (fig.6). O anel B das primeiras duas apenas apresentam grupos hidroxilo em C<sub>3'</sub> e C<sub>4'</sub> enquanto as restantes apresentam também um terceiro grupo hidroxilo em C<sub>5'</sub>. Devido à estereoquímica dos carbonos quirais C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> estes agrupam-se em dois pares de diastereoisómeros cujas configurações são 2R:3S para a (+)-catequina e (+)-galocatequina, e 2R:3R para a (-)-epicatequina e (-)-epigalocatequina. São descritas esterificações com o ácido gálico em C3 na (+)-catequina, (+)-galocatequina e (-)-epicatequina (24).



Os flavan-3-óis são mais abundantes na forma de oligómeros ou polímeros. Nesta forma, apresentam uma contribuição fundamental na cor dos vinhos, pois, apesar de serem incolores, irão interagir com as antocianinas formando novos pigmentos durante o envelhecimento dos vinhos tintos (7).

Os flavan-3-óis têm ainda a capacidade de precipitar proteínas, sendo por isso também denominados de taninos. O termo tanino refere-se a um conjunto bastante diversificado de biomoléculas dispersas pelo reino vegetal com capacidade de precipitar alcalóides e proteínas. Estruturalmente os taninos poderão ser definidos como polímeros de compostos fenólicos com massa molecular entre 500 e 3000  $\text{gmol}^{-1}$  (8). É esta propriedade de precipitar proteínas dos taninos que garante a sua intervenção na proteção das plantas contra patogéneos e predadores. A adstringência dos vinhos é também devida a elevados teores destes compostos que precipitam as enzimas salivares (25).

Os taninos podem ser divididos em taninos hidrolisáveis, taninos condensados e taninos mistos ou complexos consoante o tipo de monómeros que os constituem. Porém os taninos condensados são o único tipo de taninos presente nas uvas da espécie *Vitis vinifera*. Dependendo de práticas enológicas utilizadas poderão surgir os restantes tipo de taninos nos vinhos (ver secção 1.4.2).

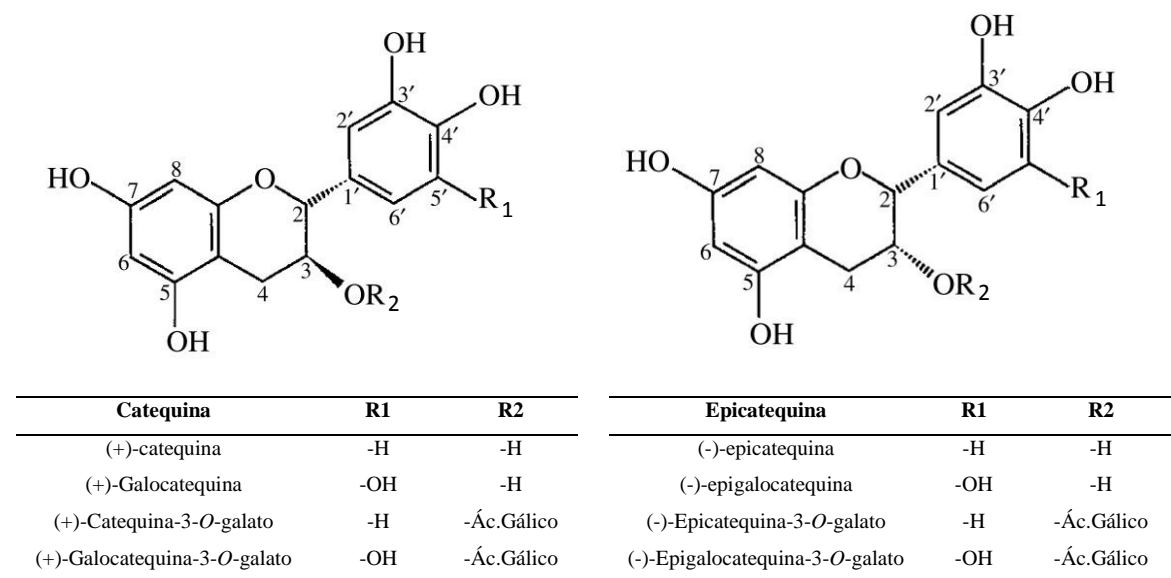


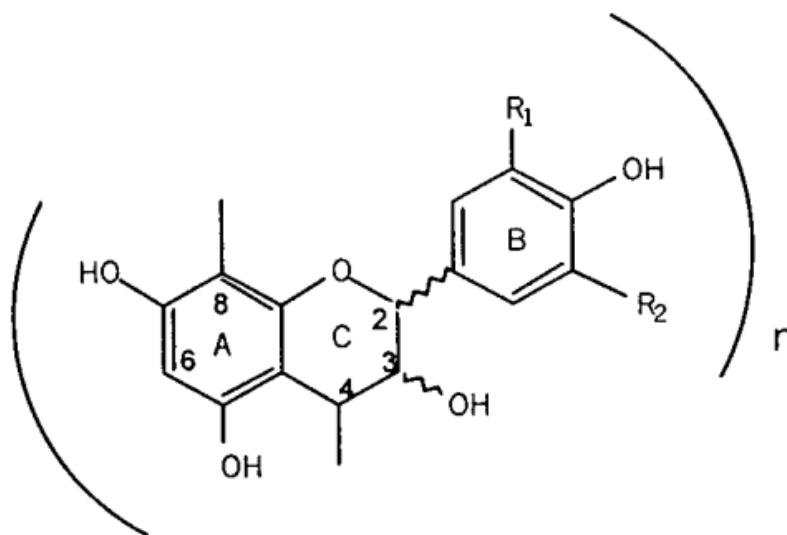
Figura 6: Estrutura dos flavanóis monoméricos da série da (+)-catequina e (-)epicatequina.

Os taninos condensados em meio ácido a quente libertam antocianidinas devido à quebra das suas ligações interflavânicas, sendo por essa razão denominadas de



proantocianidinas. São descritos dois tipos de proantocianidinas quanto ao tipo de antocianidina libertada. A procianidina é composta por (+)-catequina e (-)-epicatequina e a temperaturas elevadas em meio ácido liberta cianidina enquanto a prodelfinidina, composta por (+)-galocatequina e (-)-epigalocatequina, liberta a delphinidina. Foi identificada a ocorrência de proantocianidinas mistas, ou seja, contendo tanto (epi)-catequinas como (epi)-galocatequinas (7).

As proantocianidinas podem ser também distinguidas quanto ao tipo de ligação entre os seus resíduos e o seu grau de polimerização. A nomenclatura utiliza uma letra para caracterizar o número de monómeros seguida de um número caracterizando a ligação. São descritos dois tipos de ligações entre os resíduos de flavan-3-ol sendo a mais abundante do tipo C-C que ocorre entre o C<sub>4</sub> de um dos monómeros com o C<sub>6</sub> ou C<sub>8</sub> do outro (**fig.7**). A presença de ligações C-C caracteriza os dímeros do tipo B e trímeros do tipo C. É também descrita uma ligação éter (C-O-C) entre o C<sub>2</sub> de um dos monómeros ao grupo hidroxilo do C<sub>5</sub> ou C<sub>7</sub> do outro monómero e ocorre sempre em conjunto com uma ligação C<sub>4</sub>-C<sub>6/8</sub>, caracterizando os dímeros do tipo A. Os oligómeros de flavan-3-ol ocorrem quando existe ligação C<sub>4</sub>-C<sub>6/8</sub> entre 2 a 5 resíduos. Quando o grau de polimerização destes é superior a 5 a molécula encontra-se na forma polimérica.



**Figura 7:** Estrutura das proantocianidinas através de ligação C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> oligoméricas ( $2 \leq n \leq 5$ ) ou poliméricas ( $n \geq 6$ ). R<sub>1</sub>=-H e R<sub>2</sub>=-OH: procianidinas; R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=-OH: prodelfinidinas.

Esta subfamília de flavonóides encontra-se distribuída de forma desigual nas partes sólidas das uvas. As grainhas apresentam um teor mais elevado de proantocianidinas sendo



estas compostas por (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-3-*O*-galato, ou seja, apenas procianidinas. Apesar da menor quantidade presente nas películas, estas também poderão ser compostas por monómeros de (-)-epigallocatequina, (+)-galocatequina e (-)-epigallocatequina-3-*O*-galato, logo procianidinas e prodelfinidinas (25).

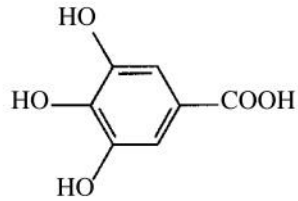
### 1.2.1.3 - Flavonóis

Os flavonóis apresentam uma coloração amarelada e diferenciam-se das restantes por apresentar uma insaturação entre o C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> juntamente com um grupo carbonilo em C<sub>4</sub>. Nas uvas são encontrados na forma glicosilada da quercetina, quempferol, miricetina e isorhamnetina. Nos vinhos podem aparecer na sua forma aglicona. A principal função atribuída a estes polifenóis é a proteção contra a radiação ultra-violeta. O seu contributo para a cor dos vinhos tintos deve-se aos fenómenos de copigmentação das antocianinas pois, apesar da sua coloração amarela, esta pouco influencia a cor dos vinhos tintos (7,8).

### 1.2.2 - Não flavonóides

Os compostos fenólicos não flavonóides presentes nas uvas incluem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e cinâmicos, e os estilbenos.

Os ácidos hidroxibenzóicos contêm um esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> e são encontrados na forma glicosilada e esterificada nas partes sólidas das uvas. O ácido gálico (fig. 8) , gentísico, *p*-hidroxibenzóico, protocatéquico, salicílico e vanílico são os ácidos hidroxibenzóicos identificados, diferindo entre si no número e localização das grupos hidroxilo no anel aromático. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem um esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> e são encontrados na película e polpa, esterificados com ácido tartárico e glucose. Como descrito anteriormente, as antocianinas aciladas podem encontrar-se esterificadas com os ácidos hidroxicinâmicos como os ácidos cumárico e cafeico. Estes compostos incolores irão ter uma contribuição na cor dos vinhos tintos através dos fenómenos de copigmentação intra e intermoleculares das antocianinas, na sua oxidação e formação de novos pigmentos.



**Figura 8: Estrutura do ácido gálico.**

Os estilbenos contêm um esqueleto carbonado  $C_6-C_2-C_6$  e são sintetizados pelas plantas em resposta a situações de stress como a radiação ultravioleta e infeções de fungos. Aparecem na forma de mono, di e tetra hidroxiestilbenos. Nos últimos anos, esta classe tem ganho notoriedade entre a comunidade científica devido aos seus potenciais e efeitos biológicos, sendo o resveratrol o composto bioativo mais estudado nos vinhos (26). Para além da prevenção da oxidação das antocianinas e dos fenómenos de copigmentação, esta classe de polifenóis não parece ter grande influência na cor dos vinhos tintos (27–29).



## 1.3 - Evolução da cor ao longo do processo de vinificação e envelhecimento dos vinhos tintos

### 1.3.1 - Extração dos compostos fenólicos durante a fermentação alcoólica

A vinificação é o conjunto de processos físico-químicos ocorridos na transformação das uvas em vinho (30). Tem início com a colheita das uvas que posteriormente são transportadas para a adega sofrendo aí as primeiras transformações físicas. No esmagamento, as películas das uvas são rompidas sendo libertada a sua polpa rica em açúcares redutores, num produto que se denomina de mosto. O esmagamento das uvas pode ser efetuado de diversas formas, desde o modo arcaico de pisa durante várias horas até à passagem das uvas por um esmagador eletrónico durante poucos segundos.

No mosto ocorre a fermentação alcoólica, genericamente definida como a transformação biológica dos açúcares monoméricos da polpa da uva (glucose e frutose) em etanol e dióxido de carbono, ocorrendo a libertação de energia sob a forma de calor. Este processo é realizado pelo metabolismo de leveduras, sendo as mais utilizadas do género *Saccharomyces* e que podem estar presentes na própria uva ou serem adicionadas. É necessário durante a vinificação um controlo rigoroso da temperatura em que esta ocorre, prevenindo a sua paragem, no caso de temperaturas extremas. Quando a quantidade de açúcares fermentáveis se torna reduzida, as leveduras ficam privadas do seu nutriente principal, terminando assim a fermentação (31,32).

A principal diferença no processo de vinificação entre vinhos tintos, brancos e rosés ocorre durante a fermentação alcoólica. Nos vinhos brancos e rosés, após o esmagamento, promove-se o mínimo contacto entre o mosto e as partes sólidas das uvas, grainhas e películas, sendo estas removidas por decantação antes do início da fermentação alcoólica. Contrariamente, na vinificação dos vinhos tintos, tanto as grainhas como as películas permanecem em contacto com o mosto durante a fermentação alcoólica. O contacto do mosto com as massas durante 8 a 10 dias, tempo médio de fermentação alcoólica, com períodos de remontagem (homogeneização dos componentes do mosto) regulares promove uma maior extração dos flavonóides para o mosto, intensificando a cor dos vinhos tintos (33).



A extração da maioria das antocianinas por difusão das partes sólidas ocorre nos primeiros dias da fermentação. Nesta altura, verifica-se uma subida acentuada da intensidade de cor do mosto, atingindo o seu pico por volta do 3º ou 4º dia e diminuindo nos seguintes. Esse fenómeno é explicado pela baixa estabilidade das antocianinas em meios aquosos e interação com os restantes polifenóis, fenómeno de copigmentação (ver secção 1.3.3.1), reduzindo a sua cor.

A remontagem assume um papel fundamental não só na extração dos compostos fenólicos (34) como para evitar a paragem da fermentação ou formação de compostos indesejados. A densidade das grainhas é superior à densidade das películas, acabando por se depositarem no fundo do depósito enquanto as películas formam uma camada superior minimizando o contato e a consequente extração dos compostos fenólicos. Esta barreira seca promove a acumulação de compostos voláteis e o aumento de temperatura. Remontagens periódicas são efetuadas para garantir uma destruição uniforme das partes sólidas por todo o depósito, maximizando o contato entre as massas e mosto, garantindo também o arejamento e a dissipação de calor. A remontagem é também importante na inibição do crescimento indesejado do segundo tipo de microrganismos, tais como as bactérias lácticas (35) e acéticas (36).

O teor alcoólico do mosto tem influência na extração da cor (37) uma vez que a extração dos pigmentos corados aumenta com o aumento do teor alcoólico (38). A película é revestida externamente por uma camada lipídica, a cutícula, que limita a transferência de compostos entre o interior da uva e o meio externo. Estruturalmente, é constituída por uma matriz polimérica de ácidos gordos hidroxilados na forma esterificada, chamada cutina (39). O etanol formado durante a fermentação atua como solvente orgânico sobre esta camada dissolvendo-a e promovendo uma maior extração dos compostos fenólicos, aumentando a cor do vinho. O etanol parece ter o mesmo efeito sobre as membranas plasmáticas dos vacúolos, dissolvendo-as e libertando mais facilmente o seu conteúdo.

O dióxido de enxofre que é adicionado durante o esmagamento das uvas como agente antisséptico parece favorecer a extração dos pigmentos vermelhos das películas e de outros polifenóis para o mosto (40).

No mosto ocorrem também reações de oxidação de antocianinas e dos restantes compostos fenólicos fenómenos que levam à diminuição da cor. A ocorrência deste tipo de reações no mosto é catalisada pela polifenoloxidase proveniente das uvas e leveduras. No mosto, os principais alvos da polifenoloxidase são os ácidos cafeoiltartárico e *p*-



cumaroiltartárico, convertendo-os nas respectivas quinonas, moléculas extremamente reativas que irão rapidamente interagir com outros compostos, incluindo as antocianinas (**fig.9**). Encontram-se descritos dois mecanismos de interação entre as quinonas e as antocianinas: reação de oxidação-redução em que as antocianinas são oxidadas a quinonas incolores, regenerando os ácidos, e reações de condensação, nas quais as antocianinas na sua forma hemiacetal atuam como agente neutrófilo sobre as quinonas pelo C<sub>6</sub> ou C<sub>8</sub> originando um produto incolor que fica em equilíbrio com a sua forma de catião flavílico (7,41).

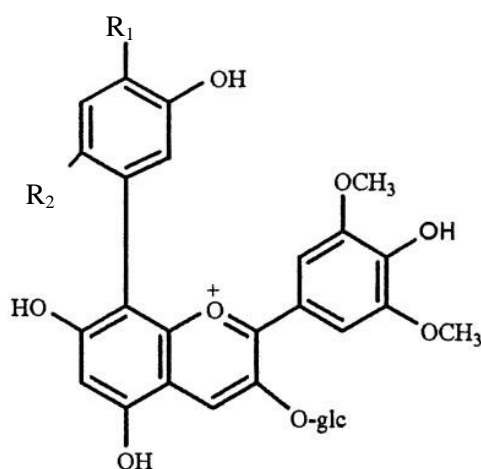


Figura 9: Produtos da condensação entre a forma oxidada do ácido cafeioriltartárico (R<sub>1</sub>=-OH) e ácido p-cumaroiltartárico (9).

### 1.3.2 - Fatores que influenciam a cor dos vinhos tintos

Durante o envelhecimento dos vinhos tintos, existem vários fatores físico-químicos que influenciam a sua cor. A forma como estes são armazenados apresenta um papel relevante na sua preservação e prevenção de características indesejáveis. Para além disso, alguns fatores intrínsecos têm também um grande impacto na cor.

A própria casta e a sua composição fenólica é determinante para as diferenças verificadas na cor dos diferentes vinhos tintos (42). A diversidade de castas tintas origina uma grande diferença qualitativa e quantitativa de antocianinas presentes no vinho. O equilíbrio das diversas formas estruturais destes está fortemente dependente do pH do





meio. A temperatura de armazenamento é também um fator a considerar pois o seu aumento elevação parece estimular a reatividade das antocianinas ou a degradação (7).

O dióxido de enxofre é utilizado na indústria vitivinícola graças às suas propriedades de antisséptico e antioxidante, sendo essencial na conservação dos vinhos. A adição do dióxido de enxofre no vinho apresenta duas consequências distintas na cor: 1) promove maior extração de polifenóis e a sua atividade antioxidante resulta na proteção das antocianinas da oxidação, evitando a diminuição da intensidade de cor; 2) reage com as antocianinas atuando como nucleófilo em C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> e origina o respetivo flaveno bissulfito incolor, diminuindo a intensidade de cor. No entanto, esta reação é facilmente reversível. Por exemplo, com a presença de acetaldeído ou outros agentes preferencialmente oxidados pelo dióxido de enxofre, liberta a antocianina e recupera a sua cor (40,43,44).

Para além da fermentação alcoólica do mosto, nos vinhos tintos ocorre também a fermentação malolática. A fermentação malolática é realizada pelas bactérias lácticas, convertendo o ácido málico do meio em ácido láctico e dióxido de carbono (45). Esta transformação influencia as propriedades sensoriais dos vinhos tintos no geral. Sob o ponto de vista enológico, a fermentação malolática encontra-se finalizada quando a concentração de ácido málico é nula. Estruturalmente, os ácidos málico e láctico diferem no número de grupo carboxílicos, sendo que o primeiro apresenta dois grupos carboxílicos e o segundo apenas um. A fermentação malolática leva à diminuição dos grupos carboxílicos presentes no meio e, por conseguinte, à diminuição da acidez total dos vinhos tintos (46).

Ao longo do envelhecimento dos vinhos ocorrem inúmeras reações em que intervêm os compostos fenólicos no geral, quer na oxidação ou formação de pigmentos mais estáveis derivados de antocianinas. As reações de oxidação que são promovidas pela presença de oxigénio têm consequências negativas na cor dos vinhos.

### 1.3.3 - Reações das antocianinas

Inúmeros estudos referem o decaimento do teor de antocianinas ao longo do envelhecimento dos vinhos apesar da cor vermelha continuar presente. Este facto é devido às constantes interações entre as antocianinas e outros polifenóis ou moléculas presentes no meio levando à formação novos pigmentos. Estes produtos, apesar de apresentarem ligeiras



variações de cor em relação à cor original manifestada pelas antocianinas, são bastante mais estáveis e perduram durante muitos anos (19,23).

### 1.3.3.1 - Copigmentação de antocianinas

O fenómeno de copigmentação é importante na estabilização da cor das antocianinas livres. Na presença de água a sua estrutura tenderá para a pseudobase carbinol incolor. Porém, estas encontram-se em permanente interação com outros componentes dos vinhos, o que resulta tanto na mudança de cor para o violeta (efeito batocrómico) como no aumento da sua intensidade de cor (efeito hiperocrómico) (47). A copigmentação intermolecular previne a hidratação do catião flavílico vermelho e a sua conversão para a sua forma de carbinol incolor. Esta interação altera a ressonância do catião flavílico protegendo a substituição em C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>, levando a mudança da cor vermelha para azul ou violeta. Encontram-se descritos quase 30 cofatores presentes nos vinhos incluindo vários minerais, flavonóides, não flavonóides, aminoácidos e ácidos orgânicos (48). As interações entre as antocianinas e os cofatores de copigmentação são geralmente de baixa energia, normalmente através de pontes de hidrogénio ou ligações hidrofóbicas.

A copigmentação pode também ser intramolecular quando se encontram presentes dois ou mais grupos aromáticos no grupo glicosídico da antocianina atuando como os próprios cofatores (48). Em termos espaciais estes ordenam-se num plano superior e inferior encontrando-se o anel heterocíclico oxigenado de carga positiva no plano intermédio, sob a forma de uma 'sandwich' (49). Os grupos aromáticos ricos em eletrões interagem com a deficiência de eletrões do anel C do catião flavílico, protegendo desta forma a hidratação do C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub> e inibindo a transformação para a forma de carbinol incolor (50). O tipo de grupos aromáticos e a sua localização no grupo glicosídico influenciam a eficiência da copigmentação intramolecular (48,50). A copigmentação intramolecular é mais eficiente na proteção contra a hidratação da antocianina que a copigmentação intermolecular.

As reações de copigmentação dependem de vários fatores do meio: pH, temperatura, concentração de antocianinas e concentração e tipo de cofatores (50,51). A presença de solventes orgânicos como o etanol no meio parece inibir a formação destes

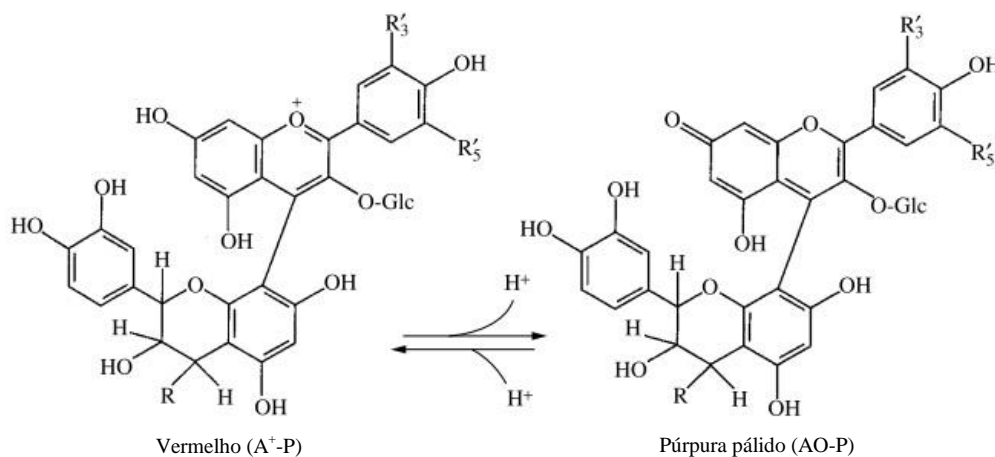


complexos, explicando assim o decréscimo de coloração do mosto a meio da fermentação alcoólica. Estes fenómenos ocorrem apenas em vinhos novos, quando ainda são encontradas antocianinas livres. Com o envelhecimento e transformação das antocianinas em pigmentos poliméricos há a diminuição da presença destes compostos na forma livre (48).

### 1.3.3.2 - Reações de condensação entre antocianinas e taninos condensados

As reações de condensação entre antocianinas e proantocianidinas têm um papel fundamental na coloração dos vinhos a longo prazo. Neste tipo de reações, ocorre a incorporação de uma antocianina num oligómero ou polímero de flavan-3-ol, ficando a sua cor protegida na forma de um polímero mais estável em relação a novas reações químicas de hidratação. Existem 3 tipos de fenómenos de condensação entre antocianinas e taninos condensados.

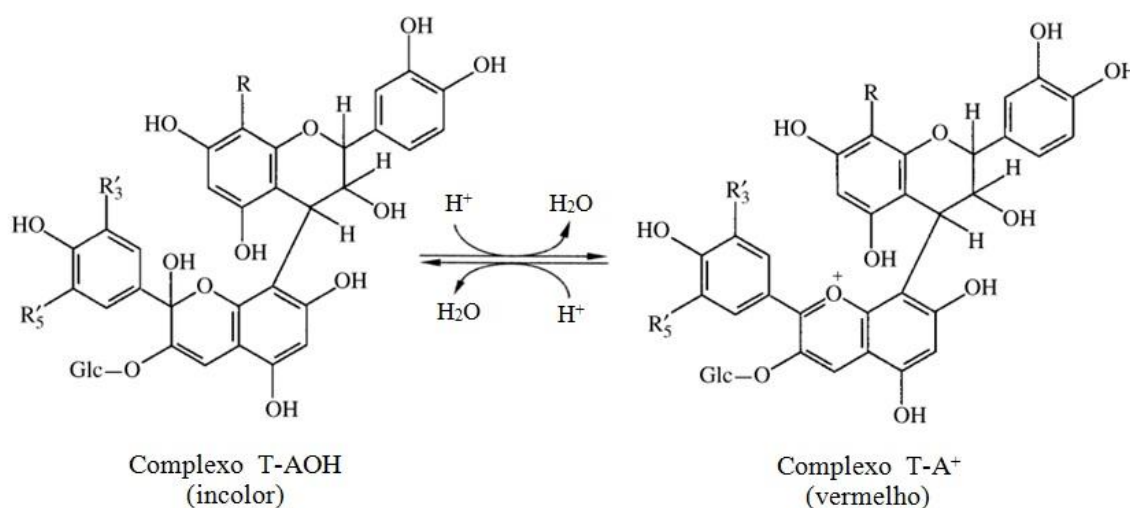
As reações de condensação direta da antocianina e tanino são iniciadas com o ataque nucleofílico do C<sub>6</sub> ou C<sub>8</sub> de um flavanol na forma oligomérica ao C<sub>4</sub> eletrofílico de uma antocianina na forma de catião flavílico. O produto formado é um flaveno incolor que oxida na presença de um agente oxidante (O<sub>2</sub> por exemplo) recuperando a sua cor. Os produtos finais encontram-se em equilíbrio na forma de pigmento vermelho (A<sup>+</sup>-P) e púrpura pálido (AO-P) (**fig.10**).



**Figura 10:** Compostos formados na condensação de antocianina→tanino.



O mecanismo proposto nas reações de condensação direta de tanino a antocianina inicia-se com o carbocátion formado aquando da clivagem ácida entre ligações de flavanóis que irá atuar como eletrofílico reagindo com o C<sub>6</sub> ou C<sub>8</sub> nucleofílico das antocianinas hidratadas na forma de hemiacetal. O produto formado é um complexo incolor que após desidratação é transformado num composto vermelho-alaranjado (**fig.11**). Este tipo de condensação ocorre sem a necessidade de oxidação e é promovido pelo aumento de temperatura (formação do carbocátion electrofílico) e da quantidade de substratos. Este tipo de condensação entre tanino e antocianina é típico quando o contacto entre o vinho e o oxigénio é mínimo, como acontece nos depósitos completamente cheios e nos vinhos após engarrafamento (52).



**Figura 11:** Cor dos complexos formados na condensação de tanino→antocianina.

A condensação entre as antocianinas e os taninos pode ocorrer de forma indireta e por intermédio de um grupo etilo (29,53). O acetaldeído aparece nos vinhos devido ao metabolismo das leveduras aquando da fermentação alcoólica e por oxidação do etanol durante envelhecimento. Este composto, na forma de carbocátion, reage com o C<sub>6</sub> ou C<sub>8</sub> do flavanol. O complexo acetaldeído-tanino formado, sofre desidratação, dando origem a um novo carbocátion que irá atuar sobre o C<sub>8</sub> da antocianina na forma de carbinol. O composto resultante (**fig.12**) é então estabilizado por desprotonação obtendo-se compostos com cor entre o violeta avermelhado e o laranja, dependendo do tipo de proantocianidina. Pensa-se



que este mecanismo ocorra também na ligação entre moléculas de flavan-3-ol mediadas pelo acetaldeído (27).

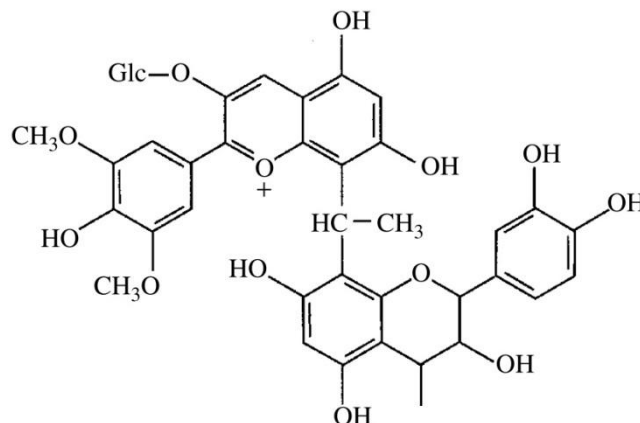


Figura 12: Complexos formados a partir da condensação indireta de tanino-antocianina mediada por acetaldeído.

### 1.3.3.3 - Piranoantocianinas

As piranoantocianinas são um grupo de pigmentos derivados das antocianinas que contribuem para o alaranjamento dos vinhos e que apresentam uma maior resistência às variações de pH e à presença de dióxido de enxofre livre. Estes resultam da cicloadição entre C<sub>4</sub> e o grupo hidroxilo do C<sub>5</sub> de antocianinas na forma de catião flavílico com compostos polares com duplas ligações. É descrita a participação do 4-vinilfenol e do 4-vinilguaiacol, metabolitos obtidos a partir da descarboxilação dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, respetivamente, pela enzima cinamato descarboxilase proveniente das leveduras. O acetaldeído (25), o piruvato (54) e os vinilflavanóis obtidos a partir da clivagem dos oligómeros flavanol-etil-flavanol ou por desidratação do flavano-etanol (formado após ataque do acetaldeído em C<sub>4</sub>) (55) são substratos na formação das piranoantocianinas.

