



**Realização dos protocolos de vinificação e fermentação Loureiro *Premium* e Estreia Vinhão de maceração a frio, e respetiva caracterização dos vinhos produzidos**

**Patrícia Alexandra Gomes Gonçalves**

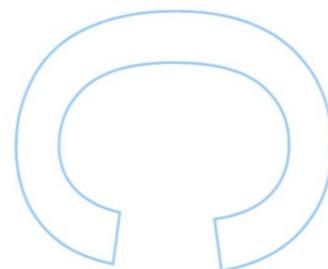
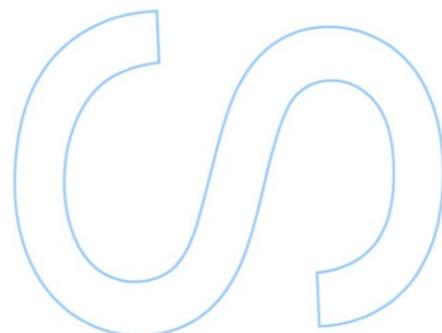
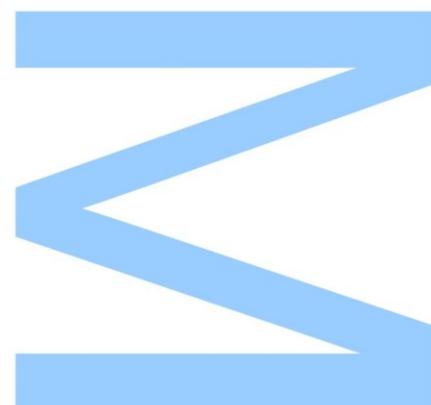
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar  
Departamento de Química e Bioquímica  
2019

**Orientador**

José Oliveira, Enólogo, Adega Ponte da Barca  
Doutora Natércia Teixeira, Investigadora, FCUP

**Coorientador**

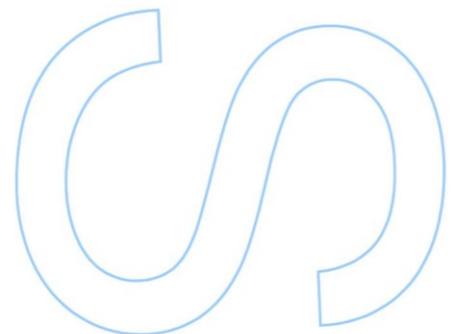
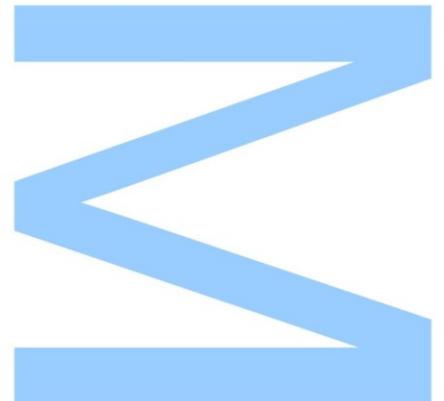
Doutor Victor Armando Pereira de Freitas, Professor Catedrático,  
FCUP



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



# Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer a todas as pessoas da Adega de Ponte da Barca que me apoiaram, quer com assuntos relacionados com o estágio como pessoais, pois sem essa ajuda a minha estadia teria sido muito mais difícil. Um especial beijinho à Iveta, que me ensinou tudo o que aprendi durante o estágio e me mostrou como um bom profissional trabalha; ao David, à Armandina, à D. Glória, à Dulce, à Eng. Patrícia e à D. Céu, por toda a disponibilidade e carinho que nunca me faltou. Não esquecendo também a companheira de estágio, Melissa, obrigada pelo carinho. Obrigada ainda a todos os outros que também contribuíram para que me sentisse bem-vinda longe de casa.

Ao Eng. Oliveira e ao Dr. Bruno Almeida, obrigada por me receberem na Adega e pela ajuda e orientação dados ao longo do estágio.

Agradeço ainda ao Professor Victor Freitas pela total disponibilidade e orientação, e ainda por me ter recebido no laboratório do seu grupo de investigação.

Deixo um obrigada muito especial à Doutora Natércia por me ter auxiliado com todo o trabalho prático e também pela disponibilidade e carinho com que me acolheu no laboratório. Agradeço muito ainda a compreensão e ajuda imensa que me deu na correção deste trabalho. Sem a sua preciosa ajuda, tudo isto não teria sido possível.

Quase no final, agradeço muito aos meus amigos, companheiros de licenciatura e de mestrado, que tornaram todo este ano especial e que me apoiaram sempre que as dúvidas estavam presentes. Passarmos por esta fase juntos tornou tudo muito mais especial.

Finalmente, mil obrigadas aos meus pais, Paula e Vítor, que foram, sem dúvida, quem permitiu que isto se tornasse realidade, com o seu apoio incondicional e inquestionável. Aqui entra também o Daniel, que me apoiou sempre que eu precisava e me fez andar para a frente quando tudo parecia desabar. Um obrigada do fundo do meu coração.

Não poderia ter pedido melhores pessoas para me apoiarem neste percurso. Obrigada.

# Resumo

O presente trabalho é resultante de uma parceria entre a Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP) e a Adega de Ponte da Barca, situada na Região dos Vinhos Verdes, sub-região do Lima, e trata da caracterização de dois vinhos – *Loureiro Premium 2018* e *Estreia Vinhão 2018* – através do acompanhamento dos processos de vinificação de ambos durante o estágio na Adega de Ponte da Barca.

O estágio na Adega teve como objetivo acompanhar e auxiliar no processo de produção dos dois vinhos referidos, com o propósito da recolha de amostras para posterior análise e caracterização no laboratório da FCUP. O objetivo desta caracterização é perceber quais as diferenças resultantes da aplicação de diferentes protocolos de vinificação e fermentação e qual o grau de aceitação destes novos vinhos produzidos, relativamente aos produzidos por protocolos tradicionais.

O processo de vinificação do vinho verde tinto *Estreia Vinhão 2018* inclui uma maceração pré-fermentativa a frio e uma fermentação sem contacto com as massas como tópico de destaque comparativamente ao protocolo em comparação *Vinhão Tradicional*. Os resultados obtidos sugerem a produção de vinhos muito distintos, com características indicadoras de diferenças profundas a nível de composição fenólica e capacidade tânica, onde o vinho obtido pelo protocolo em teste apresenta valores muito menores. Relativamente à preferência entre os vinhos pelo painel de provadores, não foram apontadas diferenças significativas.

O processo de vinificação do vinho verde branco *Loureiro Premium 2018* apresenta diferenças generalizadas para com o vinho em comparação, *Loureiro Tradicional*, grande parte resultantes da fermentação em contacto com aparas de madeira, fator de destaque do vinho em questão. Os resultados obtidos sugerem que o vinho produzido pelo protocolo em teste apresenta características favoráveis à aceitação do mesmo pelo consumidor, nomeadamente a nível da composição fenólica, o que é validado pela avaliação do painel de provadores, que indica uma maior aprovação do perfil gustativo, em comparação com o de vinificação tradicional.

Palavras-chave: Estreia Vinhão, Loureiro *Premium*, maceração pré-fermentativa a frio, madeira, composição fenólica, consumidor.

# Abstract

This work is the result of a partnership between the Faculty of Sciences of the University of Porto (FCUP) and Adegas Ponte da Barca, located in the Vinho Verde Region, Lima sub-region, and deals with the characterization of two wines - *Loureiro Premium 2018* and *Estreia Vinhão 2018* - by monitoring the winemaking processes of both during the internship at Ponte da Barca Winery.

The internship at the winery was intended to accompany and assist in the production process of the two referred wines, with the purpose of collecting samples for further analysis and characterization at the FCUP laboratory. The objective of this characterization is to understand the differences resulting from the application of different vinification and fermentation protocols, and the degree of acceptance of these new wines produced, compared to those produced by traditional protocols.

The *Estreia Vinhão 2018* red Vinho Verde making process includes cold prefermentation maceration and non-contact fermentation with the seeds and stems as a prominent topic compared to the traditional Vinhão protocol. The obtained results suggest the production of very distinct wines, with characteristics indicating deep differences in the phenolic composition and tannic capacity, where the wine obtained by the test protocol presents much smaller values. Regarding the preference between the wines by the taster panel, no significant differences were pointed.

The winemaking process of *Loureiro Premium 2018* white Vinho Verde presents generalized differences compared to traditional Loureiro wine, largely resulting from fermentation in contact with wood chips, a highlight factor of the wine in question. The results suggest that the wine produced by the protocol under test has characteristics favorable to its acceptance by the consumer, namely in terms of phenolic composition, which is validated by the panel evaluation, which indicates a greater approval of the taste profile, compared to traditional winemaking.

**Keywords:** Vinhão Estreia, *Premium Loureiro*, cold prefermentative maceration, wood, phenolic composition, consumer.

# Índice

Agradecimentos.....	2
Resumo .....	4
Abstract .....	5
Índice.....	6
Índice de Tabelas .....	9
Índice de Figuras .....	11
Lista de abreviaturas.....	16
I. Revisão bibliográfica.....	18
1. Setor vitivinícola em Portugal .....	18
1.1 A região dos Vinhos Verdes.....	18
2. Vinificação – operações pré-fermentativas .....	20
2.1 Vinificação de brancos .....	22
2.2 Vinificação de tintos .....	24
3. Fermentação .....	28
3.1 Fermentação Alcoólica (FA).....	28
3.2 Fermentação Malolática (FML) .....	31
4. Operações pós-fermentativas.....	32
4.1 Micro-oxigenação (MOX).....	32
4.2 <i>Batonnage</i> .....	34
5. Cor .....	34
5.1 Compostos fenólicos.....	35
6. Sistema CIELab .....	39
II. Descrição do plano de trabalho.....	41
Objetivo.....	41
Tarefas e calendarização .....	41
III. Materiais e métodos.....	50
1. Amostragem.....	50
2. Análises de controlo de vinificação.....	52

3. Análises físico-químicas .....	57
IV. Resultados e discussão.....	65
Dados das vindimas .....	65
Vinhão - Uvas (UV) .....	66
1. Controlo dos parâmetros de vinificação .....	66
2. Composição polifenólica .....	66
3. Análise da cor .....	73
Vinhão - Mostos – (VMAR - 68F, 69F, 70F - e VMAT).....	83
1. Controlo dos parâmetros de vinificação .....	83
2. Composição polifenólica .....	85
3. Análise da cor .....	92
Vinhão – Vinhos (VMF e VT).....	104
1. Controlo dos parâmetros de vinificação .....	104
2. Composição polifenólica .....	107
3. Análise da cor .....	113
Loureiro – Uvas (UL) .....	127
1. Controlo dos parâmetros de vinificação .....	127
2. Composição polifenólica .....	127
3. Análise da cor .....	133
Loureiro - Mostos (LMS, LMC e LMC5).....	136
1. Controlo dos parâmetros de vinificação .....	136
2. Composição polifenólica .....	137
3. Análise da cor .....	142
Loureiro - Vinhos (LP e LT) .....	145
1. Controlo dos parâmetros de vinificação .....	145
2. Composição polifenólica .....	146
3. Análise da cor .....	152
4. Análise sensorial.....	155
V. Conclusão .....	159

VI. Referências .....	161
VI. Anexos .....	172
Anexo 1: Estrutura de produção do vinho Estreia Vinhão.....	172
Anexo 2: Resultado $\pm$ desvio-padrão de todas as análises realizadas às amostras de Vinhão na FCUP. ....	173
Anexo 3: Resultado $\pm$ desvio-padrão de todas as análises realizadas às amostras de Loureiro na FCUP. ....	174
Anexo 4: Folha de prova utilizada na análise sensorial. ....	175

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas 3-monoglucósidas. ....	60
<b>Tabela 2:</b> Quantidade de uvas (kg) entregues na Adega no período das vindimas de 2018. ...	65
<b>Tabela 3:</b> Valores obtidos de IFT para as uvas Vinhão, utilizando o método de leitura espectrofotométrica a 280 nm e o método de <i>Folin-Ciocalteu</i> , nos dois anos consecutivos. ....	66
<b>Tabela 4:</b> Concentração de proantocianidinas nas uvas Vinhão em mg/g de uvas liofilizadas e mg/g de uvas frescas. ....	70
<b>Tabela 5:</b> Identificação de cada pico e respetiva concentração de antocianinas na amostra das uvas. ....	77
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros CIELab das uvas Vinhão de 2017 e 2018, e respetiva representação RGB. ....	81
<b>Tabela 7:</b> Resultados das análises físico-químicas realizadas ao mosto de Vinhão (VMAT) na ADB. ....	84
<b>Tabela 8:</b> Valores de IFT pelo método de Folin-Ciocalteu para os mostos. ....	87
<b>Tabela 9:</b> Identificação de cada pico e respetiva concentração de antocianinas na amostra VMAT. ....	95
<b>Tabela 10:</b> Valores de absorvância a 620, 520 e 420 nm de cada mosto. ....	99
<b>Tabela 11:</b> Valores de índice de cor vermelha dos mostos de 2018. ....	100
<b>Tabela 12:</b> Parâmetros CIELab e representação RGC da cor dos mostos de 2018 e 2017. ..	100
<b>Tabela 13:</b> Resultados das análises físico-químicas realizadas ao vinho VMF após o término da fermentação alcoólica (8/out), malolática (31/out) e em conservação (6/nov). ....	104
<b>Tabela 14:</b> Resultados das análises físico-químicas realizadas ao vinho VT após o término da fermentação alcoólica (15/out). ....	106
<b>Tabela 15:</b> Valores de IFT pelo método de Folin-Ciocalteu para os vinhos, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro. ....	108
<b>Tabela 16:</b> Identificação de cada pico e respetiva concentração e contribuição de antocianina nos vinhos VMF e VT. ....	115
<b>Tabela 17:</b> Valores de absorvância a 620, 520 e 420 nm de cada vinho. ....	119
<b>Tabela 18:</b> Parâmetros CIELab e representação RGC da cor dos vinhos de 2018 e 2017. ...	120

<b>Tabela 19:</b> Valores obtidos de IFT para as uvas Loureiro, utilizando o método de leitura espectrofotométrica a 280 nm e o método de <i>Folin-Ciocalteu</i> . .....	127
<b>Tabela 20:</b> Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas das uvas Loureiro (UL). .....	132
<b>Tabela 21:</b> Parâmetros CIELab das uvas Loureiro.....	134
<b>Tabela 22:</b> Resultados das análises físico-químicas realizadas ao mosto de Loureiro (LMC) na ADB. ....	136
<b>Tabela 23:</b> Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do mosto após 5 dias de fermentação (LMC5).....	141
<b>Tabela 24:</b> Parâmetros CIELab do mosto (LMS, LMC e LMC5). ....	143
<b>Tabela 25:</b> Resultados das análises físico-químicas realizadas ao vinho Loureiro Premium (LP) na ADB. ....	145
<b>Tabela 26:</b> Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro <i>Premium</i> (LP). ....	149
<b>Tabela 27:</b> Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro Tradicional (LT). ....	151
<b>Tabela 28:</b> Parâmetros CIELab dos vinhos LP e LT. ....	153

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Sub-regiões da Região dos Vinhos Verdes ( <i>Infovini.com</i> ) .....	18
<b>Figura 2:</b> Evolução dos aromas do vinho ao longo das fases da micro-oxigenação.....	33
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do fenol .....	35
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do núcleo flavânico .....	36
<b>Figura 6:</b> Estrutura das unidades monoméricas dos flavan-3-óis .....	36
<b>Figura 7:</b> Quebra das ligações monoméricas das proantocianidinas – reação proposta por Bate-Smith .....	37
<b>Figura 8:</b> Antocianinas correspondentes a cada substituição do grupo R.....	38
<b>Figura 9:</b> Exemplos de compostos não-flavonóides.....	39
<b>Figura 10:</b> Espaço do Sistema CIELab .....	40
<b>Figura 11:</b> Valores obtidos de IFT pelo método de leitura espectrofotométrica a 280 nm para o estudo em questão e para outros estudos.....	67
<b>Figura 12:</b> Valores obtidos de IFT pelo método de <i>Folin-Cicalteu</i> para o estudo em questão e para outros estudos, em mg/L (a), mg/100 g de uvas frescas (b), e mg/100 g de uvas liofilizadas (c). .....	68
<b>Figura 13:</b> Concentração de proantocianidinas em diferentes castas da Região dos Vinhos Verdes. ....	71
<b>Figura 14:</b> Comparação dos valores do índice de diálise entre os dois anos consecutivos (2017 e 2018). .....	72
<b>Figura 15:</b> Comparação dos valores de poder tanante entre dois anos consecutivos (20/set/2017 e 2018). .....	73
<b>Figura 16:</b> Valores obtidos da concentração de antocianinas livres totais nos dois anos consecutivos (2017 e 2018). .....	74
<b>Figura 17:</b> Comparação dos valores obtidos da concentração de antocianinas livres totais (mg/L) com outros estudos. ....	75
<b>Figura 18:</b> Valores obtidos da concentração de antocianinas livres totais (mg/100 g uvas frescas) no estudo em questão e noutros estudos. ....	75

<b>Figura 19:</b> Cromatograma obtido por HPLC-DAD das antocianinas 3-monoglucósidas e respectivos ésteres acetilados das uvas Vinhão. ....	77
<b>Figura 20:</b> Contribuição das diferentes antocianinas e respectivos derivados. ....	78
<b>Figura 21:</b> Contribuição de cada antocianina no perfil das castas em estudo. ....	79
<b>Figura 22:</b> Comparação dos valores de intensidade corante para três castas diferentes, em 2008 e 2018. ....	81
<b>Figura 23:</b> Gráfico radar comparativo das coordenadas L*a*b* dos dois extratos de uvas Vinhão (2017 e 2018). ....	82
<b>Figura 24:</b> Gráfico da evolução da temperatura da mistura massas + mosto nas cubas de maceração 68F, 69F e 70F. ....	83
<b>Figura 25:</b> Comparação dos valores de Densidade (g/cm <sup>3</sup> ), pH, Acidez total (g/L) e SO <sub>2</sub> total (mg/L) obtidos para mosto de maceração pré-fermentativa a frio da casta Monastrell <sup>23</sup> . ....	85
<b>Figura 26:</b> Comparação dos valores de IFT, por leitura a 280 nm, dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos consecutivos (2017 e 2018). ....	86
<b>Figura 27:</b> Comparação dos valores de IFT do mosto de outras castas, ao fim de 3 dias de maceração pré-fermentativa a frio. ....	87
<b>Figura 28:</b> Concentração de proantocianidinas nas três cubas de maceração e na mistura resultante da mistura (VMAT). ....	88
<b>Figura 29:</b> Comparação da concentração de proantocianidinas em mosto de Vinhão e de outras castas submetidas a maceração pré-fermentativa a frio. ....	89
<b>Figura 30:</b> Comparação do índice de diálise dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos. ....	90
<b>Figura 31:</b> Comparação do poder tanante dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos. ....	91
<b>Figura 32:</b> Comparação da concentração de antocianinas livres totais para os mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos. ....	92
<b>Figura 33:</b> Comparação da concentração de antocianinas do mosto de outras castas, ao fim de 3 dias de maceração pré-fermentativa a frio. ....	93
<b>Figura 34:</b> Contribuição (em %) de cada antocianina 3-monoglucósida para a concentração total do mosto de cada cuba de maceração (68F, 69F e 70F). ....	94

<b>Figura 35:</b> Cromatograma obtido por HPLC-DAD das antocianinas 3-monoglucósidas e respectivos derivados do mosto obtido da mistura das 3 cubas de maceração (VMAT).....	95
<b>Figura 36:</b> Contribuição (%) de cada antocianina 3-monoglucósida em comparação com a casta <i>Syrah</i> , para 3 dias de maceração pré-fermentativa a frio. ....	97
<b>Figura 37:</b> Comparação da intensidade corante dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos consecutivos (2017 e 2018). ....	98
<b>Figura 38:</b> Comparação da intensidade corante do mosto de Vinhão e da casta Tannat submetida a maceração pré-fermentativa a frio <sup>93</sup> .....	99
<b>Figura 39:</b> Gráficos radar com a comparação dos parâmetros L* a* b* dos mostos nos dois anos. a) 68F, b) 69F e c) 70F .....	101
<b>Figura 40:</b> Comparação dos parâmetros L* e C* para mostos de maceração a frio de diferentes castas. ....	103
<b>Figura 41:</b> Evolução do pH, acidez total, concentração de ácido málico e ácido lático após o término da fermentação alcoólica, malolática e em conservação. ....	105
<b>Figura 42:</b> Comparação dos valores de IFT dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos consecutivos .....	107
<b>Figura 43:</b> Concentração de proantocianidinas nos dois vinhos (VMF e VT), nos dois anos consecutivos.....	109
<b>Figura 44:</b> Comparação do índice de diálise dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos. ....	111
<b>Figura 45:</b> Comparação do poder tanante dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos. ....	112
<b>Figura 46:</b> Comparação da concentração de antocianinas de VMF e VT nos dois anos consecutivos.....	113
<b>Figura 47:</b> Cromatograma obtido por HPLC-DAD das antocianinas 3-monoglucósidas e respectivos derivados nos vinhos VMF (azul) e VT (vermelho). ....	115
<b>Figura 48:</b> Contribuição (em %) de cada antocianina 3-monoglucósida para a concentração total dos vinhos VMF e VT. ....	116
<b>Figura 49:</b> Contribuição (%) de cada tipo de antocianinas-3-monoglucosilada nas uvas (UV), mosto (VMAT) e vinhos (VMF e VT). ....	117
<b>Figura 50:</b> Comparação da intensidade corante dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos.....	118
<b>Figura 51:</b> Índice de cor vermelha nos vinhos VMF e VT, em 2018. ....	120

<b>Figura 52:</b> Gráfico radar com a comparação dos parâmetros L* a* b* dos vinhos VMF e VT em 2018.....	121
<b>Figura 53:</b> Gráfico radar com a comparação de VT e vinhos Vinhão e Amaral analisados noutra estudo (Características cromáticas de vinhos tintos verdes, Amaral e Vinhão).....	122
<b>Figura 54:</b> Avaliação da intensidade da cor e limpidez dos vinhos VMF e VT. ....	123
<b>Figura 55:</b> Avaliação olfativa pormenorizada e global dos vinhos VMF e VT. ....	124
<b>Figura 56:</b> Gráfico radar da avaliação olfativa pormenorizada dos vinhos VMF e VT.....	125
<b>Figura 57:</b> Avaliação gustativa pormenorizada e global dos vinhos VMF e VT. ....	125
<b>Figura 58:</b> Gráfico radar da avaliação gustativa pormenorizada dos vinhos VMF e VT.....	126
<b>Figura 59:</b> Comparação dos valores de IFT obtidos pelo método de <i>Folin-Ciocalteu</i> para várias castas brancas. ....	128
<b>Figura 60:</b> Comparação das concentrações de proantocianidinas nas uvas Loureiro (branca) e Vinhão (tinta). ....	129
<b>Figura 61:</b> Comparação da concentração de proantocianidinas entre diferentes castas brancas: Loureiro, Fernão Pires e Vital <sup>76</sup> . ....	129
<b>Figura 62:</b> Comparação do poder tanante das uvas Loureiro (branca) e Vinhão (tinta).....	130
<b>Figura 63:</b> Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas das uvas Loureiro (UL). ....	131
<b>Figura 64:</b> Valores de absorvância a 620, 520 e 420 nm de cada mosto. ....	134
<b>Figura 65:</b> Gráfico radar com as coordenadas L*a*b* do extrato de uvas Loureiro. ....	135
<b>Figura 66:</b> Evolução do IFT do mosto, por A280 (a) e Folin-Ciocalteu (b), nos primeiros 5 dias de fermentação.....	137
<b>Figura 67:</b> Evolução da concentração de proantocianidinas do mosto desde a saída do silo (LMS) até ao fim da fermentação (LFF). ....	138
<b>Figura 68:</b> Evolução do poder tanante do mosto desde a saída do silo (LMS) até ao fim da fermentação (LFF). ....	139
<b>Figura 69:</b> Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do mosto após 5 dias de fermentação (LMC5). ....	140
<b>Figura 70:</b> Evolução da intensidade corante do mosto até ao final da fermentação. ....	142

<b>Figura 71:</b> Gráfico radar com as coordenadas L*a*b* do mosto no silo (LMS), na cuba no início da fermentação (LMC) e após 5 dias (LMC5).....	144
<b>Figura 72:</b> Comparação dos valores de IFT dos vinhos Loureiro Premium (LP) e Loureiro Tradicional (LT), por A280 (a) e Folin-Ciocalteu (b).....	146
<b>Figura 73:</b> Concentração de proantocianidinas em ambos os vinhos, LP e LT.....	147
<b>Figura 74:</b> Poder tanante de ambos os vinhos, LP e LT.....	148
<b>Figura 75:</b> Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro <i>Premium</i> (LP). .....	149
<b>Figura 76:</b> Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro Tradicional (LT). .....	150
<b>Figura 77:</b> Valores de intensidade corante e contribuição de cada comprimento de onda (320 e 420 nm) em ambos os vinhos, LP e LT. ....	153
<b>Figura 78:</b> Gráfico radar com as coordenadas L*a*b* de ambos os vinhos, LP e LT.....	154
<b>Figura 79:</b> Avaliação da intensidade da cor e limpidez dos vinhos LP e LT.....	155
<b>Figura 80:</b> Avaliação olfativa pormenorizada e global dos vinhos LP e LT. ....	156
<b>Figura 81:</b> Avaliação gustativa pormenorizada e global dos vinhos LP e LT. ....	157
<b>Figura 82:</b> Gráfico radar da avaliação gustativa pormenorizada dos vinhos LP e LT. ....	157

# Lista de abreviaturas

a\* - Coordenada CIELab (verde-vermelho)

b\* - Coordenada CIELab (amarelo-azul)

Abs – Absorvância

APB – Adega Ponte da Barca

BSA – Albumina sérica bovina

C\* - Coordenada CIELab (*Chroma*)

CIE – Commission Internationale de L'Eclerage

CVRVV – Comissão Vitivinícola da Região dos Vinhos Verdes

FCUP – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

G6P – Glucose-6-fosfato

IC – Intensidade corante

ICV – Índice de cor vermelha

FA – Fermentação Alcoólica

FML – Fermentação Malolática

GHS - Glutatião

H° - Coordenada CIELab (Tonalidade; Hue)

HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência (High performace liquid chromatography)

ID – Índice de diálise

IFT – Índice de fenóis totais

L\* - Coordenada CIELab (Luminosidade)

LFF – Vinho Loureiro no final das fermentações

LMC – Mosto Loureiro na cuba, no início da fermentação

LMC5 - Mosto Loureiro na cuba, ao 5º dia de fermentação

LMS – Mosto Loureiro no silo

LP – Vinho Loureiro *Premium*

LT – Vinho Loureiro Tradicional

NTU – Unidades de turbidez (Nephelometric Turbidity Units)

MF – Maceração a frio

MOX – Micro-oxigenação

OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho

PT – Poder tanante

T – Tonalidade

TPA – Taninos proantocianínicos totais

UL – Uvas Loureiro

UV – Uvas Vinhão

UV-Vis – Ultravioleta/Visível

VFF – Vinho Vinhão no final das fermentações

VMAR68F – Mosto Vinhão após 1ª remontagem na cuba de maceração 68F

VMAR69F – Mosto Vinhão após 1ª remontagem na cuba de maceração 69F

VMAR70F – Mosto Vinhão após 1ª remontagem na cuba de maceração 70F

VMAT – Mosto Vinhão após trasfega para cuba de fermentação

VMF – Vinho Vinhão Maceração a frio (Estreia Vinhão)

Vs. - *Versus*

VT – Vinho Vinhão Tradicional

# I. Revisão bibliográfica

## 1. Setor vitivinícola em Portugal

Segundo estudos do Banco de Portugal, o setor vitivinícola representa uma grande fatia na indústria das bebidas em Portugal, com cerca 52% de volume de negócios em 2017, quando agrupada com as indústrias da cerveja e das águas e refrigerantes, sendo um dos setores com maior taxa de exportação de produto final, o vinho. É ainda um setor com um efeito multiplicador, na medida em que gera emprego na produção e apanha da uva e incentiva à ocupação do mundo rural<sup>1</sup>.

### 1.1 A região dos Vinhos Verdes

Originariamente demarcada a 18 de setembro de 1908, a região dos Vinhos Verdes estende-se por todo o noroeste do país, conhecida como a zona Entre-Douro-e-Minho, sendo, em termos geográficos, a maior região demarcada portuguesa. Divide-se em 9 sub-regiões, como se observa na Figura 1: sub-região de Amarante, sub-região do Ave, sub-região de Baião, sub-região de Basto, sub-região do Cávado, sub-região do Lima, sub-região de Monção e Melgaço, sub-região de Paiva e sub-região do Sousa, onde predominam diferentes castas e existem diferentes solos e microclimas.

Esta região sofre uma grande influência do Oceano Atlântico, e este fator aliado aos solos majoritariamente graníticos, clima ameno e elevada precipitação traduz-se em vinhos frescos, leves e elegantes, característicos da região, que têm tido cada vez mais popularidade em Portugal e no resto do Mundo<sup>2</sup>.

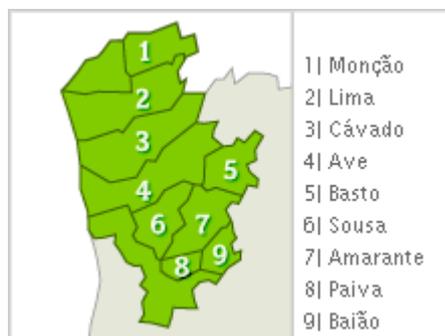


Figura 1: Sub-regiões da Região dos Vinhos Verdes (*Infovini.com*)

### 1.1.1 Adega Ponte da Barca

A Adega Ponte da Barca (antiga Adega Cooperativa) existe desde 1963 e está situada na sub-região do Lima, possuindo atualmente cerca de 1100 associados que representam cerca de 900 hectares de vinha nas várias sub-regiões dos vinhos verdes. A Adega privilegia duas castas bastante características da região, Loureiro e Vinhão, castas branca e tinta, respetivamente, nas quais aposta para produzir vinhos aromáticos, minerais e gastronomicamente versáteis, que exporta para diversos países dentro e fora da Europa.