O mecanismo proposto para a síntese das piranoantocianidinas refere o ataque do catião flavílico como eletrofílico em C<sub>4</sub> e nucleofílico no grupo hidroxilo em C<sub>5</sub> sobre a dupla ligação do metabolito alvo, seguido de desidratação e rearomatização por oxidação formando um novo anel (anel D). Os produtos resultantes encontram-se em equilíbrio de ressonância da forma vermelha e cor de tijolo (**fig.13**). A mudança de cor para o



alaranjado, típica de vinhos envelhecidos, é devida à formação destes novos pigmentos (56).

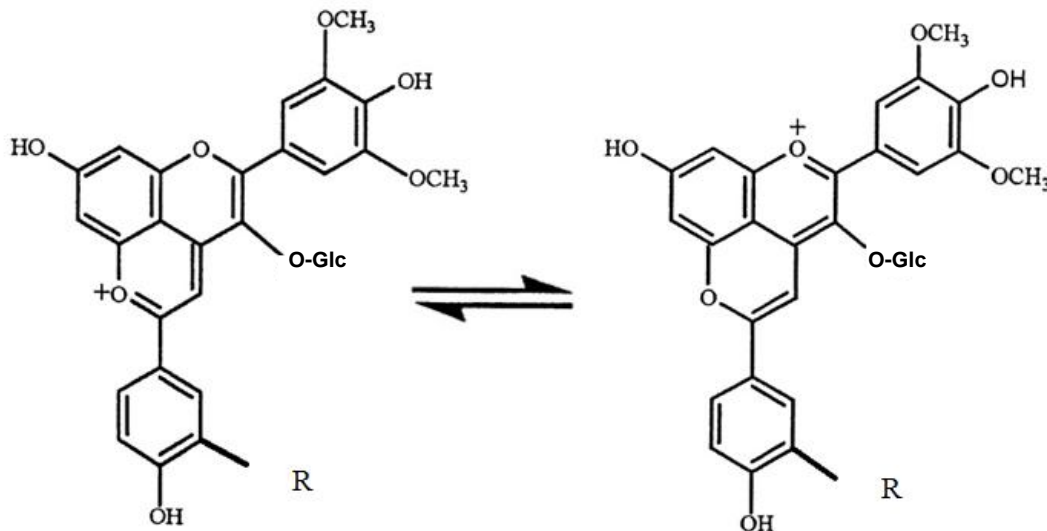


Figura 13: Equilíbrio de piranoantocianidinas formadas a partir da ligação entre a malvidina-3-glucosídeo e 4-vinilfenol (R= -H) ou 4-vinilguaiacol (R=-OCH<sub>3</sub>).

#### 1.3.3.4 - Envelhecimento em madeira

Os vinhos, durante o envelhecimento, podem ser sujeitos a estágios em barricas de madeira durante alguns meses de forma a melhorar as suas características organolépticas. O contacto das madeiras com soluções hidroalcoólicas irá promover a difusão de inúmeras moléculas, entre as quais os compostos fenólicos. Surge assim uma nova classe de taninos, não encontrados nas uvas mas cuja presença nos vinhos é recorrente, os taninos hidrolisáveis, que parecem ter também influência na cor. A adição de taninos comerciais e de lascas de madeira são outras práticas enológicas que resultam na sua presença nos vinhos.

Os taninos hidrolisáveis contêm uma molécula linear de glucose esterificada com resíduos de ácido gálico ou com o seu dímero, ácido elágico, denominando-se de galotaninos e elagitaninos (fig.14), respetivamente. Substituições com resíduos destes ácidos fenólicos mais complexos são também descritas. A ocorrência dos vários tipos de



taninos hidrolisáveis nos vinhos é dependente do tipo de madeira (a composição das madeiras francesas difere da composição das madeiras americanas). Os elagitaninos mais abundantes nas madeiras utilizadas são a vescalagina e a castalagina (8,17,57).

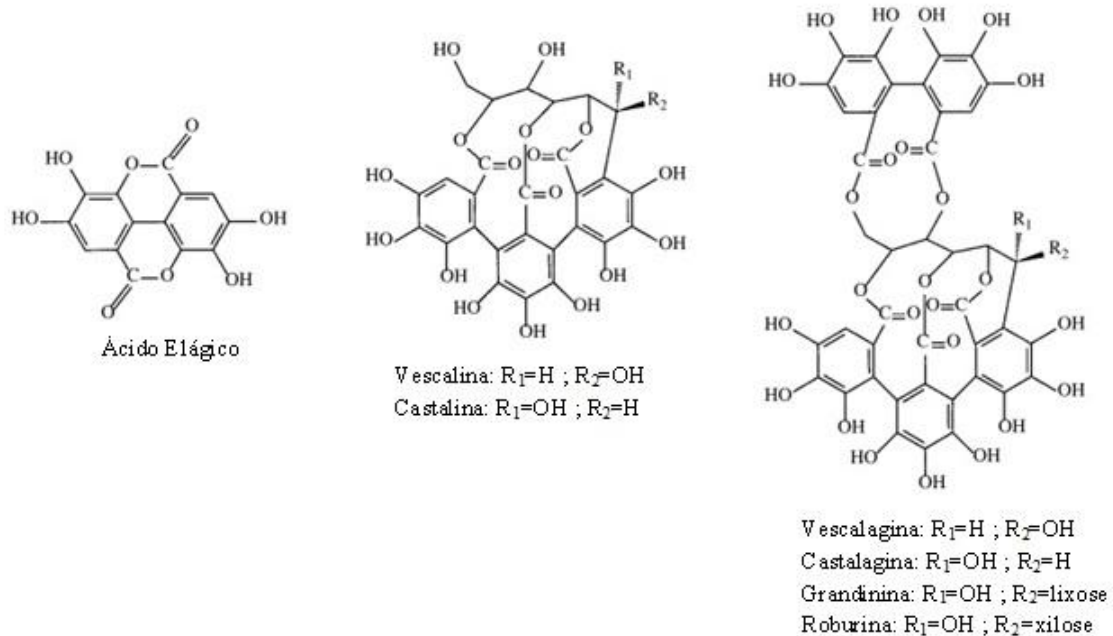


Figura 14: Estrutura do ácido elágico e elagitaninos (8).

O teor de antocianinas monoméricas decai mais rapidamente quando o seu estágio ocorre em barricas de madeira. Inicialmente esta diferença era atribuída à porosidade das barricas que permitia a entrada de oxigénio e favorecia a oxidação destes compostos (58). Mais recentemente, em soluções modelo hidroalcoólicas a pH 3,2 promoveu-se a reação entre malvidina-3-O-glicosídeo e a vescalina durante 4 meses à temperatura ambiente, formando-se um produto de condensação entre ambos, o antocianoelagitanino. A reação parece ocorrer quando a antocianina se encontra hidratada na estrutura de base carbinol. O composto resultante revelou ter uma cor vermelho escuro (59).



## 1.4 - Práticas enológicas que melhoram a cor dos vinhos tintos

Nos capítulos anteriores descreveram-se os metabolitos presentes nas uvas que irão influenciar a cor dos vinhos tintos, a sua presença e as suas interações que terão influencia na cor ao longo da vinificação e envelhecimento. Estes processos anteriormente descritos são praticamente comuns em todos os vinhos tintos, independentemente das práticas enológicas adotadas. No entanto, a evolução na área da análise química tem permitido uma maior compreensão destes fenómenos e elucidado a forma de intervir nas várias etapas com o objetivo de melhorar a cor dos vinhos tintos.

O desenvolvimento de produtos enológicos para o aperfeiçoamento das características organolépticas permite atingir níveis superiores de qualidade e de satisfação do consumidor. No mercado encontram-se inúmeros produtos enológicos com aplicação em diferentes fases do processo de vinificação e que originam diferentes características organolépticas no produto final, destacando-se a cor.

### 1.4.1 - Enzimas de maceração

As paredes das células da película da uva constituem uma barreira para a extração das antocianinas e outros compostos fenólicos para o mosto. Apesar de longos períodos de maceração possibilitarem uma maior libertação do conteúdo fenólico das células da película, por vezes a cor dos vinhos resultantes não corresponde às expectativas causadas pela concentração de antocianinas nas uvas. As diferenças na estrutura, rigidez e composição das paredes celulares das películas de diferentes castas apresentam uma grande influência na extração dos compostos e, conseqüentemente, nas propriedades cromáticas dos vinhos resultantes (60). As paredes celulares são compostas por polissacarídeos, compostos fenólicos e proteínas estabilizados entre si por ligações iónicas e covalentes. Os polissacarídeos presentes são a celulose (polímero insolúvel de  $\beta$ -(1→4)-glucose), a xiloglucana (polímero de  $\beta$ -(1→4)-glucose com ramificações em  $\alpha$ -(1→6) de resíduos de xilose) e os polissacarídeos pecticos homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (61–63).





A adição de preparados enzimáticos de maceração com atividades de celulases, hemicelulases e pectinases durante a fermentação dos vinhos tintos é uma prática enológica com vista ao aumento da extração dos compostos. Estes preparados são obtidos a partir do cultivo de fungos selecionados, *Aspergillus niger*, em meios ricos no polissacarídeo alvo da lise enzimática desejada, levando assim à elevada produção da enzima que é depois purificada e desidratada. A sua ação cliva algumas das ligações dos polissacarídeos das paredes celulares, alterando a sua estrutura e conformação, enfraquecendo-as e diminuindo a sua rigidez. Teoricamente, a ação destas enzimas possibilita uma maior extração dos compostos fenólicos das películas para o mosto, incluindo as antocianinas, e garantindo uma maior intensidade de cor nos vinhos. Porém, a sua aplicação poderá ter efeitos organoléticos indesejados como o aumento elevado da adstringência e amargura devido a uma extração exagerada de taninos condensados.

O efeito da aplicação deste tipo de produtos enológicos ao nível da cor resultante em vinhos tintos tem sido extensivamente estudado. Enquanto alguns preparados enzimáticos apresentam melhorias na cor e nas restantes qualidades organoléticas dos vinhos (64,65), outros parecem não surtir qualquer efeito (60,64), evidenciando-se mesmo efeitos negativos na extração excessiva de polifenóis em alguns dos casos. Esta aparente contradição poderá ser atribuída à diferente natureza dos preparados comerciais, o que resulta naturalmente em atividades enzimáticas distintas ou adversas ( $\beta$ -glucosidase ou fenol esterase). A legislação permite que este tipo de produtos apenas contenha no seu rótulo a informação essencial não elucidando completamente sobre a sua composição e origem. Assim, estudos serão necessários de forma a desmistificar completamente a composição deste tipo de produtos, a sua atividade e a eficiência da sua aplicação em diferentes tipos castas que apresentam variações significativas na composição e estrutura da parede celular das películas das uvas.

### 1.4.2 - Aplicação de taninos enológicos

A utilização de preparados de taninos comerciais tem sido uma prática enológica bastante recorrente. Estes preparados são compostos por taninos condensados, taninos hidrolisáveis, ou um misto de ambos. O objetivo da adição de taninos está relacionado com os processos de copigmentação e da prevenção da oxidação das antocianinas o que levaria



à sua descoloração. No caso dos taninos condensados, o efeito da sua adição é a estabilização da cor a longo prazo devido à formação de polímeros corados derivados de antocianinas e que apresentam uma maior resistência às condições do meio (pH, SO<sub>2</sub>) comparativamente com as antocianinas livres. No caso dos taninos hidrolisáveis a sua ação prende-se com a sua atividade antioxidante e fenómenos de copigmentação.

O rótulo deste tipo de produtos peca pela falta de informação sobre a sua composição e origem. Um estudo sobre a composição de 10 preparados de taninos enológicos revela uma grande diferença de composição polifenólica entre os diferentes produtos encontrados no mercado e mostram que, por vezes, a informação contida no rótulo não vai de encontro aos teores e tipos de compostos presentes nos produtos (66).

O estudo da aplicação de taninos comerciais tem também mostrado divergências quanto aos resultados obtidos em relação à cor dos vinhos. Enquanto em alguns casos a adição destes produtos realmente melhora as características cromáticas dos vinhos (60), em outros casos a sua adição parece não surtir qualquer efeito (28,64). A adição deste tipo de produtos enológicos requer assim muito cuidado por parte dos enólogos pois por um lado as quantidades adicionadas poderão não ser suficientes para surtir qualquer efeito e, por outro, a adição exagerada poderá levar a características organolépticas indesejadas, como o aumento da adstringência (64).



## **2 - Contextualização do trabalho**



## **Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto**



## 2.1 - Dão Sul

A Dão Sul é uma sociedade vitivinícola, cuja sede, a Quinta de Cabriz, está situada em Carregal do Sal, no distrito de Viseu. Desde a sua fundação, em 1989, tem apostado na divulgação dos vinhos Dão a nível nacional e internacional, possuindo uma posição de destaque no mercado dos vinhos desta região.

Para além da Quinta de Cabriz, também a Quinta dos Grilos e a Sociedade Agrícola de Santar são espaços vitivinícolas da Dão Sul na região Dão. O rápido crescimento da empresa levou-a para outras regiões. Na região dos Vinhos Verdes podemos encontrar a Quinta de Lourosa, no Douro a Quinta das Tecedeiras e a Quinta de Sá de Baixo (Encostas do Douro), na Bairrada a Quinta do Encontro, na Estremadura a quinta Martim Joannes Gradil e no Alentejo a Herdade de Monte da Cal. A Dão Sul também já expandiu a sua marca até ao vale de S. Francisco no Brasil.

Qualidade, segurança alimentar e ambiental são os princípios fundamentais que têm permitido a esta empresa a prosperidade juntamente com a sua relação fiel com o consumidor. Para além disso, os seus departamentos de inovação e marketing têm sempre procurado combater as exigências do mercado e abranger novas metas e novos destinos aos seus produtos.

## 2.2 - Castas tintas da zona do Dão

A área geográfica de produção de vinhos de ‘*Denominação de Origem Controlada*’ (DOC) do Dão situa-se a norte do centro de Portugal rodeada, a poente pelos picos do Caramulo e do Buçaco e a norte e leste pelas serras da Nave e da Estrela. Correspondendo a 20.000 ha de vinhas em solos graníticos com baixa fertilidade e com altitudes que variam entre os 400 e 500 m, esta região possui um clima bastante particular com invernos frios e chuvosos que contrastam com verões bastante quentes e secos (67,68). Em termos vinícolas é ainda uma zona sem a expressão de zonas como o Douro ou Alentejo mas que tem verificado uma grande evolução nos últimos anos. Dados de 2009 reportavam exportações de mais de 2,5 milhões de litros anuais, considerando apenas os vinhos tintos (69).



Os seus vinhos tintos são reconhecidos pela elevada qualidade com cor rubi, aroma intenso e frutado harmonizado com um sabor delicado, alto teor alcoólico e elevada acidez, que garantem o seu equilíbrio. As principais castas tintas utilizadas nos vinhos DOC Dão são Alfrocheiro, Alvarelhão, Aragonez, Bastardo, Jaen, Rufete, Tinto cão, Touriga nacional e Trincadeira (70). Apesar da presença deste conjunto de castas nos vinhos produzidos na Quinta de Cabriz, os seus estudos recaem fundamentalmente nas castas Alfrocheiro e Touriga Nacional.

A casta Alfrocheiro é uma casta de origem desconhecida, pensa-se que estrangeira, sendo apenas referenciada após a crise da filoxera. É referida uma utilização a nível nacional de 3%. Morfologicamente, os seus bagos são pequenos (1,1 g) e arredondados, de cor uniforme negro-azul e com uma película de espessura média. As grainhas são grandes e bem formadas. A sua maturação é média e precoce produzindo vinhos de teor alcoólico ligeiramente superior a 13%, acidez total bastante elevada e pH entre 3,0 e 3,5. Esta casta está associada a vinhos de qualidade e de intensidade de cor classificados em gama média/elevada, que nos vinhos jovens é descrita como granada intensa com reflexos violáceos e que evolui depressa para rubi. É uma casta multifacetada, com um bom potencial de envelhecimento (71).

A casta Touriga Nacional, por muitos considerada a casta rainha das tintas portuguesas, parece ter tido a sua origem nas terras do Dão, mais precisamente na aldeia de Tourigo. Esta casta é de extrema importância para os vinhos DOC Dão. Nos dias de hoje encontra-se bastante expandida tanto a nível nacional (todas as regiões) como a nível internacional (Espanha, África do Sul, Austrália, Califórnia e Brasil). Os seus bagos são pequenos (0,9-1,8 g), ligeiramente achatados e difíceis de destacar do engaço. A sua película negra-azul é rija e espessa e contém um número médio/elevado de grainhas (1-3/bago). Os vinhos resultantes apresentam teor alcoólico elevado (14%) e acidez total média-alta (4,5-6,0 g/L). A cor dos seus vinhos, quando novos, é descrita como retinta intensa, com tonalidades violáceas (72).

### **2.3 - Poda mínima**

As práticas vitícolas têm uma grande importância na composição química das uvas. A poda, que compreende um conjunto de operações que se efetuam na planta e que consistem na supressão parcial do sistema vegetativo lenhoso (poda seca ou de inverno) ou



herbáceo (poda verde), é um desses exemplos (73). A poda seca é a de maior importância, sendo a realizada após a queda das folhas durante os meses de dezembro, janeiro e fevereiro e a que maior impacto tem na videira e nos seus frutos. Esta prática é fundamental no mundo vitivinícola, quer a nível caseiro, quer a nível industrial, inclusivamente na Dão Sul.

Os princípios da poda de inverno assentam na regularização do crescimento vegetativo e reprodutivo da videira, relacionando-a com as características intrínsecas da casta em uso (genético) e com as condições ambientais, assegurando por um lado uma produção suficiente de uvas de qualidade, e por outro a manutenção das suas características ao longo de várias colheitas. Devido à capacidade de se adaptarem de forma eficaz a estruturas de suporte, normalmente cordões de arame, as videiras são adaptadas e direcionadas para as estruturas de suporte, o que lhes garante uma forma uniformizada e regular ano após ano, facilitando os seus tratamentos e apanha. Esta adaptação é efetuada com a remoção dos sarmentos de direção indesejada através da poda de inverno, removendo de 85 a 98% do seu crescimento anual (74). A poda regula a produção da própria videira, evitando uma elevada frutificação, o que poderia originar colheitas de baixa produção em anos seguintes. Controla também a qualidade das uvas mantendo a distribuição homogénea dos nutrientes disponíveis e adaptando a videira às condições do meio.

A poda de inverno é um processo manual que necessita de uma elevada mão-de-obra, logo bastante dispendioso, representando 20 a 30% dos custos totais de produção das empresas vitivinícolas (75). De forma a diminuir os seus custos, têm surgido diversas alternativas à poda tradicional de inverno (75,76).

A poda mínima é uma das técnicas de poda mecânica ainda pouco difundida mas que em alguns locais já se encontra em estudo. Nesta, a única poda realizada é aquela que impedirá que os sarmentos atinjam o chão e que permite a sua adaptação a um cordão posicionado entre 1,20 e 1,40 metros, não sendo assim necessário qualquer mão-de-obra posterior em termos de poda. A partir daí ocorre uma autorregulação da videira. O número sarmentos por videira será por isso mais elevado. A folhagem e vegetação da videira serão maiores visto que a poda verde é também descartada (75).

Nos anos de adaptação da videira a este tipo de poda verifica-se uma produção mais elevada de fruto que podem ser de 60%, porém de dimensões inferiores (~33%) (74,76,77). Estudos australianos mostram que a sua produção final chegou a ser 60% mais elevada



comparativamente com as videiras de poda normal. Devido à elevada produção, a distribuição de nutrientes pelos frutos na videira é maior. Os teores de açúcares, compostos fenólicos e restantes constituintes das uvas podem encontrar-se diminuídos, o que influencia a qualidade das características organolépticas dos vinhos obtidos, com pH e teor de açúcares inferiores e acidez titulável superior (76,77). No entanto, esta tendência nem sempre se verifica, dependendo da casta em uso (78).

Os vinhos de poda mínima apresentaram uma intensidade de cor inferior. O seu aroma é menos intenso, sendo dominado por aromas típicos de frutos vermelhos. Na boca, estes vinhos são mais diluídos, denotando contudo um equilíbrio agradável (75).

A avaliação das características dos vinhos obtidos com poda mínima têm sido realizadas maioritariamente na Austrália, África do Sul e França. As diferenças nos resultados obtidos poderão ser explicadas pela diferença no clima e tipo de casta utilizada. Desta forma, estudos adicionais tornam-se necessários em zonas de climas distintos e com outras castas.

A Dão Sul tem uma componente de investigação com vista ao seu desenvolvimento e crescimento (79). Assim, é importante o estudo de novas práticas vitivinícolas, avaliação química das suas matérias primas, a utilização de diferentes produtos enológicos e o impacto das práticas vitícolas e enológicas nos produtos finais.

A Dão Sul em parceria com o Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa tem trabalhado na análise de uvas obtidas a partir de videiras com poda mecânica (na qual se inclui a poda mínima) e manual bem como as características dos seus vinhos. As uvas de Touriga Nacional (2008 e 2009) e Alfrocheiro (2008-2010) provenientes de poda mecânica obtiveram um rendimento superior sem apresentarem diferenças significativas na qualidade dos mostos e vinhos relativamente aos de poda manual. Relativamente à intensidade de cor dos vinhos não se verificaram diferenças muito significativas em ambas as castas para os ensaios do mesmo ano. No entanto, não existem estudos relativamente às diferenças nas composições físico-químicas dos vinhos obtidos com os diferentes tipos de poda.





## 2.4 - Objetivo do trabalho

O primeiro objetivo do trabalho consistiu em avaliar os parâmetros físico-químicos, composição fenólica e cor dos vinhos de poda mínima (Pmin) das castas Alfrocheiro (Alf) e Touriga Nacional (TN) da região Dão e analisar as diferenças verificadas relativamente aos vinhos de poda manual (Pman) para as mesmas castas. Este trabalho permitirá determinar se a Pmin é ou não uma metodologia viável na substituição da Pman, permitindo a diminuição da mão-de-obra na vinha e o aumento da produção.

O segundo objetivo do trabalho foi avaliar a utilização dos produtos enológicos, nomeadamente enzimas de maceração e taninos hidrolisáveis, na melhoria da cor dos vinhos da casta Alf obtidos com os dois tipos de poda, mínima e manual. Estes produtos têm sido vulgarmente utilizados na Dão Sul na elaboração dos seus vinhos. Porém os seus efeitos nos vinhos obtidos a partir das castas da região do Dão ainda não são bem definidas. De facto, a utilização destes tem mais a ver com a vasta experiência profissional dos enólogos responsáveis e conhecimento teórico e não tanto com os resultados práticos obtidos. Sendo assim, torna-se pertinente a avaliação que estes produtos têm na evolução das características dos vinhos das castas tintas da região do Dão. A nível industrial esta avaliação é importante de forma a analisar se estes produtos levam realmente a melhorias organolépticas e se o seu investimento é ou não rentável.



## **Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto**



# 3 - Metodologia



## Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto





### 3.1 - Vinificação

Todos os vinhos utilizados neste trabalho experimental foram obtidos a partir de uvas provenientes da Quinta do Amieiro, Carregal do Sal, zona vitivinícola da região do Dão. Foram produzidos vinhos com uvas de duas castas Alf e TN. Para cada casta foram produzidos vinhos com uvas provenientes de videiras que foram sujeitas a Pmin e com uvas de poda manual Pman.

As uvas Alf deram entrada na adega em caixas de plástico no dia 8 de outubro de 2012. Para a vinificação de cada tipo de poda utilizaram-se 400 kg de uvas. Estas foram esmagadas e desengaçadas mecanicamente (CMA Lugana 1998) e o mosto resultante, juntamente com as partes sólidas, foi introduzido em 4 barricas de madeira com capacidade para 225 L. Assim, da casta Alf foram obtidas oito barricas, quatro com os ensaios de Alfrocheiro de poda mínima (AlfPmin) e as restantes quatro os ensaios de Alfrocheiro de poda manual (AlfPman) (fig.15).

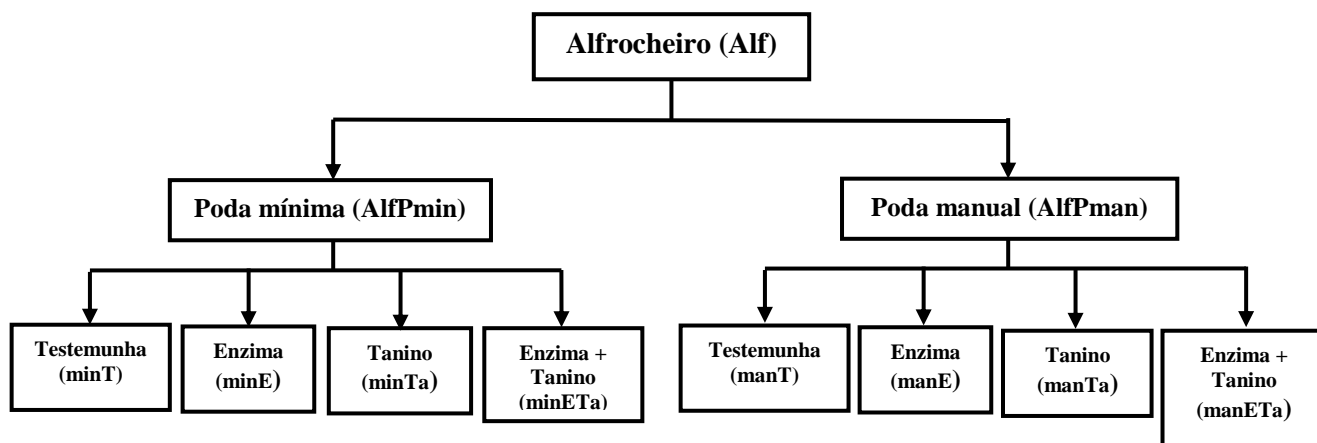
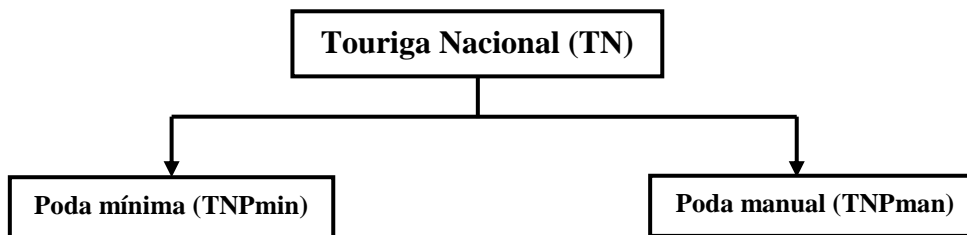


Figura 15: Ensaios realizados para a casta Alfrocheiro.

As uvas da casta Touriga Nacional (TN) de ambas as podas deram entrada na adega em caixas de plástico no dia 15 de outubro de 2012. Para cada tipo de poda utilizaram-se 100 kg, perfazendo na totalidade 200 kg de uvas. Estas sofreram o mesmo tratamento que as uvas de Alf, tendo o mosto resultante sido introduzido numa barrica de madeira com capacidade para 225 L para cada ensaio (fig.16).



**Figura 16: Ensaio realizados para a casta Touriga Nacional.**

Todos os ensaios foram inoculados com um preparado industrial de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* D254 numa concentração final de 0,2 g/kg de mosto de forma a estimular a fermentação alcoólica. Ao mesmo tempo adicionou-se em todos os ensaios difosfato de amónio numa concentração final de 0,2 g/kg de mosto. A adição deste composto enológico garante as necessidades de azoto e fosfato para o desempenho eficaz das leveduras durante a fermentação alcoólica.

Na altura da adição das leveduras foram também adicionados produtos enológicos aos ensaios de Alf de ambas as podas, tendo sido feitos 3 tratamentos diferentes:

- 1) adição de 30 mg/kg de enzimas de maceração (Laffase HE Grand Cru, Laffort<sup>®</sup>);
- 2) adição de 0,2 g/kg de taninos enológicos de estabilização de cor (VR Supra, Laffort<sup>®</sup>);
- 3) adição de 30 mg/kg de enzimas de maceração (Laffase HE Grand Cru, Laffort<sup>®</sup>) e 0,2 g/Kg de taninos enológicos de estabilização de cor (VR Supra, Laffort<sup>®</sup>)

Num último ensaio para cada tipo de poda (mínima e manual) nenhum enológico foi adicionado (testemunha).

A densidade do mosto e a temperatura foram analisadas diariamente de forma a controlar a evolução da fermentação alcoólica dos ensaios. Quando a densidade foi inferior a 1,0 g/mL e sem registar variações durante 3 dias seguidos, a fermentação alcoólica foi assumida como finalizada e o mosto passou a ser denominado de vinho.

As partes sólidas das uvas permaneceram em contacto com o vinho mais alguns dias de forma a extrair o maior número de compostos fenólicos. Posteriormente, as películas foram espremidas e removidas manualmente com recurso a um esmagador de massas. Os vinhos foram transferidos para bidons de plástico de 20 L. Ao fim de 6 semanas após a fermentação alcoólica, os vinhos foram transferidos para novos bidons de plástico (operação denominada de trasfega) e a borra resultante foi descartada. No dia seguinte inocularam-se bactérias lácticas (Alpha<sup>®</sup> *Oenococcus oeni* 1-step kit starter),



segundo as indicações do fornecedor (80), de forma a promover a fermentação malolática do vinho. Ao fim de 3 semanas a fermentação malolática estava finalizada e procedeu-se a uma nova trasfega para um bidon novo e dois garrafões de 5 L em cada vinho. No dia seguinte adicionou-se pela primeira vez dióxido de enxofre de forma a que a concentração da sua forma livre se situasse entre 50 e 60 ppm. Até ao fim da fermentação malolática, os vinhos foram analisados semanalmente e a partir daí de duas em duas semanas por FTIR. O nível dos vinhos dentro dos bidons foi mantido constante através da adição de amostra dos garrafões de forma a prevenir o contacto com o oxigénio presente.

Os vinhos permaneceram em repouso 21 semanas após a fermentação malolática. Posteriormente procedeu-se à filtração através de um filtro de membrana sobre pressão. Os vinhos foram engarrafados através de uma mangueira e a rolhagem foi efetuada segundo o procedimento habitual da empresa. Após o engarrafamento dos vinhos, no dia 24 de Maio de 2013, estes permaneceram em repouso, sob as condições indicadas. Um esquema de todo o processo de vinificação, assim como todos os tratamentos realizados é apresentado na **figura 17**.

Ao longo da vinificação foram recolhidas amostras de 250 mL dos vinhos que foram armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores. As amostras de Alf foram recolhidos às 0, 5, 10, 15, 19, 24, 28 e 34 semanas após fermentação alcoólica e as amostras de TN foram recolhidas às 0, 5, 10, 15, 19, 23 e 32 semanas após fermentação alcoólica.



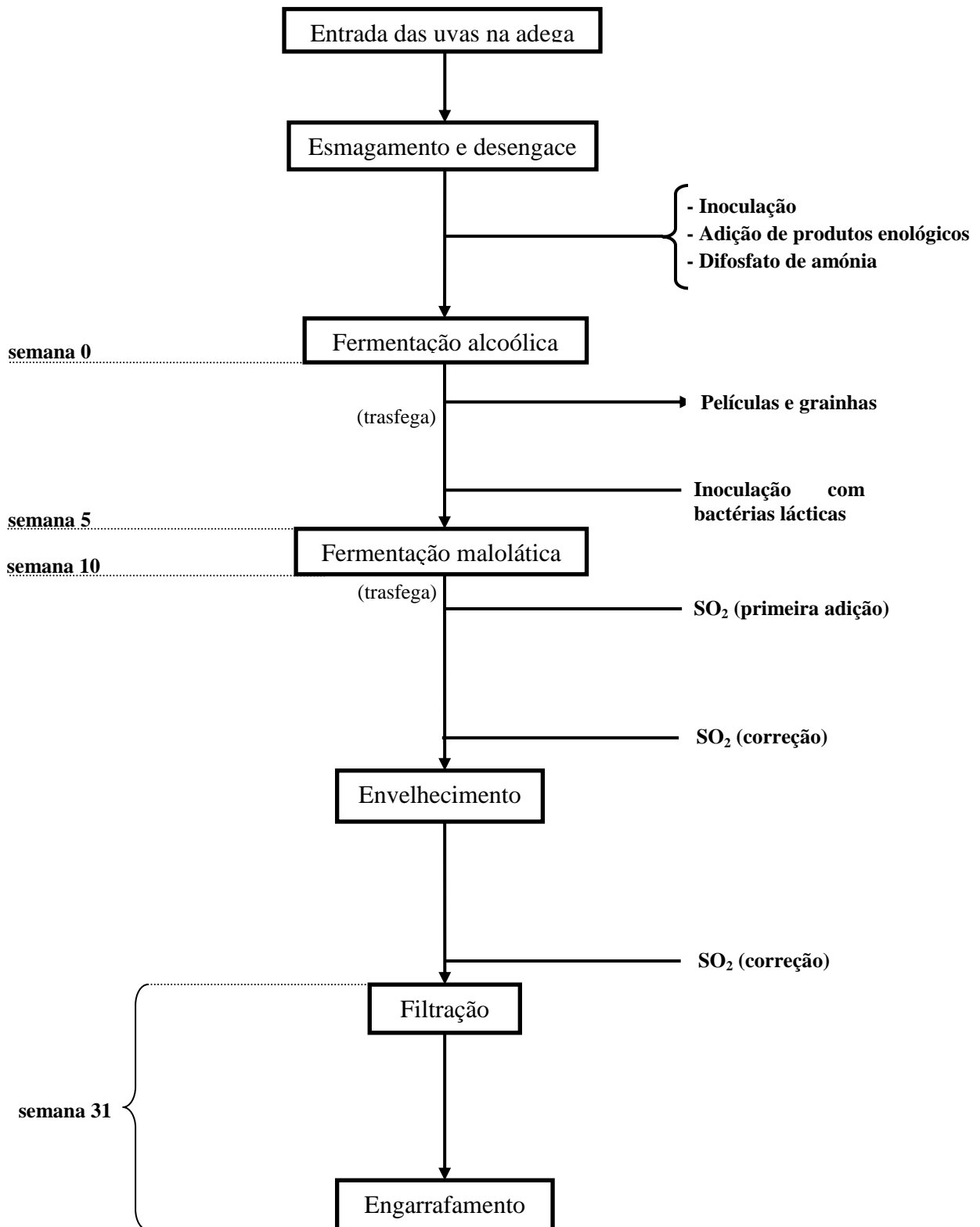


Figura 17: Esquema geral da vinificação e dos tratamentos efetuados nos ensaios ao longo da vinificação.



### 3.1.1 - Produtos enológicos

Os produtos enológicos vêm acompanhados por uma ficha técnica descrevendo o produto, as condições de aplicação e os resultados que mostram a sua eficiência:

A ficha técnica da enzima Lafase He Grand Cru (81) descreve-a como *'uma preparação purificada de enzimas pectolíticas para a produção de vinhos com coloração mais elevada bem como garante o suplemento de taninos'*. Especificando, *'favorece a extração de material de cor e taninos bastante polimerizados da pele e do sumo durante os períodos de maceração. Melhora a conservação da cor devido à purificação da antocianase'*. Como justificação, mostram resultados comparando a utilização deste produto durante a fermentação a frio e de forma tradicional com a fermentação a frio sem qualquer adição. Os resultados revelam o aumento da intensidade de cor, compostos fenólicos totais, compostos fenólicos poliméricos, antocianinas totais, antocianinas poliméricas e antocianinas monoméricas.

A ficha técnica do Tannin VR Supra (82) descreve este produto como *'uma preparação de dissolução instantânea contendo taninos elágicos e proantocianidinas para vinho tinto combinando o efeito de ambos'*. Especificando, *'inibe as enzimas responsáveis pela oxidação natural, e contém ação antioxidante protegendo o mosto e o material corado'*. Como justificação, comparam a adição de compostos fenólicos isolados ou do produto em questão com um ensaio sem qualquer adição na inibição da lacase, enzima com ação antioxidante, em vinhos que na altura da colheita das uvas se verificou a ação da *Botrytis cinerea*. É também afirmado que este produto *'protege e estabiliza a cor combinando a estabilização das antocianinas, compostos fenólicos totais e intensidade de cor'*.

Em nenhum ponto de ambas as fichas técnicas são evidenciadas as condições experimentais que levam a se obterem as conclusões citadas. Nunca é apresentada a casta nem a altura da vinificação em que estes parâmetros são avaliados. Como foi demonstrado anteriormente, a eficiência destes produtos esta muito dependente das características intrínsecas das uvas e dos procedimentos tecnológicos envolvidos na produção do vinho. Como o vinho é um produto em constante transformação torna-se fundamental o conhecimento da altura em que estas conclusões são obtidas.



## 3.2 - Análises físico-químicas

### 3.2.1 - Mosto

A acidez total do mosto após esmagamento das uvas foi determinada por titulação. A 10 mL de mosto diluído com 30 mL de água desionizada adicionou-se 1 mL de solução de azul de bromotimol (indicador) e titulou-se com NaOH 0,1 M até a cor do indicador mudar de verde para azul (pH neutro) A acidez total, expressa em g/L em equivalentes de ácido tartárico foi calculada pelo volume de NaOH gasto (mL) multiplicado por 0,75.

O pH do mosto foi obtido por um potenciómetro, calibrado diariamente com soluções de pH=1,0; pH=4,0 e pH=7,1.

Para a determinação da densidade uma amostra de 200-220 mL de mosto sem as partes sólidas da uva foi colocada numa proveta de 250 mL e mediu-se a densidade do mosto com recurso a um areómetro (990 - 1200 mg/mL) e a temperatura correspondente com um termómetro de álcool. O teor de álcool provável foi obtido através da tabela de correspondência entre a densidade do mosto (a 20°C) no dia do esmagamento das uvas multiplicado pelo fator de rendimento de fermentação ( $k=1,75$ ) utilizado na empresa. Após a inoculação procedeu-se ao controlo diário da fermentação de forma a que esta decorresse de forma normal.

### 3.2.2 - Vinhos

#### 3.2.3.1 - Determinação do teor alcoólico, acidez volátil e acidez total por FTIR

O teor alcoólico, acidez volátil e acidez total dos vinhos foram analisados semanalmente até ao fim da fermentação malolática e, a partir desta, de duas em duas semanas. A análise destes parâmetros foi realizada pelo sistema Bacchus, constituído por um FTIR Nicolet 380 (Thermo Corporation, Dinamarca), espectrofotómetro UV/Vis (Avatar) e amostrador automático (M.S.U., França). Este sistema e o software Bacchus Acquisiton foram concebidos para garantir uma análise rápida e reprodutível específica para vinhos, sendo vulgarmente utilizado nas empresas vitivinícolas. O sistema foi calibrado segundo os métodos descritos pela *OIV*:

- O teor alcoólico foi determinado por ebuliometria através da diferença entre o ponto de ebulição da água desionizada (100 mL) e do vinho (100 mL) a uma dada pressão



atmosférica. Através de uma tabela de correção, obtém-se o teor alcoólico do vinho expresso em % (v/v).

- A acidez volátil foi determinada por separação dos ácidos voláteis por arrastamento de vapor seguida da sua condensação e titulação. Num erlenmeyer introduziram-se 250 mL de água desionizada. Para o chapinador mediu-se rigorosamente 10 mL de vinho e introduziu-se o conjunto no caznav, tapando-se o tubo adutor. Ligou-se o aquecimento e quando a água do erlenmeyer entrou em ebulição introduziu-se o taco de vidro. O vapor de água passou através do tubo adutor arrastando os ácidos voláteis, da amostra e condensou para um novo erlenmeyer. Após recolha de 100 mL de destilado adicionou-se a este 3 gotas de fenolftaleína (indicador) e titulou-se com NaOH 0,1M até aparecer uma coloração rosa persistente. A acidez volátil do vinho foi expressa em g/L em equivalentes de ácido acético e foi calculada pelo volume de NaOH 0,1M gasto (mL) multiplicado por 0,6.

- Acidez total foi determinada por titulação. A 10 mL de mosto diluídos com 30 mL de água desionizada adicionou-se 1 mL de solução de azul de bromotimol (indicador) e titulou-se NaOH 0,1 M até ser atingida a cor azul (pH neutro). A acidez total, expressa em g/L de equivalentes de ácido tartárico, foi calculada pelo volume de NaOH gasto (mL) multiplicado por 0,75.

Os vinhos foram filtrados utilizando filtros de seringa de fibra de vidro de 40 mm de diâmetro (Munktell, Alemanha) e terras de diatomáceas antes da análise no sistema Bacchus. A análise foi feita em triplicado.

### **3.2.3.2 - Determinação de dióxido de enxofre por titulação**

O dióxido de enxofre livre dos vinhos foi determinado num titulador automático TitroMatic (Crison<sup>®</sup>) segundo a metodologia analítica seguinte:

Transferiu-se para um erlenmeyer 50 mL de vinho e adicionaram-se 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25% e 5 mL de solução de cozimento de amido. Titulou-se com solução de 0,025 KI até se obter uma coloração cinzenta. O teor de dióxido de enxofre (em ppm) é dado pelo volume (mL) de KI gasto na titulação multiplicado por 50.



### 3.3 - Determinação da composição fenólica

#### 3.3.1 - Densidade ótica a 280 nm.

Os compostos fenólicos, devido à sua ressonância, absorvem energia na zona do ultravioleta. A análise destes valores tem sido uma metodologia utilizada para se estimar inicialmente a composição fenólica dos vinhos pelas empresas vitivinícolas devido à rapidez de execução (8,60).

A absorvância a 280 nm foi determinada pelo espectrofotómetro (Avatar) acoplado ao FTIR Nicolet 380 da Thermo Corporation (Dinamarca) e amostrador automático M.S.U. (França) aquando da determinação dos parâmetros físico-químicos.

#### 3.3.2 - Compostos fenólicos totais

O conteúdo em compostos fenólicos totais dos vinhos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (83). Em *ependorfs* de 1 mL diluíram-se 75 µL de vinho com 925 µL de solução hidroalcoólica a 10% (v/v). A 125 µL de amostra diluída adicionaram-se 500 µL de água destilada e 125 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (armazenado a 4°C) e deixou-se a reagir no escuro. Passados 5 minutos adicionaram-se 1,25 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 g/L e água destilada. Deixou-se a reagir durante pelo menos 60 minutos no escuro à temperatura ambiente. No espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer) determinou-se a absorvância a 760 nm. Os resultados são expressos em mg/L equivalentes de ácido gálico através de uma curva de calibração com ácido gálico (0-250 mg/L).

#### 3.3.3 - Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos vinhos foi determinada pelo método de ABTS (84). Preparou-se previamente a solução de ABTS<sup>•+</sup> (sal diamónio do ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)) 7 mM em persulfato de potássio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). A solução permaneceu à temperatura ambiente durante 12 h para a formação do radical.

Em *ependorfs* de 1 mL diluíram-se 20 µL de vinho com 1,2 mL de solução hidroalcoólica 10%. A 50 µL da amostra adicionou-se 1 mL de solução diluída de ABTS<sup>•+</sup> (1 mL de ABTS<sup>•+</sup> previamente preparado em 80 mL de etanol). Deixou-se a reagir durante



15 minutos no escuro e, no espectrofotómetro UV/Vis (*Perkin Elmer*) determinou-se a absorvância a 760 nm. A análise foi realizada em triplicado.

Paralelamente com a análise das amostras, realizou-se uma curva de calibração com trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) entre 0 e 400 nM. A análise foi realizada em triplicado. Os resultados de atividade antioxidante são expressos em mM equivalentes de trolox.

### 3.3.4 - Antocianinas totais, poliméricas e monoméricas

As antocianinas totais, poliméricas e monoméricas foram determinadas pelo método de variação do pH (85). A 0,5 mL de vinho adicionou-se 1 mL de HCl 0,1M em EtOH 10% e 10 mL de HCl 2% em EtOH 10% (**Sol. A**). Num outro copo, a 0,5 mL de vinho adicionou-se 1 mL de HCl 0,1M em EtOH 10% e 10 mL de tampão pH =3,5 (**Sol. B**) ( a solução tampão foi preparada com a adição de 300 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M a 700 mL de ácido cítrico 0,1 M e ajustada a pH 3,5 com ácido cítrico). Em *cuvettes* de plástico leram-se as absorvâncias a 520 e 700 nm. A análise foi realizada em triplicado.

- Antocianinas totais (mol/L) = (A<sub>520-700</sub> da Sol. A) /28000
- Antocianinas poliméricas (mol/L) = (A<sub>520-700</sub> da Sol. B) /28000
- Antocianinas livres (mol/L) = ((A<sub>520-700</sub> da Sol. A) - (A<sub>520-700</sub> da Sol. B)) / 28000

### 3.3.5 - Antocianinas livres.

A quantificação das antocianinas livres dos vinhos engarrafados foi determinada por HPLC (86). Esta análise foi realizada no Instituto Politécnico de Viseu com o auxílio do Doutor Fernando Gonçalves num HPLC previamente otimizado e calibrado para análises de antocianinas em vinhos.

O HPLC utilizado foi o sistema Dionex Ultimate 3000 Chromatographic (Sunnyvale, California, EUA), equipado com uma bomba quaternária modelo LPG-3400 A, um amostrador automático, um compartimento de coluna termostaticado (ajustado a 30° C) e um detetor de comprimento de onda múltiplo MWD-300 A coluna (250 x 4,6 mm e



tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ ) foi uma C<sub>18</sub> Acclaim<sup>®</sup> 120 (Dionex, Sunnyvale, California, USA) protegida por uma coluna de guarda do mesmo material.

O volume de amostra analisado foi 20  $\mu\text{L}$ . Os solventes utilizados foram (A) ácido fórmico 40%, (B) acetonitrilo e (C) água destilada. As condições iniciais foram 25% de A, 10% de B e 65% de C, seguido por um gradiente linear de 10 a 30% de B e 65 a 45% de C durante 40 minutos com um fluxo de 0,7 mL/min. A detecção foi feita a 520 nm e foi utilizado o software Chromeleon ver. 6.8 (Sunnyvale, California, EUA).

As antocianinas foram identificadas através da comparação com os tempos de retenção de solução padrão de antocianinas isoladas. A quantificação foi feita pela leitura da A<sub>520 nm</sub> nos respectivos picos e através de uma curva de calibração de soluções padrão de malvidina-3-glicosídeo, sendo os resultados obtidos em equivalentes de malvidina-3-glicosídeo.

## 3.4 - Determinação da cor.

### 3.4.1 - Método de Somers

As análises da cor recomendadas pela *OIV* são a análise da intensidade de cor e a tonalidade. A tonalidade dá-nos indicação sobre a relação de antocianinas amarelas comparativamente com as antocianinas vermelhas. As transformações químicas das antocianinas ao longo do envelhecimento levam à diminuição da sua cor inicial para tons mais alaranjados. Este parâmetro serve também como um indicativo da idade do vinho em questão (8).

As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos. Em *cuvettes* de vidro de 1 mm de espessura foram medidas as absorvâncias a 420, 520 e 620 nm (espectrofotómetro *Perkin Elmer*). A intensidade de cor e a tonalidade dos vinhos foram determinados pelas seguintes fórmulas:

$$\text{- Intensidade de cor} = (A_{420} + A_{520} + A_{620}) * 10$$

$$\text{- Tonalidade} = A_{420}/A_{520}$$



### 3.4.2 - CIELab

Na determinação das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  utilizou-se o espectrofotômetro (*Perkin Elmer*) equipado com uma esfera de integração com o software *lambda 35*. Em *cuvettes* de vidro foi determinado o espectro de transmitância entre 380-780, à velocidade de 120 nm/min, utilizando o iluminante D65 e o observador 10°. As coordenadas foram determinadas segundo a legislação da comissão internacional da iluminação. A coordenada  $L^*$  dá indicação sobre a luminosidade, sendo valores positivos associados a vinhos mais claros e valores negativos a vinhos mais escuros, o  $a^*$  relaciona o vermelho (valores positivos) com verde (valores negativos) e o  $b^*$  relaciona o amarelo (valores positivos) com o azul (valores negativos) (87).

## 3.5 - Análise sensorial

A análise sensorial dos vinhos engarrafados foi efetuada por uma prova cega dos vinhos após engarrafamento. O painel de provadores foi constituído por 11 especialistas ligados a diversas áreas da empresa Dão Sul, incluindo os enólogos. Todos os vinhos do trabalho foram apresentados em copos de vidro identificados com um código aleatório. Os vinhos foram avaliados em dezassete descritores (escala de 0 a 10) divididos em cor (intensidade de cor, vermelho, amarelo e castanho), aroma (frutado, floral, balsâmicas, especiarias, empíreas, sulfurados e metálicos) e sabor (corpo, adstringência, acidez, amargo, doce e persistência). A qualidade dos vinhos foi também avaliada numa escala de 0 a 10 quanto à sua cor, aroma e sabor, assim como a apreciação geral do vinho. A folha de prova encontra-se em anexo.







# **4 - Resultados e discussão**





## 4.1 - Efeito da poda mínima na evolução da cor do vinho tinto

### 4.1.1 - Mosto

As uvas das duas castas, Alf e TN, provenientes de videiras sujeitas à Pmin e Pman foram analisadas quando chegaram à adega. Estas análises permitem-nos avaliar o seu grau de maturação e assim ter uma estimativa do teor alcoólico, acidez e pH dos vinhos resultantes. Na **tabela 1** são apresentados o teor alcoólico provável, a acidez total e o pH das uvas no dia em que foram vinificadas.

**Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do mosto dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN.**

Casta	Poda	Teor alcoólico provável (% vol)	Acidez total (g/L)	pH
Alf	Min	13,51	6,2	3,55
	Man	15,41	5,9	3,55
TN	Min	12,04	6,8	3,46
	Man	13,51	6,7	3,79

O teor alcoólico provável dos ensaios de Pmin é inferior aos da Pman em ambas as castas. O vinho Pmin da casta Alf apresentou 13,51% de teor alcoólico provável e o de Pman apresentou 15,41%. Na casta TN registou-se 12,04% para a Pmin e 13,51% para a Pman. O teor alcoólico provável corresponde ao teor de açúcares das uvas no dia da colheita sendo que estes resultados evidenciam que o grau de maturação das uvas de Pmin são menores que os da Pman. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia, nas quais o sumo de uvas obtidas a partir da Pmin tem um °Brix inferior comparativamente com Pman (88). A videira nos primeiros anos de Pmin não apresenta condições que equilibrem o seu metabolismo e a elevada produção. Apesar dos estudos da adaptação da videira à Pmin serem ainda precoces, foi verificado que nos primeiros anos de adaptação se assiste ao aumento do número de raízes e vegetação da videira. Porém este aumento não é suficiente para suportar as necessidades metabólicas das uvas presentes em maiores quantidades, nomeadamente a absorção de nutrientes do solo pelas raízes e síntese de açúcares pela fotossíntese o que diminui a composição de açúcares das uvas oriundas de Pmin (76, 85).



No caso da acidez total, as uvas de ambas obtidas a partir Pmin não apresentaram grandes diferenças em comparação com Pman. O pH é igual entre os dois tipos de poda para a casta Alf. Pelo contrário os valores de pH do TNPmin são inferiores aos da TNPman.

#### 4.1.2 - Evolução dos parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos analisados nos vinhos tintos são o teor de dióxido de enxofre livre, teor alcoólico, acidez volátil e acidez total. Estes parâmetros têm que se manter nos intervalos de valores legislados para garantir a qualidade sanitária do produto (89). Nas empresas vinícolas, a análise destes parâmetros constitui uma prática rotineira que visa o controlo das características químicas e informa sobre a necessidade de intervenção do enólogo no seu controlo. Com exceção do teor alcoólico, os restantes parâmetros sofrem uma considerável evolução ao longo do envelhecimento do vinho tinto após a fermentação alcoólica.

##### 4.1.2.1 - Teor alcoólico

O teor alcoólico depende do teor de açúcares das uvas quando estas são vinificadas, assumindo-se que a fermentação alcoólica ocorre completamente. Apesar do etanol sofrer reações químicas nos vinhos, por exemplo, oxidação a ácido acético pela ação das bactérias acéticas (36), tais variações não levam a alterações significativas. O teor alcoólico dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN são apresentadas na **figura 18**.

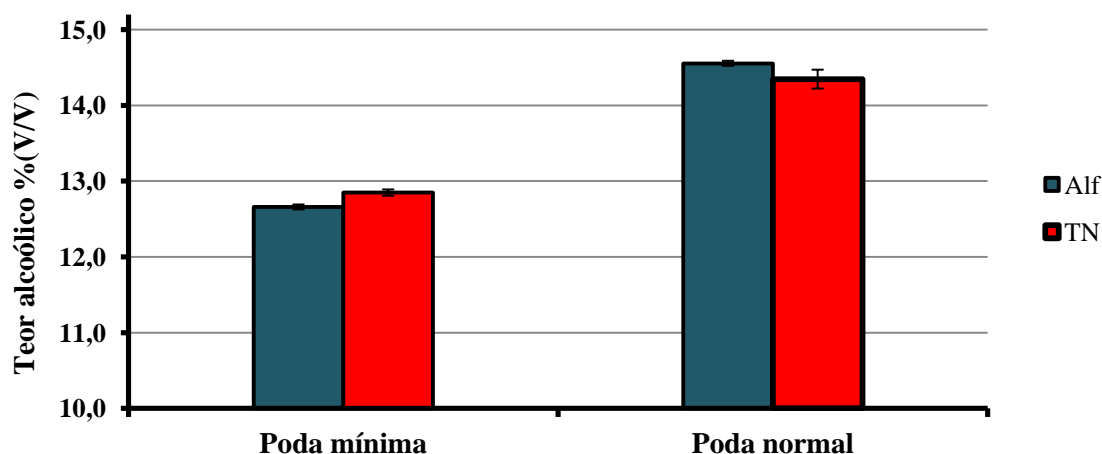


Figura 18: Teores alcoólicos dos vinhos de Pmin e Pman das castas Alf e TN.

As vinificações efetuadas a partir dos ensaios de Pmin deram origem a vinhos com teores alcoólicos inferiores, 12,7% (Alf) e 12,9% (TN), comparativamente com os ensaios de Pman, 14,6%(Alf) e 14,4% (TN). Estes resultados estão de acordo com o teor alcoólico provável inferior dos vinhos da Pmin comparativamente com a Pman. Apesar da fermentação alcoólica ter sido ligeiramente mais demorada na TN (**em anexo**), esta diferença não explica a diferença entre o teor alcoólico provável e o teor alcoólico dos ensaios entre as castas.

#### 4.1.2.2 - Dióxido de Enxofre Livre

O dióxido de enxofre é o aditivo utilizado que garante a qualidade do vinho devido às suas propriedades antioxidante e antimicrobiana (90). Quando o dióxido de enxofre é adicionado ao vinho, estima-se que um terço se combina com inúmeras moléculas presentes nos vinhos, perdendo a sua atividade. Por esse motivo, quando é analisado o teor de dióxido de enxofre nos vinhos é distinguido o dióxido de enxofre livre, passível de exercer a atividade desejada, do dióxido de enxofre combinado, que não apresenta atividade (90). O teor de dióxido de enxofre livre dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo da vinificação encontra-se na **figura 19**.

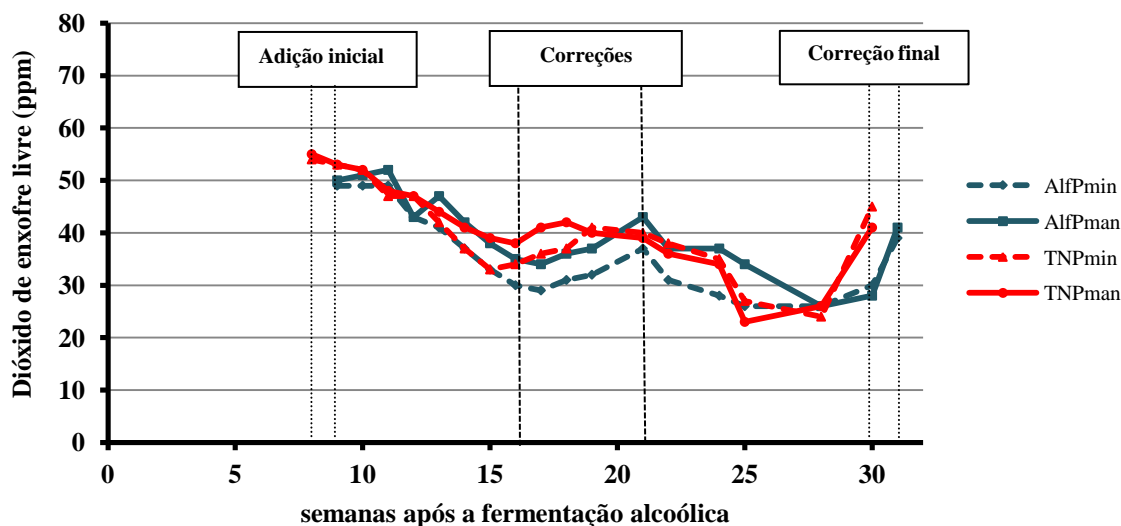


Figura 19: Dióxido de enxofre livre (expresso em ppm) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

A primeira adição de dióxido de enxofre ocorreu à 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas após a fermentação alcoólica para as castas TN e Alf, respectivamente. Inicialmente, foram adicionadas quantidades de dióxido de enxofre com o objetivo da concentração da sua forma livre se encontrar no intervalo entre 50 e 60 ppm, permitindo a proteção do vinho. Nas semanas seguintes verificou-se um decréscimo acentuado em todos os vinhos até à nova adição de dióxido de enxofre. O teor de dióxido de enxofre livre diminuiu até ao engarrafamento (30<sup>a</sup> e 31<sup>a</sup> semanas), quando foi novamente corrigido para valores entre 40 e 45 ppm.

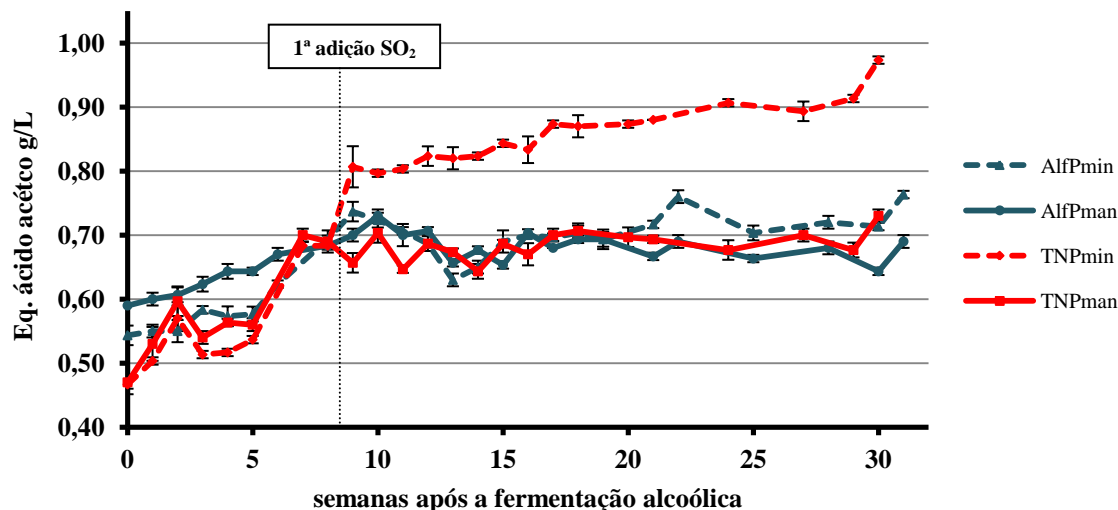
As diferenças verificadas não são indicativas das diferenças químicas resultantes do tipo de poda. Este parâmetro está dependente da intervenção do enólogo e não do vinho em questão. No entanto, a sua presença pode influenciar outros parâmetros dos vinhos ao longo do envelhecimento.