Neste momento, a Adega produz vinhos de mesa e espumantes, possuindo duas marcas: Adega Coop. Ponte da Barca e Estreia. A primeira inclui vinhos brancos, tintos e rosé, tais como Branco, Adamado Meio Seco, Branco Grande Escolha, Loureiro Grande Escolha, Alvarinho-Loureiro Colheita Seleccionada, Alvarinho Reserva, Rosé, Tinto, Vinhão Superior, e os Espumantes Branco Bruto e Vinhão Bruto; a segunda marca possui menos variedade, apresentando os seguintes vinhos: Branco, Loureiro Grande Escolha, Alvarinho-Loureiro Colheita Seleccionada, Alvarinho Reserva, Alvarinho Reserva Magnum, Rosé, Tinto, Vinhão Reserva e o Espumante Meio Seco<sup>3</sup>.

### 1.1.2 Castas da região

A legislação permite a produção de diversas castas em território demarcado dos vinhos verdes; no entanto, nem todas estão autorizadas para a produção de vinhos com diferentes títulos.

As castas da região são consideradas autóctones à custa da sua longa existência na região, o que ajuda a consolidar as características e especificidade do Vinho Verde. Estão localizadas em terrenos com condições muito próprias, e por esta razão se aceita a singularidade dos vinhos produzidos na região<sup>2</sup>.

#### 1.1.2.1 Castas brancas

No caso das castas brancas, apenas 23 podem ser utilizadas em vinhos para que estes recebam a conotação de DO Vinho Verde, sendo recomendadas apenas as seguintes: Alvarinho, Arinto, Azal, Avesso, Loureiro e Trajadura.

Uma das mais importantes para a Adega Ponte da Barca é a Loureiro, uma casta antiga e de alta qualidade, que dá origem a vinhos de cor citrina, com aromas frutados que podem ser desde citrino a floral e melado<sup>2</sup>.

### 1.1.2.2 Castas tintas

Já para a produção de vinhos DO Vinho Verde apenas 22 castas são permitidas<sup>4</sup>, sendo apenas 8 recomendadas para produção na região: Amaral, Borraçal, Padeiro, Rabo de Anho, Alvarelhão, Espadeiro, Pedral e Vinhão<sup>5</sup>.

A casta tinta mais importante da sub-região do Lima e mais utilizada pela Adega é a Vinhão, a partir da qual produz quatro vinhos diferentes e um espumante. É uma casta de grande importância por toda a região pela sua qualidade e dado ser a única tintureira. Origina vinhos carregados, adstringentes, e de onde se evidenciam aromas a frutos silvestres<sup>2</sup>.

## 2. Vinificação – operações pré-fermentativas

Todas as etapas do processo de vinificação vão determinar as características do vinho numa etapa posterior, pelo que devem ser tomadas todas as decisões necessárias com antecedência. Desde o desengace dos cachos de uvas até ao início da fermentação: tudo é importante e essencial, daí que diferentes técnicas de vinificação produzam vinhos muito diferentes.

Alguns parâmetros a acompanhar são:

. pH: o seu valor rapidamente fornece informação sobre as condições de acidez do vinho ou mosto, podendo interferir na evolução das fermentações seguintes e desenvolvimento das leveduras e bactérias presentes no meio. O contrário também acontece, isto é, a atividade de leveduras e bactérias também leva a alterações de pH do mosto ou vinho, daí a importância do parâmetro;

. SO<sub>2</sub>: apesar dos seus inconvenientes de natureza toxicológica e organolética, o SO<sub>2</sub> apresenta um conjunto de propriedades que nenhuma outra substância reúne em grau tão elevado, tendo várias ações, nomeadamente ação dissolvente, que aumenta a extração dos constituintes das células vegetais; ação antioxidante, que resulta da facilidade com que ele próprio é oxidado, protegendo alguns constituintes facilmente oxidáveis; ação anti-diastásica, que se traduz na capacidade de inibição e destruição de algumas enzimas; e ação antissética, manifestando poder antibacteriano e, em menor grau, uma ação sobre as leveduras<sup>6</sup>. Parte do dióxido de enxofre pode encontrar-se sob a forma combinada com outras moléculas, podendo estas ser antocianinas, glucose ou até compostos aromáticos, e podendo estas ligações ser reversíveis ou não. Conclui-se então que é um importante composto enológico na indústria dos vinhos, sendo também

bastante regulado e que deve ser vigiado e corrigido sempre que necessário nos mostos e vinhos. O limite legal de SO<sub>2</sub> total em vinhos em Portugal aponta para níveis máximos de 150 mg/L para vinhos tintos, e 200 mg/L para vinhos brancos e rosados (para vinhos com valores de D-glucose + D-frutose menor que 5 g/L, como é o caso dos vinhos em análise)<sup>7</sup>.

. Densidade: é um parâmetro bastante importante no acompanhamento da fermentação alcoólica de um vinho pois permite perceber em que fase é que esta se encontra: o valor da densidade do líquido vai diminuindo à medida que os açúcares vão sendo degradados pelas leveduras. É, por isso, bastante útil na determinação do momento de paragem da fermentação quando se quer obter vinhos que não sejam secos, ou seja, que apresentem um teor de açúcares relativamente elevado.

. Acidez: o valor deste parâmetro reflete-se na estabilidade físico-química e biológica do futuro vinho, e por consequência, na sua longevidade, mas reflete-se também nas suas características sensoriais<sup>8</sup>, tornando-o mais ou menos fresco. A acidez total refere-se à soma de todos os ácidos tituláveis nesse mesmo vinho e, para Portugal, pelo Regulamento (CE) nº 491/2009, Anexo III- 1 d)<sup>7</sup>, o valor deste parâmetro tem que ser igual ou superior a 3,5 g/L. A acidez volátil consiste na soma dos ácidos voláteis do vinho, isto é, todos aqueles que se libertam por ebulição ou destilação, e deriva da série de ácidos acéticos presentes no vinho de forma livre ou combinada<sup>9</sup>. É importante para ter uma noção do nível de ataque das bactérias acéticas ao vinho, e é percebido como o odor a vinagre. A acidez fixa de um vinho é a soma dos seus ácidos fixos, isto é, não-voláteis, que são maioritariamente o ácido málico e o ácido tartárico.

. Ácido málico: é considerado um ácido fraco, porém encontra-se naturalmente presente em muitos frutos, ao contrário do ácido tartárico. O isómero que se encontra nas uvas é o L(-). A sua concentração é máxima no início da maturação da uva e vai decrescendo até à fermentação malolática, onde sofre uma queda abrupta, sendo degradado a ácido láctico, o que é aconselhável para diminuir a acidez do vinho. É, portanto, aconselhável acompanhar a sua evolução ao longo das fermentações<sup>6,10</sup>.

. Ácido láctico: surge da degradação do anterior e confere suavidade ao vinho pela diminuição da acidez. É importante este parâmetro ao longo das fermentações para perceber em que patamar se encontra o vinho.

. Ácido cítrico: confere frescura aos vinhos e o limite legal é igual ou inferior a 1 g/L, segundo o Anexo I A – 24 do Reg. (CE) nº 606/2009<sup>7</sup>.

. Ácido tartárico: é um dos três principais ácidos encontrados na uva, sendo que menos de metade da sua quantidade se encontra na forma livre, já que a maioria se encontra sob a forma de sal de potássio – tartarato de potássio. É importante acompanhar para perceber precisamente que quantidade se encontra sob a forma de sal, e se é necessário adicionar ou não.

. Açúcares D-Glucose + D-Frutose: são os principais açúcares redutores presentes nas uvas e, por isso, são usados para determinar o teor em açúcares dos mostos e vinhos. A sua concentração aumenta regularmente durante a maturação da uva e fixa em determinados valores devido a vários fatores, tais como condições genéticas, do solo, do clima, do porta-enxerto e até mesmo da técnica do viticultor. No início da maturação, a glucose é o açúcar mais abundante na uva mas, após o pintor, razão glucose/frutose passa a ser ligeiramente inferior a 1<sup>o</sup>. Os limites legais encontram-se definidos no Reg. (CE) nº 607/2009, Anexo XIV - Parte A.

## 2.1 Vinificação de brancos

O processo de vinificação de uvas brancas na Adega de Ponte da Barca segue um esquema tradicional de vinhos da Região dos Vinhos Verdes:

- . Operações mecânicas após a vindima da uva (receção na Adega, desengace e prensagem);
- . Arrefecimento inicial do mosto para impedir o início da fermentação;
- . Remoção de partículas de maior dimensão do mosto por decantação ou flotação com azoto.

### 2.1.1 Decantação estática vs. Flotação com azoto

Ao contrário da vinificação de tintos, nos brancos não ocorre maceração, isto é, as películas e grainhas da uva são removidas logo no início do processo através da prensagem, interessando apenas o sumo da uva, ou mosto. Após a prensagem o mosto apresenta uma turbidez elevada devido às variadas partículas em suspensão, apresentando também uma elevada viscosidade, fruto da presença de pectinas das uvas, havendo assim necessidade de o clarificar. Esta clarificação pode ser feita por Decantação estática ou por Flotação com azoto, sendo ambos métodos utilizados na Adega Ponte da Barca:

. Decantação estática: o mosto é deixado a repousar durante cerca de 24 horas e as partículas vão assentando, estratificadamente, pela ação da gravidade, procedendo-se depois a uma trasfega do mosto clarificado<sup>6</sup>;

. Flotação com azoto: o mosto é injetado com azoto durante cerca de 4 horas e as partículas vão sendo arrastadas pelas bolhas e ascendendo à superfície, isto é, são formados complexos gás-sólidos mais leves que a fração líquida. Depois, faz-se igualmente uma trasfega do mosto clarificado.

O método da flotação com azoto apresenta algumas vantagens relativamente à técnica de decantação visto ser um processo seguramente mais rápido e também prático, o que permite reduzir o tempo de necessidade de arrefecimento do mosto e uma maior agilidade dentro da Adega<sup>11</sup>. No entanto, quanto mais reduzida a temperatura do mosto mais viscoso este se torna, dificultando bastante a separação, o que é desvantajoso quando se pretende adiar o início da fermentação, e isto acontece em ambos os métodos de remoção de partículas do mosto.

É importante realçar que ambos os métodos atingem resultados bastante favoráveis quando associados a enzimas de clarificação e/ou aplicação de SO<sub>2</sub>.

### 2.1.2 Adição de aparas de madeira em vinhos brancos

Conforme o vinho que se pretende obter, pode ser desejável recorrer à utilização de aparas ou aduelas de madeira para conferir determinados aromas ao produto. A sua utilização é bastante recorrente em vinhos tintos, mas cada vez mais frequente também em vinhos brancos, como é o caso do Loureiro *Premium*, um dos vinhos em estudo.

A utilização de madeira durante a fermentação pode ser feita por vários motivos: imitar o efeito de estágio em barrica sem a logística que isso implica, ou produzir um vinho diferente com um toque distintivo. De forma geral, terá sempre como objetivo diminuir as notas vegetais, aumentar a complexidade e subtileza aromática, aumentar a intensidade de taninos e dar volume de boca ao vinho<sup>12</sup>.

Conforme o que se pretende, há que escolher o tipo de madeira, que se divide maioritariamente em carvalho francês e americano; o tipo de tosta, que talvez seja o fator com maior influência nos resultados; e o modelo de apara ou aduela:

. Carvalho Francês vs. Carvalho Americano – existe uma preferência pelo uso do carvalho francês devido à sua elevada qualidade na produção de vinhos mais complexos, daí também ser o que tem maior custo. O carvalho americano parece conferir notas de baunilha e coco aos vinhos com os quais contata<sup>13</sup>.

. Tosta – madeira fresca não tostada é aconselhada para reforçar aromas frutados, embora possa também transmitir aromas demasiado herbáceos de serradura, que podem ser combatidos posteriormente com micro-oxigenação do vinho; madeira com tosta média a forte confere notas a baunilha e torrado, sendo privilegiada na ótica da formação de lote; madeira com tosta forte pode, por vezes, reforçar odores a enxofre, semelhantes a fósforo queimado e borracha. Na maior parte das vezes é utilizado uma mistura de madeiras com diferentes tostas para balançar todos estes atributos<sup>12</sup>.

. Modelo de apara – podem ser vários e diferem principalmente na superfície de contato com o vinho. Fragmentos mais pequenos parecem marcar pelo excesso de notas de seiva quando em contato prolongado, devendo privilegiar o uso de blocos ou aduelas, cuja atuação é mais semelhante ao das barricas<sup>12</sup>.

O momento de aplicação das aparas pode também ser importante no resultado, sendo que aplicações precoces permitem uma melhor integração do impacto sensorial<sup>12</sup>.

Analiticamente, o uso de aparas permite a transferência de compostos da madeira para o vinho: Pérez-Coello *et al.* demonstraram que a concentração de furfural sofreu um maior aumento nos vinhos em contato com aparas de carvalho americano do que os em contato com carvalho francês<sup>14</sup>, e a sua concentração aumenta ainda mais quanto maior a tosta da madeira, devido à conversão da celulose em furfural e 5-hidroximetilfurfural aquando do processo de tosta<sup>15</sup>. O mesmo estudo prevê um aumento da concentração de vanilina em vinhos em contato com as aparas, o que justifica o aroma abaunilhado que algumas fornecem, bem como o aroma geral a madeira é justificado pelo aumento da concentração de  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona, ou “lactona do *whisky*”, molécula proveniente da madeira que se encontra em maior quantidade nos vinhos estudados<sup>14,15</sup>.

De forma geral, a utilização de aparas de madeira durante a fermentação parece aumentar o seu rendimento e a produção de compostos aromáticos variados no seu decorrer<sup>15</sup>.

## 2.2 Vinificação de tintos

O processo de vinificação de uvas tintas na Adega de Ponte da Barca segue um esquema tradicional de vinhos da Região dos Vinhos Verdes:

. Operações mecânicas após a vindima da uva (receção na Adega e desengace);

. Maceração pelicular simultânea à fermentação com recurso a cubas autovinificadoras com controlo de temperatura.

A produção do vinho Estreia Vinhão apresenta a particularidade de não utilizar estas autovinificadoras, realizando uma maceração pré-fermentativa a frio, a cerca de 10°C, permitindo ao mosto estar em contato com as massas sem realizar fermentação. Quando a maceração termina, apenas o mosto é direcionado para uma cuba onde irá realizar a fermentação.

### 2.1.1 Maceração pelicular

O contato do mosto com as massas é talvez o passo mais importante que ocorre durante a etapa de vinificação de um vinho tinto e é no seu decorrer que se determina o perfil fenólico e potencial antioxidante do futuro vinho. É nesta etapa que ocorre a extração de, por exemplo, variados compostos fenólicos, responsáveis pelas características cromáticas e atributos sensoriais do vinho<sup>16</sup> bem como libertação e dispersão das enzimas endógenas das uvas<sup>6</sup>.

Vários fatores podem condicionar os resultados da etapa de maceração:

. Estado de maturação e composição das uvas: o conteúdo das uvas em compostos fenólicos depende das condições atuantes aquando da sua maturação, isto é, tudo o que o *terroir* envolve, mas também da própria casta, sendo que um bom nível de maturação conduz a uma boa acumulação de substâncias fenólicas e, por conseguinte, a mudanças favoráveis nos vinhos, tais como a redução da sensação de adstringência e a libertação mais rápida de compostos corantes durante a maceração<sup>6</sup>.

. Duração da maceração: no início da maceração ocorre a extração dos compostos menos solúveis em etanol, como é o caso das antocianinas, explicando o rápido aumento da intensidade corante nos primeiros dias da etapa. Esta intensidade tende a diminuir no período seguinte pela adsorção das antocianinas às partes sólidas, pela sua hidrólise e oxidação, ou mesmo pela formação de combinações com outros compostos fenólicos que posteriormente precipitam<sup>6,17</sup>. Desta forma, o índice de cor vermelha tende a descer e a dar lugar à pigmentação laranja/amarela.

De forma geral, quanto maior o tempo de maceração, maior a intensidade com que estes resultados se vão fazer sentir. A possibilidade de criar diferentes vinhos apenas regulando o tempo de duração da etapa de maceração fica apenas limitada à imaginação do enólogo, que pode optar por uma de curta duração com o objetivo de extrair o máximo de cor possível e menos taninos; ou por uma maceração mais longa que visa extrair mais taninos e intensidade corante aptos para o envelhecimento<sup>6</sup>.

. Temperatura de maceração: quanto maior a temperatura a que ocorre a maceração, maior vai ser a extração de compostos fenólicos, até um certo limite, nomeadamente antocianinas e taninos; no entanto, menos intenso será o aroma de fermentação e o carácter frutado do vinho final. Se se optar por uma temperatura mais reduzida, há que ter em conta que o vinho poderá ser pouco estruturado devido à presença reduzida de taninos; porém, se se preferir realizar a etapa a uma temperatura mais alta, poderá criar-se constrangimentos a nível da capacidade fermentativa das leveduras<sup>6</sup>.

. Utilização de enzimas: no processo de maceração estão envolvidas várias reações enzimáticas, que são responsáveis por extrair e solubilizar os constituintes vacuolares das células das uvas<sup>18</sup>. Heatherbell *et al.* demonstram ter obtido uma maior intensidade corante, justificada por uma maior concentração de pigmentos poliméricos, no seu estudo com a casta *Pinot Noir* em macerações enzimáticas, comparativamente a uma maceração sem a intervenção de enzimas<sup>19,20</sup>.

. Remontagens: o processo de maceração deve ser auxiliado pela realização de remontagens, que consiste na movimentação do mosto (parte líquida) por bombas, saindo da parte inferior da cuba para voltar a entrar na parte superior da mesma, obrigando o líquido a contactar uma maior área de massas possível - *pumping-over*<sup>6</sup>. Duas remontagens diárias do volume de líquido da cuba em questão parecem ser a regra geral para auxiliar na extração durante a maceração<sup>21</sup>, mas não se deve generalizar um único protocolo para todas as castas e adegas.

Por ser uma decisão difícil e completamente dependente do vinho que se pretende obter, surgiram já várias técnicas alternativas de maceração.

#### 2.1.1.1 Maceração pré-fermentativa a frio (MF)

A técnica de maceração pré-fermentativa a frio permite, teoricamente, a extração seletiva de compostos das películas das uvas que possam ser de interesse, e baseia-se no facto das células apresentarem um elevado teor de água, cujo arrefecimento permite a formação de microcristais no interior das membranas e conseqüente desorganização dos tecidos, facilitando a difusão do conteúdo das células para o exterior<sup>6</sup>. Na prática, esta técnica consiste no arrefecimento das massas para cerca de 10°C durante um período que pode chegar a vários dias, durante os quais são realizadas remontagens para ajudar na extração dos compostos.

Gerbaux *et al.*, no seu estudo de quatro anos sobre *Pinot Noir* na região da Borgonha, mostram que a técnica de maceração pré-fermentativa a frio não resulta

numa melhoria notável sobre a extração de compostos fenólicos, sendo a diferença relativamente ao vinho de maceração tradicional inferior a 5%. O estudo acrescenta ainda que este tipo de maceração não influencia significativamente o nível de cor e também de qualidade sensorial do vinho<sup>22</sup>.

Álvarez *et al.* demonstram que a maceração pré-fermentativa a frio, a cerca de 5-8°C, aumenta a concentração de compostos fenólicos e aromáticos em vinho tinto *Monastrell*, independentemente da duração da etapa<sup>23</sup>, mas outro estudo para a casta *Syrah* revela que a concentração em compostos fenólicos vai aumentando à medida que aumenta o tempo da maceração, ao contrário da intensidade corante, que vai diminuindo. O mesmo acontece com a estabilidade do vinho, que parece aumentar ao longo da duração da maceração, e que, se esta for demasiado curta, pode ter um efeito com resultados piores quando comparados com a maceração tradicional<sup>24</sup>.

Alguns autores condicionam o êxito desta técnica ao teor de maturação das uvas, obtendo melhores resultados quando utilizam uvas menos maduras<sup>23,25</sup>, daí a possibilidade de obter bons resultados em uvas da região dos vinhos verdes.

Quanto às antocianinas presentes nas películas das uvas, a maceração a frio parece não promover a sua extração relativamente a métodos tradicionais, segundo estudos feitos com a casta *Tannat*<sup>26</sup> e *Pinot Noir*<sup>19</sup>. Porém, no mesmo estudo, esta técnica parece aumentar a intensidade da cor e a sua estabilidade através da formação de pigmentos derivados de antocianinas<sup>26</sup>. Segundo outro estudo, a extração de compostos fenólicos já foi melhorada quando utilizada maceração a frio<sup>23</sup>.

Todas estas evidências levam a entender que os resultados obtidos por técnicas de maceração a frio não sejam congruentes de casta para casta e variam com diversos outros fatores, que podem ou não interferir com a eficácia do método, incorrendo vários efeitos no produto final. Por exemplo, segundo González-Neves *et al.*, o tamanho e a composição das uvas faz variar os resultados da aplicação deste tipo de maceração, bem como a possibilidade de extração das antocianinas<sup>26</sup>.

No seu estudo sobre vinhos produzidos pela casta *Babić*, Budić-Leto *et al.* demonstraram que, para períodos mais longos de MF, maior a diminuição da concentração de antocianinas no mosto, contrastando com o aumento da concentração de fenóis totais<sup>27</sup>. No entanto, outros estudos realizados para outras castas indicam que o tempo da maceração não é um fator predominante para o sucesso da etapa<sup>23</sup>.

A maceração a frio ocorre, normalmente, a uma temperatura entre os 5 e os 15°C<sup>28</sup>. A temperatura parece afetar o sucesso da extração de compostos fenólicos durante a maceração: uma temperatura baixa demonstra afetar a intensidade corante do vinho ao longo do sua conservação, mas não a tonalidade do mesmo, em estudos realizados com a casta *Babić*<sup>27</sup>. Para Piccardo D. *et al.*, uma maceração pré-

fermentativa a quente (temperatura entre 60 e 65°C) obteve melhores resultados a nível geral de extração de compostos fenólicos totais, antocianina em particular, para a casta *Tannat*<sup>29</sup>.

Ainda não existem grandes estudos sobre a associação de enzimas à maceração a frio; no entanto, a maceração a frio deveria estar acoplada ao uso de enzimas pectolíticas para garantir que o objetivo de obter uma maior extração fenólica é alcançado. Devido à dispersão de resultados sobre a capacidade de extração da maceração a frio, existem estudos que investigam a possibilidade da substituição completa desta técnica unicamente pela adição de enzimas durante uma maceração tradicional.

De uma forma geral, a MF parece obter resultados muito variados dependendo de várias condições, pré-definidas, tais como a temperatura e duração da maceração; ou não, como a composição das uvas, originando uma indecisão sobre a possível aplicação do método e respetivos resultados.

### 3. Fermentação

A produção de vinhos, tanto tintos como brancos, passa por uma fase imprescindível para a obtenção do produto final: as fermentações. Eles realizam uma fermentação alcoólica, que é geralmente a primeira a iniciar, e uma fermentação malolática, que pode começar antes do término da alcoólica. A ocorrência de cada fermentação determina grande parte das características de um vinho.

#### 3.1 Fermentação Alcoólica (FA)

Este processo realiza a transformação de açúcares em etanol e dióxido de carbono, com libertação de energia calorífica, e é essencial à produção do mais básico vinho. A sua extensão ditará o grau alcoólico do vinho, uma característica muito importante, principalmente na Região dos Vinhos Verdes, onde a obtenção de vinhos com graus alcoólicos altos pode ser dificultada pela realização de uma vindima precoce.

##### 3.1.1 Fatores que condicionam a Fermentação Alcoólica

Vários são os fatores que podem influenciar as condições a que ocorre a fermentação alcoólica e os resultados que dela advêm:

. Inoculação de leveduras: as películas das uvas encontram-se carregadas de leveduras endógenas que possivelmente não são as indicadas para conduzir a fermentação. Desta forma, recorre-se à inoculação das leveduras indicadas para que a fermentação ocorra da melhor forma. Regra geral, as culturas inoculadas conseguem dominar as condições de fermentação desde cedo, embora não completamente, de diferentes formas e com diferentes graus de dominância, que difere de cultura para cultura, como através de competição por nutrientes<sup>30,31</sup>.

É também possível controlar o crescimento de uma ou outra cultura de leveduras através do controlo da temperatura de fermentação e da adição de SO<sub>2</sub><sup>31</sup>.

Relativamente às características sensoriais, vinhos sem inoculação de leveduras parecem obter um aroma mais intenso comparativamente com vinhos inoculados com leveduras. Conclui-se que a variação de inóculos conjugada à grande variedade de leveduras endógenas existentes nas uvas produz um grande conjunto de sabores e aromas no produto final<sup>30,31</sup>.

. Temperatura: este parâmetro é um dos mais importantes a acompanhar durante a fermentação, pois afeta a cinética do processo e a qualidade do vinho produzido. Fermentações a temperaturas relativamente baixas – cerca de 10-15°C - são realizadas com o intuito de obter um vinho com um perfil aromático pronunciado, devido ao aumento da produção e retenção de compostos voláteis; no entanto, podem ser bastante lentas ou mesmo parar sem estar concluídas<sup>32</sup>. O sucesso deste tipo de fermentações encontra-se principalmente no uso de leveduras capazes de atuar nesta gama de temperaturas, o que parece ser possível pois, segundo Fleet *et al.*, a tolerância destas ao etanol aumenta com o decréscimo da temperatura<sup>33</sup>, e a sua produção de biomassa parece atingir um máximo na gama de temperaturas em questão, capacidade bastante importante no início de uma fermentação<sup>34</sup>.

Ainda assim, a maior parte das leveduras utilizadas em vinificação apresentam uma temperatura de fermentação ótima teórica na zona dos 31-33 °C, o que pode estar bastante longe da realidade prática. Em vinificações de tintos, é vulgar o recurso a temperaturas próximas destes valores para melhorar as condições de maceração<sup>6</sup>.

Em estudos com a casta *Syrah* onde efetuaram uma maceração pré-fermentativa a frio, uma temperatura de fermentação de cerca de 20 °C resultou em vinhos com acidez reduzida, aumento de pH, antocianinas e etanol, quando comparados com fermentações realizadas a temperaturas mais baixas<sup>35</sup>.

. Oxigenação do mosto: como as leveduras necessitam de oxigênio para o seu metabolismo, a sua disponibilidade durante o processo de fermentação é imprescindível, sendo que a sua carência resulta em fermentações mais lentas e mesmo incompletas, em comparação com um mosto arejado<sup>6</sup>.

O momento da oxigenação é igualmente importante, devendo ser feito no início da fermentação para fornecer oxigênio às leveduras em fase de crescimento, sendo que arejamentos tardios se tornam ineficazes. Sob condições anaeróbias, o crescimento das leveduras requer oxigenação para a síntese de lípidos essenciais à integridade da membrana; caso contrário, a fermentação irá ser bastante lenta<sup>36</sup>. Segundo Salmon *et al.*, uma oxigenação de 5-7,5 mg oxigênio/L demonstra uma síntese ótima de lípidos e crescimento das leveduras<sup>37</sup>.

Em estudos feitos com a casta *Airén*, a combinação da maceração pré-fermentativa com a hiperoxigenação do mosto (máximo de cerca de 50 mg/L) resultou num vinho com vários efeitos positivos, tais como a diminuição da concentração de compostos fenólicos, com vantagens na redução do acastanhamento do vinho, como o aumento do conteúdo de antioxidantes<sup>38</sup>.

. Adição de produtos enológicos: geralmente, associada à inoculação de leveduras, está a adição de nutrientes e fatores de crescimento, para melhorar a viabilidade e vitalidade das leveduras ao longo da fermentação. Estes podem evitar desvios metabólicos desnecessários, manter uma cinética de fermentação elevada e regular, entre outros efeitos, as características sensoriais e físico-químicas do vinho final<sup>39</sup>.

Alguns exemplos são:

. adição de Glutatião - alguns exemplos de produtos enológicos adicionados, principalmente a mostos brancos, com efeito durante a fermentação, são preparados secos de levedura inativa cuja adição tem como objetivo a proteção de compostos aromáticos da oxidação através da alta disponibilidade e alto teor natural de glutatião (GHS). Este é um tripéptido composto por três aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina que, quando reduzido, tem um grande poder antioxidante, sendo um antioxidante natural na uva, podendo ser utilizado para diminuir a necessidade de aplicação de SO<sub>2</sub> nos mostos. O seu uso leva à produção de vinhos com maior intensidade cromática e estabilidade<sup>39,40</sup>.

. adição de taninos enológicos - outra adição importante com resultados durante a fermentação alcoólica são os taninos. Estes compostos possuem a capacidade de se combinar com proteínas e polissacarídeos formando complexos estáveis, o que está na

origem da sensação de adstringência<sup>41</sup>. Podem ser bastante úteis pois possuem variados efeitos: estabilização ou intensificação da cor (co-pigmentação) através da ligação a antocianinas; limitação dos fenómenos da oxidação, nomeadamente através da ligação a oxidases, provocando a sua precipitação, o que também revela uma ação clarificante<sup>42;44</sup>. Em termos sensoriais, parecem contribuir para a redondez do vinho<sup>39</sup>. Existem, no entanto, estudos sobre a casta *Syrah* que demonstram não haver melhoria significativa na adição de taninos da uva quer antes como após a fermentação, não revelando alterações significativas a nível de cor e adstringência percebida<sup>45</sup>.

Em estudos onde se combina a maceração a frio com a adição de taninos elágicos, os resultados mostram que não existe uma mudança ou melhoria perceptível no vinho relativamente aos quais apenas foram adicionados taninos<sup>46</sup>.

### 3.2 Fermentação Malolática (FML)

A segunda fermentação a decorrer é a malolática, que consiste na conversão de ácido málico em ácido láctico, com o ácido pirúvico como composto intermediário e com libertação de CO<sub>2</sub>, sendo considerada uma desacidificação biológica.

Ao contrário da fermentação alcoólica, este fenómeno é realizado por bactérias, mais especificamente bactérias lácticas, cuja presença é maior em uvas mais maduras<sup>6</sup>, daí a recorrente aplicação de *starter kits* em vinificações de vinhos verdes. Este fenómeno diminui a acidez total o que resulta na diminuição dos aromas vegetais, conduzindo a um equilíbrio gustativo mais favorável, e conferindo corpo e complexidade aos vinhos. É quando ocorre também a produção de diacetil, o composto responsável pelo aroma amanteigado indesejável nos vinhos. É muito importante a sua ocorrência nos vinhos tintos, porém, existe muita controvérsia no caso dos vinhos brancos pois receia-se que se elimine o característico aroma frutado dos mesmos<sup>6</sup>.