#### 4.1.2.3 - Acidez volátil

O aumento da acidez volátil resulta da presença de bactérias acéticas cujo metabolismo leva à produção de ácido acético. Este parâmetro deverá ser controlado com atenção pois valores demasiado elevados poderão levar a consequências negativas a nível organolético do vinho (91). Por legislação, a acidez volátil dos vinhos tintos tem que ser inferior a 1,20 g/L sendo os valores próximos de 0,90 g/L considerados adequados (91). A



evolução da acidez volátil dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN encontram-se na **figura 20**.



**Figura 20:** Evolução da acidez volátil (expressa em g/L eq. ácido acético) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

A acidez volátil dos vinhos após a fermentação alcoólica (semana 0) registou valores inferiores a 0,60 g/L e aumentou gradualmente até à 10ª semana, estabilizando nos 0,70 g/L nas restantes semanas. A única exceção foi o vinho TNPmin cuja acidez volátil continuou a aumentar após a 10ª semana, apresentando 0,9 g/L na 30ª semana. A estabilização da acidez volátil é explicada pela primeira adição de dióxido de enxofre à 9ª semana, exercendo a atividade desejada e prevenindo a oxidação do etanol a ácido acético.

O engarrafamento dos vinhos provocou um ligeiro aumento na acidez volátil devido ao contacto com o oxigénio durante a filtração e engarrafamento. Contudo, este aumento não comprometeu a segurança dos vinhos. A evolução da acidez volátil dos vinhos não está dependente do tipo de poda nem da casta utilizada mas sim das práticas enológicas durante a vinificação.

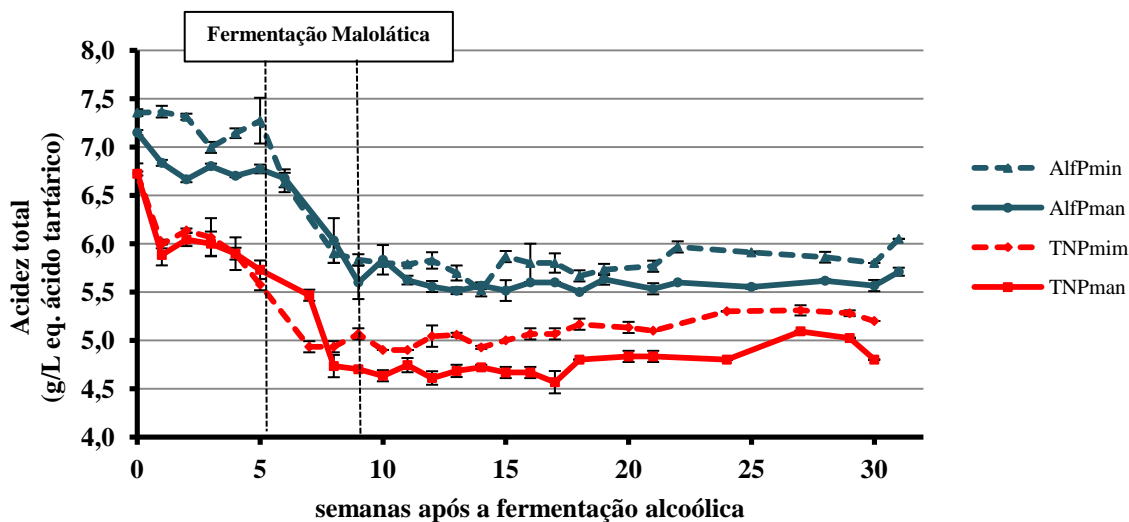
#### 4.1.2.4 - Acidez total

A acidez total indica o teor de ácidos presentes nos vinhos, existindo diversas moléculas que influenciam este parâmetro. O ácido tartárico é o ácido presente em maiores quantidades nos vinhos tintos sendo os resultados deste parâmetro geralmente expressos





em equivalentes deste ácido (92). Os ácidos cítrico, láctico, fenólicos e os ácidos intervenientes na fermentação malolática apresentam também preponderância na acidez total de um vinho (92). A evolução da acidez total dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN encontram-se na **figura 21**.



**Figura 21:** Evolução da acidez total (expressa em g/L eq. ácido tartárico) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

A acidez total dos ensaios registou a mesma tendência de evolução ao longo das vinificações. Inicialmente registaram-se os valores máximos em que o Alfmin apresentou 7,4 g/L e AlfPman 7,2 g/L enquanto o TNPmin e TNPman apresentaram ambos 6,7 g/L de equivalentes de ácido tartárico. Nas semanas iniciais a acidez total sofre uma diminuição estabilizando a partir da 8ª e 9ª semana para as castas TN e Alf, respetivamente. Esta diminuição foi mais acentuada entre a 5ª e a 10ª semana, precisamente na mesma altura em que ocorreu a fermentação malolática. A diminuição da acidez total durante a fermentação malolática esta de acordo com o decréscimo dos grupos carboxilo decorrentes da transformação do ácido málico em ácido láctico. A fermentação malolática diminuiu a acidez total dos vinhos Alf para 5,8 g/L no Pmin e para 5,6 g/L no Pman, correspondendo aos decréscimos de 19,8% e 20,9%, respetivamente. Os vinhos TN diminuíram para 4,9 g/L no vinho Pmin e para 4,6 g/L Pman, correspondendo aos decréscimos de 13,9% e 20,2%.

A Pmin originou vinhos com maior acidez total que os vinhos de Pman em ambas as castas. A análise dos vinhos engarrafados revelou que a acidez total do AlfPmin foi 6,0% maior do que a do AlfPman (6,1 g/L contra 5,7 g/L) e que a acidez total do TNPmin



foi 8,3% maior do que a do TNPman (5,2 contra 4,8g/L). Porém, estudos anteriores mostraram que a Pmin tem efeito variável na acidez total dos vinhos finais, podendo tanto elevá-la (Cabernet Sauvignon) como diminuí-la (Pinotage), dependendo da casta utilizada (93).

As diferenças da acidez total entre as duas castas estão de acordo com o descrito sobre a casta Alf *'que origina vinhos de acidez total bastante elevada'* (71), contendo valores superiores aos vinhos TN. Assim sendo, a análise comparativa entre os vinhos indica-nos que a identidade das uvas é um fator mais preponderante que o tipo de poda para a acidez total final dos vinhos.

### 4.1.3 - Evolução dos compostos fenólicos

#### 4.1.3.1 - Densidade ótica a 280

A evolução da densidade ótica a 280 nm dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN é apresentada na **figura 22**.

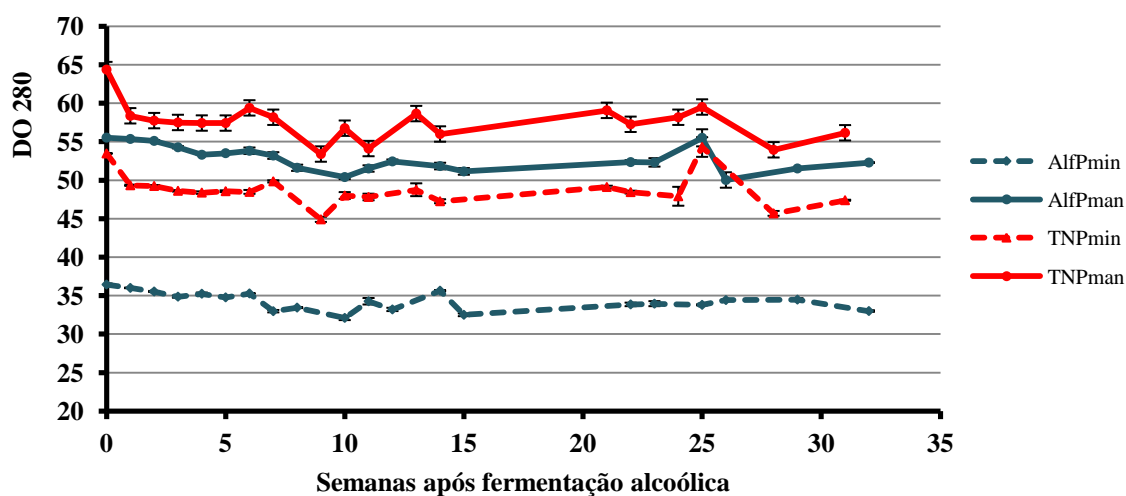


Figura 22: Evolução da densidade ótica a 280 nm dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo das 34 semanas do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

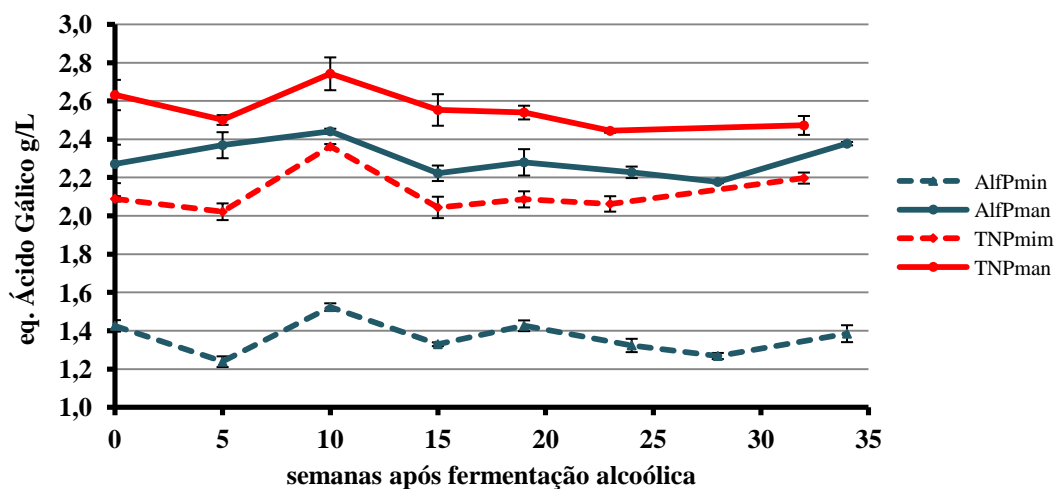
Com exceção do decréscimo verificado nos vinhos TN na primeira semana, os valores de densidade ótica a 280 nm de cada vinho são constantes ao longo da vinificação. Os vinhos de Pmin registaram valores inferiores aos da Pman em ambas as castas, sendo que a diferença foi maior no Alf. Ao fim de 34 semanas o AlfPmin apresentou 30,0 unidades de absorvância contra 52,3 do AlfPman (diminuição de 37%) e o TNPmin 47,4



unidades de absorvância contra 56,1 do TNPman (diminuição de 16%). Os valores obtidos encontram-se no intervalo de valores de referência de densidade ótica a 280 nm dos vinhos tintos (6-120) (8).

#### 4.1.3.2 - Compostos fenólicos totais

A composição fenólica total dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN encontram-se na **figura 23**. O teor de compostos fenólicos totais é constante ao longo das 34 primeiras semanas em todos os vinhos analisados.



**Figura 23:** Evolução dos compostos fenólicos totais (expressos em g/L eq. ácido gálico) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

Os vinhos de Pmin apresentam uma composição fenólica inferior aos da Pman em ambas as castas ao longo da vinificação. A análise do último ponto de vinificação (semana 34) mostra que a aplicação da Pmin na casta Alf, diminuiu 41,7% da composição fenólica (AlfPmin com 1,4 g/L e AlfPman com 2,4 g/L) enquanto na casta TN diminuiu apenas 11,1% (TNPmin 2,2 g/L e TNPman com 2,5g/L). Para ambos os tipos de poda, a TN apresentou maior teor em compostos fenólicos que a casta Alf, tal como se tinha verificado pela leitura da absorvância a 280 nm. As diferenças de composição fenólica entre as castas estão de acordo com a análise das uvas de Alf e TN, nas quais a TN apresenta maior conteúdo de compostos fenólicos no geral que a casta Alf (94). Os teores de compostos fenólicos dos quatro vinhos engarrafados (32 semanas após fermentação alcoólica) estão de acordo com o intervalo de valores (1,4-3,3 g/L em equivalente de ácido gálico) de vinhos tintos italianos (95).



Apesar deste método nos dar uma ideia aproximada sobre o teor de compostos fenólicos total dos vinhos, os valores obtidos são influenciados por outros compostos presentes nos vinhos. O ligeiro aumento verificado à 10<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana coincidem com a adição de dióxido de enxofre livre e consequente aumento de compostos fenólicos. O reagente de Folin, utilizado no método de quantificação dos compostos fenólicos totais, reage com qualquer substância redutora como o dióxido de enxofre e não apenas com os compostos fenólicos (96).

### 4.1.3.3 - Atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são vulgarmente conhecidos pela sua atividade antioxidante. Por essa razão, a análise da atividade antioxidante também possibilita avaliar as diferenças de composição fenólica nos vinhos (97,98). A atividade antioxidante dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN são apresentados na **figura 24**.

A presença de dióxido de enxofre livre influenciou os resultados obtidos. A partir da 10<sup>a</sup> semana registou-se um aumento acentuado na atividade antioxidante em todos os ensaios. Este ocorreu até sensivelmente à 20<sup>a</sup> semana, altura em que os acertos de dióxido de enxofre livre deixaram de ocorrer. Apesar desta interferência, é possível verificar as diferenças entre os vinhos ao longo do envelhecimento. Os vinhos de Pmin apresentaram valores de atividade antioxidante inferiores aos da Pman. A análise dos vinhos engarrafados mostrou que a Pmin diminuiu 50% da atividade antioxidante dos vinhos Alf (AlfPmin com 9,4 mM e AlfPman com 18,6 mM) e diminuiu 9,2% da atividade antioxidante dos vinhos TN (TNPmin com 22,4 mM e TNPman com 24,2 mM). As diferenças entre os vinhos estão de acordo com os obtidos na leitura da absorvância a 280 nm e na quantificação do conteúdo total de compostos fenólicos.

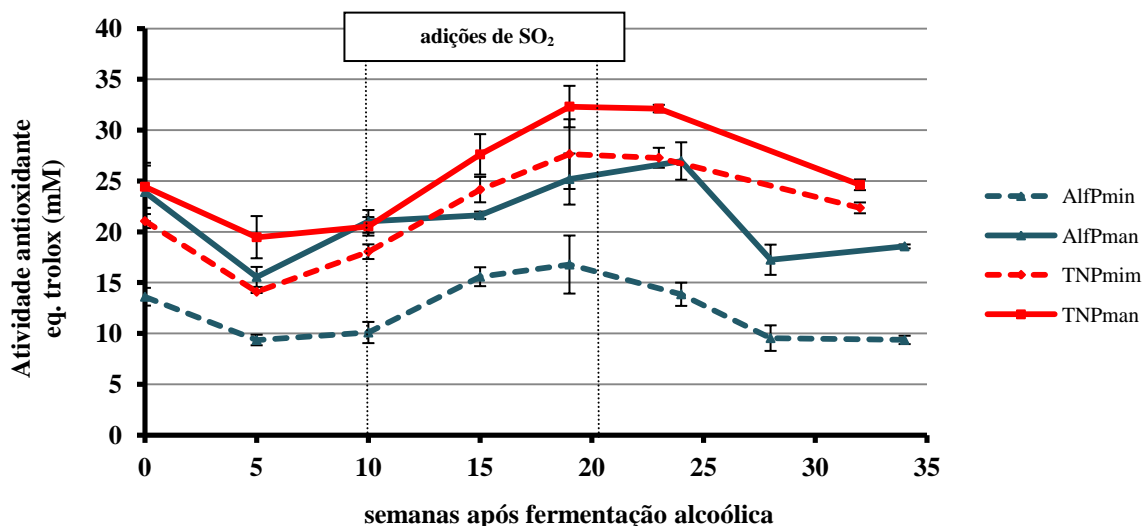


Figura 24: Evolução da atividade antioxidante (expresso em mM eq. trolox) dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

#### 4.1.3.4 - Antocianinas

As antocianinas são a principal subfamília de compostos fenólicos responsável pela cor dos vinhos tintos (18). Assim sendo, a sua quantificação é fundamental ao objetivo do trabalho. A concentração de antocianinas totais, monoméricas e livres dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN encontram-se na **figura 25, 26 e 27** respetivamente.

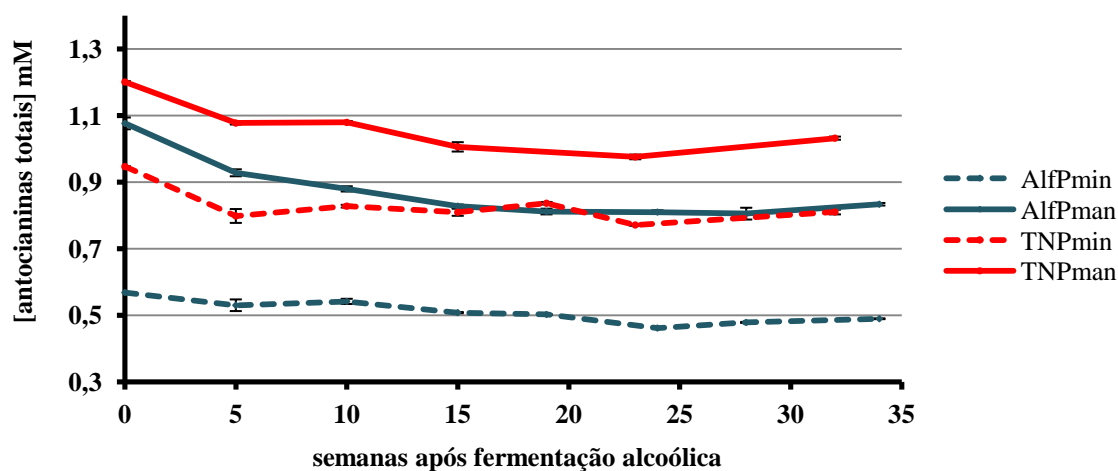


Figura 25: Evolução das antocianinas totais (expressas mM) dos vinhos de Pmin e Pman das castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.



Em termos gerais, ocorreu a diminuição das antocianinas totais, poliméricas e livres ao longo do envelhecimento, sendo mais acentuada nas semanas iniciais. A bibliografia evidencia esta tendência inicial devido à libertação das paredes celulares das leveduras em processo autolítico no fim da fermentação alcoólica. As paredes celulares, compostas maioritariamente por manoproteínas e glucanas, são parcialmente insolúveis acabando por se depositar como borra juntamente com o restante material insolúvel (99). Devido à interação eletrostática entre o catião flavílico das antocianinas livres e as cargas negativas das manoprotínas, ocorrem fenómenos de adsorção levando ao arrastamento e perda das antocianinas (100).

Após a diminuição inicial das antocianinas poliméricas até à 10<sup>a</sup> semana registou-se o aumento até à 15<sup>a</sup> semana e estabilização (**fig.26**) Estas diminuições verificadas a partir da 10<sup>a</sup> após fermentação alcoólica ocorrem principalmente devido à reatividade das antocianinas livres com outras moléculas presentes nos vinhos. Estes resultados são assim explicados pela formação de novos pigmentos, as piranoantocianidinas (19) e de produtos de condensação com taninos que, em certos casos, podem tornar-se insolúveis (87). (**fig.26**).

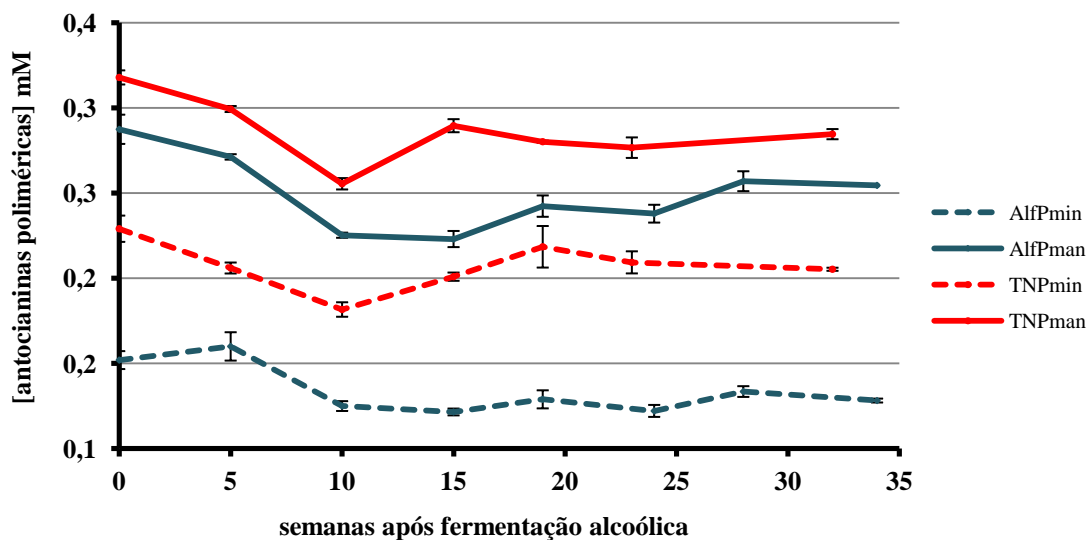


Figura 26: Evolução das antocianinas poliméricas (expresso mM) dos vinhos obtidos a partir dos vinhos de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

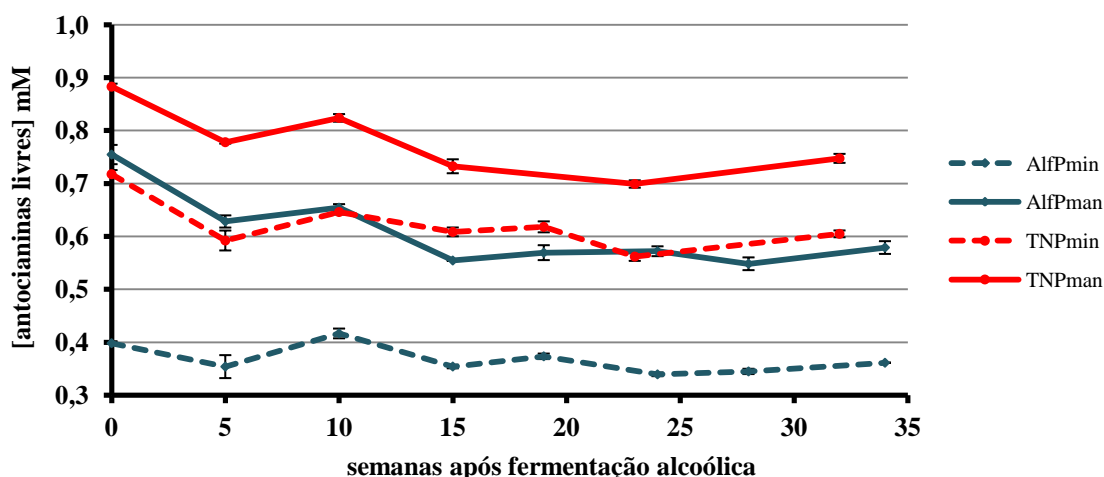


Figura 27: Evolução das antocianinas livres (expresso mM) dos vinhos obtidos a partir dos vinhos de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

Os vinhos de Pmin apresentaram ao longo da vinificação menor quantidade de antocianinas totais (**figura 25**) comparativamente com os vinhos de Pman. Logo após a fermentação alcoólica (semana 0) é possível verificar a influência da Pmin na diminuição de 47% das antocianinas totais na casta Alf e de 21% das antocianinas totais da TN. As diferenças entre as castas estão de acordo com um estudo que evidencia maior quantidade de antocianinas na película das uvas TN comparativamente com as películas das uvas Alf (94).

Na análise dos vinhos engarrafados (semana 34 do Alf e 32 do TN) na casta Alf a diferença é de 41% (AlfPmin com 0,49 mM relativamente ao AlfPman com 0,83 mM) e na TN a diferença é de 22% (TNPmin com 0,81 mM relativamente ao TNPman com 1,03 mM). Estes resultados estão de acordo com os valores de densidade ótica a 280 nm, composição fenólica total e atividade antioxidante bem como com a bibliografia no que se refere a vinhos de Pmin e Pman obtidos a partir da casta Chancellor durante 3 anos (101).

#### 4.1.3.5 - Composição em antocianinas livres dos vinhos engarrafados

A composição em antocianinas livres foi determinada em todos os vinhos após engarrafamento (34 semanas após fermentação alcoólica). Esta análise permite analisar qual o impacto da Pmin a nível molecular nos pigmentos mais importantes dos vinhos nos primeiros meses de envelhecimento. Os resultados encontram-se na **tabela 2**.



Tabela 2: Antocianinas monoméricas dos vinhos engarrafados Pmin e Pman das castas Alf e TN.

Antocianinas		[Alf] (mg/L)		[TN] (mg/L)	
		Pmin	Pman	Pmin	Pman
Ant3Glc	Df3Glc	0,61	4,21	7,75	15,84
	Cy3Glc	-	0,61	0,94	1,57
	Pt3Glc	7,42	19,93	24,83	42,15
	Pn3Glc	23,36	40,66	46,04	56,46
	Mv3Glc	258,56	361,14	348,38	387,71
	<b>Total</b>	<b>289,95</b>	<b>426,55</b>	<b>427,94</b>	<b>503,73</b>
Ant3acGlc	Df3acGlc	6,89	15,30	6,33	10,10
	Pt3acGlc	-	-	4,17	6,86
	Pn3acGlc	2,96	2,02	20,46	19,03
	Mv3acGlc	9,83	12,42	77,15	73,91
	<b>Total</b>	<b>19,68</b>	<b>29,74</b>	<b>108,11</b>	<b>109,90</b>
Ant3cumGlc	Peo3cumGlc	2,81	3,85	8,40	8,19
	Malv3cumGlc	10,03	11,41	33,65	25,73
	<b>Total</b>	<b>12,84</b>	<b>15,26</b>	<b>42,05</b>	<b>33,92</b>
<b>total</b>		<b>322,47</b>	<b>471,55</b>	<b>578,10</b>	<b>647,55</b>

Ant3Glc - Antocianidina-3-glucosídeo; Df3Glc - delfinidina-3-glucosídeo; Cy3Glc - cianidina-3-glucosídeo; Pt3Glc - petunidina-3-glucosídeo; Pn3Glc - peonidina-3-glucosídeo; Mv3Glc - malvidina-3-glucosídeo; Ant3acGlc - antocianidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Df3acGlc - delfinidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Pt3acGlc - petunidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Pn3acGlc - peonidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Mv3acGlc - malvidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Ant3cumGlc - antocianidina-3-(6-cumaril)glucosídeo; Peo3cumGlc - peonidina-3-(6-cumaril)glucosídeo; Malv3cumGlc - malvidina-3-(6-cumaril)glucosídeo.

A análise de antocianinas livres permitiu identificar onze antocianinas diferentes sendo cinco Ant3Glc, quatro Ant3acGlc e duas Ant3cumGlc. Os vinhos de Pmin registaram 322,47 mg/L de antocianinas totais na casta Alf e 578,10 mg/L na casta TN enquanto os vinhos de Pman registaram 471,55 mg/L na casta Alf e 647,55 mg/L na casta TN. Sendo assim, a aplicação da Pmin comparativamente com a Pman diminuiu 38% as antocianinas totais dos vinhos Alf e 19% as dos vinhos TN. Esta diminuição está de acordo com a registada pelo método colorimétrico de determinação de antocianinas.

As diminuições verificadas são principalmente devidas à diminuição da Mv3Glc. A presença desta antocianina livre nos vinhos Alf foi de 258,6 mg/L no AlfPmin e 361,1



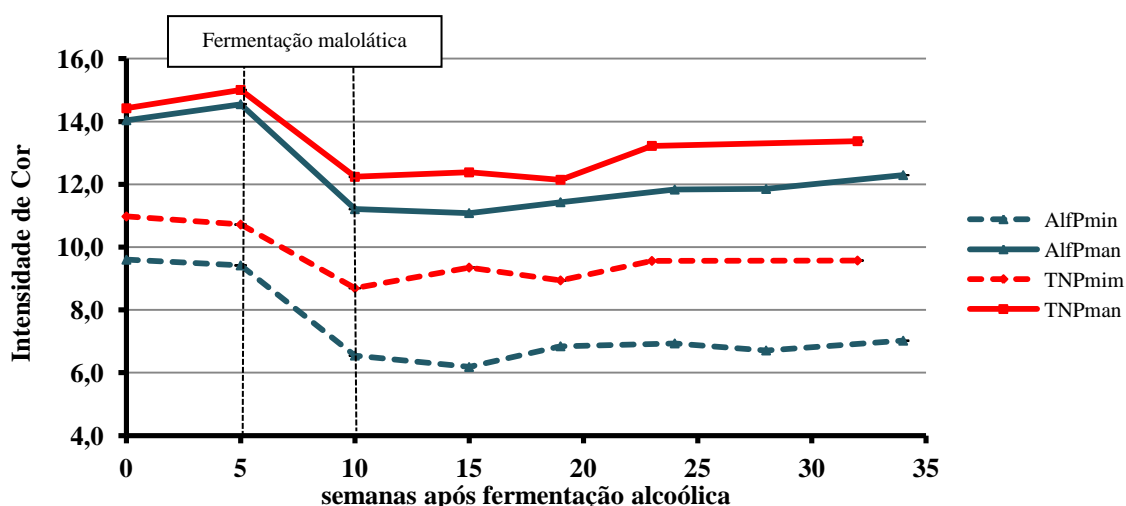


mg/L no AlfPman (diminuição de 28%) e nos vinhos TN foi de 348 mg/L no TNPmin e 387,7 mg/L no TNPman (diminuição de 10%). A Pmin apresentou também impacto nas outras antocianinas. Devido à menor presença relativa das restantes antocianinas livres comparativamente com a Mv3Glc, o impacto da poda na diminuição das restantes antocianinas foi menor. Mesmo assim, é possível afirmar que a diminuição verificada nas antocianinas devido à Pmin é registada em praticamente todos os tipos de antocianinas. Esta conclusão é especialmente visualizada na casta Alf.

#### 4.1.4 - Evolução da cor

##### 4.1.4.1 - Método de Somers

A intensidade de cor e a tonalidade dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de poda Pmin e Pman para as castas Alf e TN são apresentadas na **figura 28 e 29**, respetivamente.