#### 3.2.1 Fatores que condicionam a Fermentação Malolática

Como referido anteriormente, o grau de maturação das uvas influencia a facilidade com que a fermentação malolática arranca, devido à maior presença de bactérias. Desta forma, são muitas vezes utilizados *kits* de culturas de bactérias lácticas para auxiliar no arranque ou desenvolvimento da fermentação. Muitas vezes realizam-se 'pés-de-cuba', isto é, transfere-se parte de um vinho que já iniciou a malolática para outro que ainda não iniciou de forma a 'inocular' as bactérias presentes no primeiro e despoletar o início da fermentação no segundo.

Também as borras resultantes do processo de fermentação alcoólica são auxiliares no arranque da malolática devido à sua riqueza em microrganismos, daí ser prática comum manter o vinho em contacto com as mesmas.

Outro condicionante desta fermentação é a concentração de SO<sub>2</sub> do vinho, pois quanto maior esta for, mais a fermentação malolática vai ter dificuldades em decorrer devido à inibição da atividade das bactérias<sup>6,47</sup>. Este efeito é vantajoso quando a fermentação termina: após a degradação completa do ácido málico, as bactérias continuam presentes no vinho, podendo provocar graves alterações ao mesmo, utilizando-se a adição de SO<sub>2</sub> como medida preventiva para que isso não ocorra<sup>6</sup>.

Também a temperatura e o pH têm influência sobre a fermentação malolática: Fleet *et al.* demonstraram que a taxa de crescimento bacteriano e de fermentação aumenta com o aumento dos valores de pH de 3,0 para 4,0<sup>48</sup> e com temperaturas situadas entre os 22°C e os 25°C<sup>47</sup>. A presença de etanol condiciona também a ocorrência da fermentação malolática, sendo que concentrações mais elevadas apresentam maior efeito inibitório<sup>47</sup>.

A utilização de *starter kits* é comumente realizada para garantir o sucesso da fermentação malolática. Geralmente, estes *kits* possuem culturas de bactérias com elevada tolerância a condições extremas – pH baixo e altas concentrações de etanol - e baixa produção de diacetil. Possuem ainda um ativador específico para as bactérias em questão, minimizando a duração da etapa de aclimatização<sup>39,49</sup>. Existem vários *kits* com culturas distintas conforme o resultado desejado em termos de características sensoriais. A única desvantagem da utilização destes produtos é o facto de serem bastante caros; no entanto, o impacto deste fator pode ser minimizado pela realização de pés-de-cuba.

## 4. Operações pós-fermentativas

Incluem operações importantes numa reta final de produção. É nesta altura que há a oportunidade de corrigir erros cometidos anteriormente, se assim for possível.

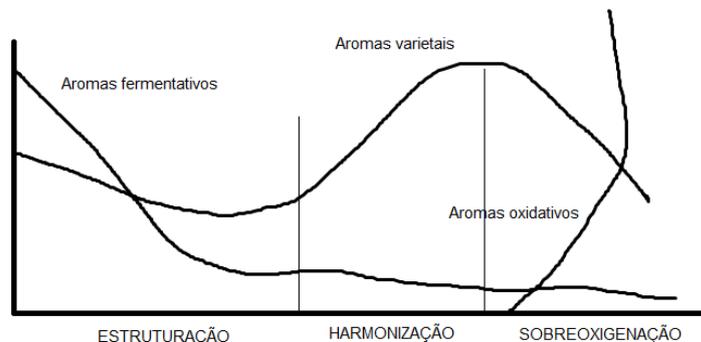
### 4.1 Micro-oxigenação (MOX)

A micro-oxigenação é a introdução de oxigénio em mosto ou vinho de forma controlada e regular, em várias fases do processo de vinificação, com recurso a um módulo de doseamento, onde se define o caudal de oxigénio pretendido.

A adição de oxigénio permite a ocorrência de uma ligeira oxidação, com a consequente produção de etanal, que servirá de elo de ligação entre as antocianinas e os taninos, resultando num fenómeno de polimerização, que se transpõe numa diminuição de reatividade dos taninos, transmitindo a sensação gustativa de taninos arredondados.

A aplicação da MOX pode ser dividida em 3 fases (Figura 2):

1. Fase de estruturação – uma adição de oxigénio rápida antes e depois da FML; antes pelo aumento da estrutura do vinho e estabilidade da cor através da estimulação da polimerização de taninos; depois pela manutenção da estrutura do vinho definida anteriormente e evolução dos taninos; aplicação neste momento do processo deve ser precedida pela remoção das borras da cuba para que estas não “roubem” o oxigénio a ser fornecido ao vinho<sup>6</sup>;
2. Fase da harmonização – adição de oxigénio mais lenta e longa; a estrutura definida vai sendo harmonizada e o vinho vai suavizando;
3. Fase da saturação – demasiada oxigenação que resulta em aromas oxidativos e na secagem dos taninos e, conseqüentemente, num aumento da adstringência do vinho<sup>50</sup>.



**Figura 2:** Evolução dos aromas do vinho ao longo das fases da micro-oxigenação.

Embora o objetivo da MOX seja o desenvolvimento de características cromáticas desejáveis<sup>51</sup>, aromas complexos e o melhoramento da qualidade sensorial dos taninos<sup>50</sup>, alguns estudos revelam que o efeito na cor e conteúdo fenólico da realização de MOX após a fermentação malolática não é tão significativo como a sua realização antes desta começar<sup>52</sup>, inclusive devido ao efeito do SO<sub>2</sub>, que é normalmente adicionado no fim da FML.

A temperatura a que se encontra o vinho aquando da micro-oxigenação é um fator bastante importante já que altera a solubilidade do oxigénio e a taxa com que ocorrem as reações de oxidação: se a temperatura for muito alta a solubilidade do

oxigénio diminui, mas se for muito baixa as reações de oxidação decorrem de forma muito lenta e começa a haver a acumulação de oxigénio do vinho, o que não é desejável. Estabeleceu-se então que a temperatura ideal será à volta dos 15 °C<sup>53</sup>.

#### 4.2 *Batonnage*

O processo de *batonnage* consiste na ressuspensão periódica das borras - os restos de leveduras depositadas no fundo da cuba - no vinho em conservação<sup>54</sup>, com o objetivo de aumentar a quantidade de macromoléculas transferidas para o vinho<sup>55</sup>.

O tempo de contacto e a frequência das agitações deve ser decidida com cuidado para que não promova a passagem de sabores desagradáveis para o vinho nem dificulte em demasia a clarificação posterior do vinho<sup>56</sup>. Segundo Ageeva *et al.*, a duração do contacto dos sedimentos de levedura não deve exceder os 2 meses com *batonnage* mensal; no entanto, bons resultados também foram obtidos quando a *batonnage* foi realizada duas vezes por mês, durante 3 meses<sup>56</sup>.

O produto final, o vinho, deve ser alvo de várias análises, nomeadamente as mesmas que acompanham o processo de vinificação e que foram identificadas anteriormente, e ainda outras que se ache necessário, como por exemplo a determinação do teor alcoólico do vinho: segundo a definição da Portaria 985/82, de 19 de outubro, o teor alcoólico, em volume, de um vinho é o número de dm<sup>3</sup> de álcool etílico contido em 100 dm<sup>3</sup> desse vinho, sendo estes dois volumes medidos à temperatura de 20 °C, isto é, resumidamente, a percentagem v/v de etanol no vinho.

## 5. Cor

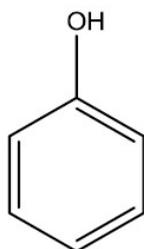
A cor de um vinho é uma característica muito importante e está intrinsecamente associada à sua qualidade e/ou possíveis defeitos, sendo a primeira forma de contacto com o consumidor. A sua expressão resulta da existência de compostos corados nas uvas e sua consequente transferência para o vinho através dos processos de vinificação.

O acompanhamento da evolução da cor faz parte do processo normal de produção de um vinho, e é feito através da realização de várias análises, maioritariamente com recurso a técnicas de espectrofotometria e colorimetria.

## 5.1 Compostos fenólicos

Estes são compostos com atividade antioxidante e estão diretamente ligados à cor, adstringência, e corpo dos vinhos, acumulando-se nas películas, polpa e mesmo grainhas das uvas<sup>57</sup>. Esta acumulação depende fortemente das condições ambientais a que as uvas estiveram expostas aquando da maturação, daí existirem vinhos com perfis fenólicos muito diferentes<sup>57</sup>, até porque o teor de compostos fenólicos destes é menor do que o das uvas, devido à impossibilidade de extrair a 100% todos os compostos. Geralmente, os vinhos tintos apresentam maior teor de compostos fenólicos do que os brancos, resultante da presença de antocianinas e outros compostos fenólicos.

A característica identificativa dos compostos fenólicos é a presença de um anel aromático hidroxilado, uma estrutura comum a todos e responsável pela sua reatividade. A forma mais simples é o fenol (Figura 3), cujo nome define esta série de compostos<sup>57</sup>. Este grupo divide-se em compostos de natureza flavonóide -antocianinas, flavonóis, flavanonóis, flavonas e flavanóis -, e não flavonóide – ácidos fenólicos e estilbenos -.



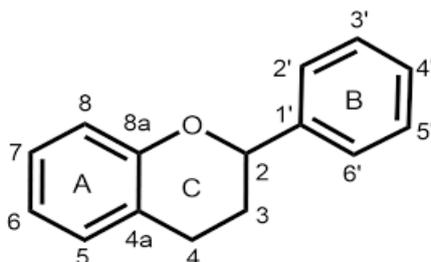
**Figura 3:** Estrutura química do fenol

### 5.1.1 Compostos flavonóides

Os compostos flavonóides caracterizam-se por apresentar uma cadeia estrutural básica C6-C3-C6<sup>43,58</sup>, sendo que a estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirânico. Estes são os principais responsáveis pelas sensações gustativas (nomeadamente os flavanóis) e características cromáticas dos vinhos (através das antocianinas e proantocianidinas). No entanto, não são compostos voláteis, por isso não contribuem para o aroma. Podem encontrar-se no estado livre ou polimerizado com outros flavonóides, não-flavonóides, açúcares ou até combinações destes<sup>57</sup>.

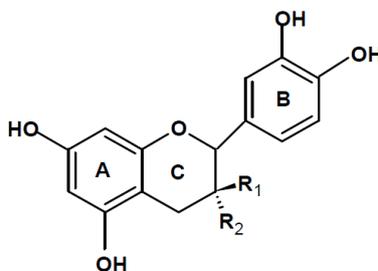
### 5.1.1.1 Flavanóis

Dentro do grupo do flavanóis, ou, mais comumente, os flavan-3-óis, destacam-se as proantocianidinas, ou taninos condensados. A sua estrutura é constituída por dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico pirânico, que juntos caracterizam o núcleo flavânico (Figura 4).



**Figura 4:** Estrutura química do núcleo flavânico

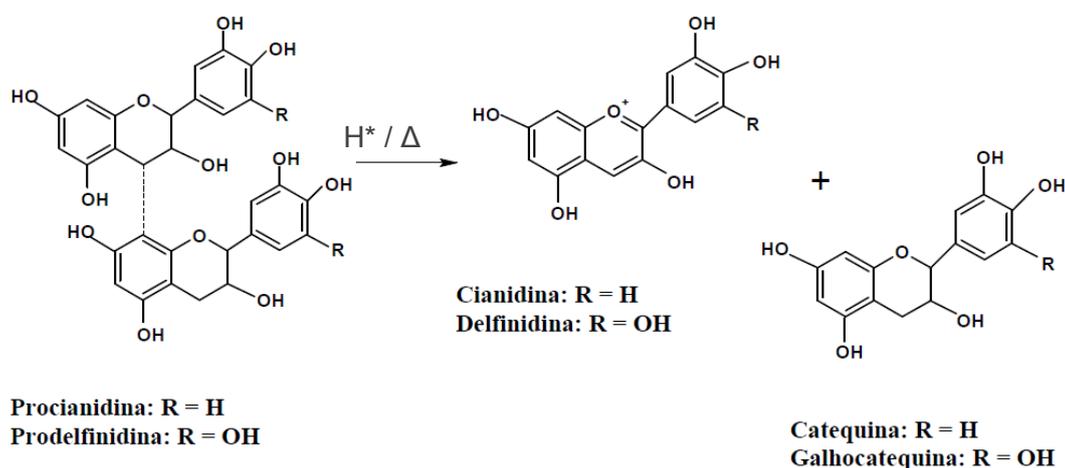
As diferentes formas de estrutura de flavanóis devem-se a diferenças da estereoquímica dos carbonos C2 e C3, e do grau de hidroxilação dos anéis aromáticos. As principais formas encontradas nas uvas são procianidinas, a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (Figura 5), sendo a primeira a mais representativa nas películas das uvas<sup>57</sup>.



(+) - catequina:  $R_1 = OH$  ;  $R_2 = H$   
(-) - epicatequina:  $R_1 = H$  ;  $R_2 = OH$

**Figura 5:** Estrutura das unidades monoméricas dos flavan-3-óis

As proantocianidinas, também denominados de taninos condensados, são compostos localizados fundamentalmente nas grainha das uvas<sup>57</sup>, que libertam antocianidinas - nomeadamente cianidina e delphinidina - quando aquecidos em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a rutura das ligações entre as unidades monoméricas, de acordo com o mecanismo proposto por Bate-Smith (Figura 6).



**Figura 6:** Quebra das ligações monoméricas das proantocianidinas – reação proposta por Bate-Smith

Este mecanismo é o princípio da análise que se realiza para determinar os taninos proantociânicos: partir de compostos sem cor, e obter compostos que absorvem a 520 nm através da decomposição em meio ácido.

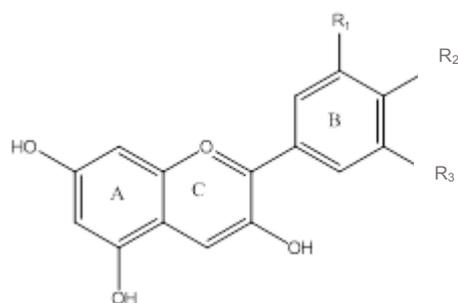
Os taninos são as moléculas responsáveis pela sensação de adstringência sentida na boca, pois ligam-se às proteínas, precipitando-as e criando uma sensação de boca seca. Além de existirem os taninos condensados, referidos anteriormente, existem também taninos hidrolisáveis, que resultam da ligação de um açúcar, geralmente a glucose, a um composto fenólico, como o ácido gálico ou elágico. Estes já não contêm monómeros de flavan-3-ol nem ocorrem naturalmente nas uvas, mas sim na madeira.

A biossíntese dos taninos começa com o desenvolvimento da parte floral da videira, e a sua acumulação atinge rapidamente um máximo. O momento deste pico na concentração dos taninos parece ser influenciado pelo local geográfico da vinha; após este momento, a concentração de taninos que o produto final, isto é, o vinho, irá ter começa a diminuir, devido à diminuição da capacidade de extração dos mesmos pela interação com outros componentes celulares, tais como a parede celular das uvas<sup>59</sup>. Segundo Raso et al. (2011), a concentração de proantocianidinas aumenta então com a maceração e diminui após a FA, o que se pode explicar pelo fenómeno da polimerização, muito comum nestes compostos<sup>17</sup>.

#### 5.1.1.2 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos encontrados nas películas e polpa de uvas, (especialmente de castas tintureiras, como é o caso da casta Vinhão) tendo como estrutura base o catião flavílio, podendo apresentar diferentes graus de metilação e/ou hidroxilação do anel B, e diferentes quantidades e tipos de açúcares ligados a si<sup>57</sup>.

As antocianinas presentes na *Vitis vinifera* são as referidas na Figura 7: Cianidina, Peonidina, Delfinidina, Malvidina e Petunidina.



Antocianinas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Cianidina	OH	OH	-
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	OH	-
Delfinidina	OH	OH	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH

**Figura 7:** Antocianinas correspondentes a cada substituição do grupo R

A cor que as antocianinas apresentam varia consoante as suas estruturas químicas e as condições do meio: mais azulada com o aumento dos grupos hidroxilo e o efeito inverso com o aumento dos grupos metoxilo. O valor do pH determina se a antocianina apresenta cor ou não, e que cor é essa: de forma geral, quanto mais baixo o pH, mais vermelha a cor da antocianina; e quanto mais alto, mais amarela. É interessante perceber que, na gama de valores de pH dos vinhos (3,0-4,0), a maior parte das antocianinas encontra-se na forma incolor, sendo que apenas cerca de 20% destes compostos é que apresentam cor, e é essa cor transmitida ao vinho<sup>43</sup>. Naturalmente se conclui que a cor verificada nos vinhos tintos se deve à ocorrência de outro tipo de fenómenos como, por exemplo, a copigmentação. Durante a fermentação, as antocianinas podem ainda ser degradadas, resultando numa perda de cor.

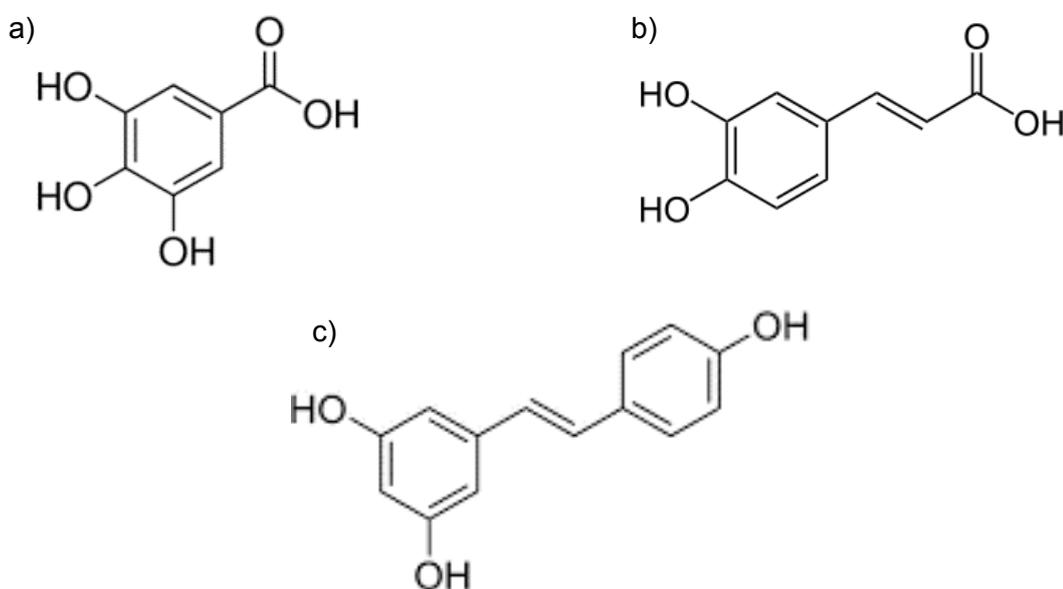
O dióxido de enxofre pode ter diferentes efeitos na presença de antocianinas, conforme o momento da sua aplicação: antes da fermentação aumenta a sua extração; durante o engarrafamento, estabiliza a cor do vinho, através da formação de compostos estáveis e incolores<sup>60</sup>.

### 5.1.2 Compostos não-flavonóides

Os compostos de natureza não-flavonóide englobam os ácidos fenólicos e o estilbenos. São os compostos fenólicos mais importantes nos vinhos brancos,

encontrando-se sobretudo na polpa das uvas e contribuindo, embora de forma reduzida e indireta, para o aroma e perfil gustativo dos vinhos<sup>57,61</sup>.

Os compostos deste tipo podem ser ácidos fenólicos (benzoicos ou cinâmicos) ou outros derivados fenólicos (ex: estilbeno). Nas uvas, os hidroxicinâmicos são os mais abundantes, encontrando-se nas células das películas e polpa<sup>62</sup>. Estes compostos têm um papel muito importante na ocorrência de reações de oxidação que levam ao acastanhamento dos mostos e vinhos<sup>63</sup>. A Figura 8 apresenta alguns compostos fenólicos não-flavonóides.



**Figura 8:** Exemplos de compostos não-flavonóides.  
a) Ácido gálico; b) Ácido cafeico; c) Estilbeno (Resveratrol)

## 6. Sistema CIELab

Em 1976, a Comissão Internacional de Iluminação (CIE – *Commission Internationale L'Eclairage*, em francês) desenvolveu o modelo colorimétrico  $L^* a^* b^*$ , vulgarmente conhecido como CIELab que, para cada cor, mede o grau de luminosidade,  $L^*$ , a cromaticidade,  $C^*$ , e a tonalidade,  $H^\circ$ . A luminosidade de uma cor refere-se à sua intensidade luminosa, não dando informação sobre qual é a cor, mas apenas o quão brilhante ela é. A percepção da cor de uma amostra pode ser definida pela sua tonalidade e pelo seu *chroma*, características expressas pelas coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ .

Cada cor pode ser assim descrita por um conjunto de coordenadas:

$L^*$  (em percentagem) – 100% para branco – completamente transparente - e 0% para preto – completamente opaco -.

$a^*$  - vermelho a verde:  $+a$  = mais vermelho;  $-a$  = mais verde

$b^*$  - amarelo a azul:  $+b$  = mais amarelo;  $-b$  = mais azul

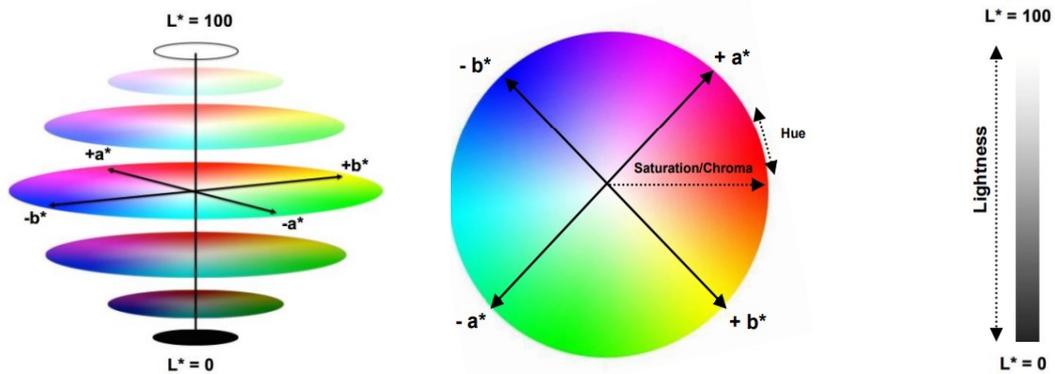


Figura 9: Espaço do Sistema CIE Lab

Este sistema é normalmente utilizado uma condição iluminante D65 que simula a luz média natural durante o dia, a uma temperatura de 6500 K; e um ângulo do observador de  $10^\circ$ . A sua utilidade passa ser possível por contornar a dificuldade de definir uma cor específica a uma amostra, possibilitando comparações rigorosas entre amostras.

## II. Descrição do plano de trabalho

### Objetivo

Os objetivos deste trabalho passam por: melhorar o protocolo Estreia Vinhão relativamente ao ano de 2017, com a finalidade de aumentar o poder tanante e, conseqüentemente, a sensação de adstringência do mesmo, tendo como foco o mercado internacional; e por produzir um vinho branco de Inverno com a casta Loureiro, com elevada adstringência e capacidade de guarda, com recurso a um protocolo *Premium*.

### Tarefas e calendarização

Este trabalho exige o acompanhamento da matéria-prima – a uva – até ao produto final – o vinho engarrafado.

O período das vindimas refere-se aos dias em que a Adega recebeu as uvas que os seus sócios produziram. Este teve a duração de cerca de duas semanas: 24 de setembro a 6 de outubro, sendo que nos quatro primeiros dias (24-28 setembro) a entrada era exclusivamente de uvas brancas e nos últimos dois dias (4-6 outubro) a entrada era exclusivamente de uvas tintas.

Ao longo deste período, as tarefas realizadas na Adega consistiam principalmente em acompanhar a entrada das uvas e o seu percurso pelas instalações. Para isso era necessário:

- . Preparar produtos enológicos necessários de antemão, para que estivessem prontos na altura da sua aplicação, ou prepará-los na altura;
- . Perceber qual o percurso de cada dorna de uvas e executá-lo, desde a escolha do tegão para onde vai ser direcionada até qual a prensa que vai ser utilizada, qual o silo de destino (no caso dos mostos brancos) e, finalmente qual a cuba de fermentação para onde ia;
- . Proceder aos diversos protocolos de vinificação e fermentação que variam conforme o tipo e qualidade de uva e produto final (vinho) pretendido;
- . Recolha de amostras nos diversos pontos do processo, e seu respetivo armazenamento nas devidas condições. Este passo apenas foi feito para o material de interesse deste projeto, nomeadamente Vinhão de alta qualidade para produzir o *Vinhão Estreia 2018*, e Loureiro de alta qualidade para produzir o *Loureiro Premium 2018*.

A par de todo este processo é necessário efetuar análises a um parâmetro muito importante em todos os silos que são cheios: o SO<sub>2</sub>. Uma amostra é retirada após a homogeneização do silo para analisar o sulfuroso total, para se perceber se o mosto está suscetível à oxidação e se é ou não necessário adicionar mais deste produto enológico.

Fora do período da vindima, era necessário auxiliar no laboratório da Adega, com as diversas análises efetuadas diariamente, que passavam por determinar valores de teor alcoólico, SO<sub>2</sub> livre e total, acidez total, pH, índice de colmatagem, entre outras. Este trabalho durou até ao fim do estágio na Adega, em dezembro de 2018.

Paralelamente, foi realizado o acompanhamento do processamento dos mostos de interesse, já referidos em cima, e cujos protocolos se encontram no material suplementar. No caso do protocolo *Loureiro Premium*, o seu acompanhamento foi mais fácil pois tratou-se de um processo contínuo: o mosto foi transferido para a cuba de fermentação 15F, onde ficou até ao final da fermentação malolática, sem requerer grandes cuidados para além da adição de produtos em diversas fases do processo e a submersão regular dos sacos de madeira. No caso do protocolo Vinhão Estreia, o acompanhamento foi mais trabalhoso pois este protocolo antecipava um etapa pré-fermentativa de maceração a frio de onde surgiram algumas dificuldades.

De seguida encontram-se todas as etapas do processo de produção de ambos os vinhos e respetiva descrição. Apenas se encontram as fases que já foram realizadas até à data de escrita deste relatório. As primeiras etapas são comuns não só para os dois vinhos referidos mas para todos, tratando-se de uma fase genérica:

#### 1. Vindima

As uvas são colhidas pelos viticultores associados da Adega Cooperativa de Ponte da Barca, CRL.

#### 2. Transporte

Após a colheita, as uvas são transportadas pelos viticultores para a adega nas melhores condições de transporte possíveis, fazendo o possível para que cheguem inteiras e não espremidas ou calcadas.

#### 3. Receção na Adega (24 setembro – 6 outubro, aproximadamente)

Na receção das uvas, a primeira tarefa a cumprir é a sua amostragem para determinar o grau provável e avaliar o estado sanitário. Depois as uvas são pesadas, e é feito um

registo computadorizado relativo ao sócio, peso, data e horário de entrega, videira, tipo de uva (casta), grau provável e estado sanitário.

#### 4. Descarga

As uvas são descarregadas no tegão tendo em conta o tipo de uva e a sua qualidade. As uvas para o Vinhão Estreia foram rececionadas no tegão 1 do cais de descarga 1; as uvas para o Loureiro Premium foram rececionadas no tegão 6 do cais de descarga nº 3.

#### 5. Desengace

A separação das uvas do engaço é feita com a utilização de um desengaçador automático e serve para evitar que este transmita cheiros e sabores herbáceos desagradáveis ao vinho.

As seguintes etapas são, na sua maior parte, diferentes entre os vinhos, por isso encontram-se divididas.

### **Vinhão Estreia 2018:**

#### 6. Bombeamento das uvas para as cubas de maceração

As massas (pele + sementes + mosto) eram direcionadas para as três cubas de maceração de inox utilizadas (68F, 69F e 70F), com cerca de 10 000 L cada, e durante este bombeamento é aplicado dióxido de enxofre para a proteger da oxidação. Uma análise é depois realizada para determinar a quantidade de SO<sub>2</sub> real e ajustar para o valor definido de 20 mg/cm<sup>3</sup>. Infelizmente, a bomba doseadora encontrava-se desregulada, pelo que o valor de SO<sub>2</sub> nas uvas não era o pretendido, mas sim bastante superior: 133 mg/cm<sup>3</sup> na cuba 68F, 41 mg/cm<sup>3</sup> na cuba 69F, e 4 mg/cm<sup>3</sup> na cuba 70F. O valor desta última deve-se ao fecho completo da bomba depois de descoberto o sucedido anteriormente. No entanto, como as três cubas de maceração iriam ser misturadas numa única cuba de fermentação decidiu-se não proceder a nenhum ajuste.

Durante o enchimento da cuba, a enzima *Prozym Thermo* é aplicada para auxiliar na extração dos compostos aromáticos e na degradação das pectinas do mosto, sendo adicionado também gelo seco – cerca de 70 kg - para refrigerar as uvas e preservar a qualidade do mesmo. (Nota: a quantidade de gelo seco adicionado não foi a ideal devido a uma rutura no *stock*).

## 7. Maceração pré-fermentativa a frio (10° C)

Para esta etapa era importante já ter as cubas refrigeradas antes do seu enchimento, por isso a manta de cada uma já tinha sido ligada para manter a temperatura perto dos 10°C. Segundo o protocolo, a maceração deveria ter a duração de três dias e ocorrer a uma temperatura constante de cerca de 10° C para manter o mosto numa fase não-fermentativa.

Deveriam ainda ser efetuadas três remontagens por dia, uma delas com passagem pelo permutador, para favorecer a extração da cor através da promoção do contacto entre o mosto e as massas, e aumentar a solubilização dos aromas do mosto, sem que este começasse a fermentar.

Infelizmente, a maceração durou apenas 2 dias devido a um problema técnico que ocorreu aquando da tentativa de remontagem: as grelhas colocadas no fim da cuba para 'filtrar' as massas e permitir a saída do mosto foram mal colocadas em duas das cubas utilizadas, o que levou ao entupimento das mangueiras e dificultou muito o processo de remontagem. Esta foi realizada duas vezes a todas as cubas no dia do seu enchimento (1 de outubro), com passagem pelo permutador, para arrefecer as massas; e ainda duas outras vezes no dia seguinte, tendo ocorrido o entupimento no fim desse mesmo dia.

## 9. Drenagem do mosto

Uma vez terminada a maceração, o mosto é separado das partes sólidas por drenagem, transferindo a parte líquida para outra cuba onde a fermentação vai ocorrer. Devido ao problema com a drenagem do mosto das massas, estas foram encaminhadas para uma prensa (prensa 1) de onde foi recolhido a lágrima das três cubas de maceração (4000 L da 70F, 4000 L da 69F e 3250 L da 68F). Como faltavam ainda cerca de 2250 L para encher a cuba, esta foi atestada com mosto levemente prensado das cubas 70F e 68F.