**Figura 28:** Evolução da intensidade de cor dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

A intensidade de cor dos ensaios variou da mesma forma para todos os vinhos ao longo das 34 semanas de envelhecimento após a fermentação alcoólica (**fig.28**). Entre a 5ª e a 10ª semana de envelhecimento a intensidade de cor diminuiu acentuadamente, estabilizando a partir da 10ª semana. Esta diminuição está de acordo com o impacto da fermentação malolática nas características dos vinhos tintos. A fermentação malolática, entre a 6ª e 9ª semana diminuiu a acidez total do vinho. Como a cor das antocianinas livres



é influenciada pelo pH do vinho (22), ocorreu a diminuição das antocianinas na sua forma vermelha e ao aumento das antocianinas na sua forma incolor e amarela. A influência da fermentação maloláctica na intensidade de cor dos vinhos tintos vem de acordo com o descrito (102). Nas últimas semanas regista-se um aumento da intensidade de cor, mais uma vez, que coincide com o aumento da acidez total dos vinhos.

Os resultados obtidos para a cor dos vinhos estão de acordo com a composição fenólica total e antocianinas totais, sendo que os vinhos que apresentam maior composição fenólica e antocianinas apresentam intensidade de cor superior. Ao longo de toda a vinificação os vinhos de Pmin apresentaram intensidade de cor inferior aos respetivos vinhos de Pman. No fim do estudo o AlfPmin registou 7,0 e o AlfPman 12,3 enquanto o TNPmin 9,6 e o TNPman 13,4. A substituição da Pman pela Pmin afetou menos a intensidade de cor na casta TN (decréscimo de 28,4%) comparativamente com a casta Alf (decréscimo de 42,9%). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores sobre o efeito da Pmin na cor dos vinhos tintos comparativamente com a Pman. As diferenças na intensidade da cor das castas estão também de acordo com estes resultados.

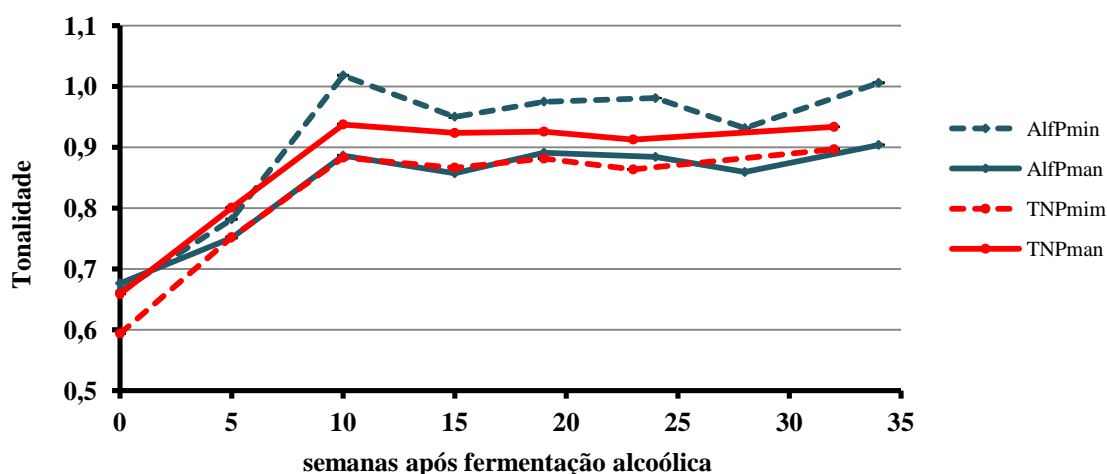


Figura 29: Evolução da tonalidade dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

Após a fermentação alcoólica, a tonalidade dos vinhos apresentou valores entre 0,6 e 0,7. A tonalidade aumentou até à 10<sup>a</sup> semana, o que corresponde ao fim da fermentação maloláctica e à primeira adição de dióxido de enxofre livre. O vinho com maior tonalidade foi o AlfPmin (1,0), seguindo-se os restantes vinhos (0,9). A tonalidade manteve-se constante até ao fim do estudo. A diminuição da acidez total provocada pela fermentação

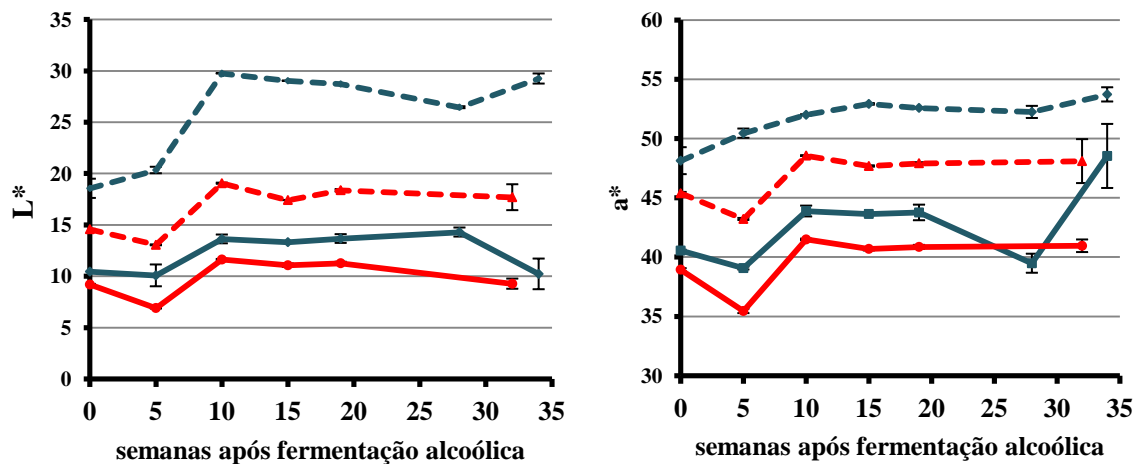


alcoólica tem como consequência a diminuição das antocianinas na sua forma vermelha e o aumento das antocianinas na sua forma incolor e amarela, aumentando dessa forma a tonalidade dos vinhos. A comparação da tonalidade entre os diferentes ensaios evidencia que o tipo de poda e a casta não apresentam influência neste parâmetro.

#### 4.1.4.2 - CIELab

Os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN encontram-se na **figura 30**.

Os resultados da análise das 3 coordenadas esta de acordo com os resultados da análise da cor. O  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  evoluíram da mesma forma durante a vinificação o que esta de acordo com um estudo que evidencia a relação linear entre as três coordenadas no caso da cor dos vinhos tintos (103). Durante as primeiras 5 semanas assistiu-se à diminuição do brilho, tons de vermelho e amarelo, com exceção do AlfMin. Entre a 5ª e a 10ª semanas, ou seja, durante a fermentação malolática, as três coordenadas aumentaram e estabilizaram a partir daí até às últimas semanas. Os vinhos obtidos por Pmin apresentaram  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  sempre superiores aos vinhos de Pman, o que significa que os vinhos de Pmin eram mais claros, vermelhos e amarelos.



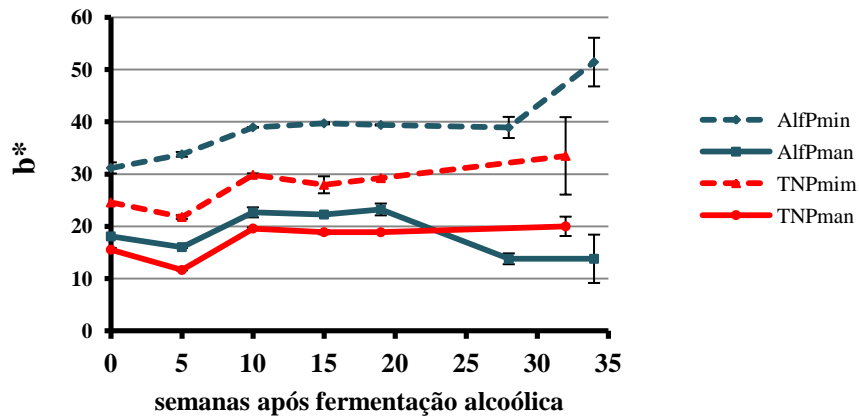


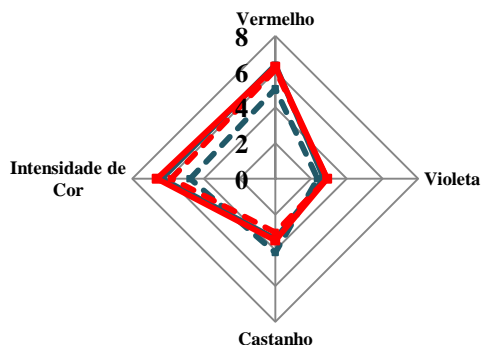
Figura 30: Evolução do  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN ao longo do envelhecimento após a fermentação alcoólica.

#### 4.1.5 - Análise sensorial

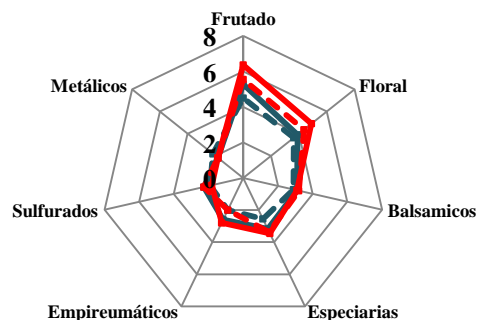
A análise sensorial é fundamental nos estudos das características dos vinhos. O vinho é um produto alimentar que se rege pela preferência do consumidor. Torna-se assim necessário avaliar até que ponto a substituição do tipo de poda influencia a percepção da cor, aroma e gosto do vinho na perspectiva do consumidor. A avaliação sensorial dos vinhos de Pmin e Pman das castas Alf e TN encontram-se na **figura 31**.



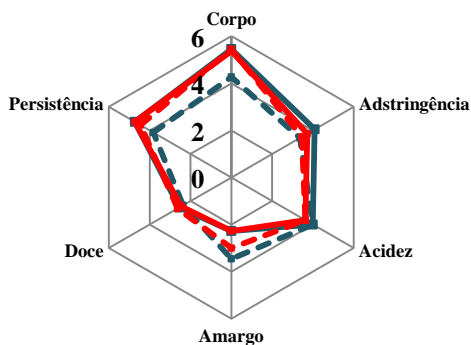
### Cor



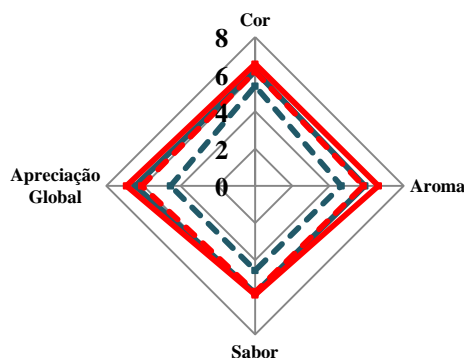
### Aroma



### Sabor



### Qualidade



--- Alfmin    — Alfman    - - - Tnmin    — Tnman

Figura 31: Análise sensorial dos vinhos obtidos a partir dos ensaios de Pmin e Pman das castas Alf e TN.

Na perspectiva do painel de prova, o vinho TNmin apresentou níveis de vermelho, violeta e castanho bastante aproximados aos vinhos obtidos com recurso à Pman. No entanto, o Alfmin registou vermelhos e violetas diminuídos e castanhos aumentados em relação ao AlfPman. A identificação do castanho mais elevado esta de acordo com a tonalidade, na qual o Alfmin registou valores superiores. Os vinhos de Pman apresentaram uma coloração mais intensa que os de Pmin. A cor do TNmin foi mais intensa que a do Alfmin, aproximando-se bastante dos valores obtidos nos ensaios de Pman o que vem de



acordo com a análise analítica. Visualmente, a substituição para a Pmin mostrou resultados insatisfatórios apenas na casta Alf.

Os vinhos obtidos a partir de Pmin registaram aromas diferentes sendo que o painel provador detetou menos aromas frutados e empireumáticos em ambas as castas. Na casta Alf, a Pmin diminuiu o aroma de especiarias e na casta de TN diminuiu os aromas florais. Os restantes aromas manifestaram-se da mesma forma nos vinhos obtidos por Pman. Na boca, os vinhos obtidos por Pmin revelaram-se menos persistentes e adstringentes. O painel de provadores considerou também estes vinhos de Pmin mais amargos. O Alfmin revelou-se menos encorpado na boca. Os vinhos assemelharam-se em termos de doçura e os da casta Alf foram considerados mais ácidos, o que está de acordo com a análise da acidez total.

Em termos gerais, o painel de provadores preferiu o vinho TNman pela sua cor e aroma. Pelo contrário, a qualidade do vinho Alfmin foi considerada a mais inferior em todos os sentidos. O vinho obtido a partir da casta TN com Pmin apresentou qualidades organolépticas mais aproximadas do vinho de Pman do que no caso do Alf.



## 4.2 - Utilização de produtos enológicos nos ensaios de vinho da casta Alfrocheiro

O segundo objetivo do trabalho correspondeu à avaliação da eficiência da adição de produtos enológicos ao mosto antes da fermentação alcoólica na eventual manutenção da composição fenólica e cor dos vinhos. Os produtos estudados foram enzimas de maceração e taninos para estabilização de cor. A sua eficiência foi avaliada através da análise da evolução da composição fenólica e cor dos vinhos durante 34 semanas após a fermentação alcoólica.

Comparativamente com a casta TN, a casta Alf é conhecida por originar vinhos com intensidade de cor inferior, tal como foi comprovado pelos resultados apresentados na primeira parte do trabalho. Assim, o estudo da adição de produtos enológicos foi realizado na vinificação dos vinhos obtidos a partir da casta Alf. A adição de produtos enológicos foi também realizada na produção de vinhos de Pmin de forma a verificar se manteria a sua composição fenólica e cor.

Os parâmetros físico-químicos dos vinhos (**em anexo**), foram analisados semanalmente. A adição dos produtos enológicos não promoveu alterações significativas na evolução dos vinhos. Os vinhos apresentaram teores alcoólicos diferentes e devido a isso, a extração dos compostos fenólicos das partes sólidas da uvas para o mosto foi diferente. Dessa forma, para além da análise da evolução, serão evidenciadas as variações dos diferentes verificadas na última análise comparativamente com a inicial dos parâmetros fenólicos e de cor.

Os teores alcoólicos dos ensaios da adição dos produtos enológicos de estabilização de cor tanto para a Pmin como para a Pman encontram-se na **figura 32**. No caso da Pmin, o vinho em que foi adicionada enzima (minE) apresentou teor alcoólico superior (13,5%) que os vinhos em que foram adicionados apenas taninos (minTa) e ambos os produtos (minETa) (13,0%). O vinho de testemunha (minT) apresentou teor alcoólico inferior (12,7%). Relativamente aos vinhos de Pman, o vinho com adição de tanino (manTa) apresentou teor alcoólico inferior (13,7%) comparativamente com os restantes vinhos. O vinho com adição de enzima (manE) e o vinho sem qualquer adição (manT) apresentaram ambos 13,5% enquanto o vinho com adição de ambos os produtos (manETa) registou o teor alcoólico mais elevado.

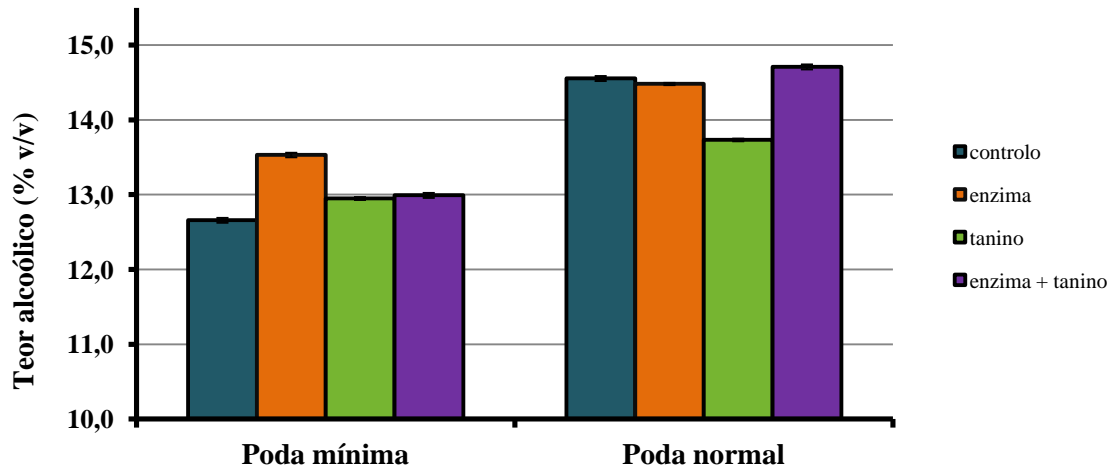


Figura 32: Teores alcoólicos dos ensaios de Pmin e Pman da casta Alf que sofreram a adição de produtos enológicos.

#### 4.2.1 - Evolução dos compostos fenólicos

##### 4.2.1.1 - Densidade ótica a 280nm

A evolução da densidade ótica a 280nm ao longo das 34 semanas de envelhecimento e a % de diminuição registada na última semana em relação ao início nos ensaios com a adição de produtos enológicos são apresentados **figura 33 e 34** nos vinhos de Pmin e de Pman, respetivamente.



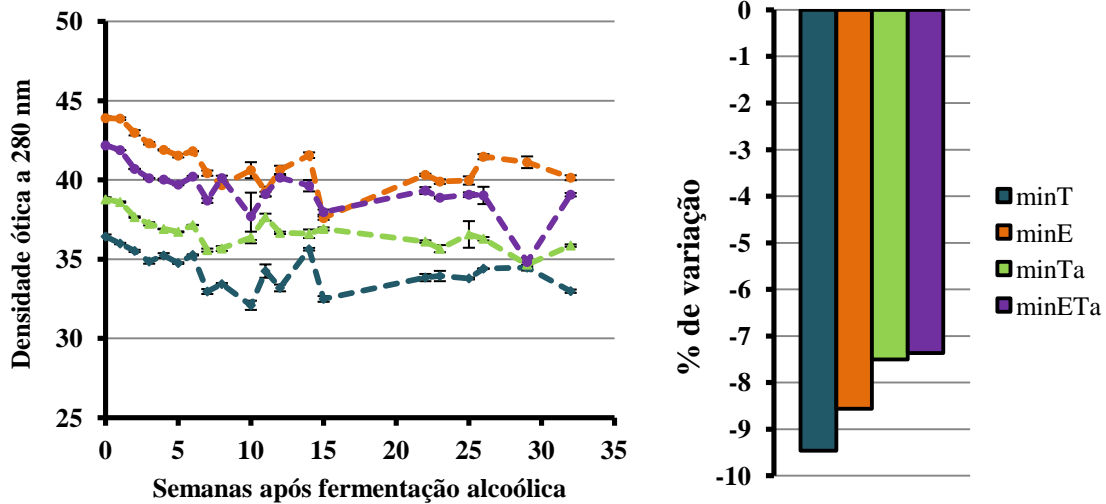


Figura 33: Evolução da densidade ótica a 280 nm ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.

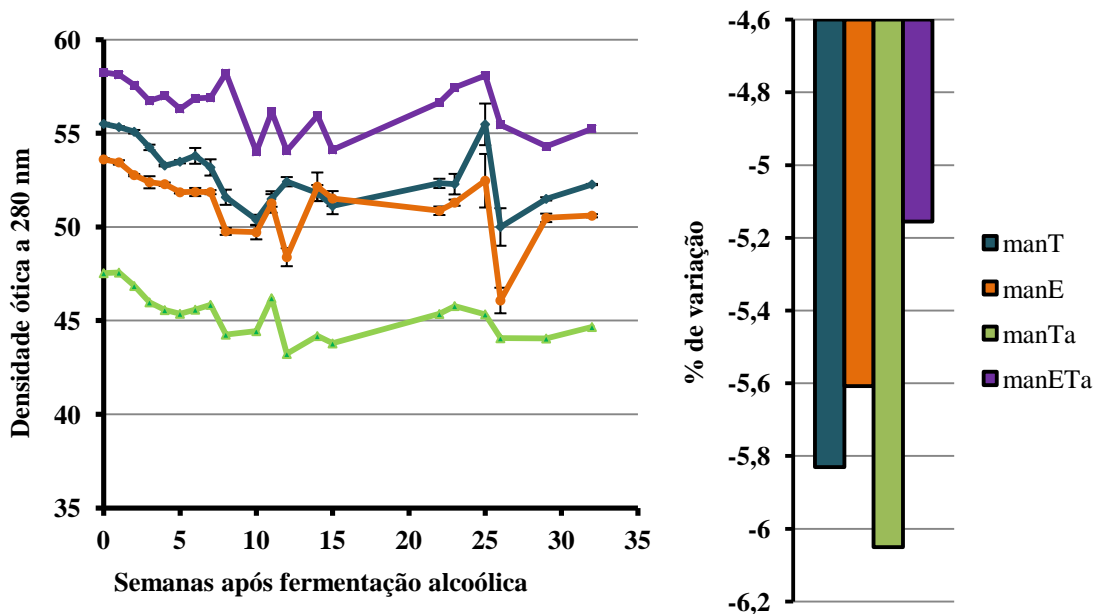


Figura 34: Evolução da densidade ótica a 280 nm ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos.

No geral, a densidade ótica a 280 nm dos ensaios de Pmin foi diminuindo ao longo da vinificação, mas a adição de produtos enológicos levou a uma menor taxa de diminuição comparativamente com o controlo (minT). Inicialmente (semana 0), a absorvância a 280 nm registou valores superiores no minE (43,9) seguida do minETa (42,2), minTa (38,8) e minT (36,4) O envelhecimento dos vinhos levou a que a adição de



tanino (minTa) e a adição conjunta de enzima e tanino (minETA) apresentassem menor variação ao fim de 34 semanas (7,5 e 7,4%), comparativamente com a adição de enzima isoladamente (minE) com 8,6%. Após a fermentação alcoólica (semana 0), o minE registou o valor de densidade ótica a 280 nm mais elevado, indicando maior extração de compostos fenólicos. Porém, a sua estabilidade ao longo do envelhecimento foi inferior. A adição de tanino isolado ou juntamente com enzima (min Ta e minETa) promoveu maior estabilidade dos compostos que absorvem a 280nm nos vinhos de Pmin.

Os vinhos de Pman registaram valores superiores de densidade ótica a 280 nm que os de Pmin ao longo do envelhecimento, tal como se verificou anteriormente em ambas as castas. Após a fermentação alcoólica, o vinho manETA apresentou valores máximos (58,3) seguido do manT (55,5). Os ensaios em que foram adicionados produtos enológicos isoladamente (manE e manTa) registaram uma absorção inferior a 280 nm que o próprio controlo com 53,6 e 47,5. Nos vinhos de Pman, a adição de produtos enológicos a adição de produtos enológicos levou à menor diminuição da densidade ótica comparativamente com os vinhos de Pmin durante o envelhecimento. Com a adição de ambos os produtos (manETA) verificou-se a menor variação (5,2%), seguida da adição isolada de enzima (manE) com 5,6%. A adição de tanino (manTa), resultou em menor estabilidade (6,1%) que o controlo (manT) com 5,8%.

### 4.2.1.2 - Compostos fenólicos totais

A evolução dos compostos fenólicos totais ao longo das 34 semanas de envelhecimento e a % de diminuição registada na última semana em relação ao início nos ensaios com a adição de produtos enológicos são apresentados nas **figura 35 e 36** nos vinhos Pmin e Pman, respetivamente.

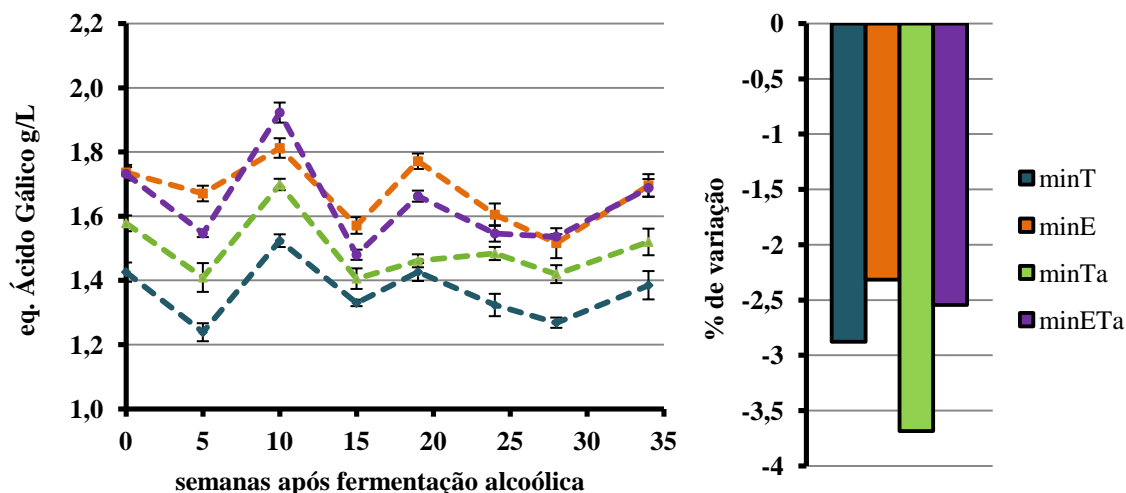


Figura 35: Evolução dos compostos fenólicos totais ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.

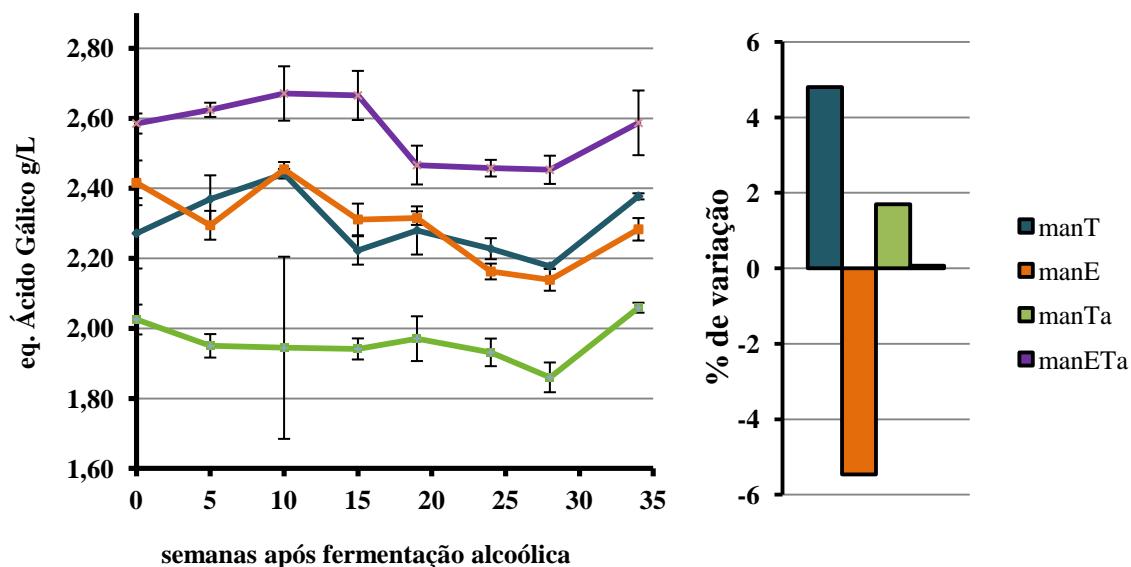


Figura 36: Evolução dos compostos fenólicos totais ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada na última semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos.

A adição dos produtos enológicos elevou o teor de compostos fenólicos nos vinhos de Pmin. As diferenças quantitativas da composição fenólica são as mesmas verificadas pela leitura da densidade ótica a 280 nm. Os vinhos em que foram adicionadas as enzimas



(minE e minETa) contêm maior teor de compostos fenólicos ao longo do envelhecimento. Inicialmente (semana 0), estes dois vinhos apresentaram 1,7 g/L de compostos fenólicos seguidos do minTa com 1,6 g/L e do minT com 1,4 g/L.

No geral, a variação de compostos fenólicos registada ao fim de 34 semanas foi bastante pequena (menor que 4%). A adição de enzima isolada (minE) ou em conjunto com tanino (minETa) levou a um decréscimo de 2,3% e 2,5%, respetivamente. Quando foi aplicado apenas o tanino (minTa), obtiveram-se valores de diminuição maiores (3,7%) comparativamente com o controlo (minT com 2,9%). Nos vinhos de Pmin, a adição de enzima estabilizou a composição fenólica ao contrário do tanino que levou à diminuição à composição fenólica total.

No caso da Pman a evolução ocorre da mesma forma e quantitativamente de acordo com a densidade ótica a 280 nm. Porém, a adição dos produtos enológicos diminuiu a composição fenólica dos vinhos ao longo do envelhecimento. Neste caso, e ao contrário do que aconteceu nos ensaios de Pmin, a adição de apenas enzima (manE) diminuiu em 5,5% os compostos fenólicos totais. Enquanto a adição de ambos os produtos (manETa) quase não alterou a composição fenólica e a adição de tanino (manTa) levou a um aumento de 2,6%. No vinho onde não ocorreu qualquer adição (manT) aumentou 5,1%. No geral, a adição de produtos enológicos não elevou a estabilidade dos compostos fenólicos totais nos vinhos de Pmin e Pman.

### 4.2.1.3 - Antocianinas

A evolução da concentração de antocianinas totais, poliméricas e livres ao longo das 34 semanas de envelhecimento e a % de diminuição registada na última semana em relação ao início nos ensaios com a adição de produtos enológicos de Pmin são apresentados nas **figura 37, 38 e 39**, respetivamente.