## 10. Enchimento da cuba de fermentação

Durante o enchimento da cuba, as leveduras selecionadas e os nutrientes necessários são aplicados para controlar e regularizar o processo de fermentação:

- . levedura HPS: levedura principal que produz mais polissacarídeos que a maior parte das leveduras e contribui para dar volume de boca ao vinho. Foi preparada colocando em água a cerca de 37°C com adição de nutriente para reidratar;
- . *Optimum Red* - levedura inativa que liberta compostos que interagem com polifenóis, aumentando a textura e a estabilidade da cor do vinho;
- . *Tainiraisin* - tanino da película de uva branca que auxilia na proteção contra a oxidação dos compostos corantes do mosto;

. *Fermaid O* - mistura de nutrientes importantes para as leveduras, aumentando ainda o carácter frutado do vinho e o volume de boca.

No fim do enchimento da cuba foi colocado ainda um *Blend Aragonês*, isto é, aparas de madeira com e sem tosta que arredondam taninos mais adstringentes, e conferem volume e aroma a madeira ao vinho.

#### 11. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica começou entre o dia 4 e 5 de outubro. Durante a fermentação alcoólica os açúcares contidos no mosto são transformados em etanol, havendo a libertação de dióxido de carbono. Esta é monitorizada diariamente, várias vezes ao dia, através da leitura da densidade e temperatura do mosto, a fim de ter uma noção da quantidade de açúcares que lá permanecem. A temperatura média de fermentação encontrava-se nos 16-17 °C. No entanto, um erro é cometido nesta verificação, pois a correção da densidade segundo a temperatura não é feita, pelo que são resultados não corrigidos. É ainda feita diariamente uma prova do conteúdo da cuba e atribuída uma nota, neste caso um 9, que é uma nota intermédia relativamente às restantes cubas. Ainda durante a fermentação, os sacos de aparas foram sendo regularmente submersos para promover a passagem dos aromas para o mosto.

#### 12. Adição de produtos enológicos

Ao longo da fermentação é necessário adicionar alguns produtos com diferentes propósitos. Por exemplo, no dia seguinte à aplicação da levedura (2/10/2018), foi adicionado um *Kit de bactéria + ativador VP41* com o objetivo de fomentar o início da fermentação malolática, mesmo que as condições não sejam as mais favoráveis para as bactérias. Estas são uma gama de bactérias malolática resistentes a altos teores de etanol, SO<sub>2</sub> e baixos valores de pH, fornecendo ainda aromas de frutos vermelhos e tropicais.

No dia em que a densidade determinada era igual à densidade inicial – 30, foram adicionados dois produtos:

. *Fermaid E* – nutriente complexo que fornece às leveduras azoto facilmente assimilável e fatores de crescimento que iriam auxiliar ao complementar o processo de fermentação;

. *Booster Rouge* – leveduras inativas que ajudam à perceção de um aroma mais frutado e auxiliam na redução de sensações desagradáveis resultantes de uvas apodrecidas.

#### 13. Desencuba + trasfega

Uma vez que o mosto se encontra fermentado, sendo agora considerado vinho, é necessário transferi-lo para outra cuba para separá-lo das leveduras e borras que se

vão depositando no fundo da cuba. Procede-se a uma desencuba e uma posterior trasfega, ou transferência, para outra cuba, esta uma cuba de conservação. No entanto, neste caso, as borras finas são transferidas juntamente com o vinho para ter tempo de lhe conferir um maior corpo e volume.

#### 14. Fermentação malolática

Nesta segunda fermentação, o ácido málico é convertido em ácido láctico, estabilizando o vinho, diminuindo a sua acidez e melhorando as propriedades organoléticas do mesmo. A diminuição do ácido málico ocorreu mais significativamente após a trasfega para a cuba 68 e aconteceu a par de um aumento da concentração de ácido láctico, e esta relação foi acompanhada com análises com o objetivo de perceber quando a fermentação tinha chegado ao fim.

#### 15. Conservação

O vinho “novo” é mantido em repouso, sendo periodicamente analisado para acompanhar a sua evolução e manter a sua boa conservação. Foi ainda feita *batonnage* uma vez por semana durante o primeiro mês de conservação do vinho, para dar mais corpo ao vinho e promover o desenvolvimento de sabores mais complexos. De momento, a *batonnage* continua a ser feita até decisão do enólogo de parar.

#### 16. Montagem do lote

No caso do Vinhão Estreia este passo não foi feito realizado, pois apenas a cuba em questão foi trabalhada para obter este vinho. No entanto, esta etapa consiste na realização de uma prova organolética aos vários vinhos obtidos para perceber quais conjugam de uma forma agradável entre si para perfazerem um mesmo lote.

#### 17. Correção do vinho

Após uma prova organolética do vinho, percebeu-se que o vinho apresentava pouco corpo, embora estivesse agradável de aroma. Para resolver esta questão, fez-se um ensaio em pequena escala onde se experimentou quatro combinações de diferentes produtos à base de leveduras inativas e taninos para perceber qual adicionaria mais corpo ao vinho. As combinações eram as seguintes:

- . Garrafa 1 – branco do ensaio, apenas o vinho original
- . Garrafa 2 – *Nobless* 40 g/hL
- . Garrafa 3 – *Nobless* 40 g/hL + *Opera NoGreen* 5 g/hL
- . Garrafa 4 - *Nobless* 40 g/hL + *Opera NoGreen* 3 g/hL + *Opera Fruity* 3 g/hL
- . Garrafa 5 - *Nobless* 20 g/hL + *Opera Fruity* 5 g/hL

A combinação escolhida foi a da garrafa 3, tendo sido de seguida aplicados os respetivos produtos à cuba em questão, ambos diluídos em vinho. Após a adição foi feita uma remontagem com azoto.

### **Loureiro Premium 2018:**

#### 6. Bombeamento das uvas para a prensa

O equipamento que trata da passagem das massas para a prensa é a bomba de massas, e à medida que ia efetuando este transporte, ia adicionando uma mistura de enológicos preparada antecipadamente:

- . Enzima *Prozym Thermo* – enzima referida anteriormente, que auxilia na extração dos compostos aromáticos e na degradação das pectinas do mosto;

- . *PK SOL M2* – formulação que contém PVPP e proteína de ervilha, com ação clarificante e estabilizante da oxidação dos mostos;

- . *Punchy* – levedura inativa que auxilia a otimizar o perfil sensorial dos vinhos aumentando a expressão de frutos exóticos e citrinos.

Estes produtos foram preparados em bidões de 25 L e iam sendo adicionados de forma controlada às massas.

#### 7. Prensagem

O mosto é prensado em prensas pneumáticas para permitir o contato com as películas das uvas. As pressões usadas são muito baixas, na ordem dos 0,5 bar, e realizadas poucas rotações, para impedir o esmagamento de grainhas que contêm taninos indesejáveis. Nesta fase, um produto com poder antioxidante e antissético, *Oxyless*, é aplicado no tabuleiro da prensa e no silo para proteger o mosto evitando o uso excessivo de sulfuroso. É ainda adicionado gelo seco para baixar a temperatura do mosto e evitar uma fermentação precoce.

À medida que o mosto vai saindo da prensa, vai sendo enviado para um silo, onde é adicionada uma enzima que auxilia na clarificação do mosto, *Prozym clarificação*.

#### 8. Flotação

O mosto prensado encontra-se turvo, com partículas em suspensão, sejam elas leveduras ou poeiras de sujidade das próprias uvas, havendo a necessidade de as remover. Para isso, este ano resolveram utilizar o método de flotação, ao invés do método de decantação estática utilizado em anos anteriores. Este método utiliza azoto

para fazer subir à superfície as partículas que turvam o mosto e é realizado em cerca de 4 horas a uma temperatura baixa (cerca de 10 °C) para inibir o início da fermentação.

#### 9. Enchimento da cuba de fermentação – 26/09/2018

O mosto já clarificado é direcionado para a cuba de fermentação 25F e à medida que esta é cheia são adicionados os seguintes enológicos:

- . Levedura *Flavia* – levedura fermentativa que aumenta a produção de aromas varietais;
- . *Fermaid O* - nutriente complexo já referido, que fornece às leveduras azoto facilmente assimilável e que aumenta o carácter frutado e volume do vinho produzido;
- . *Stimula Sauvignon Blanc* – levedura inativa usada com o objetivo de aumentar o consumo de alguns percursores e a sua bioconversão em tióis voláteis, otimizando a atividade das leveduras do mosto;
- . *Optimum White* – levedura específica inativada que aumenta a disponibilidade de glutatião, um antioxidante, o que se traduz num vinho com maior complexidade e longevidade.

No fim do enchimento da cuba foram colocados Microaduelas *Blend Premium* e Aparas *Blend 12* de madeira para conferir ao vinho notas complexas de especiarias e madeira em geral.

#### 10. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica começou por volta do dia 28 de setembro e ocorreu a cerca de 18 °C. Esta foi diariamente monitorizada através da medição da densidade e temperatura do mosto, a fim de determinar a quantidade de açúcar remanescente, fazendo-se ainda uma prova do conteúdo da cuba ao qual se atribui uma nota. Infelizmente, ao longo da fermentação, este ensaio teve sempre uma nota um pouco fraca relativamente aos restantes.

Quatro dias após a aplicação da levedura, ou seja, dia 30/09/2018 foram aplicados os seguintes produtos:

- . *Go Ferm Protect Evolution* - ação nutritiva e protetora das leveduras, aumentando a sua tolerância ao etanol e proporcionando uma maior libertação de compostos aromáticos;
- . Levedura *QA23* – levedura selecionada na região dos Vinhos Verdes pela CVRVV que oferece segurança fermentativa aliada a baixa exigência de azoto assimilável e oxigénio, conferindo aromas cítricos e frescos ao vinho.

Quando a densidade do mosto se encontrava próxima das 1065 g/cm<sup>3</sup> adicionou-se o *Fermaid E Blanc*, um nutriente complexo que compensa as deficiências em nutrientes e fatores de crescimento, melhorando a viabilidade e vitalidade no último

passo da fermentação. Complementou-se este passo com a oxigenação do mosto com 7 mg/L de oxigénio. Quando a densidade finalmente atingiu aproximadamente as 1000 g/cm<sup>3</sup>, adicionou-se a *Bactéria VP41 + ativador*, cujo objetivo já referido é o de fomentar o início da fermentação malolática, mesmo que as condições não sejam as mais favoráveis para as bactérias, realçando notas de frutos tropicais e maracujá em vinhos brancos.

A fermentação alcoólica dá-se por terminada quando o vinho atinge uma densidade inferior a 998 g/cm<sup>3</sup>, o que aconteceu por volta do dia 4 de outubro.

#### 11. Fermentação Malolática

Dia 23 de outubro realizou-se a análise ao ácido málico, o que nos deu a informação de que a fermentação malolática já tinha terminado. Foram aplicados nesta altura dois produtos:

- . Redules – produto que atua como um tratamento curativo para a eliminação de defeitos organoléticos produzidos por compostos enxofrados;
- . Oxyles – antioxidante que ajuda a proteger os aromas fermentativos.

#### 12. Desencuba - 23/10/2018

Uma vez que o açúcar e o ácido málico já foram maioritariamente degradados, é necessário passar o vinho para outra cuba, a cuba 55, com o objetivo de separar as leveduras e borras que estão depositadas no fundo da mesma, para evitar odores indesejáveis. No entanto, as borras finas foram direcionadas para a cuba de destino juntamente com o vinho para lhe dar mais corpo. Passado pouco menos de 2 meses, foi adicionado novamente Redules e o vinho trasfegado. Logo de seguida foi adicionado Longevity, um produto que protege o vinho da oxidação durante a etapa de conservação.

#### 13. Conservação

O vinho “novo” é mantido em repouso, sendo periodicamente analisado para acompanhar a sua evolução e manter a sua boa conservação. Nesta fase fez-se uma análise sensorial e percebe-se que o vinho começa a melhorar, contendo notas de madeira como previsto. Também nesta fase e tal como no caso do Vinhão, está previsto realizar *batonnage* uma vez por mês até março.

### III. Materiais e métodos

O plano experimental/protocolo já foi especificado no capítulo da planificação e calendarização das tarefas, passando resumidamente por acompanhar a entrada das uvas e o seu percurso e modificações que sofrem ao longo do processo. Neste capítulo seguem as análises realizadas às diversas amostras recolhidas durante esse processo.

#### 1. Amostragem

Diversas amostras foram recolhidas do início ao fim do processo, desde as uvas até ao vinho produzido.

Relativamente ao vinho **Vinhão Estreia** foram recolhidas/os:

. 01/outubro: cerca de cinco cachos de uvas, um de cada dorna que iria dar origem ao vinho pretendido, em sacos de plástico aos quais foi retirado o ar tanto quanto possível. Este saco foi então armazenado no congelador a cerca de -18 °C. (Amostra UV)

. 01/outubro: uma garrafa plástica de 1,5 L (anteriormente de água) com conteúdo de cada cuba de maceração (68F, 69F e 70F), após a primeira remontagem, armazenadas no congelador a cerca de -18 °C. (Amostras VMAR68F, VMAR69F e VMAR70F, respetivamente)

. 03/outubro: duas garrafas plásticas, uma de 1,5 L e outra de 0,33 L (anteriormente de água) com mosto da cuba de fermentação 25F após a transferência para a cuba, antes do início da fermentação armazenadas no congelador a cerca de -18 °C. A garrafa de menor volume foi envolta num material opaco para posterior análise da cor. (Amostra VMAT)

. 18/outubro: três garrafas plásticas de 0,5 L (anteriormente de água) com o vinho após a fermentação, armazenadas no congelador a -18 °C. (Amostras VFF\_A, VFF\_B e VFF\_C)

. 8/novembro: uma garrafa de vidro escurecido com amostra de vinho da cuba de conservação C68 armazenada dentro de uma caixa de cartão no laboratório da Adega, a temperatura ambiente. A par desta, retirou-se também uma amostra do balão 2 numa outra garrafa idêntica, de Vinhão produzido pelo método tradicional, isto é, numa cuba autovinificadora sem maceração a frio, pertencentes ao lote 1/18 dos vinhos tintos, armazenada da mesma forma. (Amostras VMF e VT, respetivamente)

Relativamente ao vinho **Loureiro Premium** foram recolhidas/os:

. 26/setembro: cerca de seis cachos de uvas, um de cada dorna que iria dar origem ao vinho pretendido, em sacos de plástico aos quais foi retirado o ar tanto quanto possível. Este saco foi então armazenado no congelador a cerca de -18 °C. (Amostra UL)

. 26/setembro: duas garrafas plásticas, uma de 1,5 L e outras duas de 0,5 L (anteriormente de água) com mosto do silo, armazenadas no congelador a cerca de -18 °C. (Amostras LMS)

. 29/setembro: uma garrafa plástica de 1,5 L (anteriormente de água) do mosto da cuba 15F durante a fermentação, armazenadas no congelador a cerca de -18 °C. (Amostra LMC)

. 3/outubro: uma garrafa plástica de 1,5 L (anteriormente de água) do mosto da cuba 15F ao quinto dia de fermentação, armazenadas no congelador a cerca de -18 °C. (Amostra LMC5)

. 22/outubro: uma garrafa plástica de 0,5 L (anteriormente de água) do vinho da cuba 15F após as fermentações, armazenada no congelador a cerca de -18 °C. (Amostra LFF)

. 28/novembro: uma garrafa de vidro escurecido com amostra de vinho da cuba de conservação C55 armazenada dentro de uma caixa de cartão no laboratório da Adega a temperatura ambiente. A par desta, retirou-se também uma amostra do vinho Loureiro tradicional, lote 1/18 de vinhos brancos, numa outra garrafa idêntica, armazenada mesma forma. (Amostras LP e LT, respetivamente)

Todas estas amostras permaneceram armazenadas durante cerca de quatro meses, e foram posteriormente analisadas no laboratório da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP).

## 2. Análises de controlo de vinificação

As análises físico-químicas efetuadas no laboratório da Adega de Ponte da Barca (APB) são análises recorrentes de acompanhamento da evolução dos mostos e vinhos lá produzidos. Algumas das análises aqui referidas não foram efetuadas aos vinhos em questão, mas fizeram parte do trabalho diário na Adega.

### *pH*

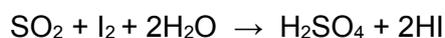
A análise é feita com recurso a um elétrodo combinado de pH e é efetuada pelo aparelho *Crison TitroMatic*.

### *Dióxido de enxofre - SO<sub>2</sub>*

A sua análise é realizada com recurso a um elétrodo de SO<sub>2</sub> e é efetuada pelo aparelho *Crison TitroMatic*, obtendo-se o valor em g/dm<sup>3</sup>.

### *SO<sub>2</sub> livre*

A medição divide-se em dois passos: adição de Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%) e posterior titulação com uma solução de Iodo (I<sub>2</sub> 0,01M). A adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> serve para acidificar o meio para que a titulação ocorra nas condições devidas. A equação da reação é a seguinte:



No método manual para determinação do dióxido de enxofre livre, adiciona-se uma solução de amido fervido para se notar a ocorrência da mudança de cor; no entanto, com o titulador automático, o amido não é necessário pois o próprio aparelho deteta o ponto de viragem na titulação, parando a adição de titulante. O método e os cálculos são realizados automaticamente pelo equipamento *Crison TitroMatic*, e o resultado é expresso em mg/L.

### *SO<sub>2</sub> total*

A análise começa com a adição de NaOH 4 M à amostra para realizar uma hidrólise alcalina, a qual tem um tempo de reação de 5 minutos. Após o tempo de espera, procede-se à adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25% - mais uma vez, para acidificar o meio - e respetiva titulação com solução de iodo 0,01 M. A hidrólise alcalina é necessária para quebrar a ligação do SO<sub>2</sub> ao ião bissulfito, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, apresentando-se assim as duas formas em equilíbrio:



Nesta análise, o aparelho tem que realizar duas medições na mesma análise: determinar o SO<sub>2</sub> livre e o combinado, e a sua soma dá o valor do SO<sub>2</sub> total. O método e os cálculos são realizados automaticamente pelo equipamento *Crison TitroMatic*, e o resultado é expresso em mg/L.

#### *SO<sub>2</sub> combinado*

A sua determinação passa pela determinação prévia do SO<sub>2</sub> livre e total, sendo calculada pela diferença dos dois valores:

$$\text{SO}_2 \text{ combinado} = \text{SO}_2 \text{ total} - \text{SO}_2 \text{ livre}$$

#### *Teor alcoólico provável*

A sua análise utiliza um refratómetro que determina o teor de açúcares presentes na amostra e calcula assim o teor de álcool provável no vinho.

#### *Título alcoólico volúmico adquirido / Teor alcoólico*

Para esta análise, faz-se uso de um ebuliómetro que deve ser inicialmente lavado com água e calibrado, através da medição da temperatura de ebulição da água. Posteriormente, o aparelho deve ser lavado com a amostra a ser analisada. O teor alcoólico é obtido através da determinação da sua temperatura de ebulição e respetiva conversão para 20 °C, com recurso ao disco de conversão.

#### *Gás – CO<sub>2</sub>*

O CO<sub>2</sub> do vinho é determinado com recurso a um manómetro e o resultado é apresentado em bar. À garrafa amostra deve ser colocada a rolha de imediato, isto é, logo após o seu enchimento, para não perder gás.

#### *Densidade*

O método utilizado designa-se Densimetria, no qual se faz uso de um densímetro que indica o valor da densidade do líquido em g/cm<sup>3</sup>, a uma dada temperatura. Esse valor é depois corrigido para a temperatura de 20 °C.

### *Acidez total*

A medição da acidez total consiste na titulação de 25,00 mL de amostra com NaOH 0,5M até o pH se encontrar igual a 7,00, o que resulta na completa neutralização dos ácidos tituláveis da amostra. O dióxido de carbono não se encontra incluído nesta medição porque é retirado à amostra antes da sua análise, através de uma agitação vigorosa. O método e os cálculos são realizados automaticamente pelo equipamento *Crison TitroMatic*, e o resultado é expresso em g/L de ácido tartárico, sendo este o ácido que se encontra em maior quantidade nas uvas.

Nota: de forma a simplificar a descrição dos métodos, a partir deste ponto, fica reconhecido que todos os métodos referidos são realizados no aparelho *MiuraOne*, adaptado para análises de mostos e vinhos, e que este utiliza metodologias de ensaios enzimáticos UV/Vis, realizando automaticamente os cálculos dos resultados.

### *Acidez volátil*

A determinação passa pela utilização de um método enzimático: a enzima acetil-CoA sintetase (ACS) vai catalisar a reação do ácido acético com a coenzima A, na presença de ATP, produzindo assim acetil-CoA (eq. 1), que por sua vez vai reagir com o oxaloacetato produzido a partir da ação da malato desidrogenase (L-MDH) sobre o ácido málico, que também leva à formação de NADH (eq. 2 e 3):



O aumento de NADH vai provocar um aumento da absorvância a 340 nm que vai ser a base do cálculo da concentração do ácido acético da amostra. O resultado é expresso em g/L de ácido acético.

### *Acidez fixa*

A acidez fixa de um vinho é a soma dos seus ácidos fixos, isto é, não-voláteis, que são maioritariamente o ácido málico e o ácido tartárico. A sua determinação passa pela determinação prévia da acidez volátil e da acidez total, sendo calculada da seguinte forma:

$$\text{Acidez fixa} = \text{acidez total} - \text{acidez volátil}$$

### *Ácido L-Málico*

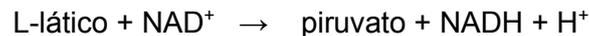
A determinação do ácido L-málico passa também por uma análise enzimática: a enzima L-malato desidrogenase (L-MDH) catalisa a oxidação do ácido málico a oxaloacetato com a redução concomitante de NAD<sup>+</sup>:



O aumento da absorvância a 340 nm provocado pela formação de NADH é diretamente proporcional ao aumento da concentração de ácido L-málico na amostra. O resultado é expresso em g/L.

### *Ácido L-Lático*

A determinação passa também por uma análise enzimática e ocorre da seguinte forma: a enzima L-lactato desidrogenase (L-LDH) catalisa a oxidação do ácido L-lático a piruvato, com a redução concomitante de NAD<sup>+</sup>:



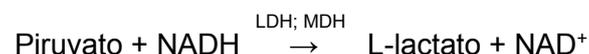
O aumento da absorvância a 340 nm provocado, mais uma vez, pela formação de NADH é diretamente proporcional ao aumento da concentração de ácido L-lático na amostra. O resultado é expresso em g/L.

### *Ácido Cítrico*

O valor de ácido cítrico é determinado com auxílio das reações seguintes: o ácido cítrico é convertido em acetato e oxaloacetato por ação da enzima citrato liase (CL):



Esta reação é deslocada no sentido da formação de oxaloacetato pela reação secundária deste e do seu produto descarboxilado, piruvato, com a oxidação concomitante de NADH:



O aumento da absorvância a 340 nm que deriva da oxidação do NADH é inversamente proporcional ao aumento da concentração de ácido cítrico na amostra. O resultado é expresso em g/L.

### *Ácido Tartárico*

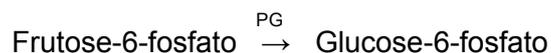
Este método baseia-se no produto da reação do ácido tartárico (ou tartarato) com ácido vanádico: um produto alaranjado quando em meio ácido cuja absorvância pode ser medida a 492 nm. O aumento da absorvância deste composto é proporcional à quantidade de ácido tartárico presente na amostra. O resultado é expresso em g/L.

### *Açúcares: D-Glucose + D-Frutose*

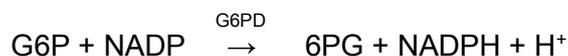
A determinação dos açúcares redutores decorre do seguinte modo: a enzima Hexoquinase (HQ) catalisa a fosforilação da D-glucose e da D-frutose mediante o uso de ATP:



De seguida, a frutose-6-fosfato converte-se em glucose-6-fosfato na presença da enzima fosfoglucose isomerase (PGI):



Na presença da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a glucose-6-fosfato é oxidada a 6-fosfogluconato com a redução concomitante de NADH:



O aumento da absorvância a 340 nm devido à formação de NADPH é diretamente proporcional ao aumento da concentração de D-glucose + D-frutose na amostra. O resultado é expresso em g/L.

### 3. Análises físico-químicas

#### *Preparação de solução sintética de vinho*

É necessário preparar uma solução sintética de vinho (12% etanol; 5 g/L ácido tartárico) para utilizar em diluições de vinhos, pois esta imita melhor as suas características do que a água, sem afetar os parâmetros em análise.

Prepara-se pesando-se cerca de 12,5 g de ácido tartárico e diluindo-se numa mistura de 300 mL de etanol e 2200 mL de água desionizada. O pH da solução é, por fim, corrigido para aproximadamente 3,20 com *pellets* de NaOH.

#### *Preparação do extrato de uva*

Consiste numa técnica que tem como finalidade extrair o conteúdo das uvas de forma uniforme para preparar uma amostra representativa da amostra inicial. Esta extração inicia-se com a recolha e pesagem de 10 bagos de uvas, dos diferentes cachos recolhidos aquando da vindima, e o seu congelamento a -80 °C. Após congelados, foram liofilizados, utilizando um liofilizador *BenchTop Pro*, e é preparado o extrato das uvas: trituração da amostra liofilizada com 100 mL de uma solução de H<sub>2</sub>O desionizada/etanol 1:1 e com recurso a um homogeneizador Ultra-Turrax. Este processo é repetido três vezes, para garantir a extração de todos os componentes. A mistura é depois filtrada em algodão e centrifugada a 12 000 rpm durante 10 minutos. No final, é evaporado parte do solvente utilizado na extração com recurso ao evaporador rotativo, e o restante é transferido para um balão de 100 mL, onde se perfaz o volume total com H<sub>2</sub>O desionizada.

#### *Análise da cor*

As análises à cor das amostras foram realizadas por espectrofotometria de UV-Vis devido às características dos compostos fenólicos e à sua capacidade de absorver radiação UV e Visível.

#### *Índice de fenóis totais*

Esta determinação pode ser feita por dois métodos distintos: através da análise espectrofotométrica a 280 nm, ou através do Índice de *Folin-Ciocalteu*. O primeiro método baseia-se na capacidade que os anéis benzénicos têm em absorver radiação

UV, sendo o seu máximo de absorção a 280 nm; o segundo método consiste na oxidação dos compostos fenólicos pelo Reagente de *Folin-Ciocalteu*.

Para o primeiro método, dilui-se a amostra apenas o necessário e lê-se a absorvância a 280 nm com recurso a células de quartzo com percurso ótico 1 mm.

O IFT é dado através da utilização da seguinte expressão:

$$\text{IFT} = \text{Abs (280 nm)} \times \text{fator de diluição}$$

Para o segundo método, começou-se por diluir as soluções 10 vezes com solução sintética de vinho. De seguida, em tubos *ependorf*, colocaram-se 15 µL de amostra diluída, 75 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu*, e 500 µL de água desionizada. Agitou-se a amostra num *vortex* e, de seguida, adicionaram-se 300 µL de carbonato de sódio a 20% e 610 µL de água desionizada, sendo novamente agitada. Após finalizar a preparação da solução, esta permanece em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante 30 minutos, estabilizar completamente a reação. Para finalizar, colocaram-se 350 µL desta solução em quatro poços de uma placa, para esgotamento da amostra. O branco realizou-se de igual modo, mas substituindo a amostra por água desionizada. Efetuaram-se as leituras da absorvância a 750 nm no leitor de placas *Power wave XS*, Bio-TEK®.

O valor em fenóis totais é expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/mL, e foi determinado através de uma curva de calibração obtida a partir do ácido gálico, originando a seguinte equação de reta:

$$\text{IFT (mg/mL)} = \frac{\text{Abs} - 0,0183}{0,8949}$$

#### *Intensidade corante*

Esta determinação permite determinar a intensidade da cor de uma amostra e passa pela soma das leituras da absorvância num espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific de duplo feixe Evolution Array, a 420, 520 e 620 nm, para o caso dos vinhos tintos; e a 320 e 420 nm para o caso dos vinhos brancos. A leitura foi efetuada com recurso a células de quartzo de percurso ótico de 1mm.

$$\text{IC}_T = (\text{A}_{420} + \text{A}_{520} + \text{A}_{620}) \times \text{fator de diluição}$$

$$\text{IC}_B = (\text{A}_{320} + \text{A}_{420}) \times \text{fator de diluição}$$

### *Índice de cor vermelha*

O valor desta determinação é o valor obtido pela leitura da absorvância a 520 nm, valor do pico de absorção das antocianinas, pelo espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific de duplo feixe Evolution Array, e utilização de células de quartzo de percurso ótico de 1 mm. É apenas realizado às amostras tintas.

$$\text{ICV} = A_{520} \times \text{fator de diluição}$$

### *Parâmetros CIELab*

A análise espectrofotométrica é realizada a 450 nm, 520 nm, 570 nm e 630 nm num espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific de duplo feixe Evolution Array, e os resultados são depois colocados no software MSCV®, com condição luminante D65, e ângulo do observador 10°, e obtidas as coordenadas referidas para ser possível perceber a cor no espaço. A leitura é feita com recurso a células de vidro de percurso ótico 2 mm.

### *Antocianinas livres totais (método do bissulfito)*

O método do bissulfito é utilizado para quantificar as antocianinas livres totais de uma amostra através da reação das antocianinas com dióxido de enxofre, que origina a um produto incolor cuja absorvância é lida para posterior comparação com a referência colorida.

Começou por se colocar num matraz 40,0 mL de HCl 2%, juntamente com 2,00 mL de etanol e 2,00 mL de amostra. Transferiu-se 10,00 mL dessa solução para quatro tubos de ensaio, aos quais se adicionou 4,00 mL de bissulfito 20%, exceto num deles, que será o branco, no qual se adiciona 4,00 mL de água desionizada. A leitura é então feita a 520 nm, com recurso a células de vidro de percurso ótico de 10 mm, num espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific de duplo feixe Evolution Array.