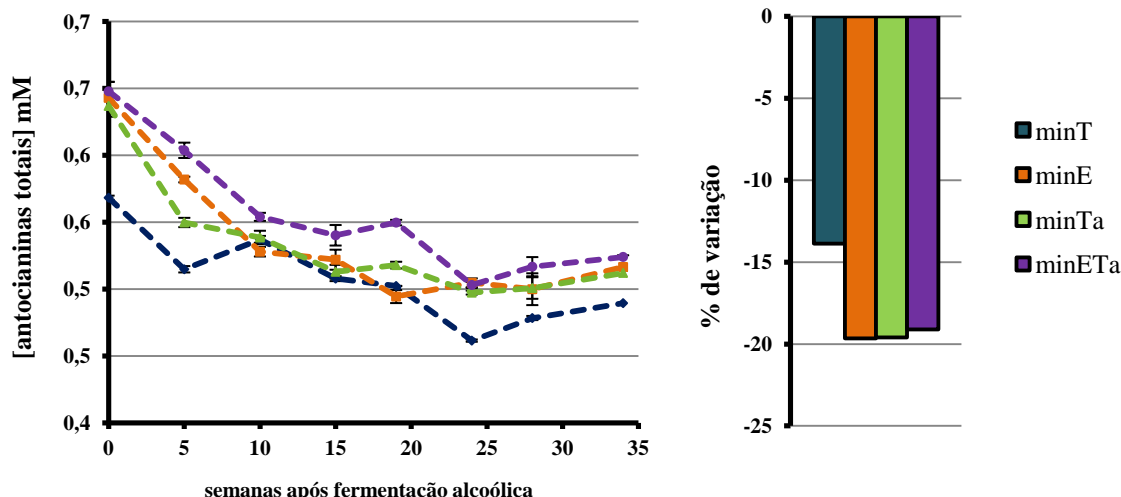


Figura 37: Evolução da concentração de antocianinas totais (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios Pmin com a adição de produtos enológicos.

O teor de antocianinas totais após a fermentação alcoólica (semana 0) foi superior nos vinhos com adição de produtos enológicos (6,4 mM) comparativamente com o controlo (5,7 mM). Nos vinhos com adição de produtos enológicos não ocorreram diferenças significativas entre si na diminuição de antocianinas totais até ao fim da fermentação (19%), tendo ocorrido maior diminuição comparativamente com o controlo (14%).

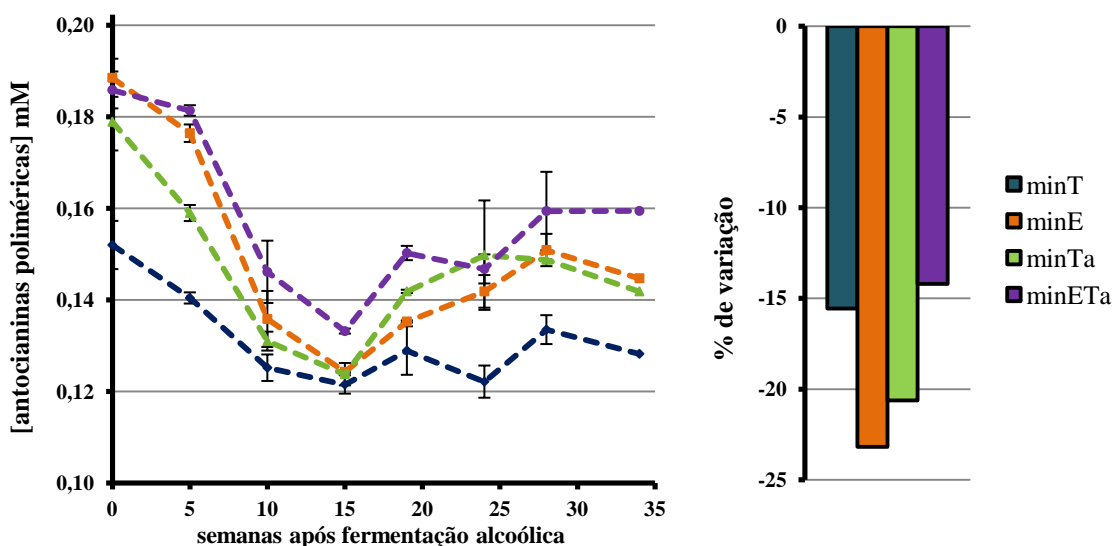
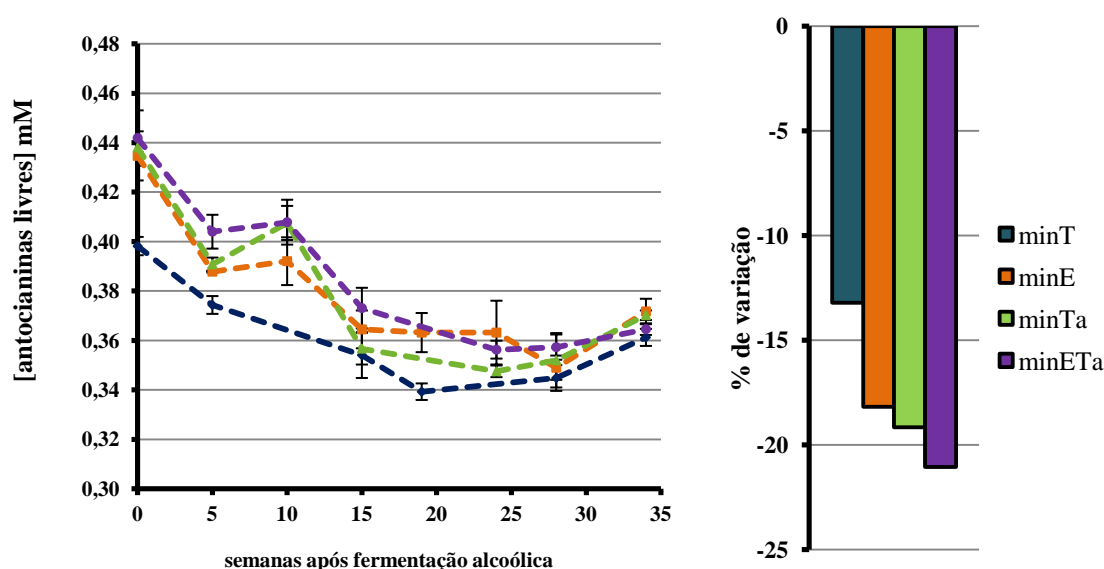


Figura 38: Evolução da concentração de antocianinas poliméricas (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos



Relativamente às antocianinas poliméricas, a adição de produtos enológicos não alterou a sua diminuição até à 15ª semana de envelhecimento. A adição de produtos enológicos promoveu maior polimerização das antocianinas da 15ª semana até ao fim da vinificação sendo que o aumento foi maior no vinho minETa (19,7%) seguido da minE (16,4%) e minTa (14,6%). Comparando as antocianinas poliméricas da última análise (semana 34) com a análise inicial (semana 0), a variação de antocianinas poliméricas do minETa foram inferiores (14%), comparativamente com o controlo (15,5%). A adição dos produtos isoladamente levou a uma grande diminuição das antocianinas poliméricas (23,2%) para a enzima (minE) e 20,6% para o tanino (minTa).



**Figura 39:** Evolução da concentração de antocianinas livres (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.

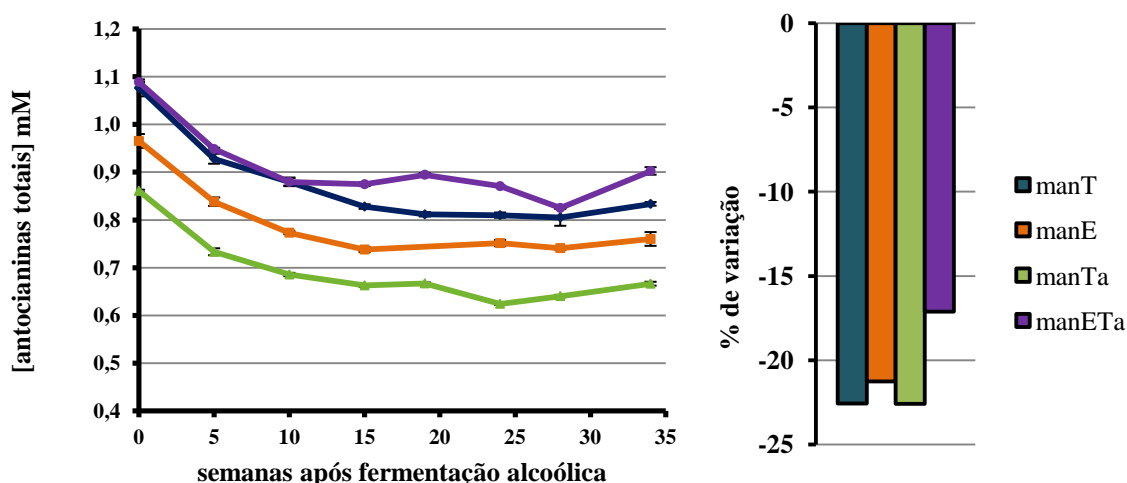
A adição dos produtos enológicos levou a uma maior diminuição das antocianinas monoméricas comparativamente com o ensaio onde não ocorreram quaisquer adições (13,2%). As perdas em antocianinas livres, ao fim de 34 semanas, foram superiores no minETa (21,1%) seguido do minTa (19,2%) e minE (18,2%).

A diminuição de antocianinas totais face à adição dos produtos são aproximadamente as mesmas. Contudo existe uma grande diferença na taxa de perda de antocianinas poliméricas entre os ensaios minE e minTa comparativamente com o minETa enquanto as perdas de antocianinas monoméricas foram semelhantes. Estes resultados



levam a supor que a taxa de polimerização de antocianinas com a adição de tanino e enzima isolados (minE e minTa) foi bastante elevada levando a tornarem-se insolúveis. Apesar de no ensaio minETa ter ocorrido uma diminuição acentuada das antocianinas totais, verificamos que esta diminuição aconteceu com maior taxa apenas nas antocianinas monoméricas, comparativamente com os restantes ensaios. Assim sendo, a adição de ambos os produtos em simultâneo (minETa) estabilizou as antocianinas poliméricas, permanecendo solúveis tal como se pretende.

A evolução da concentração de antocianinas totais, poliméricas e livres ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e a % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de poda manual com a adição de produtos enológicos que visam a cor encontram-se na **figura 40, 41 e 42** respetivamente.



**Figura 40:** Evolução da concentração de antocianinas totais (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos.

Tal como visto anteriormente, o teor de antocianinas totais dos vinhos de Pman é superior às antocianinas dos vinhos Pmin. Após a fermentação alcoólica (semana 0) os vinhos manETa e manT apresentavam 1,1 mM seguidos do manE com 9,7mM e por último o manTa com 8,6 mM.

Ao longo do envelhecimento, a adição de ambos os produtos em simultâneo (manETa) levou a uma menor perda de antocianinas totais (17,5%) comparativamente com o controlo (22,6%) ao contrário da adição de tanino (manTa) em que não se verificou qualquer alteração relativamente ao controlo (22,6%).

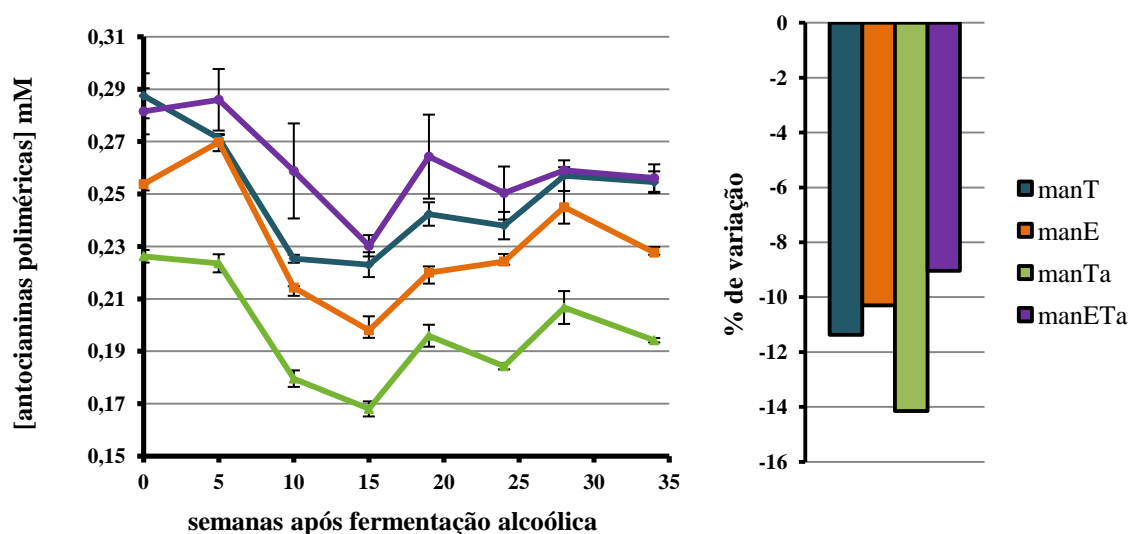


Figura 41: Evolução da concentração de antocianinas poliméricas (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos

O teor de antocianinas poliméricas logo após a fermentação alcoólica (semana 0) foi maior nos vinhos manETa (0,29 mM) seguido do controlo (0,28 mM). Tal como no caso das antocianinas totais, o manE (0,25 mM) e o manTa (0,23 mM) continham menor teor de antocianinas poliméricas que o controlo.

A adição de enzimas isoladamente (manE) ou com tanino (manETa) elevou a concentração de antocianinas poliméricas nas primeiras 5 semanas de envelhecimento. Porém, entre a 5ª e a 15ª semanas após a fermentação alcoólica registou-se a diminuição das antocianinas poliméricas nos quatro vinhos, seguida do aumento até ao fim da vinificação, tal como tinha acontecido nos vinhos de Pmin. Ao fim de 34 semanas de envelhecimento, a aplicação de tanino (manTa) revelou-se novamente ineficaz na estabilidade das antocianinas poliméricas pois neste vinho ocorreu maior diminuição (14%) do que no controlo (11%). Ao contrário do que ocorreu nos vinhos Pmin, a adição de enzima isolada (manE) no Pman levou a maior estabilidade (10%) comparativamente com o controlo (11%). A adição de ambos os produtos enológicos (manETa) apresentou novamente ligeiras melhorias (9%) na estabilidade das antocianinas poliméricas ao fim de 34 semanas.

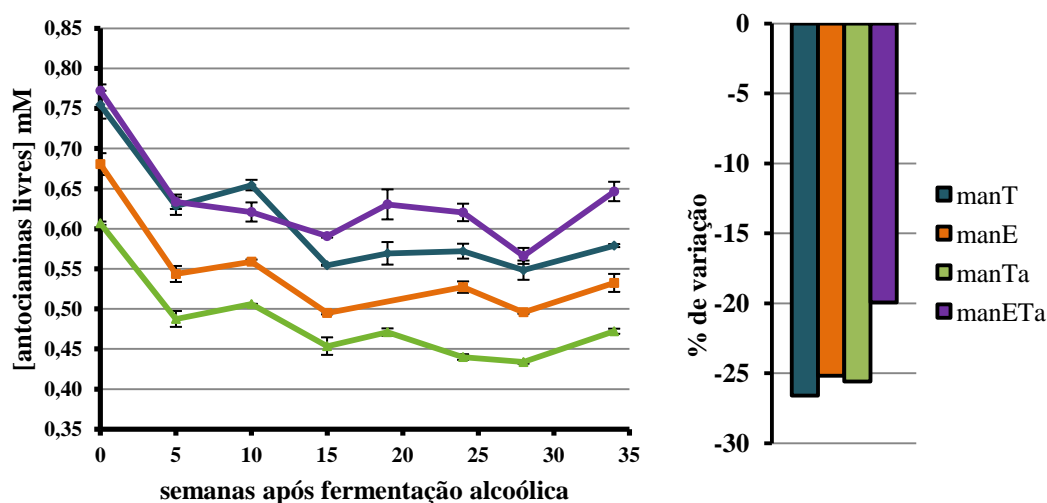
A adição de produtos enológicos nos vinhos de Pman também não alterou a diminuição verificada nas primeiras 5 semanas das antocianinas monoméricas. No ensaio





manETa as perdas em antocianinas livres foram as menores, 20%, comparativamente com a adição dos produtos isolados (manE e manTa), com 25%, e sem qualquer adição de produtos enológicos, 27% (**fig.42**). A menor diminuição das antocianinas quando aplicados os produtos enológicos está também de acordo com o fenómeno de copigmentação.

No caso da Pman, tal como se verificou na Pmin, a adição de ambos os produtos revelou resultados mais benéficos na estabilização das antocianinas.



**Figura 42:** Evolução da concentração de antocianinas livres (expressas em mM) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34<sup>a</sup> semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos.

#### 4.2.1.4 - Antocianinas livres dos vinhos engarrafados

Foi avaliado o efeito da adição dos produtos enológicos na composição em antocianinas livres nos vinhos engarrafados. Os resultados encontram-se na **tabela 4** para os vinhos de Pmin e na **tabela 5** para os vinhos de Pman.

A análise das antocianinas livres dos vinhos de Pmin evidencia que a adição dos produtos enológicos diminuiu a totalidade das antocianinas monoméricas. O vinho que serviu de controlo apresentou a maior composição de antocianinas (322,5 mg/L) sendo a Mv3glc com 258,6 mg/L, a mais abundante.



Tabela 3: Antocianinas monoméricas dos vinhos engarrafados Pmin com a adição de produtos enológicos.

		Concentração (mM)			
		minT	minE	minTa	minETa
Ant3Glc	Df3Glc	0,61	0,77	0,43	
	Pt3Glc	7,42	7,20	6,57	5,29
	Pn3Glc	23,36	27,37	21,46	22,15
	Mv3Glc	258,56	245,54	246,56	234,00
	<b>Total</b>	<b>289,95</b>	<b>280,88</b>	<b>275,02</b>	<b>261,44</b>
Ant3acGlc	Df3acGlc	6,89	7,38	8,07	7,28
	Pn3acGlc	2,96	3,42	2,93	1,28
	Mv3acGlc	9,83	9,40	9,68	9,10
	<b>Total</b>	<b>19,69</b>	<b>20,20</b>	<b>20,68</b>	<b>17,66</b>
Ant3cumGlc	Peo3cumGlc	2,81	3,05	2,20	2,57
	Malv3cumGlc	10,03	9,77	9,38	8,42
	<b>Total</b>	<b>12,83</b>	<b>12,82</b>	<b>11,58</b>	<b>10,98</b>
<b>Antocianinas livres totais</b>		<b>322,48</b>	<b>313,90</b>	<b>307,28</b>	<b>290,09</b>

Ant3Glc - Antocianidina-3-glucosídeo; Df3Glc - delphinidina-3-glucosídeo; Cy3Glc - cianidina-3-glucosídeo; Pt3Glc - petunidina-3-glucosídeo; Pn3Glc - peonidina-3-glucosídeo; Mv3Glc - malvidina-3-glucosídeo; Ant3acGlc - antocianidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Df3acGlc - delphinidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Pt3acGlc - petunidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Pn3acGlc - peonidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Mv3acGlc - malvidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Ant3cumGlc - antocianidina-3-(6-cumaryl)glucosídeo; Peo3cumGlc - peonidina-3-(6-cumaryl)glucosídeo; Malv3cumGlc - malvidina-3-(6-cumaryl)glucosídeo.

A adição de enzima (minE) levou à diminuição em 3% das antocianinas totais (313,9 mg/L) e esta diminuição é praticamente devida à diminuição de 5% da Mlv3Glc (245,5). A adição de tanino (minTa) diminuiu em 5% as antocianinas monoméricas totais (307,3 mg/L) comparativamente com o controlo. As Ant3Glc diminuíram 5% (275,2 mg/L) e as Ant3cumGlc diminuíram 10% (11,6 mg/L), ao contrário das Ant3acGlc que aumentaram 5% (11,1 mg/L).

Quando se adicionaram ambos os produtos em conjunto (minETa) as antocianinas monoméricas totais diminuíram 10,0% (290,1 mg/L) sendo esta diminuição dividida pelos 3 tipos de antocianinas: as Ant3Glc com 9,8% (261,4 mg/L), as Ant3acGlc com 10,3% (17,7 mg/L) e as Ant3cumGlc com 14,4% (11,0 mg/L).



Os resultados obtidos deixam entender que a adição de produtos enológicos nos vinhos de Pmin diminui, no geral, a estabilidade das antocianinas monoméricas ao fim de 34 semanas de envelhecimento. As razões para uma estabilidade menor das antocianinas livres terá a ver com a elevação da reatividade devido à maior presença de compostos fenólicos, como consequência da adição dos produtos enológicos e confirmada pela análise de compostos fenólicos totais nos vinhos de Pmin. Assim sendo, a formação de pigmentos derivados das antocianinas ou a condensação das antocianinas com outros compostos fenólicos ocorre de forma mais acelerada quando se adicionam os produtos enológicos tal como se verificou na análise das antocianinas pelo método colorimétrico.

No caso dos vinhos de Pman (**tabela 4**), a análise das antocianinas mostrou que o vinho sem qualquer adição enológica (manT) continha 471,4 mg/L de antocianinas livres, em que 426,6 mg/L correspondiam a Ant3Glc, 29,6 mg/L a Ant3acGlc e 15,3 mg/L a Ant3cumGlc.

A adição de enzima (manE) nos vinhos de Pman promoveu a perda de 11% das antocianinas livres totais. Esta tendência foi verificada em todos os tipos de antocianinas livres em que as Ant3Glc diminuíram 11% (380,3 mg/L), as Ant3acGlc 6,6% (27,7 mg/L) e as Ant3cumGlc 17,8% (12,6 mg/L). A aplicação de enzima nos vinhos de Pman levou a uma diminuição mais acentuada das antocianinas livres comparativamente com os vinhos Pmin.

A adição de taninos (manTa) levou também à diminuição das antocianinas livres totais, registando-se 20,6% de diminuição (374,4 mg/L). Esta tendência foi também verificada em todos os tipos de antocianinas monoméricas, em que as Ant3Glc diminuíram 21,1% (336,6 mg/L), as Ant3acGlc 18,6% (24,1 mg/L) e as Ant3cumGlc 10,7% (13,6). Tal como no caso da enzima, as diminuições dos vinhos com adição de tanino de Pman foram maiores que os da Pmin.

A adição de ambos os produtos em conjunto (manETa) aumentou as antocianinas monoméricas totais em 19,5% (563,4 mg/L) comparativamente com o controlo sendo este aumento observado para os diferentes tipos de antocianinas monoméricas com as Ant3Glc a ter aumentado 18,2% (504,3 mg/L), as Ant3acGlc 30,5% (38,7 mg/L) e as Ant3cumGlc 33,9% (20,4 mg/L).

Estes resultados vêm de acordo com a análise quantitativa de antocianinas livres pelo método colorimétrico na última semana analisada.



Tabela 4: Antocianinas monoméricas dos vinhos engarrafados de Pman com a adição de produtos enológicos.

		Concentração (mM)			
		manT	manE	manTa	manETa
Ant3Glc	Df3glc	4,21	3,74	2,04	6,19
	Cy3glc	0,61	0,49	0,37	0,71
	Pt3gcl	19,93	13,57	11,63	28,15
	Pn3gcl	40,66	34,94	27,57	49,70
	Mv3glc	361,14	327,54	295,00	419,51
	<b>Total</b>	<b>426,55</b>	<b>380,29</b>	<b>336,61</b>	<b>504,26</b>
Ant3acGlc	Df3acGlc	15,30	14,47	11,20	17,51
	Pn3acGlc	2,02	1,66	1,66	4,88
	Mv3acGlc	12,30	11,53	10,72	15,41
	<b>Total</b>	<b>29,62</b>	<b>27,66</b>	<b>24,11</b>	<b>38,66</b>
Ant3cumGlc	Peo3cumGlc	3,85	3,21	3,14	4,86
	Malv3cumGlc	11,41	9,34	10,49	15,58
	<b>Total</b>	<b>15,26</b>	<b>12,55</b>	<b>13,64</b>	<b>20,44</b>
<b>Antmon totais</b>		<b>471,43</b>	<b>420,50</b>	<b>374,36</b>	<b>563,35</b>

Ant3Glc - Antocianidina-3-glucosídeo; Df3Glc - delphinidina-3-glucosídeo; Cy3Glc - cianidina-3-glucosídeo; Pt3Glc - petunidina-3-glucosídeo; Pn3Glc - peonidina-3-glucosídeo; Mv3Glc - malvidina-3-glucosídeo; Ant3acGlc - antocianidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Df3acGlc - delphinidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Pt3acGlc - petunidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Pn3acgel - peonidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Mv3acGlc - malvidina-3-(6-acetil)glucosídeo; Ant3cumGlc - antocianidina-3-(6-cumaril)glucosídeo; Peo3cumGlc - peonidina-3-(6-cumaril)glucosídeo; Malv3cumGlc - malvidina-3-(6-cumaril)glucosídeo.

## 4.2.2 - Evolução da cor

### 4.2.2.1 - Método de Somers

A evolução da intensidade de cor e a tonalidade ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e a % de diminuição e aumento registada à 34<sup>a</sup> semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor encontram-se na **figura 43 e 44**.

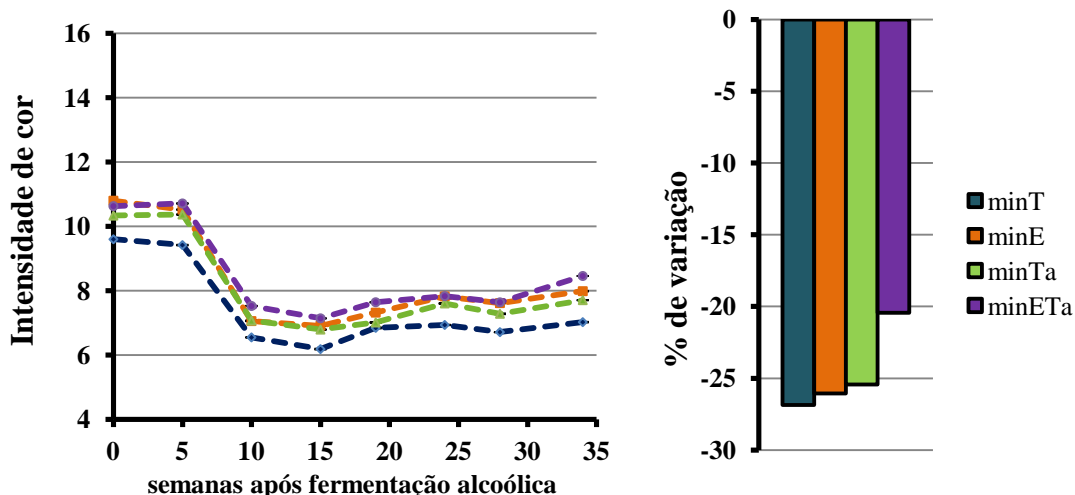


Figura 43: Evolução da intensidade de cor (expressas UA) ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor.

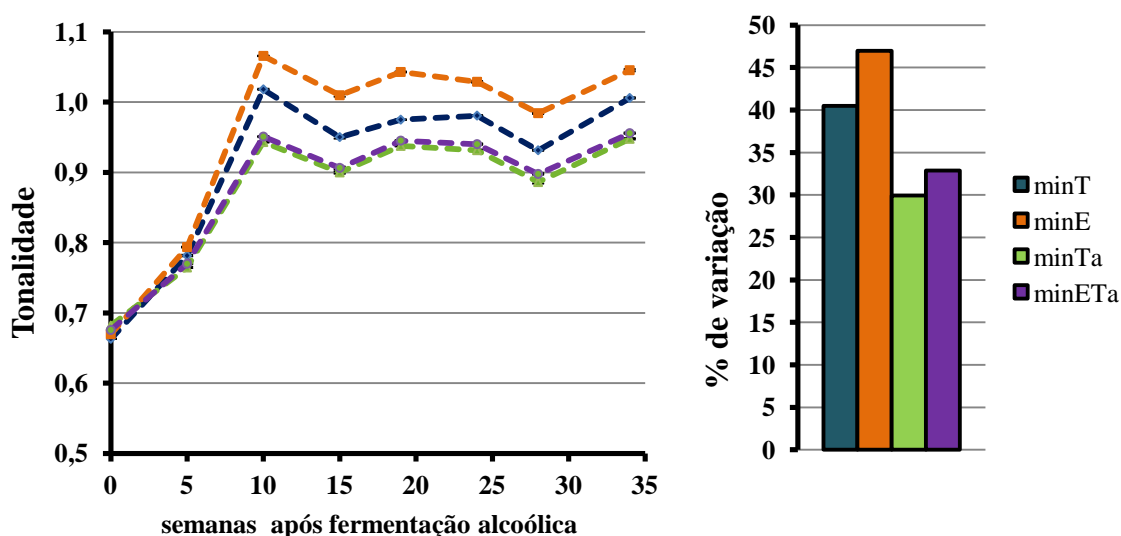


Figura 44: Evolução da tonalidade ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.

A adição de produtos enológicos nos ensaios de Pmin não alterou a tendência geral de alteração da intensidade de cor. Porém, aumentou a sua estabilidade ao fim de 34 semanas de envelhecimento. As diferenças quantitativas entre os ensaios estão de acordo com a composição fenólica total e antocianinas totais. A última análise revelou que na adição de ambos os produtos (minETa) ocorreu menor taxa de diminuição (20%)



comparativamente com o controlo (27%). A adição dos produtos isoladamente (minE e minTa) resultou na diminuição de 26% e 25%.

Como a tonalidade dos vinhos de Pmin logo após a fermentação alcoólica é igual, a comparação entre os ensaios pode ser efetuada de forma direta. Ao fim de 34 semanas de envelhecimento, a tonalidade do minTa (0,95) e do minETa (0,96) foi inferior ao controlo (1,00), ao contrário do minE, que foi superior (1,05). A adição de tanino, quer isolado (minTa), quer juntamente com enzima (minETa), promoveu a estabilização da cor das antocianinas vermelhas nos vinhos de Pmin. Como descrito anteriormente, os preparados de taninos têm como objetivo a estabilização de cor dos vinhos tintos a longo prazo. Ao fim de poucas semanas, no caso da Pmin, já se verifica este efeito. Teoricamente, os taninos reagem com as antocianinas, através de fenómenos de condensação ou fenómenos de copigmentação prevenindo a alteração da sua cor para incolor ou amarelo. Pelo contrário, a adição de enzimas elevou o conteúdo em antocianinas de cor amarela comparativamente com as de cor vermelha ao fim de 34 semanas.

A evolução da intensidade de cor e a tonalidade ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e a % de diminuição e aumento registada à 34<sup>a</sup> semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor encontram-se na **figuras 45 e 46s**.