A quantidade de antocianinas livres que reagiu com o bissulfito é igual à diferença entre as duas medidas de absorvância:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{referência}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}$$

A concentração de antocianinas presentes na amostra é dada pela utilização da equação da reta obtida a partir de padrões concentrados de malvidina-3-glucósido.

$$[\text{antocianinas}] \text{ (mg/L)} = \frac{\Delta\text{Abs} - 0,0024}{0,0015}$$

### *Antocianinas 3-monoglucósidas livres por HPLC*

A utilização do HPLC permite a determinação e identificação das antocianinas na amostra através da sua passagem por uma coluna cromatográfica, que resulta na sua separação e possível identificação.

A análise foi realizada em triplicado por um HPLC (Merck Ref.L-7100) equipado com um detetor UV-VIS (Merck L-7420 A) por injeção direta de 20 µL de amostra, numa coluna Merck de fase reversa C18 ODS (250 x 4,6 mm d.i.). Apenas as amostras tintas foram analisadas por este método.

Os solventes utilizados foram os seguintes:

. solvente A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 10% (v/v)

. solvente B: H<sub>2</sub>O/HCOOH 10% (v/v) / Acetonitrilo 30% (v/v).

Os cromatogramas foram obtidos a um comprimento de onda de 520 nm, a 25 °C, com um fluxo de 1,0 mL/min e segundo o gradiente eluição descrito na Tabela 1.

**Tabela 1:** Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas 3-monoglucósidas.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	80	20
70	15	85
75	0	100
85	0	100
90	80	20

As antocianinas 3-monoglucosídicas e respetivos ésteres acetilados foram identificados tendo por base os espectros UV/VIS e os tempos de retenção dos respetivos padrões. A sua quantificação foi feita com recurso à seguinte equação de reta obtida por padrões de malvidina 3-monoglucósido:

$$[\text{antocianinas}] \text{ (mg/L)} = \frac{\text{Área} - 18528}{2 \times 10^7}$$

### *Preparação das amostras para HPLC-ESI-MS*

Num tubo *ependorf* colocou-se 600 µL de amostra previamente filtrada (Ø = 0,45 µm), 600 µL de acetato de etilo, e 300 µL de acetonitrilo. Levou-se ao *vórtex* durante cerca de 10 segundo e centrifugou-se a 5400 rpm durante 5 minutos. Após a

centrifugação, procedeu-se à remoção da fase orgânica para outro tubo e reservou-se. Ao *ependorf* inicial adicionou-se novamente 600 µL de acetato de etilo e 300 µL de acetonitrilo, voltando a repetir o processo. Retirou-se novamente a fase orgânica e adicionou-se à extraída inicialmente, no tubo reservado. Evaporou-se os solventes no aparelho de *speed* vácuo LABCONCO, com recurso a uma bomba, uma *cold trap*, e um concentrador, levando a amostra à secura. Ressuspender a amostra seca em 100 µL de água desionizada, com auxílio do aparelho de ultrassons. Colocar num vial para análise no HPLC-ESI-MS. Esta preparação foi apenas realizada às amostras brancas.

### *HPLC-ESI-MS*

Esta determinação foi realizada num sistema HPLC *Finnigan Surveyor Plus* equipado com um detetor PDA Plus, um amostrador automático Plus, uma bomba HPLC quaternária acoplada a um detetor de massa *Finnigan LCQ Deca XP Plus* equipado com uma fonte ESI e uma *ion trap*. A fase estacionária foi a coluna *Thermo Finnigan Hypersil Gold* (150 x 4,6 mm i.d., 5 µm). O espectrómetro de massa foi operado em modo ião-negativo, com uma temperatura e voltagem capilar de 275 °C e 4,5 kV, respetivamente. O espectro de massa foi gravado entre 150 e 2000 m/z. A fase móvel era composta pelo solvente A (0,1 %(v/v) de ácido fórmico) e solvente B (100 %(v/v) metanol. A taxa de fluxo foi de 0,20 mL/min e o método começou com um gradiente linear desde 90 % a 60 % de A em 90 minutos, atingindo os 100 % de B em 5 minutos e um gradiente isocrático de 100 % B durante 5 minutos. Esta análise foi apenas realizada às amostras brancas.

### *Taninos globais*

#### *Índice de Diálise*

Este parâmetro permite avaliar a complexidade estrutural dos compostos fenólicos presentes nas amostras através da quantificação de compostos polimerizados que ficam retidos no interior de uma membrana de diálise através da leitura num espectrofotómetro UV-Vis.

Começa por se cortar 25 cm de uma membrana de diálise (celulose; 6,4 mm diâmetro; cut off 12-14 KDa de peso molecular; porosidade média de 25 Å de raio) e coloca-se a hidratar em água desionizada. Após hidratação, coloca-se 5,00 mL de amostra no seu interior e dá-se um nó nas duas pontas. É, de seguida, colocada dentro de um frasco de diálise com 50,00 mL de solução sintética de vinho. Paralelamente, preparou-se a solução referência, com 5,00 mL de amostra diretamente noutra frasco de diálise. Os frascos foram fechados e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo

da luz durante 24 horas, após as quais foi medida a absorvância a 280 nm, num espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific de duplo feixe Evolution Array, com recurso a células de quartzo de percurso ótico 1 mm. A análise foi realizada em triplicado.

O índice é calculado pela seguinte expressão:

$$ID = \frac{(d_0-d)}{d_0} \times \text{fator de diluição}$$

onde:

ID – índice de diálise

$d_0$  – Absorvância da solução de referência

$d$  – Absorvância da solução resultante da diálise

#### *Poder tanante*

O poder tanante de uma amostra baseia-se na capacidade que os taninos possuem de interagirem com as proteínas, resultando na formação de agregados insolúveis e na conhecida sensação de adstringência. O método consiste numa determinação por nefelometria segundo De Freitas e Mateus (2001), com recurso à Albumina de Soro Bovina (BSA), onde a turbidez da amostra é lida antes e depois da formação desses agregados, e a diferença é referente à capacidade tanante dos taninos.

Começou por se diluir a amostra 50x com solução sintética de vinho, previamente filtrada. Colocaram-se 4,00 mL da amostra diluída em quatro tubos de ensaio pequenos, homogeneizou-se no *vórtex* e efetuou-se a leitura da turbidez, correspondendo ao branco. Posteriormente, adicionam-se 150  $\mu$ L de solução aquosa de proteína albumina sérica bovina (BSA), de concentração 0,8 g/L, a cada tubo de ensaio. Homogeneizou-se novamente no *vórtex* e guardou-se à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Após esse período, efetuou-se a leitura do valor de turbidez da amostra num turbidímetro HACH 2100N, equipado com adaptador de células de 100 x 12 mm, sempre com agitação prévia da leitura.

O valor do poder tanante é expresso em NTU/mL (unidades de turbidez), e é determinado pela seguinte expressão:

$$\text{Turbidez (NTU/mL)} = \frac{\text{Turbidez (amostra)} - \text{Turbidez (branco)}}{0,08}$$

O valor 0,08 é substituído por 4 na fórmula para determinar o poder tanante das amostras brancas, visto estas não terem sido diluídas 50x.

#### *Taninos proantociânicos totais*

Consiste na determinação dos taninos condensados, capazes de dar origem a proantocianidinas. Através de uma decomposição em meio ácido, os taninos são convertidos nestes compostos que são depois determinados por absorvância lida a 520 nm. É importante referir que, como é realizada uma decomposição em meio ácido com aquecimento, é importante remover os açúcares numa primeira etapa para que não influenciem na medição da absorvância.

A remoção dos açúcares é efetuada por extração sólido-líquido e passagem numa coluna com gel C18. Coloca-se um disco de algodão no fundo de uma seringa, e um pouco de gel C18 por cima. De seguida, coloca-se um pouco de metanol para compactar a coluna, e lava-se a coluna várias vezes com água desionizada e com recurso a uma bomba de vácuo, sem deixar secar. Pipeta-se 1 mL de amostra e vai lavando-se com água, de modo a solubilizar os açúcares, para estes serem arrastados pela coluna e, eventualmente, saírem da seringa. Deixar secar a coluna para retirar toda a água e descartar o filtrado. Colocar novamente metanol na coluna para arrastar os restantes componentes da amostra e conseguir recuperá-la. Evaporar o metanol no evaporador rotativo (150 rpm, 35 °C) até à secatura. Aquando da análise da amostra, ressuspender a amostra seca em 50 mL de solução modelo de vinho (ou água desionizada, no caso das uvas). Realizar a análise dos taninos condensados, lembrando que a diluição 1:50 já foi realizada.

Para a análise propriamente dita, pipetam-se 4,00 mL de amostra diluída para quatro tubos de hidrólise, aos quais se adicionam 2,00 mL de água desionizada e 6,00 mL de HCl 37%, no interior da hotte. Três desses tubos (amostra) são colocados em banho seco a 100 °C durante 30 minutos; o quarto tubo (referência) é apenas colocado ao abrigo da luz durante o mesmo período. Terminado o tempo, os tubos são arrefecidos em água durante cerca de 10 minutos, no final dos quais se adicionou 1,00 mL de etanol (para estabilizar as antocianinas) a todos os tubos e homogeneizou-se no *vórtex*.

Por fim, mede-se a absorvância de todas as soluções com recurso a células de vidro de percurso ótico 10 mm, num espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific de duplo feixe Evolution Array.

O valor da absorvância é obtido pela diferença entre a amostra e a referência:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs amostra} - \text{Abs referência}$$

A concentração de proantocianidinas é determinada em g/L utilizando a seguinte expressão:

$$[\text{proantocianidinas}] \text{ (g/L)} = 19,33 \times (\Delta\text{Abs} \times 50)$$

sendo 50 o fator de diluição da amostra inicial.

#### *Análise sensorial*

A análise sensorial foi realizada por um painel de seis provadores da Câmara de Provadores da CVRVV apenas às amostras de vinho, Vinhão e Loureiro. Este painel utilizou uma ficha de prova (Anexo 4), onde avaliou a qualidade visual, olfativa e gustativa de cada vinho numa escala de 1 a 5. Para facilitar a leitura dos resultados, a ausência de escolha de descritor foi representada por 0 (zero). As amostras foram enviadas diretamente da Adega para a Comissão Vitivinícola da Região dos Vinhos Verdes, tendo sido avaliadas passado um mês e meio da sua recolha.

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi efetuada através de OneWay e TwoWay ANOVAS, com auxílio do teste de *Tuckey*, e com recurso ao programa GraphPad Prism 7.04, onde se utilizou um intervalo de confiança de 95 %, ou seja, um intervalo de significância de  $p < 0,05$ . Os níveis de significância da diferença vão desde *extremamente significativo* (\*\*\*\*) até *não significativo* (ns).

## IV. Resultados e discussão

### Dados das vindimas

A Tabela 2 apresenta a quantidade e casta das uvas que foi entregue na Adega durante o período das vindimas, quer tintas como brancas.

**Tabela 2:** Quantidade de uvas (kg) entregues na Adega no período das vindimas de 2018.

	CASTAS	QUANTIDADE (kg)	
BRANCAS	Diversas	25 826	1349548 (≈ 69 %)
	Loureiro	1 267 611	
	Arinto	18 352	
	Alvarinho	10 211	
	Trajadura	27 548	
TINTAS	Diversas	77 296	606577 (≈ 31 %)
	Vinhão	523 267	
	Touriga Nacional	1 455	
	Borraçal	4 559	
TOTAL		1956125	(100 %)

Como se observa pelos dados, a Adega recebeu cerca de 1956125 kg de uvas (tintas e brancas), perfazendo um total de 7 castas diferentes, sendo quatro delas brancas e as restantes três variedades tintas.

A maior percentagem corresponde a variedades brancas, no valor de aproximadamente 69% da totalidade das uvas, enquanto que as variedades tintas correspondem a cerca de 31 %, menos de 1/3 da totalidade. Recorde-se ainda que uma parte das uvas tintas foram utilizadas para produzir vinho rosé, pelo que a quantidade de vinho tinto produzido será bastante menor que a de vinho branco.

Relativamente aos vinhos em análise, sabe-se que foram produzidos cerca de 10 000 L de Vinhão Estreia e 10 000 L de Loureiro *Premium*.

## Vinhão - Uvas (UV)

### 1. Controlo dos parâmetros de vinificação

A única análise realizada às uvas na Adega foi a do grau alcoólico provável; no entanto, visto apenas ter sido usado extrato de 1 cacho de uvas de uma dorna aleatória, o resultado não deve ser visto como determinante do grau alcoólico do vinho obtido.

O grau alcoólico provável obtido pelas uvas Vinhão foi de 12,0 % v/v, que vemos depois não estar completamente de acordo com o valor de grau alcoólico do vinho final.

### 2. Composição polifenólica

As análises foram realizadas ao extrato de uvas obtido por liofilização e trituração de 10 bagos (método descrito na secção Materiais e Métodos).

#### 2.1 Índice de fenóis totais

O índice de fenóis totais (IFT) foi analisado por dois métodos: análise da absorvância por espectrofotómetro a 280 nm, e pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados de ambos os métodos encontram-se na Tabela 3.

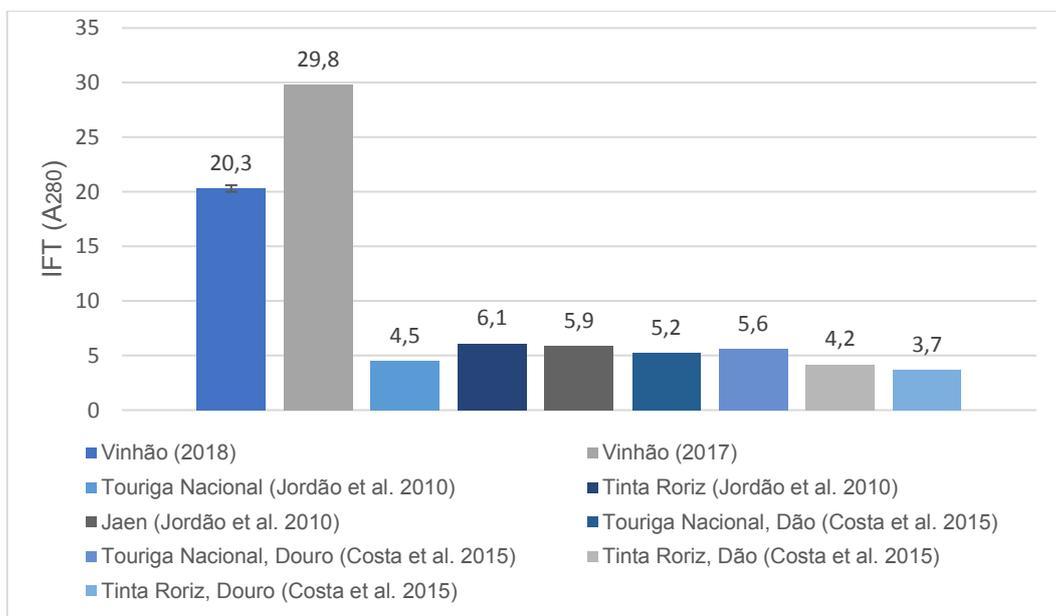
**Tabela 3:** Valores obtidos de IFT para as uvas Vinhão, utilizando o método de leitura espectrofotométrica a 280 nm e o método de *Folin-Ciocalteu*, nos dois anos consecutivos.

Índice de Fenóis Totais (IFT)		
Vinhão 2018 (20 bagos)		Vinhão 2017 (20 bagos)
A <sub>280nm</sub>	Folin-Ciocalteu (mg/L equiv. ác. gálico)	A <sub>280nm</sub>
40,6 ± 0,3	150,0 ± 20	59,5 ± 0,05

O Índice de fenóis totais encontrado para um extrato de uma amostra de 10 bagos foi IFT=20,30 pelo método de leitura a 280 nm e IFT=150 mg/L de equivalentes de ácido gálgico pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

Para podermos comparar com os valores obtidos no ano passado, devemos ter em conta o método de preparação da amostra das uvas utilizado, que foi muito semelhante com exceção do número de bagos utilizados, como demonstrado na Tabela 3. Assim sendo, e porque no ano anterior foi usado o dobro do número de bagos utilizado este ano, temos que ter este fator em conta na comparação. Concluímos então que há uma ligeira diferença no valor obtido por espectrofotometria a 280 nm dos fenóis totais das uvas nos dois anos em questão, para uma amostra de 20 bagos: IFT(2017)=59,5 e IFT(2018)=40,6. Esta diferença de quase 32% pode dever-se a variados fatores, sendo o mais óbvio a diferença das condições a foram submetidas as uvas em diferentes anos, nomeadamente condições climáticas ao longo da sua maturação, tais como temperatura e luminosidade<sup>6</sup>. É de realçar ainda que os valores obtidos apenas fornecem uma ideia do estado geral das uvas utilizadas nos processos de vinificação, não sendo uma amostra totalmente representativa de todas essas uvas.

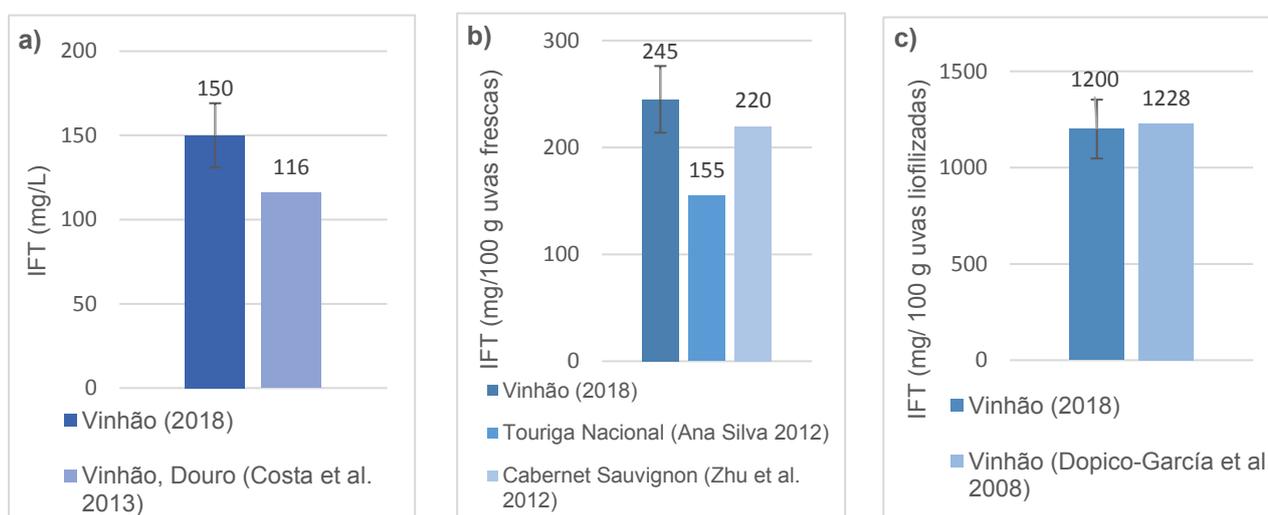
Comparando o valor obtido com outros estudos, e tendo em conta as diferenças na massa ou número de bagos utilizados na extração, podemos ver que, como seria de esperar por ser uma casta tintureira, o IFT das uvas analisadas é bastante superior, como está especificado na Figura 10.



**Figura 10:** Valores obtidos de IFT pelo método de leitura espectrofotométrica a 280 nm para o estudo em questão e para outros estudos.

Por exemplo, em 2010 Jordão *et al.* determinaram valores de IFT=4,54 para uma amostra de 10 bagos de Touriga Nacional, cerca de 4,5x inferior ao valor obtido para as uvas em análise<sup>64</sup>; encontram-se ainda valores semelhantes quando se compara com os obtidos no mesmo estudo para as castas *Jaen* e *Tinta Roriz*, cerca de 3x e 3,5x menores, respetivamente, que os deste estudo. Estas diferenças são justificadas pela característica tintureira da casta em estudo, cuja concentração em polifenóis não se limita à película das uvas, mas se encontra também na polpa. Valores semelhantes são obtidos por Costa *et al.*, o que volta a reforçar a mesma ideia<sup>65</sup>.

Utilizando agora os valores obtidos pelo método de *Folin-Ciocalteu*, obteve-se um valor de IFT=150 mg/L equivalentes de ácido gálgico, ou aproximadamente 816,7 mg/ 100g de uvas frescas. A comparação com resultados obtidos em outros estudos encontra-se resumida na Figura 11.



**Figura 11:** Valores obtidos de IFT pelo método de *Folin-Ciocalteu* para o estudo em questão e para outros estudos, em mg/L (a), mg/100 g de uvas frescas (b), e mg/100 g de uvas liofilizadas (c).

Como se vê pelos gráficos, Costa *et al.* apresentam valores semelhantes aos obtidos para a mesma casta em estudo, na região do Douro: IFT=116 mg/L<sup>66</sup>, quando comparados com IFT=150 mg/L. A diferença destes valores pode advir de vários fatores, nomeadamente a diferença do *terroir* – a região do Douro apresenta diferenças significativas da região dos Vinhos Verdes, quer a nível de condições meteorológicas como de solo, e todas estas condições podem influenciar a acumulação de polifenóis pelas uvas. Seria, no entanto, de esperar que o valor da casta Vinhão na região do Douro obtivesse um valor mais elevado:

. Na região dos Vinhos Verdes a humidade relativa é constantemente maior e esta condição diminui o défice de vapor de água, diminuindo a transpiração e fotossíntese, conseqüentemente diminuindo a acumulação de polifenóis<sup>67</sup>.

. Na região do Douro as temperaturas são mais altas durante todo o ano, comparativamente com a região dos Vinhos Verdes, o que parece favorecer a acumulação de polifenóis<sup>67,68</sup>.

. Na região dos Vinhos Verdes o solo é considerado mais fértil<sup>69</sup>, o que tende a contribuir para o desenvolvimento excessivo das videiras, havendo uma negligência na acumulação de polifenóis<sup>68</sup>, ao contrário dos solos do Douro que são de baixa fertilidade<sup>70</sup>.

Uma explicação para estes resultados pode advir das características da própria casta: Vinhão é uma casta de origem minhota, que posteriormente 'migrou' para o Douro, com o nome de Sousão. Este facto pode ajudar a explicar os resultados na medida em que a casta pode apresentar as características mais vantajosas nas condições de origem, nomeadamente na região dos Vinhos Verdes, e por isso apresentar uma maior acumulação de polifenóis do que na região do Douro.

Sobre o estudo de 2008 de Dopico-García *et al.*, percebe-se que os resultados obtidos do IFT em mg/kg de uvas liofilizadas são bastante semelhantes, o que está de acordo com o esperado, já que corresponde à mesma casta na mesma região vitivinícola.

Ainda sobre os restantes dados da Figura 11, pode ver-se que os dados de IFT para as outras castas não tintureiras (*Cabernet Sauvignon*<sup>71</sup> e *Touriga Nacional*<sup>72</sup>), são inferiores, o que também vai de encontro ao esperado.

## 2.2 Taninos proantocianínicos totais

Os taninos proantocianínicos são taninos condensados que são capazes de dar origem a antocianidinas, compostos corados, através da sua decomposição em meio ácido pela ação do calor (Reação de Bate-Smith). Ao determinar a quantidade de antocianidinas na amostra, determinamos, indiretamente, a quantidade destes taninos. Estes compostos localizam-se maioritariamente nas partes sólidas da uva (por ordem decrescente: grainha, engaço e película), e em poucas quantidades na polpa, daí que uma maior ou menor etapa de extração resulte num vinho com maior ou menor teor de taninos<sup>59,73</sup>.

O valor obtido de proantocianidinas para as uvas em estudo encontram-se na Tabela 4, em diferentes unidades, para facilitar a comparação ao longo da discussão dos resultados.

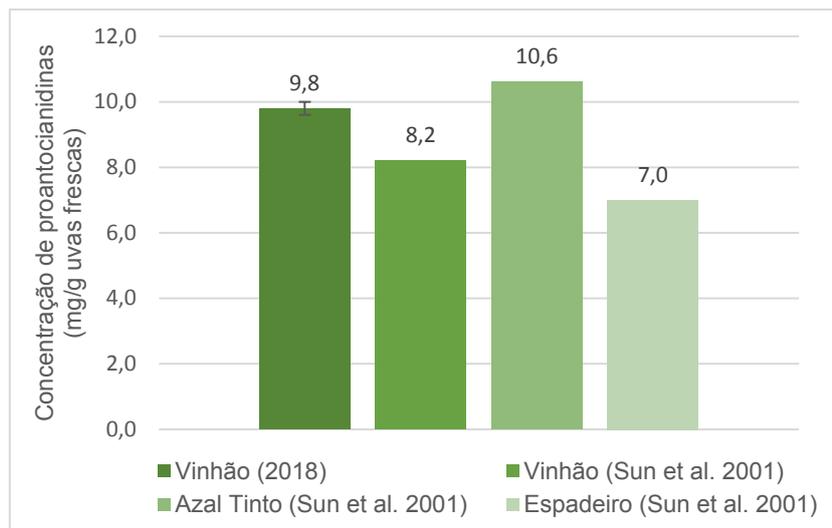
**Tabela 4:** Concentração de proantocianidinas nas uvas Vinhão em mg/g de uvas liofilizadas e mg/g de uvas frescas.

Amostra	Concentração de proantocianidinas	
	mg/g uvas liofilizadas	mg/g uvas frescas
Vinhão 2018	48,0 ± 1,0	9,8 ± 0,2

O resultado da concentração de proantocianidinas foi convertido para mg/g de uva para permitir a comparação com dados de outros estudos. Dentro destes parâmetros, dividiu-se ainda em g de uvas liofilizadas e frescas. A comparação seria mais rigorosa se se utilizasse apenas a massa de uvas liofilizadas, para remover a massa da água presente nas uvas; no entanto, a maior parte destes mesmos estudos apresenta os resultados por massa de uvas frescas, pelo que foi necessário utilizar também esta conversão.

O teor de taninos condensados obtido para a casta Vinhão, neste estudo, é ligeiramente maior ao obtido por Ribéreau-Gayon, em 1972 (8,8 g/g de uvas frescas), para a casta *Cabernet Sauvignon*, uma casta que, geralmente, apresenta uma película grossa rica em taninos<sup>74</sup>. Tal pode advir do facto do autor não realizar a extração de proantocianidinas da polpa das uvas mas incluir o seu peso fresco no cálculo da concentração, embora a percentagem de contribuição da polpa no aumento da concentração destes compostos seja bastante baixa, à volta dos 4%, contribuindo principalmente com proantocianidinas monoméricas, nomeadamente catequinas<sup>75</sup>.

Em 2001, Sun *et al.* publicaram dados de concentrações de taninos condensados em várias castas portuguesas da Região dos Vinhos Verdes, na colheita de 1993, e expressou os resultados em g/g de uvas frescas: a casta com maior teor de taninos foi a Azal Tinto (10,6 g/g uva), seguida pela Vinhão (8,2 g/g uva), e por fim a Espadeiro (7,0 g/g uva)<sup>76</sup>. Estes resultados são próximos entre si e próximo do obtido neste estudo para Vinhão (9,8 g/g uva), o que é interessante visto serem todos da mesma região vitivinícola. As diferenças, embora pequenas, entre ambos os valores para a casta Vinhão são perfeitamente aceitáveis, principalmente devido à distância temporal entre a colheita das duas amostras (1993 e 2018). Esta relação está apresentada na Figura 12.



**Figura 12:** Concentração de proantocianidinas em diferentes castas da Região dos Vinhos Verdes.

No mesmo ano, Mateus *et al.* estudaram também outras duas castas, Touriga Nacional (TN) e Touriga Franca (TF), encontrando valores máximos nas películas e grainhas de 113 g/g de película liofilizada e 131 g/g de uva de grainha liofilizada, respetivamente para TN; e valores de 127 g/g de película liofilizada e 158 g/g de grainha liofilizada, respetivamente para TF<sup>77</sup>. O problema com a apresentação destes dados é que não os podemos comparar diretamente com os valores para o Vinhão porque apenas incluem dados para a película e para a grainha, separadamente, sendo que, para o fazer, teríamos que entrar com dados de percentagens de cada elemento na composição de uma uva liofilizada.

Relativamente a outros estudos, em 2009, Hanlin *et al.* determinaram valores para *Cabernet Sauvignon* que são menores que a metade do obtido por Ribéreau-Gayon em 1972 para a mesma casta, o que é explicado pela utilização de somente as películas no primeiro estudo, mas que, ainda assim, sugere alguma variabilidade na concentração das proantocianidinas entre a mesma casta, havendo a realidade da intervenção de outros fatores<sup>78</sup>.

Pelos resultados obtidos conclui-se que, ao contrário da acumulação de antocianinas, nas castas tintureiras, a acumulação de taninos condensados pode não ser tão superior às castas que não possuem esta característica, e esta perceção encaixa na conclusão de que estes se encontram maioritariamente nas partes sólidas das uvas, e não na polpa corada, único atributo diferente das castas tintureiras como o Vinhão, havendo ainda autores que sugerem que a quantidade de proantocianidinas existente na polpa se deve apenas à contaminação pela película aquando da extração<sup>76</sup>.

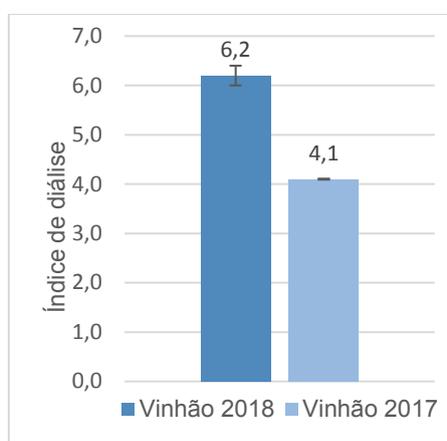
Ainda outra grande observação será os fatores que provocam a grande variabilidade dos resultados: variados estudos comprovaram que a acumulação de taninos condensados depende de inúmeros fatores, tais como a casta, o local da

plantação e as suas características geográficas e climáticas<sup>75,79</sup> e as práticas culturais de viticultura.

### 2.3 Índice de diálise

O Índice de diálise de uma amostra dá informação sobre a complexidade estrutural dos compostos polifenólicos nela existentes através da percentagem de compostos polimerizados que ficam retidos no interior da membrana de diálise. Assim, um maior valor de ID corresponde a uma amostra com mais compostos polimerizados e, conseqüentemente, com maior poder tanante<sup>80</sup>.

O valor de ID para a amostra das uvas está apresentado na Figura 13, juntamente com o do estudo do ano passado.