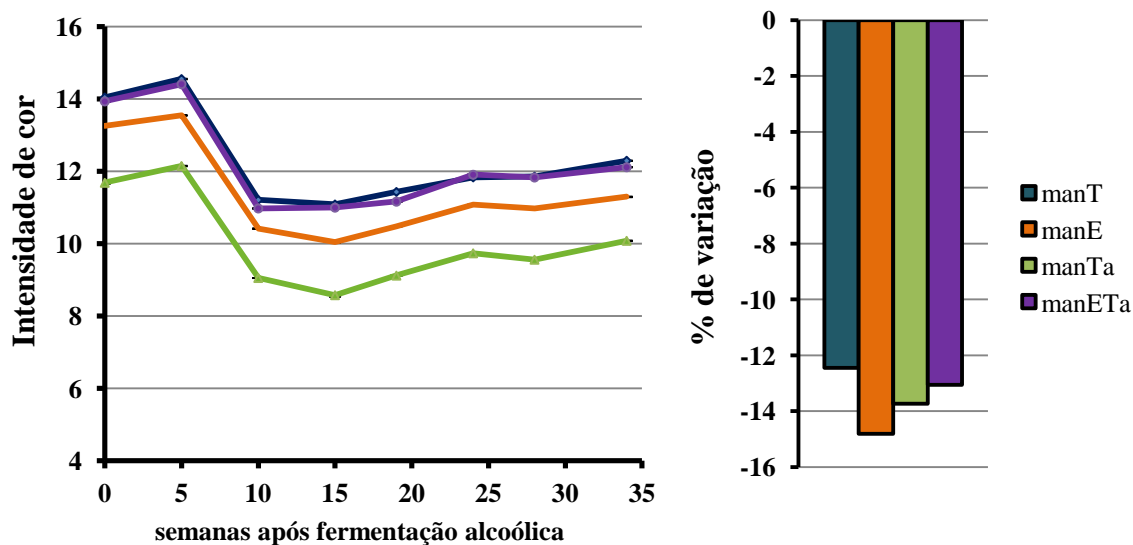


Figura 45 Evolução da intensidade de cor ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34<sup>a</sup> semana (à direita) nos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.

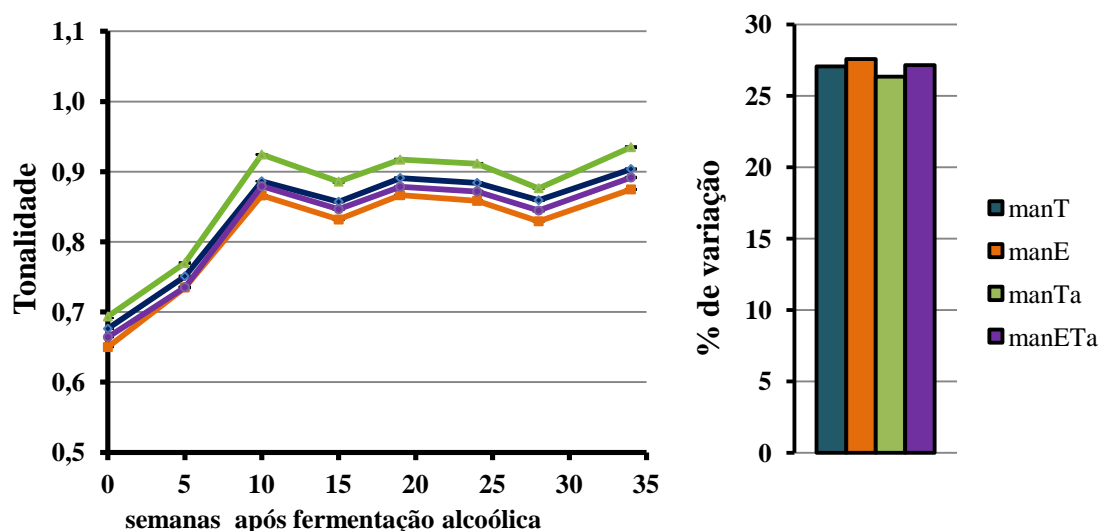


Figura 46: Evolução da tonalidade ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e % de diminuição registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos.

A aplicação de produtos enológicos nos ensaios de Pman não apresentou resultados benéficos na intensidade de cor dos vinhos ao fim de 34 semanas de envelhecimento, ao contrário do que se verificou nos vinhos de Pmin. Os vinhos evoluíram da mesma forma e ao fim de 34 semanas de envelhecimento o vinho sem qualquer adição (manT) foi o que apresentou menor % de diminuição da cor inicial, cerca de 12,5%. A adição de enzima (manE) levou à diminuição mais elevada da cor, 14,8% e o tanino (manTa) 13,7%. A adição de ambos os produtos levou à perda de 13,1% da intensidade de cor. Relativamente à tonalidade, as diferenças verificadas entre os vinhos durante o envelhecimento são pequenas, não existindo diferenças significativas ao fim de 34 semanas. Estes resultados sugerem que a adição dos produtos enológicos não alterou a tonalidade dos vinhos.

#### 4.2.2.2 - CIELab

A evolução das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento (à esquerda) e a % de diminuição e aumento registada à 34ª semana (à direita) nos ensaios de Pmin e Pman com adição de produtos enológicos que visam a cor encontram-se nas **figuras 47 e 48**, respetivamente.

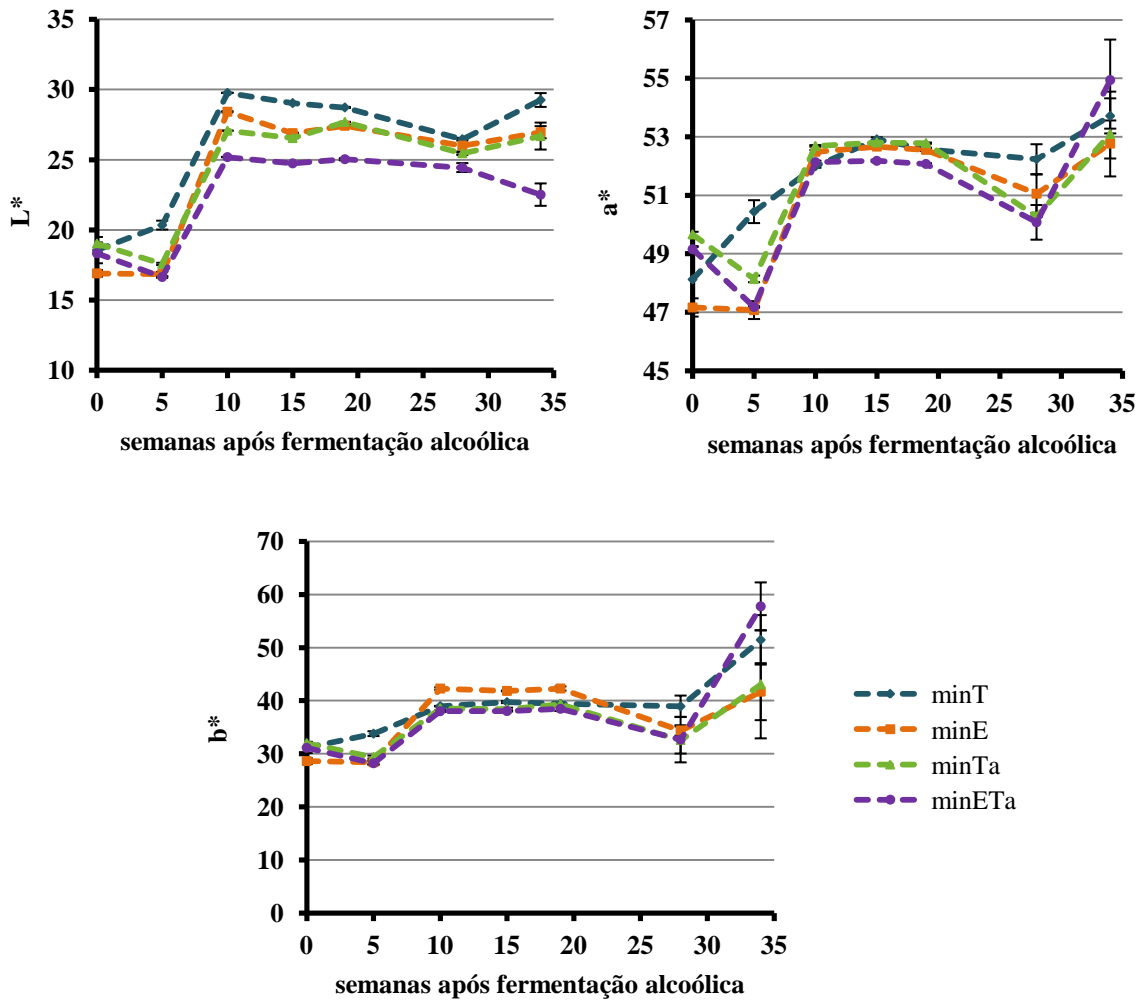


Figura 47: Evolução do L\*, a\* e b\* ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos.

As análises das coordenadas L\*, a\* e b\* nos ensaios de Pmin demonstram também algumas diferenças aparentes entre os ensaios. A adição de enzima e tanino em conjunto diminuiu o L\* (clareza) e o a\*(vermelho) enquanto a adição dos produtos isolados apenas diminuiu o L\*. Porém, a adição apenas de enzima aumentou o b\* (amarelo), o que vem de acordo com o aumento da tonalidade no ensaio minE.



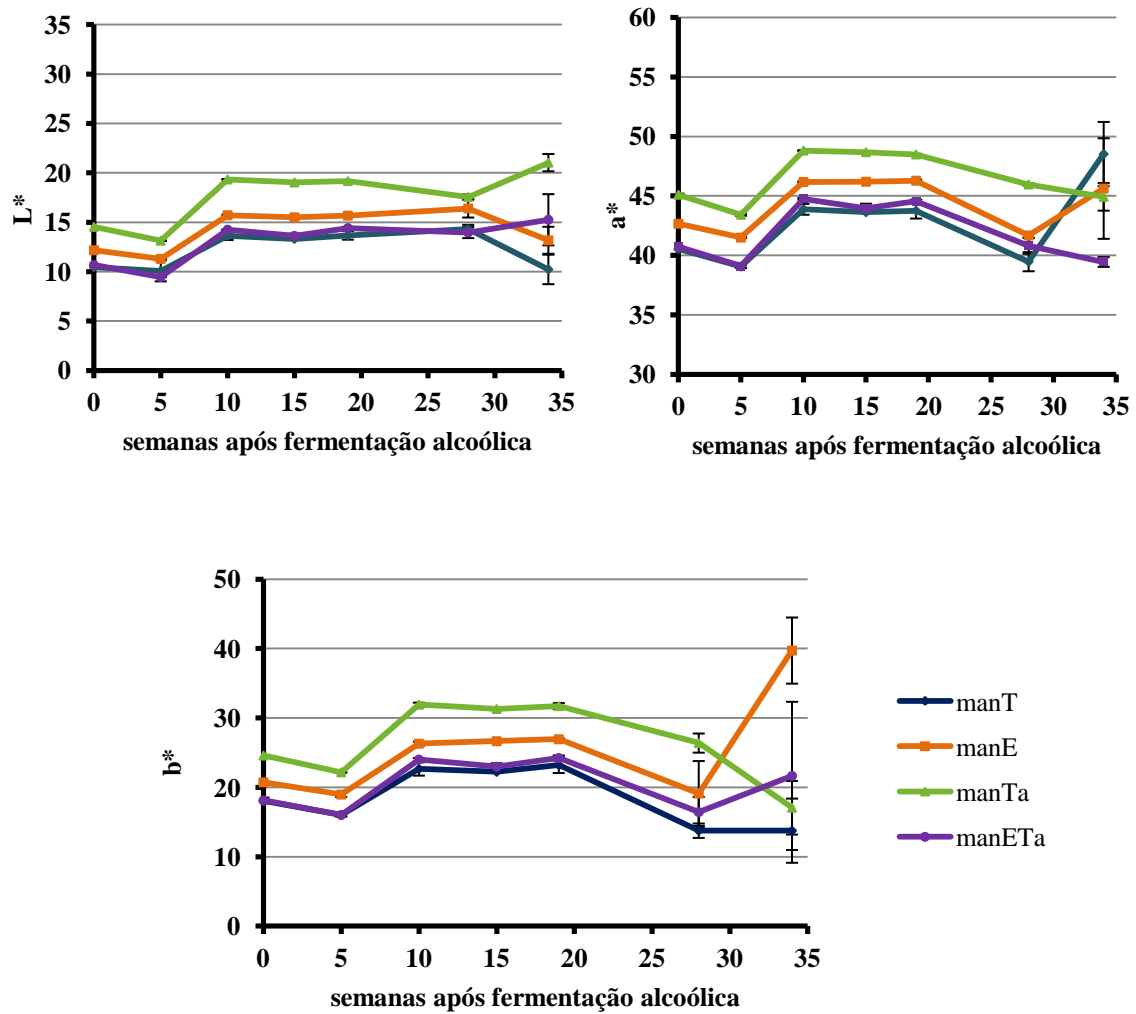


Figura 48: Evolução do L\*, a\* e b\* ao longo das primeiras 34 semanas de envelhecimento dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos.

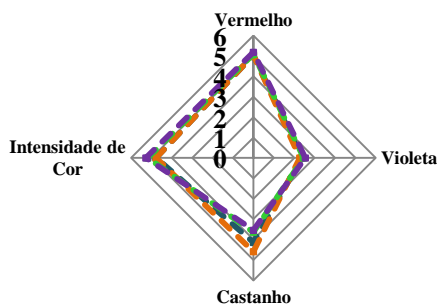
Nos vinhos de Pman, a adição de enzimas e taninos isoladamente (manE e manTa) elevaram o L\*, o a\* e o b\* tendo ocorrido maior elevação do caso do tanino. Estes produtos promoveram assim que os vinhos de Pman fossem mais claros, vermelhos e amarelos. A adição dos produtos em simultâneo (manETa) não promoveu diferenças significativas nos parâmetros L\*, a\* e b\* comparativamente com o controlo.



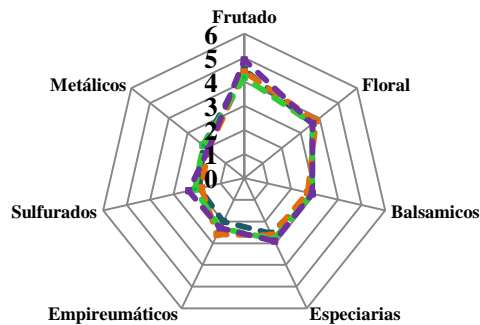
### 4.2.3 - Análise sensorial

De forma a avaliar o efeito da adição dos produtos enológicos nas características finais dos vinhos procedeu-se a uma prova organolética.

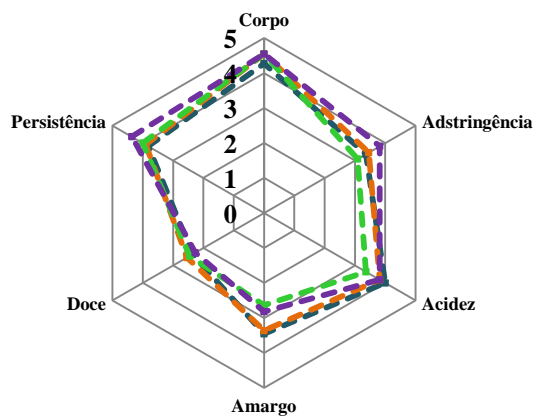
#### Cor



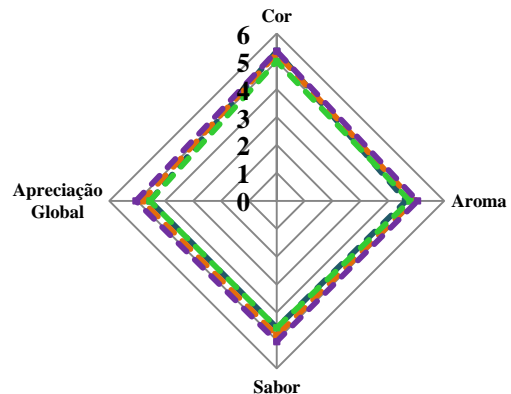
#### Aroma



#### Sabor



#### Qualidade



--- minT    --- minE    --- minTa    --- minETa

Figura 49: Análise sensorial dos vinhos engarrafados de Pmin com a adição de produtos enológicos.

A análise sensorial revelou que a adição de taninos de estabilização de cor nos vinhos de Pmin melhorou a cor (fig.51). Apesar dos vermelhos e violetas não serem



superiores, a adição de taninos, quer isolados (minTa), quer juntamente com enzimas de maceração (minETa) diminuiu os castanhos, tornando a cor dos vinhos mais intensa. Estes resultados estão de acordo com a diminuição da tonalidade dos vinhos de Pmin com adição de tanino (minTa e minETa)

A adição dos produtos enológicos não levou a grandes alterações no aroma dos vinhos. Porém, no sabor verificou-se que a adição de qualquer um dos produtos enológicos tornou o vinho mais encorpado e a aplicação conjunta de enzima e tanino (minETa) aumentou a adstringência e persistência na boca. No entanto, a adição apenas de tanino (minTa) diminuiu a adstringência, acidez e amargura dos vinhos de Pmin. A nível global, os vinhos que sofreram a adição de ambos os produtos (minETa) foram melhor classificados apesar das diferenças não serem muito consideráveis.

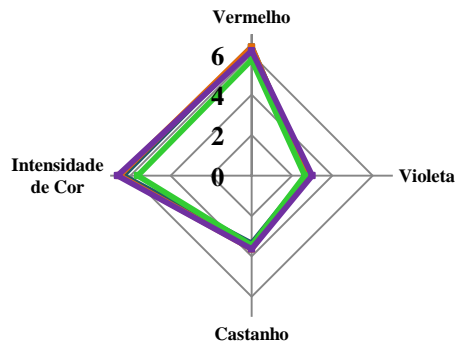
A adição dos produtos enológicos também não apresentou grande influência nas características finais dos vinhos de Pman (**fig.50**). A adição apenas de tanino (manTa) verificou-se prejudicial em termos de cor, o que pode ser devido à menor composição fenólica. Apesar das diferenças de cor observadas pelos resultados obtidos pelo método CieLab, a nível de prova sensorial essas diferenças não são perceptíveis.

Em termos de aroma verifica-se uma tendência de aumento apenas de notas florais nos vinhos com adição de ambos os produtos enológicos (manETa) enquanto que a adição apenas de tanino diminuiu o aroma de compostos florais. Em termos de sabor, o vinho com adição de tanino revelou ser mais amargo, com menos corpo e persistência. Os vinhos com tanino (manTa) e a enzima (manE) revelaram ser menos adstringentes. A ineficiência dos produtos enológicos é mostrada na qualidade geral onde, com exceção do tanino (manTa), que diminuiu a qualidade dos vinhos, não se verificam diferenças significativas entre os vinhos.

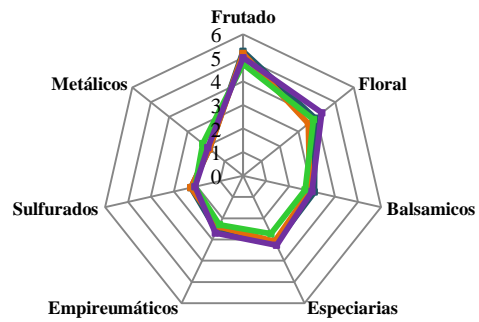


## Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto

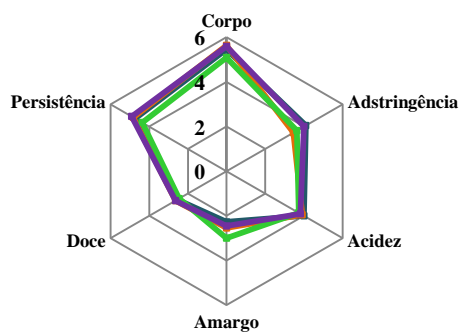
### Cor



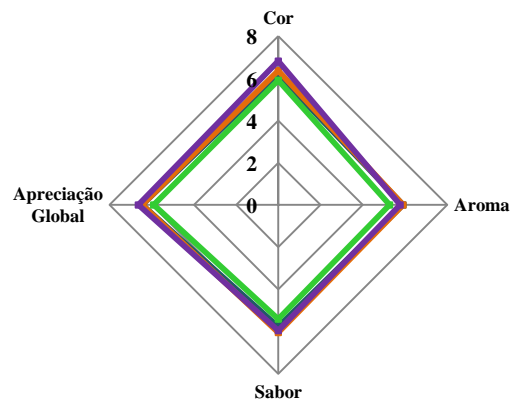
### Aroma



### Sabor



### Qualidade



— manT — manE — manTa — manETa

Figura 50: Análise sensorial dos vinhos engarrafados de Pman com a adição de produtos enológicos.



# 5 - Conclusão



## **Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto**



O objetivo principal deste trabalho experimental veio no seguimento dos estudos realizados pela empresa Dão Sul na viabilidade de utilização da Pmin como alternativa à Pman. Os resultados obtidos na colheita de 2012 das castas Alf e TN mostram que os vinhos de Pmin apresentaram menor teor alcoólico dos vinhos, aumentando a acidez total. A aplicação da Pmin resultou em vinhos com valores diminuídos nos parâmetros relativos à composição fenólica, nomeadamente a densidade ótica a 280 nm, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antocianinas totais, poliméricas e monoméricas. Estas diferenças traduziram-se numa intensidade de cor inferior dos vinhos de Pmin e elevação dos parâmetros L\*, a\* e b\* comparativamente com os vinhos de Pman. As diferenças na composição fenólica entre os vinhos de Pmin e Pman foram especialmente maiores nos vinhos da casta Alf comparativamente com a casta TN.

A análise sensorial dos vinhos de Pmin e Pman das castas Alf e TN mostrou que o painel de provadores considerou os vinhos TN de ambas as podas similares ao contrário do AlfPmin, cuja qualidade foi considerada bastante inferior comparativamente com o AlfPman. Sendo assim, os resultados de vinificação de 2012 mostram que a aplicação da Pmin apresentou melhores resultados na casta TN. Por seu turno, a aplicação da Pmin na casta Alf apresentou resultados mais baixos na qualidade organolética podendo ser utilizada em vinhos de gama média/baixa.

Nos anos transatos a este estudo, a aplicação da Pmin nas videiras permitiu diminuir consideravelmente a mão-de-obra na vinha entre dezembro e fevereiro. Para além disso, a produção foi bastante mais elevada, superiorizando os 50%. Face aos benefícios financeiros que esta substituição transportou, quer na elevada produção, quer na diminuição dos custos na vinha entre Dezembro e Fevereiro, estes resultados revelam-se bastante promissores a nível industrial.

Torna-se conveniente atentar também ao facto dos ensaios de Pmin da colheita de 2012 não poderem ser analisados isoladamente. Entre 2008 e 2010 verificou-se, em todos os anos, a diminuição ligeira da intensidade de cor dos vinhos de Pmin para ambas as castas. Porém, a forma como a videira irá reagir à elevação da produção contínua, é ainda uma incógnita. A continuação da avaliação das características físico-químicas, fenólicas, cromáticas e organoléticas torna-se imperativa de forma a atingir uma conclusão definitiva sobre a utilização da Pmin por parte da empresa.

O segundo objetivo do trabalho consistiu na avaliação da eficiência da adição de produtos enológicos na evolução da cor de vinhos tintos. Os resultados obtidos são ainda



preliminares, não se verificando grandes benefícios com a adição destes produtos. Porém, a adição conjunta de taninos de estabilização de cor e enzimas de maceração apresentou uma ligeira tendência de melhoria nos resultados físico-químicos, fenólicos e de cor. A prova organolética também evidenciou uma ligeira elevação da qualidade geral destes vinhos.

Tal como tem sido referido, a utilização dos produtos enológicos necessita de bastante cuidado por parte do enólogo e, por essa razão, estes resultados são importantes para a sua decisão de utilização ou não destes produtos. É também necessário verificar se o investimento nestes produtos realmente resulta em melhorias nas características organoléticas dos vinhos pois a sua adição tem como consequência a elevação do preço do produto final. Caso esta adição não surta efeitos benéficos perceptíveis a nível organolético, apesar de estes serem verificados a nível químico como se verificou em alguns dos casos, não valerá a pena elevar o preço do vinho.

A análise final da eficiência destes produtos na colheita de 2012 na casta Alf ainda não se encontra concluída. De facto, a fase em que esta avaliação é realizada é ainda precoce. O tempo de estágio dos vinhos tintos é normalmente de dois anos antes de estarem disponíveis no mercado. Este estudo durou apenas 34 semanas. O efeito a curto prazo demonstrou melhorias principalmente na adição dos produtos em simultâneo. Porém, futuras avaliações dos vinhos, tanto a nível químico como organolético, poderão evidenciar diferenças mais significativas na utilização destes produtos.





# 6 - Bibliografia



1. Mueller Loose S, Szolnoki G. Market price differentials for food packaging characteristics (2012). *Food Quality and Preference*, 25(2):171–82.
2. Sáenz-Navajas M-P, Echavarri F, Ferreira V, Fernández-Zurbano P. (2011) Pigment composition and color parameters of commercial Spanish red wine samples: linkage to quality perception. *European Food Research and Technology*, 232(5):877–87.



3. Parpinello GP, Versari A, Chinnici F, Galassi S. (2009) Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines. *Food Research International*, 42(10):1389–1395.
4. Herreroa A, Sanchezb MS, Sarabiab LA, Work P. (1995). Modelling the Relation Between CieLab Parameters and Sensory Scores for Quality Control of Red-wine Colour. *Analyst*. 120:2793–2798.
5. Kennedy J. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35:107–20.
6. Bueno JM, Ramos-Escudero F, Sáez-Plaza P, Muñoz AM, José Navas M, Asuero AG. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 42(2):102–25.
7. Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(2):85–118.
8. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdiou D. (2006). Phenolic Compounds. Handbook of Enology. John Wiley & Sons, Ltd; 141–203.
9. Vermerris W, Nicholson R. (2006) Chemical Properties of Phenolic Compounds. Phenolic Compound Biochemistry. Springer Netherlands; 35–62.
10. Renaud S, De Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808):1523–6.
11. Pereira DM, Valentão P, Pereira J a., Andrade PB. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*. 14(6):2202–11.
12. Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R. (2010) Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: focus on omega-3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols. *Cardiovascular therapeutics*, 28(4):e13–9.
13. Grassi D, Desideri G, Ferri C. (2010). Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*, 2(8):889–902.
14. German JB, Walzem RL. (2000). The health benefits of wine. *Annual review of nutrition*. 20:561–93.
15. Haslam E. (2007) Vegetable tannins - lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68(22-24):2713–21.
16. Cheynier V. (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1):223–229.
17. Vermerris W, Nicholson R. (2006) Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. Phenolic Compound Biochemistry:1–34.
18. Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10):4009–17.
19. García-Puente Rivas E, Alcalde-Eon C, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. (2006). Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2):215–22.



20. Núñez V, Monagas M, Gomez-Cordovés MC, Bartolomé B. (2004). Vitis vinifera L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology*, 31(1):69–79.
21. Santiago JL, González I, Gago P, Alonso-Villaverde V, Boso S, Martínez MC. (2008). Identification of and relationships among a number of teinturier grapevines that expanded across Europe in the early 20th century. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. (Föex):223–229.
22. He F, Liang N-N, Mu L, Pan Q-H, Wang J, Reeves MJ, et al. (2012) Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2):1571–1601.
23. Alcalde-Eon C, Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2):238–54.
24. González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. (2004) Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*. 513(1):283–9.
25. Vivar-Quintana a. M, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. (2002) Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1):147–55.
26. Xu Q, Si L-Y. (2012) Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutrition research*, 32(9):648–58.
27. Cedex T, Cnrs URA, Bordeaux U, Libdration C De. (1997) (+)-Catechin—acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry*, 46(2):229–34.
28. Neves AC, Spranger MI, Zhao Y, Leandro MC, Sun B. (2010) Effect of addition of commercial grape seed tannins on phenolic composition, chromatic characteristics, and antioxidant activity of red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22):11775–82.
29. Guerra MT. New Anthocyanin Pigments Formed after Condensation with Flavanols (1997). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:2262–6.
30. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. (2006) Front Matter. Handbook of Enology. John Wiley & Sons, Ltd; i–xiv.
31. Alexandre H, Charpentier C. (1998) Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1):20–7.
32. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. (2006) Biochemistry of Alcoholic Fermentation and Metabolic Pathways of Wine Yeasts. Handbook of Enology. John Wiley & Sons, Ltd; 53–77.
33. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. (2006) Red Winemaking. Handbook of Enology. John Wiley & Sons, Ltd; 327–395.
34. Romero-Cascales I, Fernández-Fernández JI, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. (2005) The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. *European Food Research and Technology*, 221(1-2):163–167.
35. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A.(2006) Lactic Acid Bacteria. Handbook of Enology. John Wiley & Sons, Ltd; 115–37.
36. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. (2006) Acetic Acid Bacteria. Handbook of Enology. John Wiley & Sons, Ltd;183–192.



37. Canals R, Llaudy MC, Valls J, Canals JM, Zamora F. (2005) Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10):4019–4025.
38. Ambuti AG, Apuano RC, Ecce LL, Ragasso MGF, Oio LM, Sanctis ITAF De. (2009) Extraction of phenolic compounds from ' Aglianico ' and ' Uva di Troia ' grape skins and seeds in model solutions : Influence of ethanol and maceration time. *Vitis*. 48(4):193–200.
39. Casado CG, Heredia A. (2001) Ultrastructure of the cuticle during growth of the grape berry (*Vitis Vinifera*). *Physiologia Plantarum*, 111:220–4.
40. Bakker J, Bridle P, Bellworthy SJ, Reader HP. (1998) Effect of Sulphur Dioxide and Must Extraction on Colour , Phenolic Composition and Sensory Quality of Red Table Wine. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 78:297–307.
41. Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V, Silva AMS. (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*. Elsevier Ltd; 44(5):1115–1126.
42. González-Neves G, Gil G, Barreiro L. (2007) Influence of grape variety on the extraction of anthocyanins during the fermentation on skins. *European Food Research and Technology*. 226(6):1349–55.
43. Ribéreau-Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B, Lonvaud A. (2006) The Use of Sulfur Dioxide in Must and Wine Treatment. *Handbook of Enology*. John Wiley & Sons, Ltd; 193–221.
44. Berké B, Chèze C, Vercauteren J, Deffieux G. (1998) Bisulfite addition to anthocyanins: revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters*. 39(32):5771–57774.
45. Ferrer S, Pardo I, Maicas S, (2001) Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16:805–10.
46. Varakumar S, Naresh K, Variyar PS, Sharma A, Reddy OVS. (2013) Role of Malolactic Fermentation on the Quality of Mango ( *Mangifera indica* L.) Wine. *Food Biotechnology*, 27(2):119–36.
47. Eiro MJ, Heinonen M. (2002) Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50(25):7461–6.
48. Boulton R. (2001) The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine : A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2:67–87.
49. Figueiredo P, Brouillard R. (1999) New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. *Phytochemistry*, 51:125–32.
50. Figueiredo P, Elhabiri M, Toki K, Saito N, Dangles O, Brouillard R. (1996) New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry*, 41(1):301–8.
51. Gómez-Míguez M, González-Manzano S, Escribano-Bailón MT, Heredia FJ, Santos-Buelga C. (2006) Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(15):5422–9.
52. Remy S, Moutounet M. (2000) First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin – tannin reactions. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 751:745–51.