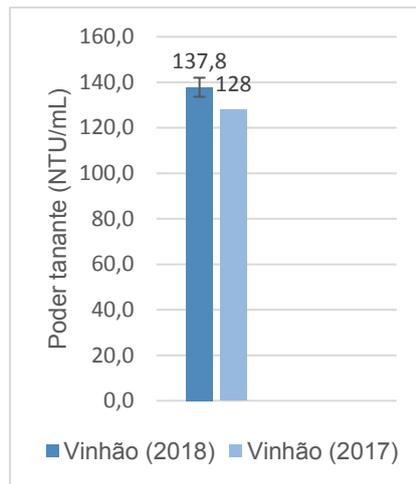


**Figura 13:** Comparação dos valores do índice de diálise entre os dois anos consecutivos (2017 e 2018).

Os resultados obtidos são um pouco diferentes: as uvas do ano 2018 parecem apresentar um maior valor de compostos polifenólicos polimerizados, relativamente às uvas do ano 2017 (ID = 6,2 e ID = 4,1, respetivamente). Isto pode refletir-se depois na capacidade tanante do vinho final.

### 2.4 Poder tanante

O poder tanante consiste na capacidade que os taninos têm para precipitar as proteínas, formando complexos insolúveis e causando a conhecida sensação de adstringência, muito valorizada a nível organolético nos vinhos<sup>41</sup>. Este parâmetro foi medido com recurso à BSA. O resultado encontra-se na Figura 14, juntamente com o do estudo do ano passado.



**Figura 14:** Comparação dos valores de poder tanante entre dois anos consecutivos (20/set/2017 e 2018).

Os resultados obtidos em anos diferentes são bastante semelhantes: em 2017 o valor de 128 NTU/m e em 2018 o de 138 NTU/mL, o que é apoiado pelo facto das uvas terem origem na mesma região.

O poder tanante da amostra é proporcional à quantidade de taninos condensados capazes de precipitar a BSA, processo que decorre da combinação de pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas<sup>81</sup>; no entanto, nem todos os taninos são capazes de o fazer, daí que a relação não seja diretamente proporcional à quantidade total de taninos. Em 1984, L. J. Porter e J. Woodruffe relataram que os taninos necessitam de ter um tamanho mínimo para provocar a precipitação das proteínas<sup>80</sup> e, em 1999, Douglas and Harbertson acrescentaram que taninos mais pequenos que tetrâmeros não o conseguiriam fazer<sup>82</sup>. Mais tarde, em 2014, J. F. Harbertson *et al.* acrescentaram a conclusão de que taninos mais pequenos (por exemplo, trímeros) conseguiam participar na precipitação das proteínas devido a um efeito conjunto com taninos maiores, possivelmente porque a ligação destes últimos poderiam alterar a configuração da proteína e facilitar o acesso aos primeiros<sup>83</sup>.

### 3. Análise da cor

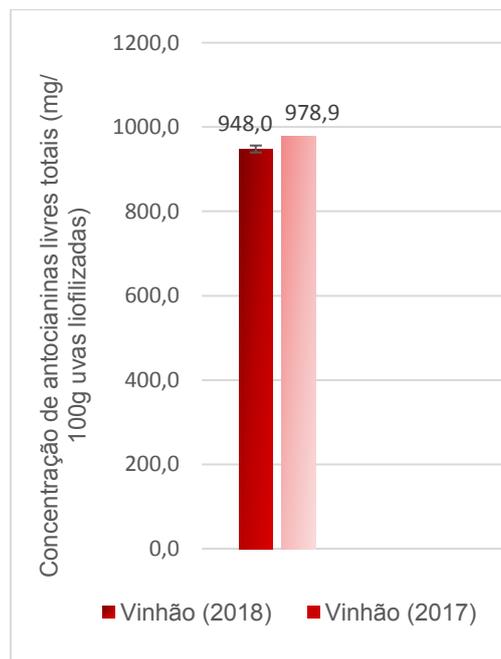
A quantificação e caracterização dos compostos fenólicos das uvas, principalmente das antocianinas, é cada vez mais um parâmetro de análise recorrente pela importância que estas têm no produto final, sendo que têm demonstrado ser compostos que muito contribuem para as características organoléticas e de cor dos vinhos; têm um papel importante a nível de benefícios para a saúde, e têm ainda mostrado ser bons marcadores químicos na caracterização de diferentes castas<sup>84</sup>.

### 3.1 Antocianinas livres: quantificação e caracterização por HPLC

#### a) Método do bissulfito

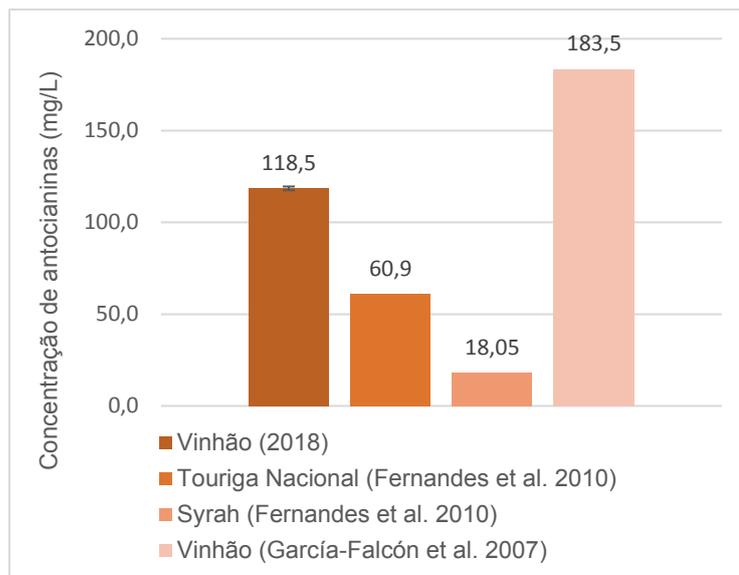
O método utilizado para determinar o valor das antocianinas livres totais foi o método do bissulfito, onde este ião reage com as antocianinas, formando um composto incolor e, por isso, provocando a descoloração da amostra, que é depois medida por análise espectrofotométrica.

Os resultados obtidos por esta análise encontram-se na Figura 15, bem como os resultados obtidos no ano anterior pelo mesmo estudo:

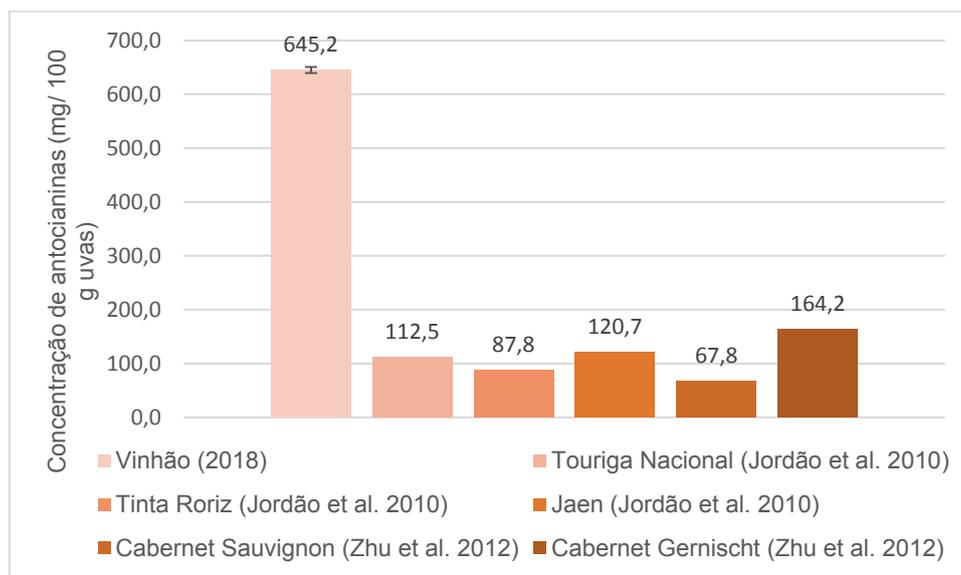


**Figura 15:** Valores obtidos da concentração de antocianinas livres totais nos dois anos consecutivos (2017 e 2018).

Os resultados mostram que os valores encontrados em mg de antocianinas por 100 g de bagos liofilizados em diferentes anos são bastantes próximos, o que está de acordo com o esperado já que a origem das uvas foi a mesma, isto é, os produtores fornecedores da adega foram os mesmos nos dois anos, daí não se esperar grandes diferenças a nível da composição antociânica das uvas.



**Figura 16:** Comparação dos valores obtidos da concentração de antocianinas livres totais (mg/L) com outros estudos.



**Figura 17:** Valores obtidos da concentração de antocianinas livres totais (mg/100 g uvas frescas) no estudo em questão e noutros estudos.

A comparação com outros estudos teve que ser feita com os valores de massa dos bagos frescos pois não havia informação da massa dos bagos liofilizados, o que seria o mais indicado, para que a quantidade de água nos bagos não interferisse na comparação dos resultados.

Como se observa nas Figuras 16 e 17, a comparação dos resultados foi feita conforme o resultado encontrado em cada referência bibliográfica (em mg/L ou mg/100 g de uvas frescas). Concluímos que o resultado obtido de 118,5 mg/L é um pouco inferior ao obtido por García-Falcón *et al.* em 2007, correspondendo a cerca de 60 - 65% desse valor, para a mesma casta e na mesma região. Tal facto pode estar relacionado com as

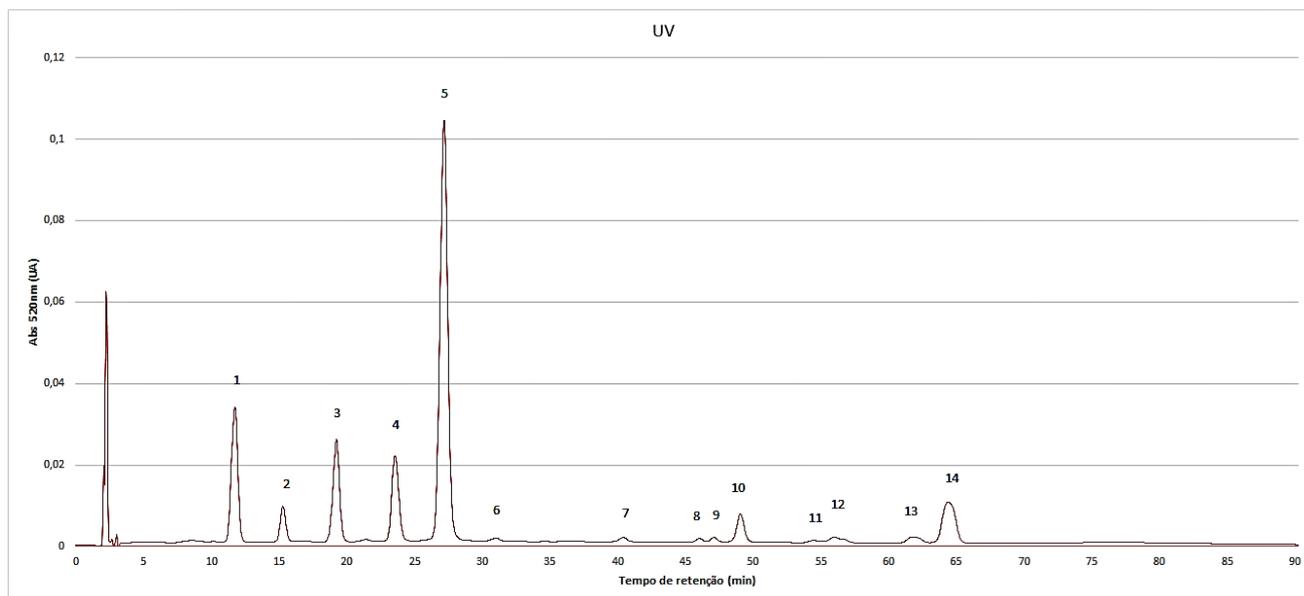
condições climáticas ocorridas nos respectivos anos: em 2018, o clima nos meses de verão, durante a maturação da uva, foi considerado relativamente mais quente que o mesmo período em 2007<sup>85,86</sup>, o que prejudica a acumulação de compostos fenólicos, nomeadamente antocianinas<sup>87</sup>; no entanto, esse mesmo período em 2007 foi considerado bastante chuvoso, e segundo Leeuwen *et al.*, isso também não promove a acumulação de compostos fenólicos<sup>87</sup>, sendo favorável a ocorrência de um déficit hídrico moderado<sup>88</sup>; apesar disto, foi observado nesse ano um clima ameno, e esse sim, promove a acumulação compostos fenólicos<sup>85</sup>.

Quando comparando os resultados com os de outras castas, observa-se um valor bastante superior (até 9,5x maior, no caso *Cabernet Sauvignon*, de Zhu *et al.*), o que é facilmente explicado pela característica tintureira da casta em estudo e, por conseguinte, maior acumulação de antocianinas.

#### b) HPLC

Para caracterizar o perfil antociânico das uvas procedeu-se à análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), de onde se retirou informação sobre a identificação e quantificação de todas as antocianinas 3-monoglucósidas e respetivos ésteres acilados presentes na amostra. Esta caracterização é importante pois o perfil antociânico parece ser constante de casta para casta e independente da área de produção, embora existam fatores não-genéticos, tais como práticas de viticultura e condições climáticas, que afetam mais a concentração das antocianinas dos que propriamente o seu perfil qualitativo<sup>84</sup>.

A Figura 18 apresenta o cromatograma obtido e a Tabela 5 faz a legenda deste cromatograma e apresenta as respetivas concentrações de cada composto na amostra.



**Figura 18:** Cromatograma obtido por HPLC-DAD das antocianinas 3-monoglucósidas e respetivos ésteres acetilados das uvas Vinhão.

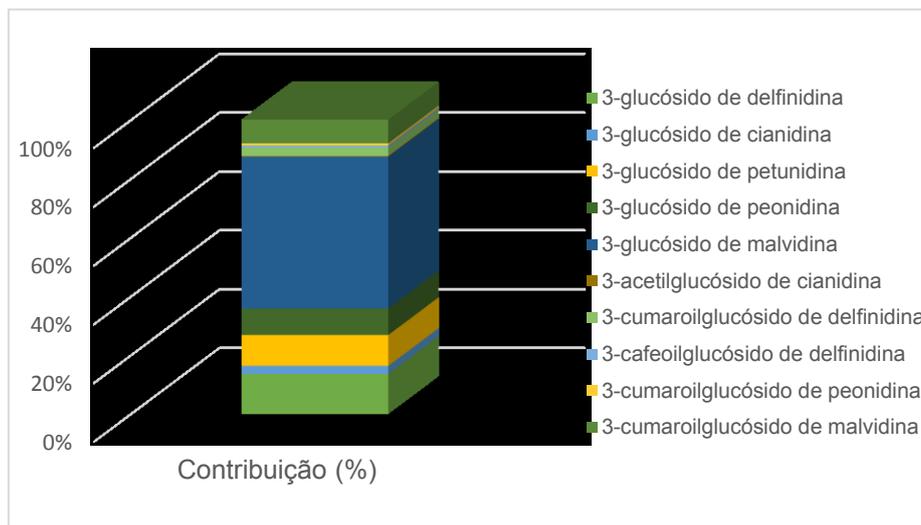
**Tabela 5:** Identificação de cada pico e respetiva concentração de antocianinas na amostra das uvas.

	Identificação	Concentração (mg/L)	Contribuição (%)
1	3-glucósido de delphinidina	27,1 ± 0,3	13,5
2	3-glucósido de cianidina	5,5 ± 0,3	2,8
3	3-glucósido de petunidina	20,7 ± 0,6	10,5
4	3-glucósido de peonidina	18,1 ± 0,4	9,0
5	3-glucósido de malvidina	102,7 ± 0,6	51,6
6	3-acetilglucósido de delphinidina	Não quantificável	
7	3-acetilglucósido de cianidina	0,5 ± 0,7	0,25
8	3-acetilglucósido de petunidina	Não quantificável	
9	3-acetilglucósido de peonidina	Não quantificável	
10	3-cumaroilglucósido de delphinidina	5,8 ± 0,1	2,9
11	3-acetilglucósido de malvidina	Não quantificável	
12	3-cafeoilglucósido de malvidina	1,4 ± 0,1	0,65
13	3-cumaroilglucósido de peonidina	1,5 ± 0,1	0,75
14	3-cumaroilglucósido de malvidina	15,8 ± 0,2	8,0

Como a Tabela 5 demonstra, a antocianina 3-monoglucósida mais abundante é a 3-glucósido de malvidina, representando mais de 50% da totalidade das antocianinas presentes na amostra. A antocianina mais próxima é a 3-glucósido de delphinidina, representando cerca de 13,5% da totalidade, embora bastante distante da anteriormente referida. Por fim, a menos abundante é a 3-acetilglucósido de cianidina, representando cerca de 0,25% da totalidade. Existem ainda alguns picos característicos

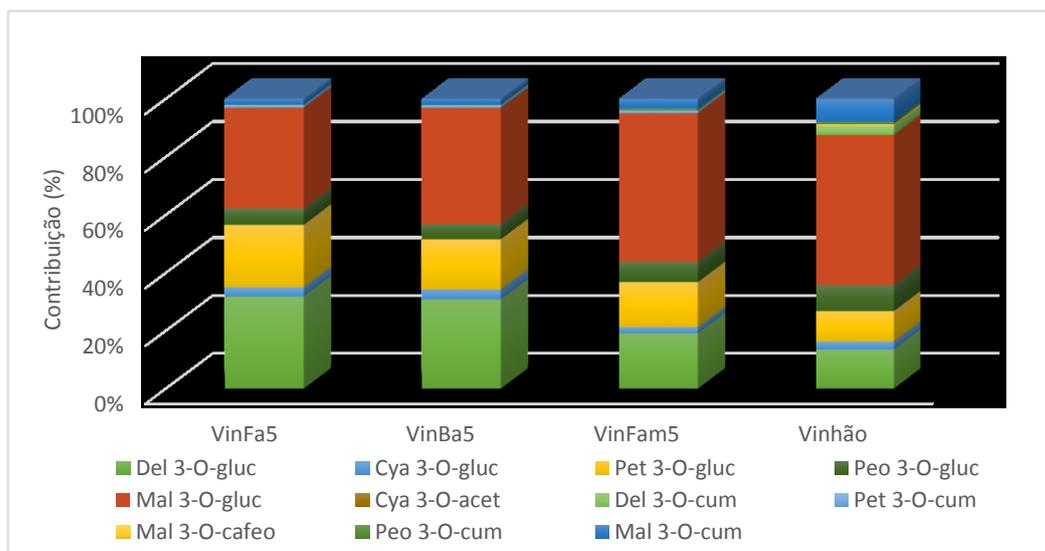
de outros compostos, e por isso estão assinalados no cromatograma, mas que não são quantificáveis.

Na Figura 19 consegue perceber-se melhor esta relação e a contribuição de cada antocianina 3-monoglucósida na amostra.



**Figura 19:** Contribuição das diferentes antocianinas e respetivos derivados.

Dopico-García *et al.* estudaram também a casta Vinhão de diferentes localizações, e a Figura 20 apresenta os valores encontrados noutros estudos com a mesma casta, e a comparação com os valores encontrados para a casta Vinhão.



**Figura 20:** Contribuição de cada antocianina no perfil das castas em estudo.

Pela informação que a figura dá, concluímos que a malvidina 3-glucósido é a antocianina presente em maior quantidade nas uvas da casta Vinhão – cerca de 50% -, embora duas das amostras referidos por Dopico-García *et al.*, nomeadamente VinBa5 e VinFa5, tenham obtido valores um pouco inferiores, na ordem dos 35-40%. A antocianina seguinte mais abundante parece ser a delphinidina 3-glucósido, embora a sua percentagem na totalidade das amostras varie entre os 14 e os 32%. De seguida, e em terceiro lugar, apresenta-se a petunidina 3-glucósido, com uma média de valores perto dos 15%.

Com valores mais baixos, encontramos os derivados cumáricos, nomeadamente o 3-cumaroilglucósido de peonidina, com valores perto dos 0,5% da totalidade da amostra. É de salientar que o derivado cumárico da petunidina não foi encontrado na amostra em análise, ao contrário do outro estudo, embora em baixas concentrações. No entanto, foi encontrado na amostra em análise o 3-cafeoilglucósido de malvidina, embora em baixas concentrações, ao contrário do outro estudo que nem refere esse mesmo composto. A Figura 20 serve, precisamente, para perceber melhor estas diferenças.

De forma geral, vemos que as antocianinas glucosiladas representam a maior fatia na composição da amostra – 87% -, seguidas pelas cumaroiladas – 12% -, e por fim pelas acetiladas – 0,3 % -. Quando se compara os valores obtidos pelos diferentes estudos, percebe-se que podem ser bastante distintos, mas percebe-se também que os valores de percentagem de cada composto relativamente à totalidade da concentração de antocianinas em cada amostra se encontram mais próximos uns dos outros, o que indica que existe de facto variabilidade dentro de uma mesma casta, mas que pode

apenas ser indicativa do estudo de uvas de vinhas com diferentes anos e diferentes origens.

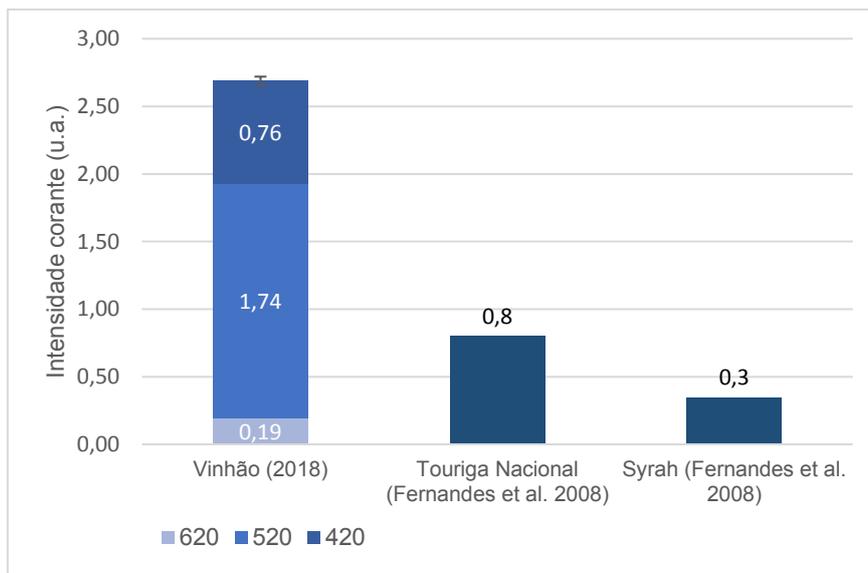
Comparando o valor do IFT (1200mg/100 g uvas liofilizadas) com o valor da concentração de antocianinas livres totais obtido pelo método do bissulfito (948,0 mg/100 g uvas liofilizadas), concluímos que estas correspondem a 79% de todos os compostos fenólicos presentes nas uvas em análise. No entanto, se compararmos com o valor de concentração de antocianinas obtido por HPLC (1596mg/100 g uvas liofilizadas), percebemos que este é maior que o IFT da mesma amostra. Em 2015, Costa *et al.* observaram também este fenómeno, onde determinaram valores de IFT de 0,274 mg/g de uvas frescas pelo mesmo método de leitura a  $A_{280nm}$ , e concentrações de antocianinas de 0,762 mg/g de uvas frescas por HPLC<sup>65</sup>, detetando também discrepâncias de valores entre os métodos. Castillo-Sánchez *et al.* observaram resultados semelhantes no seu estudo de 2007 (IFT=156-243 mg/L e [antocianinas]=1835-2000 mg/L)<sup>89</sup>.

Relativamente aos métodos utilizados, quando comparados os valores de antocianinas livres totais obtidos pelo método do bissulfito e pelo HPLC, observa-se que o primeiro é menor (118,5 mg/L e 199,6mg/L, respetivamente), o que vai contra o que seria de esperar: em 1992, Rivas-Gonzalo *et al.* observaram que os valores obtidos por HPLC eram sempre menores aos obtidos por outros métodos, pois este apenas detetava e quantificava as antocianinas monoméricas, ao contrário dos outros, que detetavam também pigmentos polimerizados sensíveis ao efeito descorante do bissulfito<sup>90</sup>.

### 3.2 Índice de cor vermelha e intensidade corante

Os parâmetros de intensidade corante e índice de cor vermelha ajudam a caracterizar a cor da amostra, neste caso, uma extração do conteúdo de 10 bagos de uvas Vinhão, e a perceber o potencial de cor do futuro vinho.

Na Figura 21 observa-se, além da contribuição de cada comprimento de onda no cálculo da IC, a comparação deste parâmetro com resultados do estudo de Fernandes *et al.* sobre as castas Touriga Nacional e *Syrah*. Os dados apresentados desse estudo são de uma parcela de vinha na Lousada, localizada na Região dos Vinhos Verdes, para maior fiabilidade da comparação.



**Figura 21:** Comparação dos valores de intensidade corante para três castas diferentes, em 2008 e 2018.

Os valores de intensidade corante obtidos por Fernandes *et al.* são significativamente menores aos obtidos neste estudo, o que é facilmente justificado pela característica tintureira da casta Vinhão, que não existe nas castas Touriga Nacional e Syrah. Tal relação está ainda de acordo com a concentração de antocianinas livres totais em ambos os estudos: 118,5 mg/L no Vinhão, 60,9 mg/L na Touriga Nacional, e 18,0 mg/L na Syrah<sup>91</sup>.

Relativamente ao índice de cor vermelha, foi obtido o valor de  $1,74 \pm 0,03$  u.a. para a amostra das uvas em questão. A maior contribuição no cálculo da intensidade corante e do índice de cor vermelha vem da medição a 520 nm, o que é facilmente justificável visto se tratar de vinhos ainda muito jovens, ou seja, ainda sem grande percentagem de tons azuis e ainda menos amarelos.

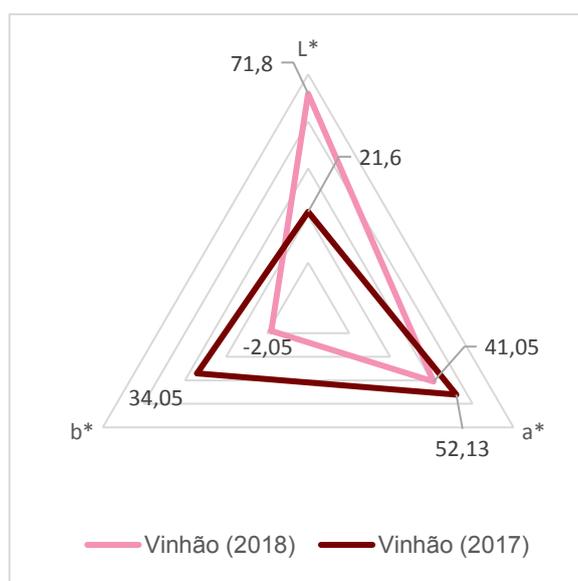
### 3.3 Parâmetros CIELab

Os resultados da análise no sistema CIELab estão apresentados na Tabela 6, juntamente com os resultados obtidos no ano anterior.

**Tabela 6:** Parâmetros CIELab das uvas Vinhão de 2017 e 2018, e respetiva representação RGB.

	Parâmetros CIELab					Cor
	L*	a*	b*	C*	H°	
Vinhão (2018)	71,8	41,05	-2,05	41,10	357,1	RGB (244,146,182)
Vinhão (2017)	21,6	52,13	34,05	62,26	33,15	RGB (118,0,0)

Comparando com os resultados de 2017, as uvas de 2018 apresentam um valor de  $a^*$  menor, o que significa que apresentam uma menor predominância da cor vermelha que as do ano anterior; apresentam ainda um valor de  $b^*$  significativamente menor, demonstrando que apresentam uma menor predominância da cor amarela, e um desvio no sentido da cor azul, relativamente às uvas de 2017. Observando os valores de luminosidade ( $L^*$ ), verifica-se que o extrato de uvas mais recente apresenta mais do triplo do valor de 2017, o que se traduz num extrato com muita maior claridade. A Figura 22 ilustra esses mesmos resultados.



**Figura 22:** Gráfico radar comparativo das coordenadas  $L^*a^*b^*$  dos dois extratos de uvas Vinhão (2017 e 2018).

Os valores de  $C^*$  fornecem ainda algumas conclusões: o extrato de 2017 apresenta um valor maior que 50, pelo que é considerada uma cor vívida<sup>92</sup>; já o extrato de 2018 não chega bem a esse valor, embora esteja relativamente perto. Sobre o valor de  $H^\circ$  podemos dizer que o extrato das uvas de 2018 está muito perto do  $360^\circ$ , ou  $0^\circ$ , estando mais localizado na zona dos vermelhos vivos que o de 2017, que já se encontra mais afastado, na zona dos laranjas.

## Vinhão - Mostos – (VMAR - 68F, 69F, 70F - e VMAT)

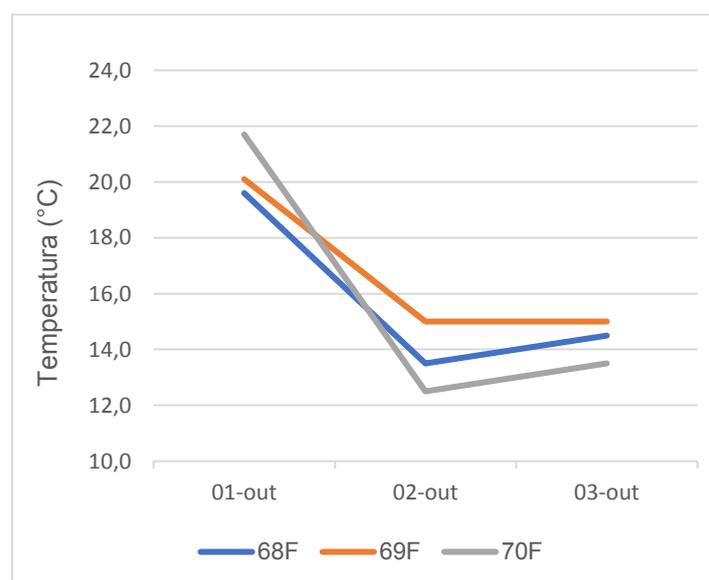
As três amostras denominadas VMAR representam o mosto em cada uma das cubas de maceração: 69F, 68F e 70F. A amostra VMAT representa o que obtivemos com a mistura dessas três cubas, antes do início da fermentação.

Relativamente ao processo, como foi realizada uma maceração a frio, o mosto que posteriormente iria dar origem ao vinho Vinhão Estreia encontrava-se separado em três cubas de maceração – 68F, 69F e 70F, que foram cheias de forma sequencial, e cujas características se encontram aqui mencionadas e comparadas.

### 1. Controlo dos parâmetros de vinificação

Na Adega, os parâmetros analisados ao longo da vinificação foram os que habitualmente se monitorizam, tais como temperatura, densidade, teor de acidez, concentração de dióxido de enxofre, pH, entre outros.

Na Figura 23 encontra-se a evolução da temperatura da mistura massas + mosto nas três cubas de maceração do Vinhão, desde o dia do enchimento (1/10/2018) e até ao dia da trasfega para a cuba de fermentação (3/10/2018).



**Figura 23:** Gráfico da evolução da temperatura da mistura massas + mosto nas cubas de maceração 68F, 69F e 70F.

A temperatura escolhida para ocorrer a maceração a frio tinha sido aproximadamente 10 °C; no entanto, vemos pelo gráfico que nenhuma das misturas chegou a esse valor, atingindo um valor mínimo de 12,5 °C, ainda superior ao suposto.

Tal adveio da impossibilidade de as arrefecer logo na passagem pelo tegão devido à rutura do *stock* de gelo seco. Este era um passo importante no processo porque arrefecer as massas uma vez no interior da cuba de maceração revelou-se um processo bastante mais difícil.

Comparando com os valores obtidos pelo estudo do ano anterior, percebe-se que o controlo da temperatura nesse ano foi relativamente melhor, tendo as massas de uma das cubas atingido uma temperatura mínima muito próxima de 10 °C.

Os restantes parâmetros apresentam valores da mistura das três cubas de maceração, ou seja, mais representativos do resultado final, e encontram-se na Tabela 7.

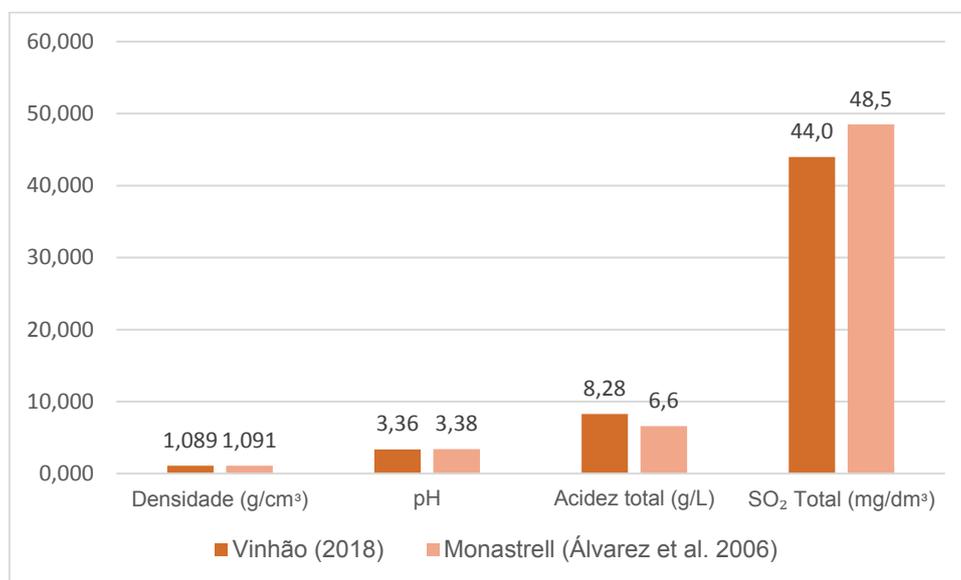
**Tabela 7:** Resultados das análises físico-químicas realizadas ao mosto de Vinhão (VMAT) na ADB.

<b>VMAT (CUBA 25)</b>	
04/out	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,089
pH	3,36
Acidez total (g/L)	8,28
Acidez volátil (g/L)	0,07
SO <sub>2</sub> Livre (mg/dm <sup>3</sup> )	35
SO <sub>2</sub> Total (mg/dm <sup>3</sup> )	44
Ácido Tartárico (g/L)	1,8
Ácido Málico (g/L)	4,62
Ácido Cítrico (g/L)	0,48
Ácido Acético (g/L)	0,07
Ácido Lático (g/L)	0,09

O valor da densidade é justificado pela presença de açúcares, e só irá diminuir quando a fermentação começar e estes começarem a ser degradados, atingindo um valor menor que 1,000 g/cm<sup>3</sup>. O pH apresenta um valor admissível e que tenderá a aumentar devido à degradação dos ácidos que, neste momento, apresentam valores ainda elevados devido à fase precoce no processo de vinificação. O SO<sub>2</sub> total deveria obter valores mais baixos, na ordem das 20 mg/dm<sup>3</sup>, segundo o pedido no protocolo de vinificação, mas tal não foi possível devido a uma avaria no sulfímetro, o equipamento que doseia o dióxido de enxofre colocado nas uvas.

A concentração de ácido tartárico é mais baixa que o teoricamente esperado, visto ser o ácido mais abundante nas uvas, mas este valor também se observou no mosto de 2017. Relativamente ao ácido málico, prevê-se que a sua concentração vá diminuir ao longo da fermentação malolática, observando-se paralelamente o aumento da concentração de ácido lático.

Em 2006, I. Álvarez *et al.* determinaram alguns dos mesmos parâmetros, nomeadamente a densidade, pH, acidez total e sulfuroso total do mosto submetido também a maceração pré-fermentativa a frio, como apresentado na Figura 24. Os valores retirados do artigo referido são relativos a uvas com grau provável próximo do obtido para as uvas Vinhão (aproximadamente 12,0 °Be).



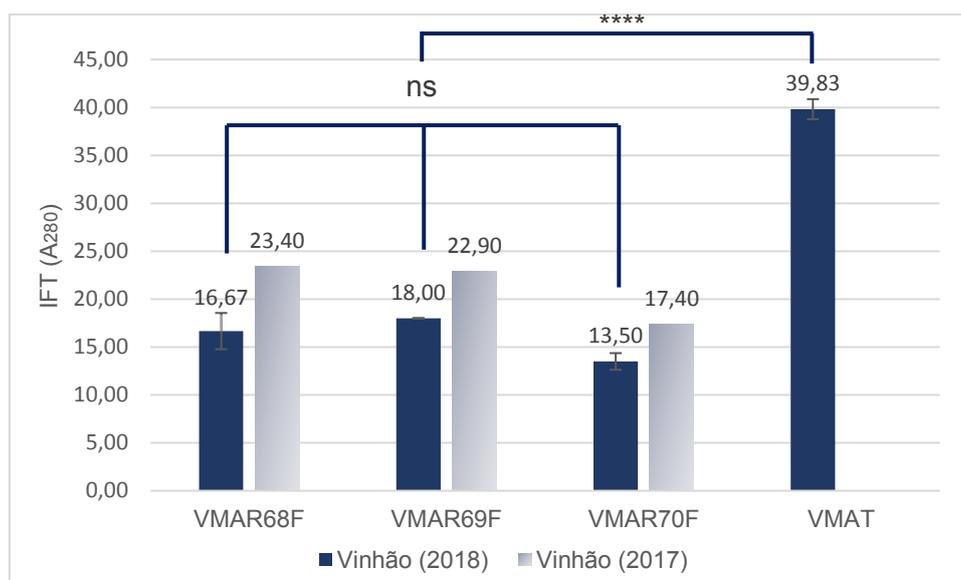
**Figura 24:** Comparação dos valores de Densidade (g/cm<sup>3</sup>), pH, Acidez total (g/L) e SO<sub>2</sub> total (mg/L) obtidos para mosto de maceração pré-fermentativa a frio da casta Monastrell<sup>23</sup>.

Os valores obtidos para cada casta são semelhantes em termos gerais, variando mais significativamente no valor da acidez total; no entanto, este é um parâmetro que depende fortemente da composição da uva e, portanto, varia generosamente consoante a casta utilizada<sup>8</sup>.

## 2. Composição polifenólica

### 2.1 Índice de fenóis totais

Tal como no extrato das uvas, o índice de fenóis totais (IFT) foi analisado por dois métodos: análise da absorvância por espectrofotómetro a 280 nm, e pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Os resultados do primeiro método em ambos os anos encontram-se na Figura 25.



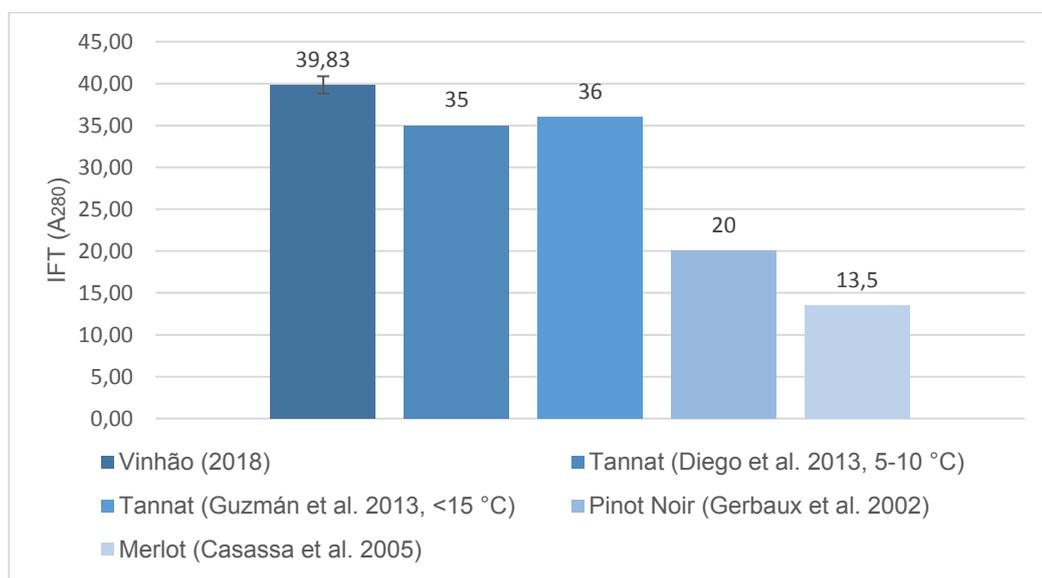
**Figura 25:** Comparação dos valores de IFT, por leitura a 280 nm, dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos consecutivos (2017 e 2018).

Pelos resultados, observa-se que o mosto do ano anterior apresenta, de forma geral pelas três cubas, um maior índice de fenóis, comparativamente com o deste ano.

Relativamente aos dados das três cubas, quando comparados, obtêm-se valores ligeiramente diferentes, principalmente entre a cuba 69F e a 70F: o valor de IFT desta última corresponde a apenas 75% do valor da 69F, e a cerca de 81% do valor da 68F, sendo assim a mais pobre em compostos fenólicos, embora não sejam significativamente diferentes (ns,  $p < 0,05$ ). Isto é facilmente justificado pela origem das uvas, que poderá não ser do mesmo produtor e, logo, apresentar diferenças mais profundas; e pela maturação das mesmas, que influencia a acumulação de compostos fenólicos. Pode ainda ser justificado pela diferença de temperatura de maceração entre as cubas: a cuba 70F foi a que se manteve mais perto dos 10 °C, e entende-se agora que temperaturas mais baixas podem não apresentar uma maior eficácia na extração dos compostos fenólicos, tendo muitas vezes o efeito contrário<sup>6,22</sup>.

Para os dados de 2018, obteve-se ainda o valor da mistura das três cubas, que é bastante alto comparativamente com o valor médio obtido pelas cubas, sendo a diferença extremamente significativa relativamente a todas as cubas de maceração (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). Este facto é justificado pela prensagem que o conteúdo das cubas sofreu ao ser transferida para a cuba de fermentação, de onde foi retirada a amostra VMAT. Esta prensagem promoveu uma maior extração dos compostos fenólicos das massas para o mosto, aumentando assim o IFT.

Outros estudos que estudam o efeito da maceração pré-fermentativa a frio na extração de polifenóis estão representados na Figura 26, em comparação com o valor obtido para a casta Vinhão em 2018.



**Figura 26:** Comparação dos valores de IFT do mosto de outras castas, ao fim de 3 dias de maceração pré-fermentativa a frio.

Percebe-se então que a casta *Tannat* é a mais semelhante à casta Vinhão no que respeita ao efeito da maceração a frio, com valores de IFT bastante semelhantes para uma mesma duração, o que provavelmente reside no facto de ser também uma casta tintureira<sup>29,93</sup>. As castas *Pinot Noir*<sup>22</sup> e *Merlot*<sup>25</sup> são as que apresentam valores mais baixos de IFT, o que é facilmente percebido por não serem castas tintureiras, ao contrário das outras duas.

Os resultados obtidos pelo método de *Folin-Ciocalteu* encontram-se de acordo com os obtidos por este método e os valores obtidos encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8:** Valores de IFT pelo método de Folin-Ciocalteu para os mostos.

Casta	IFT (g/mL)			
	68F	69F	70F	VMAT
Vinhão (2018)	256,1 ± 5,6	250,5 ± 23,0	191,9 ± 12,9	666,8 ± 14,4

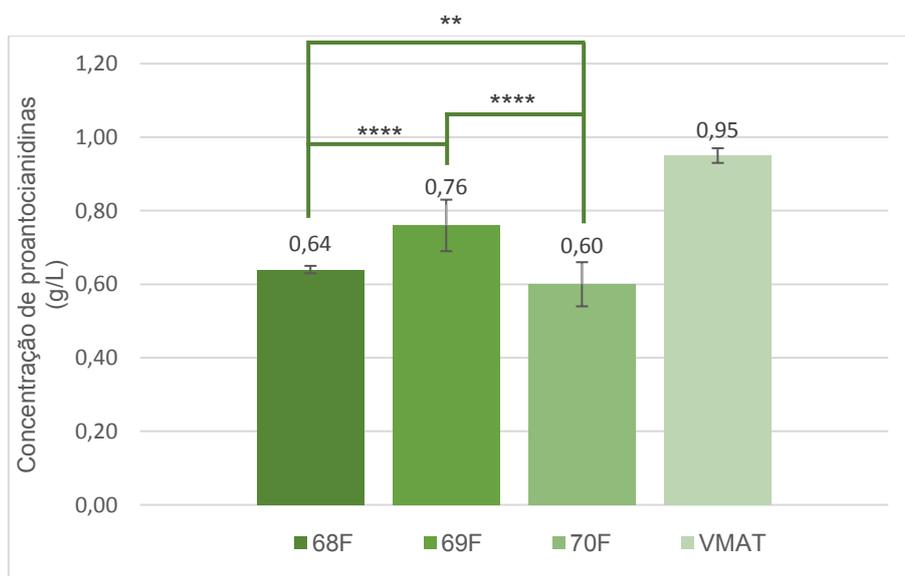
A única diferença, em proporção, entre estes valores e os obtidos pelo outro método é que, com o método de *Folin-Ciocalteu*, a cuba 68F é a que apresenta maior valor de IFT, embora muito próximo do valor da cuba 69F, sendo a sua diferença não significativa (ns,  $p < 0,05$ ). Ainda assim, o valor da cuba 70F volta a ser cerca de 75%

do valor da cuba mais alta, sendo a diferença entre elas significativa (\*,  $p < 0,05$ ). Mais uma vez, o IFT da amostra VMAT é significativamente superior ao valor médio das três cubas, pela razão já apresentada atrás.

## 2.2 Taninos proantociânicos totais

Para realizar a análise da concentração de proantocianidinas nos mostos das diferentes cubas de maceração e da mistura resultante foi necessário, primeiramente, retirar os açúcares às respectivas amostras (pelo método já descrito no capítulo dos Materiais e Métodos).

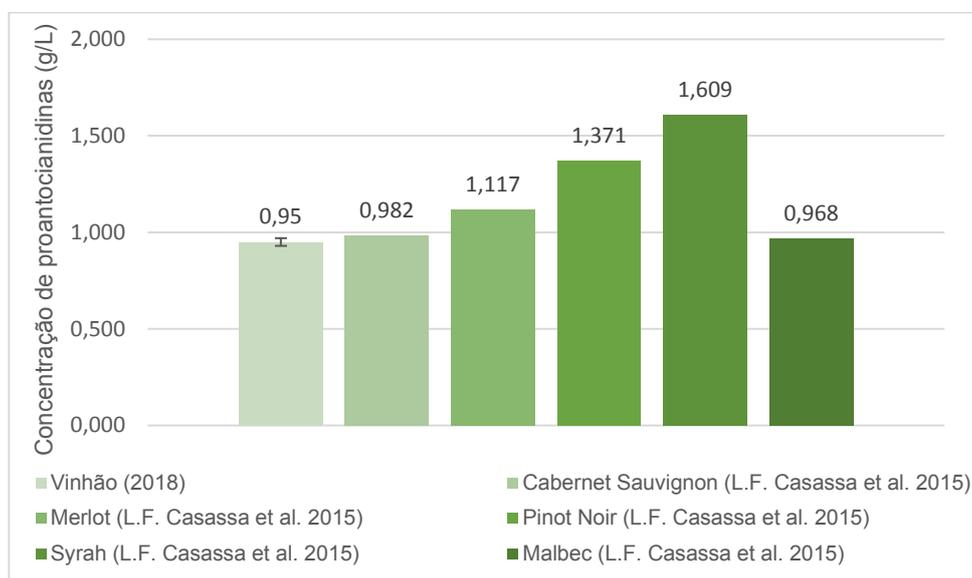
A Figura 27 apresenta a relação da concentração dos taninos proantociânicos totais entre cada cuba de maceração e a respetiva mistura, correspondente à amostra VMAT.



**Figura 27:** Concentração de proantocianidinas nas três cubas de maceração e na mistura resultante da mistura (VMAT).

O mosto da cuba de maceração com maior concentração de proantocianidinas é o da 69F, com um valor de 0,76 g/L; de seguida vem a 68F, com 0,64 g/L; e por fim a 70F, com 0,60 g/L, correspondente a 79 % da cuba com maior concentração. Estes resultados encontram-se alinhados com os anteriores, indicando que a cuba 70F é a mais fraca das três cubas em termos de compostos fenólicos. As diferenças são mais significativas quando comparadas com a cuba 69F (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). Relativamente à mistura das três cubas (VMAT), o resultado é significativamente maior devido à prensagem realizada às massas à saída das cubas de maceração, promovendo assim uma maior extração dos compostos.

A Figura 28 apresenta a comparação da concentração de proantocianidinas da amostra VMAT e dos dados para outras castas determinados por L. F. Casassa *et al.*, em 2015.

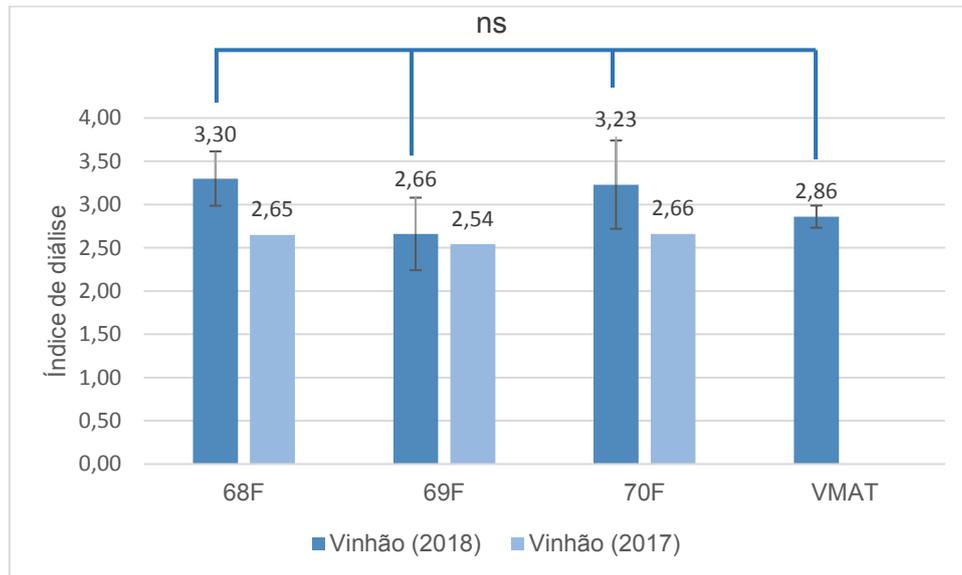


**Figura 28:** Comparação da concentração de proantocianidinas em mosto de Vinhão e de outras castas submetidas a maceração pré-fermentativa a frio.

Pela observação do gráfico, percebe-se que a casta Vinhão apresenta um valor baixo de taninos condensados, quando comparado com outras castas. No entanto, é de notar que os dados do estudo utilizado se referem a mosto ao 14<sup>o</sup> dia de maceração pré-fermentativa a frio, a aproximadamente 9 °C<sup>94</sup>, em comparação com uma maceração de 3 dias a uma temperatura ligeiramente maior, no caso do Vinhão. Este facto pode influenciar a extração de proantocianidinas e possivelmente explicar o valor mais baixo determinado para o mosto de Vinhão, visto a duração da maceração ser um fator importante na extração de compostos fenólicos<sup>95,96</sup>.

### 2.3 Índice de diálise

Os resultados obtidos para o índice de diálise dos mostos encontram-se apresentados na Figura 29.



**Figura 29:** Comparação do índice de diálise dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos.

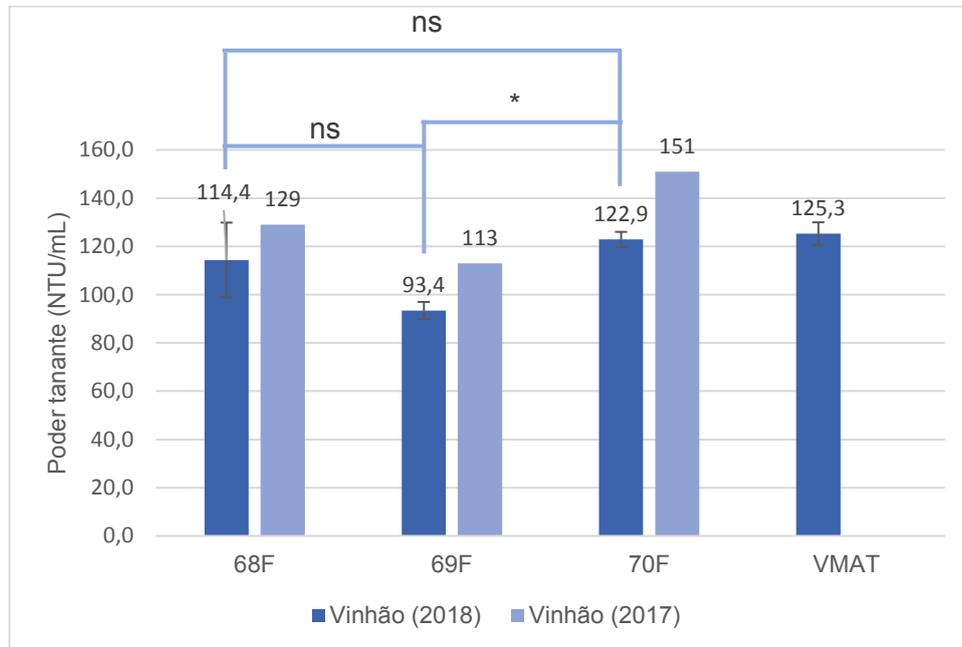
Conclui-se que o índice de diálise obtido para as três cubas de maceração em 2018 é, de forma geral, maior que o valor obtido no ano anterior, com uma diferença máxima de 0,65 na cuba 68F. Isto está de acordo com os resultados obtidos para as uvas, e pode resultar num vinho com maior complexidade estrutural do que o de 2017.

Entre cubas, o maior valor de ID é apresentado pela 68F, seguida pela 70F, e por fim a 69F, embora sem significância a nível das diferenças (ns,  $p < 0,05$ ). Desta informação podemos retirar que a cuba 70F é a cuba com maior percentagem de taninos estruturalmente complexos, em função da concentração de taninos condensados totais.

Comparativamente com o valor das cubas, o valor da mistura (VMAT) é apenas ligeiramente menor, também sem diferença significativa (ns,  $p < 0,05$ ). Isto revela que a diferença de valores da concentração dos taninos totais e o efeito da prensagem correspondem, principalmente, a uma maior extração de taninos mais pequenos e estruturalmente menos complexos, visto não se registar grande diferença a nível do índice de diálise.

## 2.4 Poder tanante

Os valores de poder tanante obtidos para as três cubas de maceração e para a amostra da mistura após prensagem (VMAT) estão apresentados na Figura 30, juntamente com os dados de 2017.



**Figura 30:** Comparação do poder tanante dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos.

As relações entre os resultados de diferentes anos não estão perfeitamente alinhadas com os valores obtidos para o índice de diálise: os valores de ID indicavam que os mostos de 2018 das diferentes cubas de maceração possuíam maior percentagem de taninos polimerizados, o que resultaria num maior poder tanante pois, como vimos anteriormente, taninos mais polimerizados apresentam maior eficácia na precipitação de proteínas<sup>80,82</sup>; no entanto, isso não parece acontecer pois o poder tanante dos mostos das cubas de 2018 é menor que o dos mostos das cubas de 2017. Porém, tal como visto no índice de diálise, as cubas 68F e 70F são as que apresentam maior valor de poder tanante, sem diferenças significativas (ns,  $p < 0,05$ ). Tal pode advir da maior dificuldade que taninos mais polimerizados possam ter em se ligar às proteínas devido à falta de flexibilidade da molécula e consequente impedimento estereoquímico<sup>41</sup>.

Comparativamente aos dados de 2017 para o mosto obtido por vinificação tradicional, o valor de poder tanante dos mostos de maceração a frio são bastante menores, o que está de acordo com o efeito pretendido deste tipo de maceração, que é

uma maior extração de proantocianidinas de menor massa molecular<sup>23</sup> e, conseqüentemente, menor capacidade de precipitação das proteínas<sup>80,82</sup>.

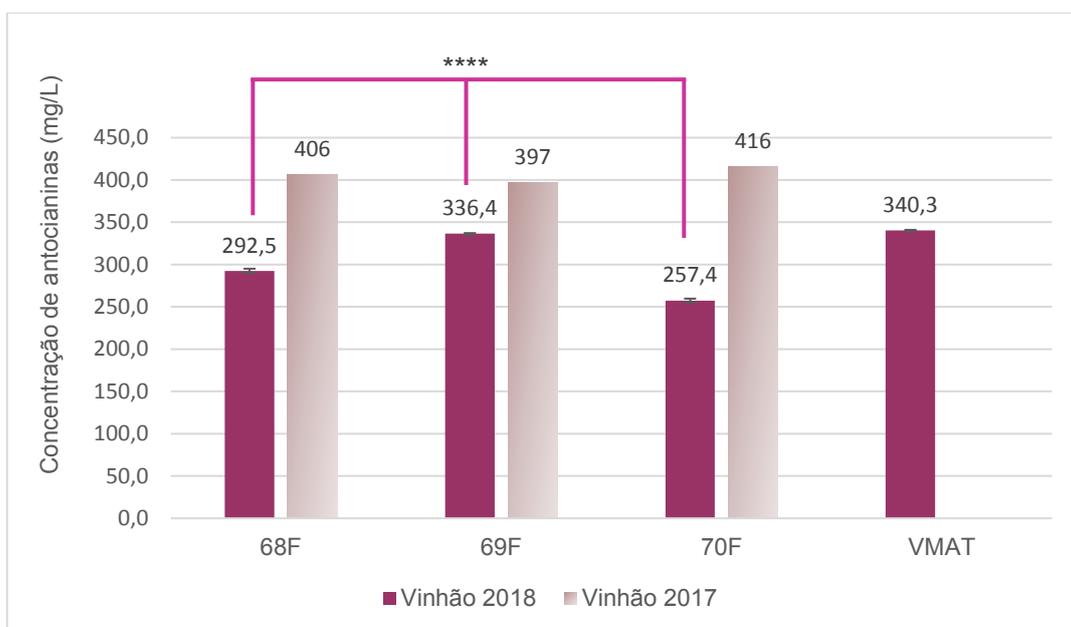
Já na amostra VMAT, o valor do poder tanante acompanha os valores de 2017, e é ligeiramente maior que os das cubas de 2018, o que vem de acordo com o que se tem visto do efeito da prensagem.

### 3. Análise da cor

#### 3.1 Antocianinas livres: quantificação e caracterização por HPLC

##### a) Método do bissulfito

Os valores de concentração de antocianinas livres totais obtidos para o mosto das três cubas de maceração e para a amostra da mistura dessas cubas está apresentado na Figura 31, juntamente com os resultados do ano anterior.

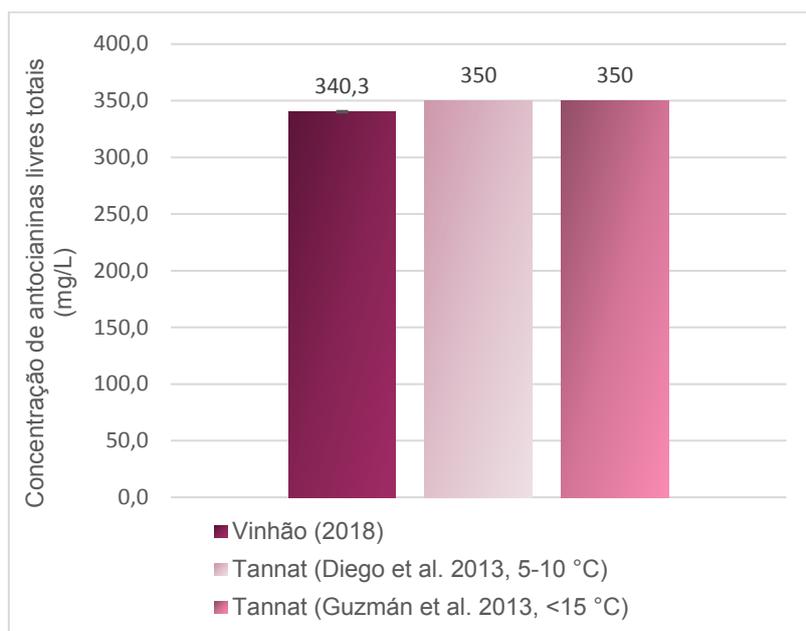


**Figura 31:** Comparação da concentração de antocianinas livres totais para os mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos.

Pela observação do gráfico anterior, percebe-se que as cubas de 2017 apresentavam uma maior concentração de antocianinas de forma generalizada, com uma diferença média de aproximadamente 111 mg/L, um valor ainda significativo. Relativamente ao valor determinado para a mistura das cubas (VMAT), esta diferença desce para 66 mg/L, visto este apresentar uma concentração mais elevada, possivelmente devido à ação da prensagem, como já referido em cima.

Comparando os valores obtidos para as três cubas de maceração, observa-se a mesma relação que no índice de fenóis totais por medição a 280 nm: a cuba com maior concentração de antocianinas é a 69F, seguida pela 68F, e por fim a 70F. Esta última corresponde novamente a cerca de 75% do valor da cuba com valor mais alto, e a 88% da cuba seguinte. As diferenças entre todas as cubas são consideradas extremamente significativas (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ).