53. Dallas C, Ricardo-da-silva JM, Laureano O. (1996) Products Formed in Model Wine Solutions Involving Anthocyanins , Procyanidin B 2 , and Acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:2402–7.
54. Fulcrand H, Benabdeljalil C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M. (1998) A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*. 47(7):1401–7.
55. Mateus N, Silva AMS, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C, De Freitas V. (2003) A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51(7):1919–1923.
56. Sarni-manchado P, Favre-bonvin J. (1996) Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the chemical society-perkin transactions*, 1(7):735–9.
57. Michel J, Jourdes M, Silva MA, Giordanengo T, Mourey N, Teissedre P. (2011) Impact of Concentration of Ellagitannins in Oak Wood on Their Levels and Organoleptic Influence in Red Wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59:5677–83.
58. Chassaing S, Lefeuvre D, Jacquet R, Jourdes M, Teissedre P, Dangles O, et al. (2010) Physicochemical Studies of New Anthocyano-Ellagitannin Hybrid Pigments : About the Origin of the Influence of Oak C-Glycosidic Ellagitannins on Wine. *European Journal of Organic Chemistry*. 1:55–63.
59. Quideau S, Jourdes M, Lefeuvre D, Montaudon D, Saucier C, Glories Y, et al. (2005) The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chemistry*, 11(22):6503–13.
60. Bautista-Ortín a. B, Fernández-Fernández JI, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. (2007) The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7):546–552.
61. Ortega-Regules A, Ros-García JM, Bautista-Ortín AB, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. (2007) Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): technological implications. *European Food Research and Technology*, 227(1):223–31.
62. Vidal S, Williams P, Neill MAO, Pellerin P. (2001) Polysaccharides from grape berry cell walls . Part I : tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45:315–23.
63. Doco T, Williams P, Pauly M, O'Neill M a., Pellerin P. (2003) Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 53(3):253–61.
64. Bautista-Ortín a. B, Martínez-Cutillas A, Ros-García JM, Lopez-Roca JM, Gomez-Plaza E. (2005) Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(8):867–78.
65. Ducasse M-A, Canal-Llauberes R-M, De Lumley M, Williams P, Souquet J-M, Fulcrand H, et al. (2010) Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118(2):369–76.
66. Obrique-Sliér E, Peña-Neira A, López-Solís R, Ramírez-Escudero C, Zamora-Marín F. (2006) Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology*, 229(6):859–66.



67. Valentão P, Seabra RM, Lopes G, Silva LR, Martins V, Trujillo ME, et al. (2007) Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*, 100(1):64–70.
68. I.P. I da V e do V. Terras do Dão [Internet]. [cited 2013 Jan 23]. Available from: <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/508>
69. Dão V. A comissão: Estatísticas [Internet]. [cited 2013 Jan 23]. Available from: <http://www.cvrdao.pt/estatisticas.asp>
70. Esteves M a, Orgaz MD. (2001) The influence of climatic variability on the quality of wine. *International journal of biometeorology*.;45(1):13–21.
71. Böhm J. Portugal vitícola - O grande livro das castas. Lisboa: Ferreira publicações; 2007.
72. Böhm J. Atlas das castas da península ibérica. Dinalivro, editor. Lisboa; 2011.
73. Embrapa. Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado [Internet]. [cited 2013 Jan 13]. Available from: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/>
74. Clingeleffer P. (1984). Production and growth of minimal pruned sultana vines. *Vitis*, 23(1):42–54.
75. Rousseau J, Alain C, Ojeda H. (2007) La taille minimale, une voie pour la maîtrise des coûts de production? *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques*, 34(122):39–42.
76. Clingeleffer P. (1988) Response of Riesling clones to mechanical hedging and minimal pruning of cordon trained vines (MPCT) - Implications for clonal selection. *Vitis*, 27(2):87–93.
77. Maccarthy M, R C. (1990) Minimal pruning effects on the performance of selections of 4 Vitis-Vinifera cultivars. *Vitis*, 29(2):85–96.
78. Archer E, Schalkwyk D Van. (2007) The Effect of Alternative Pruning Methods on the Viticultural and Oenological Performance of Some Wine Grape Varieties, 28(2).
79. Globalwines. Vinhos, Qualidade, Segurança Alimentar e Ambiente [Internet]. [cited 2013 Jan 23]. Available from: <http://www.daosul.com/pt/go/qualidade,-seguranca-alimentar-e-ambiente>
80. Lallemand. Alpha Oenococcus oeni [Internet]. [cited 2013 Jun 25]. Available from: [http://www.lallemandwine.com/catalog/img/catalog/description\\_activity\\_image\\_1330336470\\_alpha BD.pdf](http://www.lallemandwine.com/catalog/img/catalog/description_activity_image_1330336470_alpha BD.pdf)
81. Laffort. Laffort Technical Info: Laffase HE Grand Cru [Internet]. [cited 2013 Jun 18]. Available from: [http://vinestovintages.ca/LaffortTechnicalInfo/PDS\\_Lafase HE Grand Cru.pdf](http://vinestovintages.ca/LaffortTechnicalInfo/PDS_Lafase HE Grand Cru.pdf)
82. Laffort. Laffort Technical Info: Tannin VR Supra [Internet]. [cited 2013 Jun 6]. Available from: [http://vinestovintages.ca/LaffortTechnicalInfo/PDS\\_Tannin VR Supra.pdf](http://vinestovintages.ca/LaffortTechnicalInfo/PDS_Tannin VR Supra.pdf)
83. Singleton V, Rossi J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*, 16(3):144–56.
84. Roberta R, Nicoletta Pellegrini, Proteggente A, Pannala A, Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, 26(98):1231–7.



85. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of agricultural and food chemistry* [Internet]. 2000 Feb;48(2):220–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691619>
86. Gonçalves FJ, Rocha SM, Coimbra M a. (2012 ) Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material. *Food chemistry*. 134(2):957–63.
87. Santos MC, Nunes C, Cappelle J, Gonçalves FJ, Rodrigues A, Saraiva J a., et al. (2013) Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulfur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141(3):2558–66.
88. Lakso AN. Physiology of Minimal versus Normal Pruning of Concord Grapes [Internet]. Available from: <http://www.hort.cornell.edu/lakso/fcp/PaperScans/1999scan134.pdf>
89. Comissão europeia. REGULAMENTO (CE) N° 606/2009 DA COMISSÃO de 10 de Julho de 2009 [Internet]. 2009 [cited 2013 Jun 4]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:193:0001:0059:pt:PDF>
90. Monro TM, Moore RL, Nguyen M-C, Ebendorff-Heidepriem H, Skouroumounis GK, Elsey GM, et al. (2012) Sensing free sulfur dioxide in wine. *Sensors*. 12(8):10759–73.
91. Macías MM, Manso AG, Orellana CJG, Velasco HMG, Caballero RG, Chamizo JCP. (2013) Acetic acid detection threshold in synthetic wine samples of a portable electronic nose. *Sensors*, 13(1):208–20.
92. Tôres AR, Lyra WDS, De Andrade SIE, Andrade RAN, Da Silva EC, Araújo MCU, et al. (2011) A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid-base titration without indicator, 84(3):601–6.
93. Archer E, Schalkwyk D Van. (2007) The Effect of Alternative Pruning Methods on the Viticultural and Oenological Performance of Some Wine Grape Varieties. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 28(2):107–39.
94. Novak I, Janeiro P, Seruga M, Oliveira-Brett AM. (2008) Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta*. 630(2):107–15.
95. Simonetti P, Pietta P, Testolin G. (1997) Polyphenol Content and Total Antioxidant Potential of Selected Italian Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4):1152–5.
96. Gil DMDA, Rebelo MJF. (2009) Metabisulfite interference in biosensing and Folin-Ciocalteu analysis of polyphenols. *Microchimica Acta*, 167(3-4):253–8.
97. Valle-ribes C Del. (2010) The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 37–41.
98. Campos AM, Lissi EA. (1996) Kinetics of the Reaction between 2,2' -Azinobis 6-Sulfonic Acid ( ABTS ) Derived Radical Cations and Phenols. *International journal of chemical kinetics*, 29(3):219–24.
99. Escot S, Feuillat M, Dulau L, Charpentier C. (2001) Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.7(3):153–9.





100. Morata a, Gómez-Cordovés MC, Suberviola J, Bartolomé B, Colomo B, Suárez J a. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(14):4084–8.
101. Reynolds A. (2001) Evaluation of minimal pruning upon vine performance and berry composition of Chancellor. *American journal of enology and viticulture*, 52(1):45–8.
102. Martínez-Pinilla O, Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestarán B. (2012) Sensory profiling and changes in colour and phenolic composition produced by malolactic fermentation in red minority varieties. *Food Research International*. 46(1):286–93.
103. Hernández B, Sáenz C, De la Hoz JF, Alberdi C, Alfonso S, Diñeiro JM. (2009) Assessing the color of red wine like a taster's eye. *Color Research & Application*, 34(2):153–62.



# 7 - Anexos



## **Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto**



## 7.1 - Ficha de prova sensorial

	<b>Ficha de Prova de Vinho Tinto</b>
--	--------------------------------------



**Nome:** \_\_\_\_\_

**Data:** 05/06/2013

A presente prova pretende comparar vinhos obtidos no ano de 2012 a partir das castas Touriga Nacional e Alfrocheiro resultantes do ensaio da Poda Mínima. Os vinhos da casta Alfrocheiro foram submetidos a diferentes tratamentos tecnológicos que tiveram como objectivo avaliar a estabilização dos compostos da cor e dos taninos.

Numa escala de 1 a 10 classifique os atributos Cor, Aroma e Gosto, da seguinte forma:

**Cor, Aroma e Sabor: 1** Inexistente - **10** Muito Intenso

**Apreciação Global: 1** Muito mau - **10** Excelente

Parâmetros		D8H	K4F	Q0D	U6N	L9S	C3T	M2P	A1O	W7X	B5R
<b>COR</b>	Vermelho										
	Violeta										
	Castanho										
	Intensidade										
	Qualidade										
<b>AROMA</b>	Frutado										
	Floral										
	Balsâmicos										
	Especiarias										
	Empireumáticos										
	Sulfurados										
	Metálico										
	Qualidade										
<b>SABOR</b>	Corpo										
	Adstringência										
	Acidez										
	Amargo										
	Doce										
	Persistência										
	Qualidade										
<b>APRECIÇÃO GLOBAL</b>											

Figura 51: Folha utilizada na prova organolética dos vinhos.



## 7.2 - Controlo de fermentação

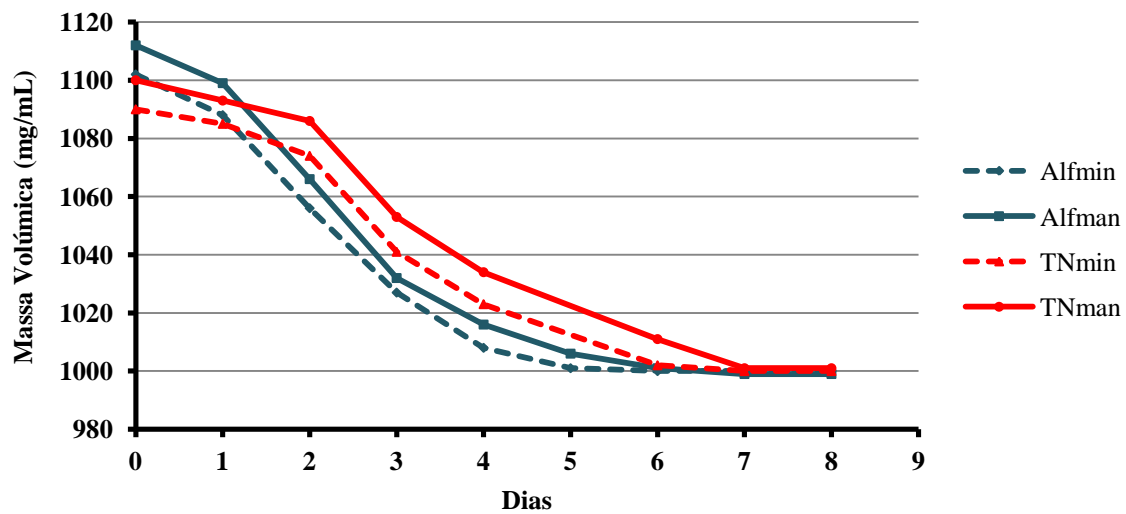


Figura 52: Evolução da massa volúmica do mosto (expressa em mg/mL) durante a fermentação alcoólica dos ensaios de Pmin e Pman para as castas Alf e TN.

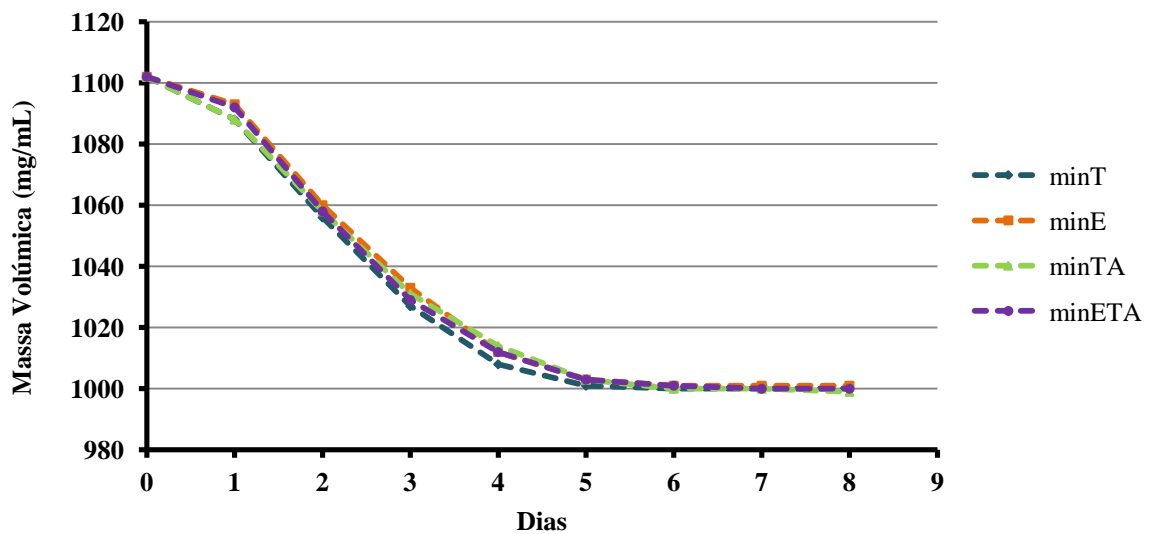


Figura 53: Evolução da massa volúmica do mosto (expressa em mg/mL) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor.

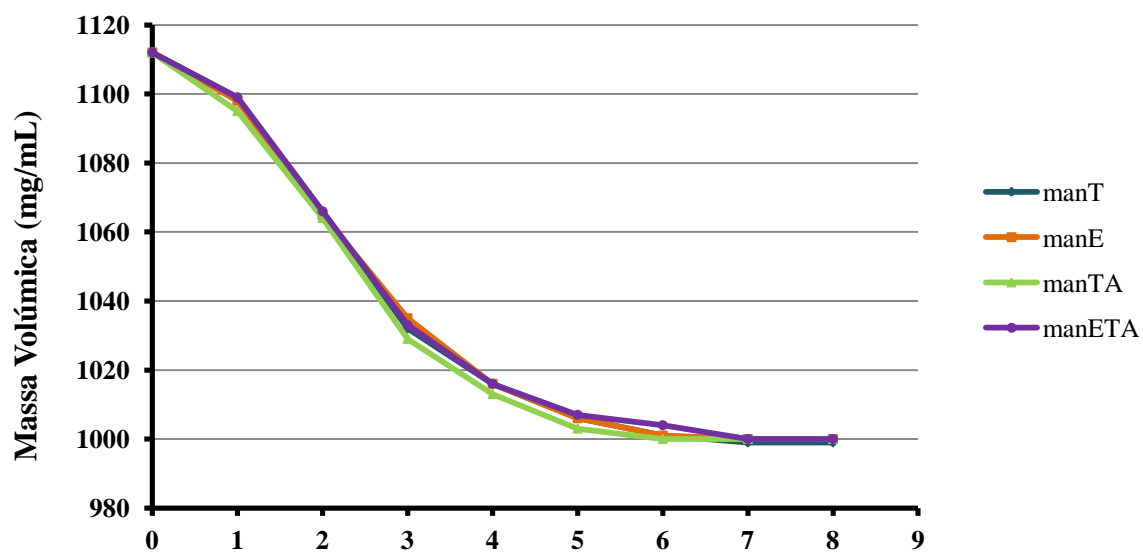


Figura 54: Evolução da massa volúmica do mosto (expressa em mg/mL) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor.



## 7.2 - Evolução dos parâmetros físico-químicos dos vinhos com adição de produtos enológicos

### 7.2.1 - Dióxido de Enxofre Livre

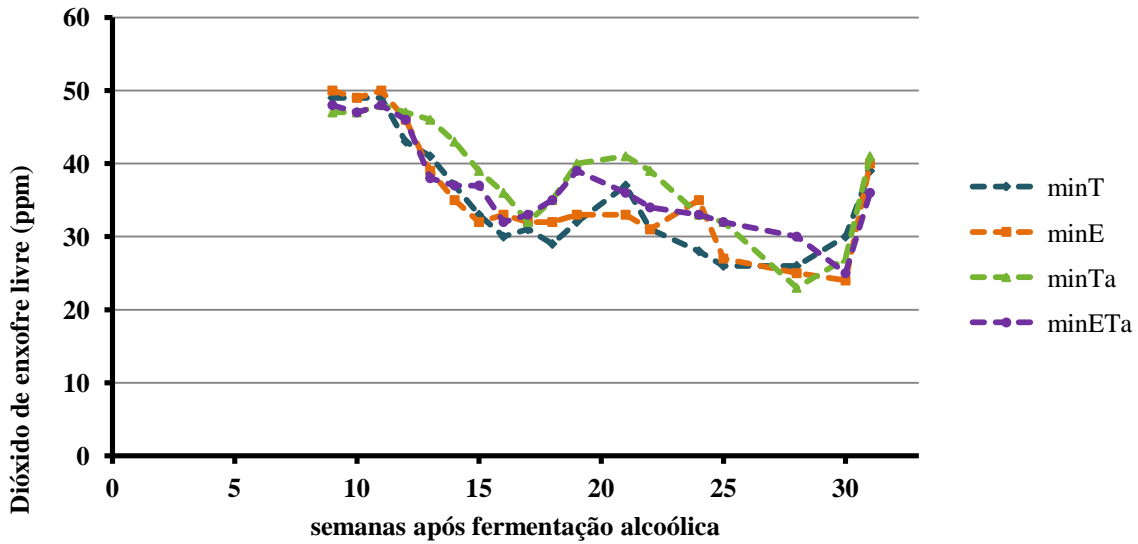


Figura 55: Evolução do  $\text{SO}_2$  (expressa em ppm) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica.

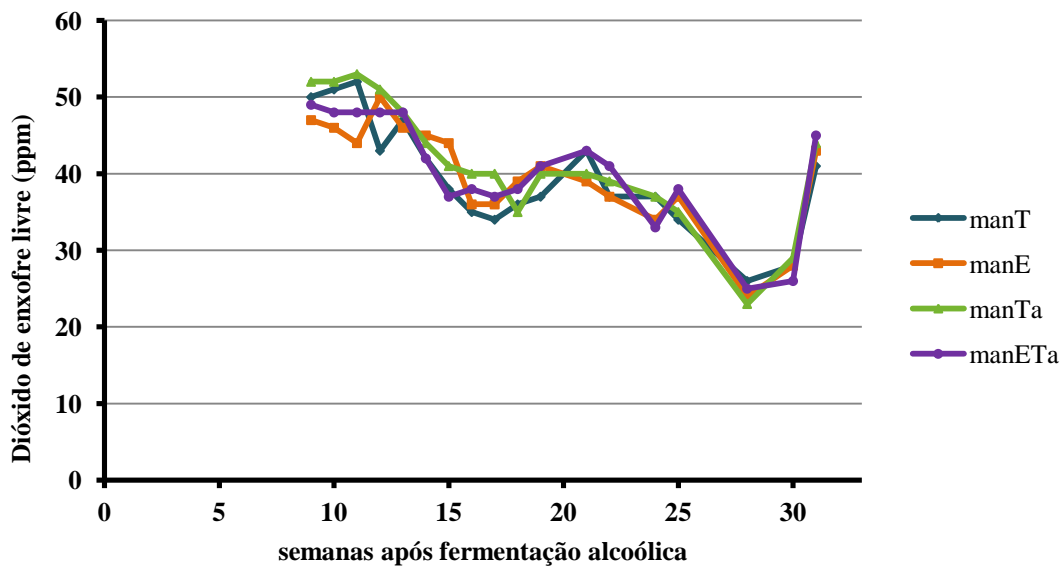


Figura 56: Evolução do  $\text{SO}_2$  (expressa em ppm) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica.



7.2.2 - Acidez volátil

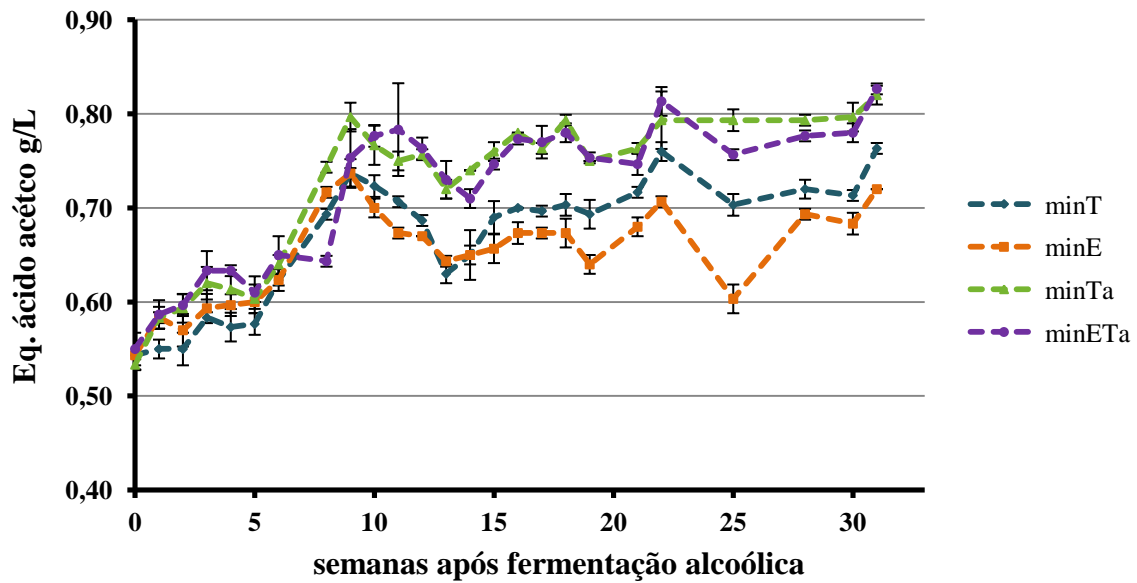


Figura 57: Evolução da acidez volátil (expressa em g/L eq. ácido acético) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica.

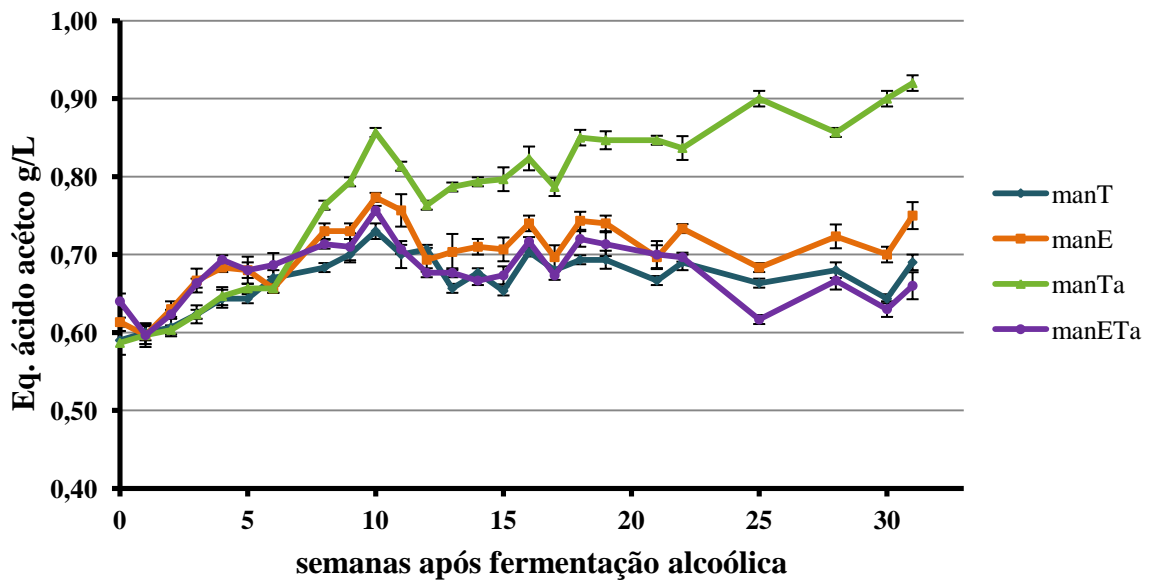


Figura 58: Evolução da acidez volátil (expressa em g/L eq. ácido acético) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica.





### 7.2.3 - Acidez total

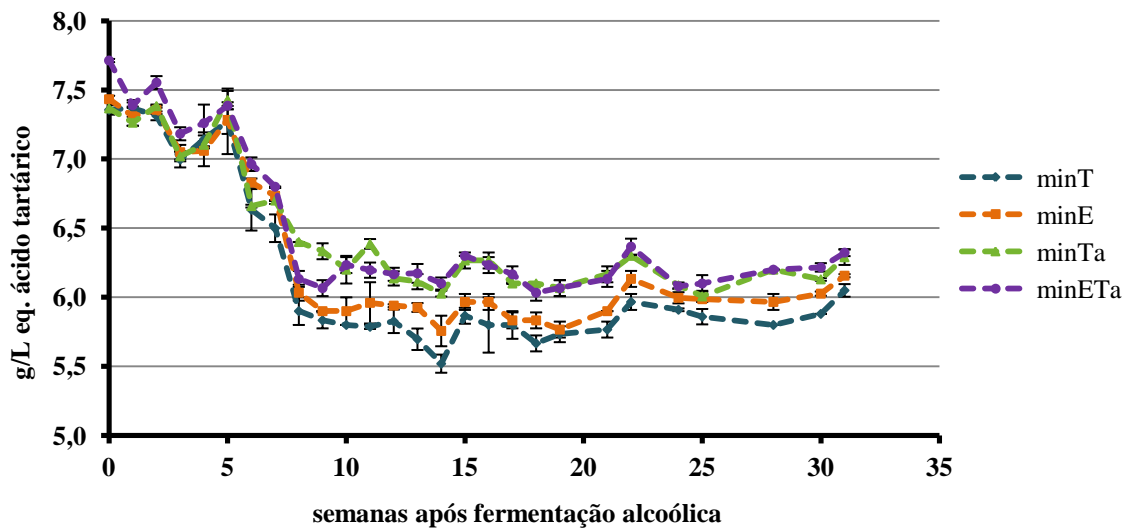


Figura 59: Evolução da acidez total (expressa em g/L eq. ácido tartárico) dos ensaios de Pmin com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica.

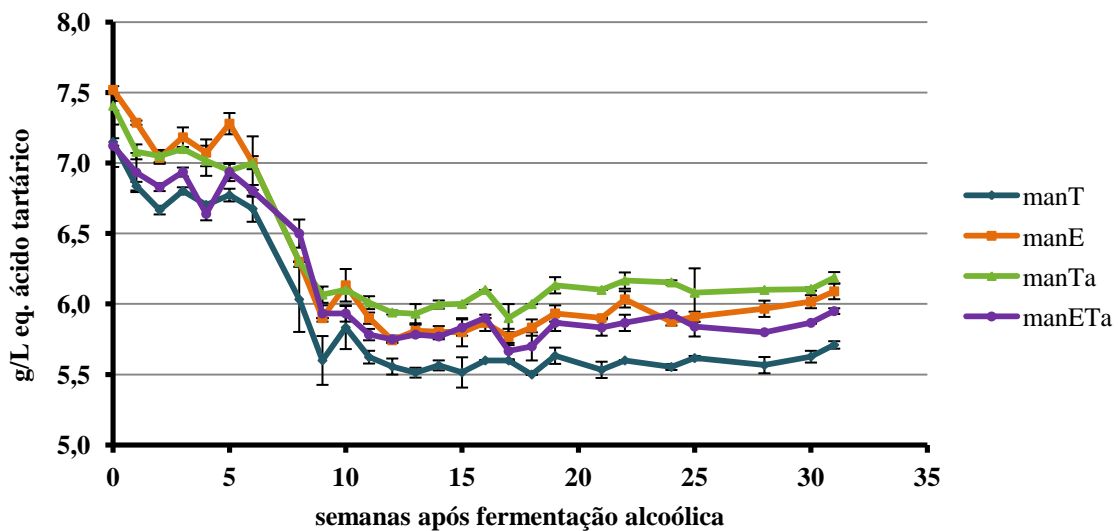


Figura 60: Evolução da acidez total (expressa em g/L eq. ácido tartárico) dos ensaios de Pman com a adição de produtos enológicos que visam a cor ao longo das 32 semanas após a fermentação alcoólica.