A Figura 32 compara os valores obtidos com estudos já referidos anteriormente.



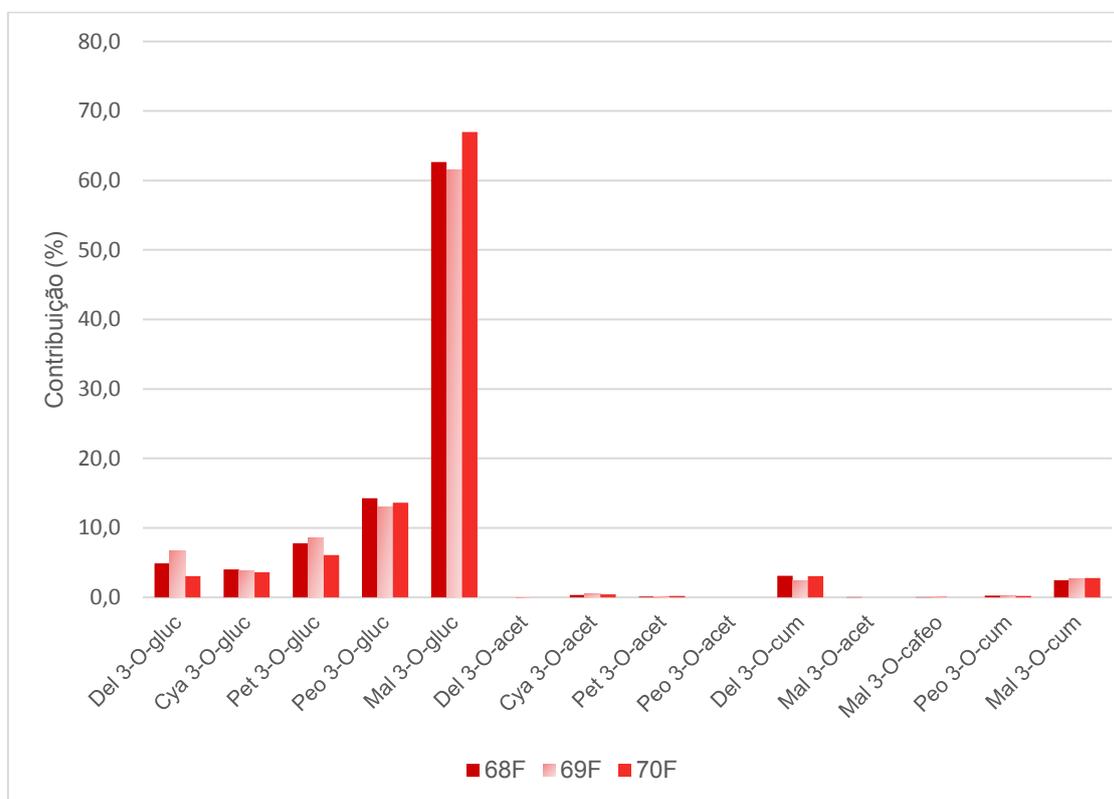
**Figura 32:** Comparação da concentração de antocianinas do mosto de outras castas, ao fim de 3 dias de maceração pré-fermentativa a frio.

Comparando com a casta *Tannat*, com resultados de dois estudos diferentes<sup>29,93</sup>, percebe-se que, por ser uma casta tintureira, apresenta concentrações de antocianinas livres muito semelhantes, embora menores quando comparadas com os valores de Vinhão do ano de 2017.

Diego *et al.* estudaram também a evolução da concentração de antocianinas ao longo da maceração utilizando um método tradicional, e concluíram que com este último o valor é muito maior, à volta de 900 mg/L, quase o triplo do valor obtido pela maceração pré-fermentativa a frio<sup>29</sup>. Podemos assumir que este valor se assemelharia ao valor do mosto de Vinhão Tradicional, dada a correlação com os dados da casta *Tannat*.

## b) HPLC

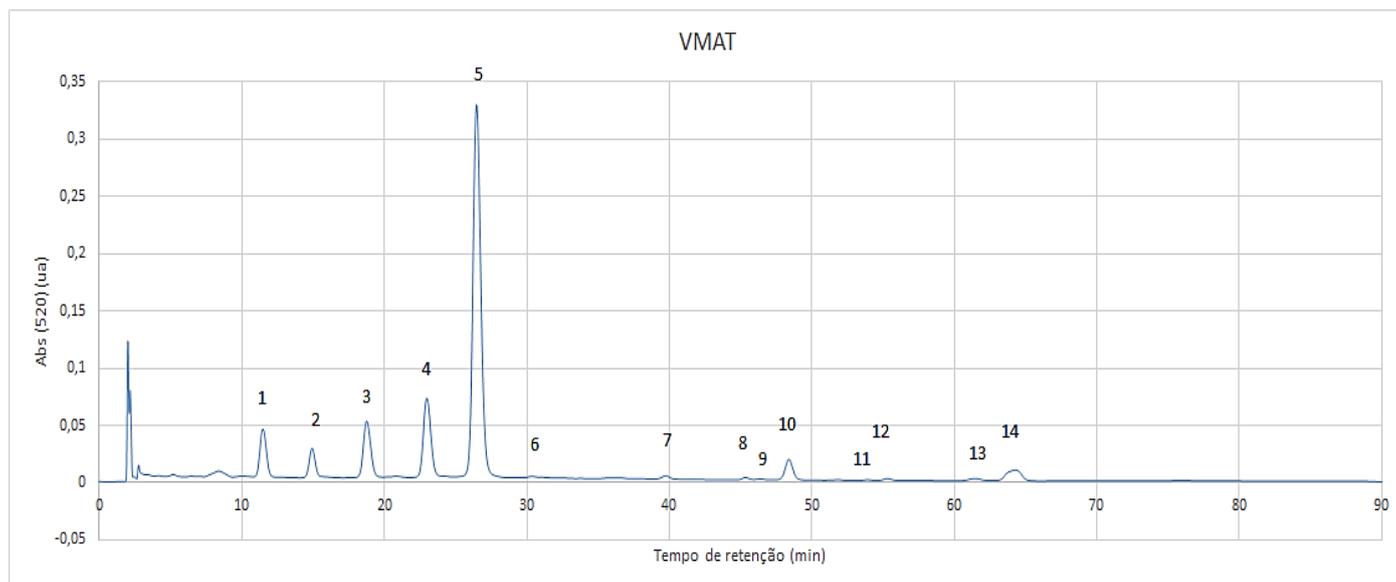
A análise por HPLC foi feita para os mostos das três cubas de maceração e para a amostra VMAT, corresponde à mistura das três. Os resultados do perfil antociânico das cubas de maceração encontram-se na Figura 33.



**Figura 33:** Contribuição (em %) de cada antocianina 3-monoglucósida para a concentração total do mosto de cada cuba de maceração (68F, 69F e 70F).

Comparando os resultados dos mostos de cada cuba de maceração, observam-se valores bastante próximos e relativamente constantes entre as três cubas e a contribuição de cada composto para a totalidade das antocianinas. Observa-se ainda que a cuba 70F é a que tem maior percentagem de malvidina 3-monoglucósido (cerca de 67%), o que pode indicar que esta antocianina é a extraída com mais facilidade, visto ser a cuba com resultados de concentração total mais baixos. Segundo os dados obtidos, a cuba 69F é a única com um valor de delphinidina 3-acetilglucósido alto o suficiente para ser quantificável (0,1 mg/L). O mesmo acontece para a cuba 68F, tendo sido a única a apresentar valores de concentração da malvidina 3-acetilglucósido.

O cromatograma obtido por análise HPLC da mistura das três cubas, a amostra VMAT, está apresentado na Figura 34. A Tabela 9 faz a legenda deste cromatograma e apresenta as respectivas concentrações de cada composto na amostra.



**Figura 34:** Cromatograma obtido por HPLC-DAD das antocianinas 3-monoglucósidas e respetivos derivados do mosto obtido da mistura das 3 cubas de maceração (VMAT).

**Tabela 9:** Identificação de cada pico e respetiva concentração de antocianinas na amostra VMAT.

	Identificação	Concentração (mg/L)	Contribuição (%)
1	3-glucósido de delphinidina	32,0 ± 0,2	6,3
2	3-glucósido de cianidina	19,3 ± 0,1	3,8
3	3-glucósido de petunidina	43,1 ± 0,3	8,5
4	3-glucósido de peonidina	60,8 ± 0,3	12,1
5	3-glucósido de malvidina	310,9 ± 1,6	61,7
6	3-acetilglucósido de delphinidina	0,1 ± 0,0	0,02
7	3-acetilglucósido de cianidina	2,2 ± 0,3	0,4
8	3-acetilglucósido de petunidina	0,6 ± 0,0	0,1
9	3-acetilglucósido de peonidina	Não quantificável	
10	3-cumaroilglucósido de delphinidina	16,3 ± 0,2	3,2
11	3-acetilglucósido de malvidina	Não quantificável	
12	3-cafeoilglucósido de malvidina	0,8 ± 0,0	0,2
13	3-cumaroilglucósido de peonidina	2,5 ± 0,6	0,5
14	3-cumaroilglucósido de malvidina	16,4 ± 1,1	3,2

Comparativamente aos resultados de cada cuba de maceração, os resultados de VMAT são proporcionalmente maiores, o que está de acordo com o que foi dito anteriormente sobre o efeito da prensagem.

Tal como nas uvas, a malvidina 3-glucósido representa a maior parte das antocianinas presentes no mosto, correspondendo a cerca de 62 %. De seguida, e ao

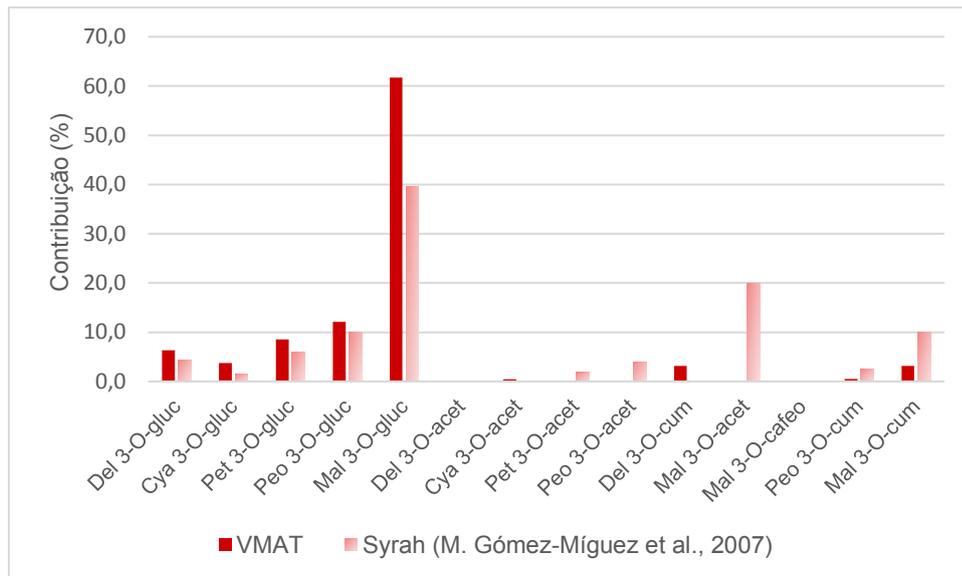
contrário do que acontece nas uvas, aparece a peonidina 3-glucósido, com aproximadamente 12 %, e logo a seguir a petunidina 3-glucósido, com 8,5%. Estes dados não estão completamente alinhados com os resultados das uvas, o que sugere o efeito da maceração pré-fermentativa a frio nos mostos e valida o que se sabe sobre este processo, que é que promove uma extração seletiva de compostos.

Observando os compostos minoritários nota-se que a delphinidina 3-acetilglucósido é o que tem menor concentração, correspondendo a apenas 0,02% da totalidade das antocianinas e derivados. É importante lembrar que existem outros compostos em menores concentrações, mas por essa razão, a sua concentração não pode ser determinada, embora os seus picos correspondentes estejam apresentados no cromatograma.

Acrescentando ainda, no mosto, as antocianinas glucosiladas totais correspondem a 92,4 % e nas uvas a 87,4 %; as cumaroiladas representam 6,9 % no mosto e 11,7 % nas uvas, e, por fim, as acetiladas correspondem a 0,5 % no mosto e 0,3% nas uvas, valores que não se encontram totalmente afastados e que possivelmente representam a casta em questão.

Relativamente aos valores obtidos em 2017 para os mostos de maceração a frio, são bastante semelhantes, bem como a sua contribuição em percentagem, o que, mais uma vez, sugere o efeito da maceração pré-fermentativa a frio a que foram sujeitos os mostos.

Em 2007, M. Gómez-Míguez *et al.* apresentaram os resultados da evolução da concentração das antocianinas ao longo da maceração pré-fermentativa a frio para a casta *Syrah*, e a Figura 33 apresenta esses resultados ao fim do terceiro dia maceração, em comparação com os obtidos para a casta Vinhão<sup>97</sup>.



**Figura 35:** Contribuição (%) de cada antocianina 3-monoglucósida em comparação com a casta *Syrah*, para 3 dias de maceração pré-fermentativa a frio.

Os valores obtidos para a casta *Syrah* são, como era de esperar, bastante mais baixos quando comparados com os da casta Vinhão, visto esta ser tintureira. Apresentam ainda diferenças ao nível da contribuição de cada antocianina para a concentração total, sendo que a malvidina 3-monoglucósido, sendo a mais abundante, apenas corresponde a 40% da totalidade, em comparação com 62%. Para além disto, apresenta uns estrondosos 20% do derivado acetilado da malvidina, em comparação com uma quantidade não quantificável na amostra de Vinhão.

Em comparação, a casta *Syrah* apresenta valores de 61,5% de antocianinas monoglicosiladas, 12,6% cumariladas e 25,8% acetiladas, uma diferença significativa, especialmente ao nível das antocianinas cumariladas. Esta diferença é justificada por serem castas diferentes, logo o perfil antociânico vai variar<sup>84</sup>.

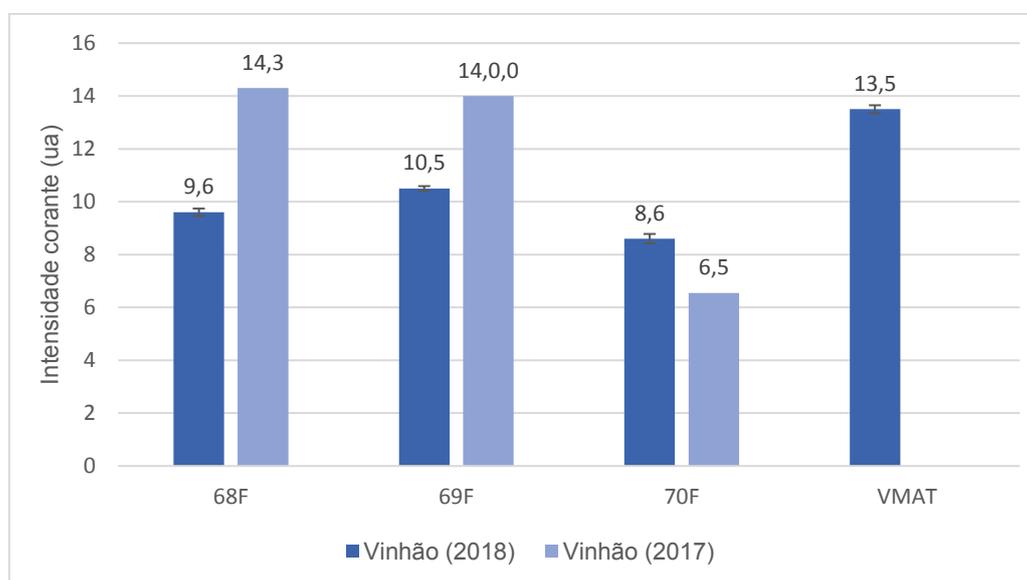
O fenómeno da diferença de valores obtidos pelo método do bissulfito e por HPLC volta a repetir-se com as amostras do mosto, encontrando-se valores de 340,3 mg/L e 504,1 mg/L, respetivamente. A razão para isto acontecer não foi identificada.

Pensando no valor obtido de IFT (670 mg/L) pelo método de *Folin-Ciocalteu*, percebe-se que as antocianinas correspondem a cerca de 51% dos fenóis totais, pelo método do bissulfito; e a 75% pelo HPLC.

### 3.2 Índice de cor vermelha e intensidade corante

A cor do mosto deverá estar bastante alinhada com a cor do vinho final, pelo que é importante a sua análise para perceber quais as características que este poderá vir a

ter. A Figura 36 apresenta os dados de intensidade corante para os mostos dos dois anos.



**Figura 36:** Comparação da intensidade corante dos mostos das três cubas de maceração (68F, 69F e 70F) nos dois anos consecutivos (2017 e 2018).

Comparando os resultados das cubas de maceração de 2018, nota-se que a cuba com menor intensidade corante é a 70F, o que está alinhado com a concentração de antocianinas, que regista o menor valor nessa mesma cuba.

Pela análise do gráfico observa-se que os mostos de 2018 apresentam uma intensidade corante menor, comparativamente aos de 2017, em quase todas as cubas de maceração, havendo uma exceção na cuba 70F, que fica muito aquém dos resultados registados pelas outras cubas, e onde o valor de 2018 ultrapassa o de 2017. Este último facto não parece estar alinhado com o resultado da concentração de antocianinas totais que, para a mesma cuba, é maior em 2017, e como a relação com as outras cubas no mesmo ano é tão díspar, pode ponderar pensar-se que ocorreu algum erro na leitura do valor. No entanto, o valor da amostra correspondente à mistura das cubas após prensagem (VMAT) é maior, o que vem de acordo com todos os resultados de outros parâmetros até agora: a prensagem aumentou a extração de compostos fenólicos, nomeadamente antocianinas e taninos, contribuindo assim para um mosto com maior intensidade corante.

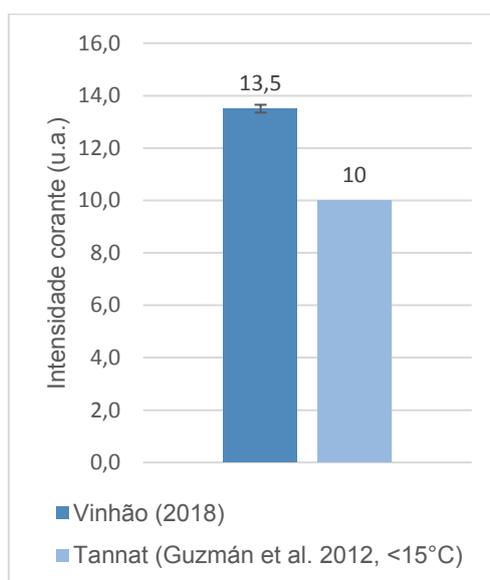
Quando comparados com os valores obtidos para o mosto de Vinhão tradicional, estes são claramente maiores (IC = 18,5), o que está de acordo com os efeitos da maceração pelicular fermentativa em cuba autovinificadora. A contribuição da

absorvância lida a 520 nm é bastante constante de cuba para cuba (aproximadamente 63 %) bem como das restantes absorvâncias, pelo que um valor geral menor corresponde a uma leitura menor em todos os comprimentos de onda. A Tabela 10 apresenta os valores de absorvância lidos aos diferentes comprimentos de onda, 620, 520 e 420 nm.

**Tabela 10:** Valores de absorvância a 620, 520 e 420 nm de cada mosto.

Vinhão (2018)	68F	69F	70F	VMAT
620 nm	0,8	0,8	0,7	1,2
520 nm	6,0	6,8	5,4	8,4
420 nm	2,8	2,9	2,5	3,9

A Figura 37 apresenta a comparação do valor da intensidade corante da amostra VMAT com valores obtidos por Guzmán *et al.* para a casta *Tannat*, ao fim de três dias de maceração pré-fermentativa a menos de 15 °C.



**Figura 37:** Comparação da intensidade corante do mosto de Vinhão e da casta *Tannat* submetida a maceração pré-fermentativa a frio<sup>93</sup>.

Como se observa pelo gráfico, o mosto *Tannat* apresenta menor valor de intensidade corante, correspondendo a cerca de 74 % do valor obtido para o mosto Vinhão. Visto que a temperatura média de maceração de ambas as castas corresponder a 15 °C, a diferença entre ambas parece advir do facto de existirem diferenças intrínsecas à própria casta, resultando num mosto com maior ou menor intensidade corante. No caso de *Tannat*, Guzmán *et al.* obtiveram resultados onde uma maceração de maior duração parece resultar numa maior intensidade corante. Possivelmente, o mesmo resultado seria obtido para a casta Vinhão, o que estaria de acordo com os

resultados de outros autores para diferentes castas<sup>95</sup>. Outros artigos referem ainda que existe um momento em que deixa de ser produtivo continuar a maceração com o objetivo de aumentar a intensidade corante, limitando este processo a um determinado período de dias ligeiramente maior que em vinificações tradicionais, e obtendo valores semelhantes ou até maiores<sup>92</sup>.

A Tabela 11 apresenta os dados de índice de cor vermelha para os mostos de 2018.

**Tabela 11:** Valores de índice de cor vermelha dos mostos de 2018.

Intensidade da Cor Vermelha (ICV)			
68F	69F	70F	VMAT
6,01 ± 0,05	6,76 ± 0,04	5,40 ± 0,07	8,42 ± 0,07

Sobre os dados apresentados na tabela anterior, conclui-se que a cuba 69F é a que apresenta maior valor de absorvância a 520 nm, seguida pela 68F, e por fim a 70F, existindo diferenças consideradas extremamente significativas na comparação destes valores (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). O valor da amostra correspondente à mistura (VMAT) é significativamente maior que a média dos valores das cubas (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ) devido ao efeito da prensagem, como já dito anteriormente, e que é corroborado pelo aumento da concentração de antocianinas nesta mesma amostra, quando comparada à de cada cuba.

### 3.3 Parâmetros CIELab

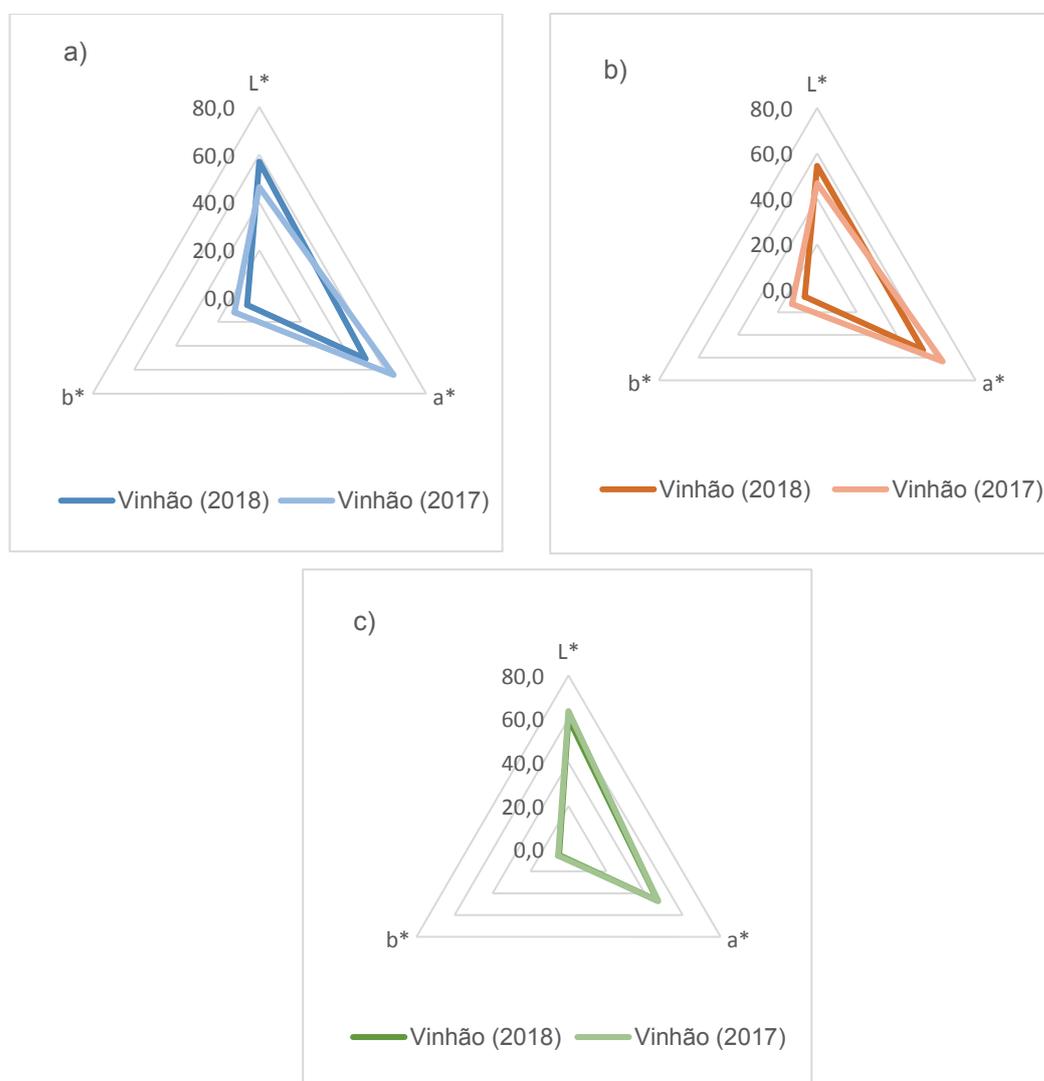
Os parâmetros CIELab dos mostos analisados encontram-se na Tabela 12, juntamente com os do ano 2017, bem como uma representação RGB das respetivas cores.

**Tabela 12:** Parâmetros CIELab e representação RGC da cor dos mostos de 2018 e 2017.

	Amostras	Parâmetros CIELab					Cor
		L*	a*	b*	C*	H°	
Vinhão (2018)	68F	57,1	51,01	5,85	51,34	6,5	RGB (217,95,130)
	69F	54,5	53,38	6,28	53,75	6,7	RGB (212,85,122)
	70F	60,3	46,97	4,99	47,24	6,1	RGB (221,109,139)
	VMAT	47,6	57,73	9,66	58,53	9,5	RGB (198,59,100)
Vinhão (2017)	68F	46,5	64,39	11,96	65,49	10,52	RGB (204,41,94)
	69F	46,8	63,30	12,71	64,57	11,4	RGB (203,45,94)
	70F	63,6	47,17	5,47	47,48	6,6	RGB (231,117,147)

Comparando o mosto das três cubas de maceração em 2018 observa-se que é a 69F que apresenta maior tonalidade vermelha, seguida da 68F, e depois a 70F, com diferenças significativas (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). A mistura das três cubas após prensagem apresenta ainda um valor mais alto, o que está completamente de acordo com o índice de cor vermelha apresentado. Relativamente à coordenada  $b^*$ , é novamente a cuba 69F que apresenta maior valor e, portanto, tem maior tonalidade amarela comparada com as outras, à exceção da mistura, que apresenta um valor ainda maior. A cuba 70F é a que apresenta menor valor de  $C^*$ , sendo a que tem a cor menos viva. Já relativamente ao valor de  $H^\circ$ , é bastante semelhante entre as cubas, não existindo diferenças significativas entre elas (ns,  $p < 0,05$ ).

As Figuras 16a), 16b) e 16c) apresentam a diferença de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  entre os dois anos consecutivos de forma gráfica, para melhor visualização.



**Figura 38:** Gráficos radar com a comparação dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  dos mostos nos dois anos. a) 68F, b) 69F e c) 70F

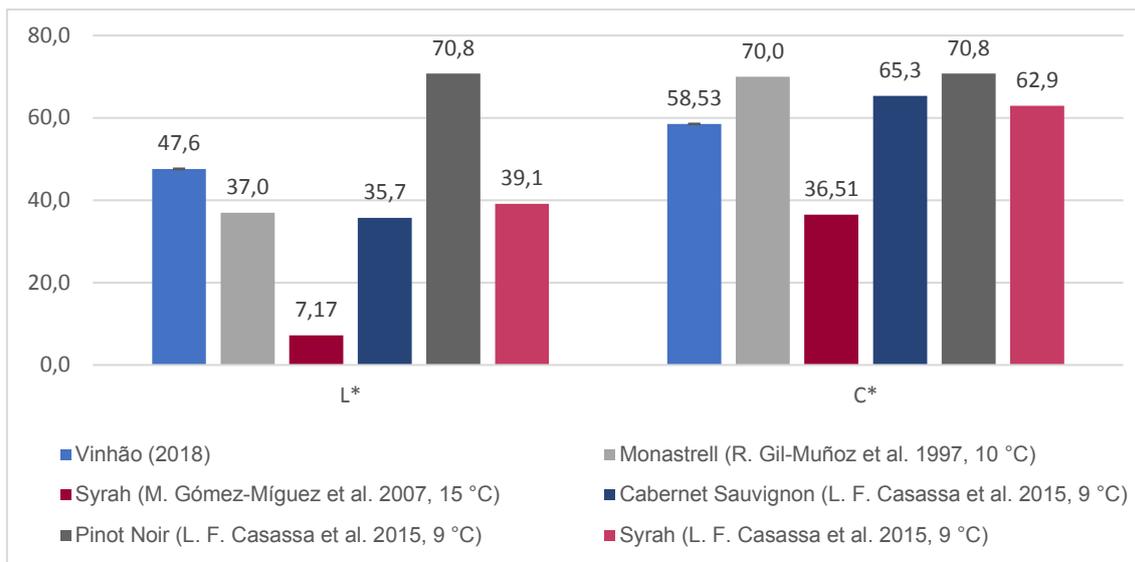
Comparativamente ao ano 2017, as cubas obtiveram valores mais baixos mais altos da coordenada  $a^*$  e, por isso, apresentavam uma tonalidade vermelha mais fraca, com exceção da cuba 70F, que teve um valor muito semelhante à mesma cuba em 2018. Os vinhos de 2017 apresentam, ainda, maior tonalidade amarela relativamente aos de 2018, e menor luminosidade, tendo, portanto, uma cor mais densa.

Os mostos de ambos os anos registaram um valor de  $C^*$  acima de 50, pelo que apresentam uma cor viva<sup>92</sup>, sendo ligeiramente mais intensa nos de 2017. No entanto, os maiores valores de  $H^0$  obtidos pelos mostos de 2017 indicam um maior afastamento da tonalidade vermelha pura em direção à tonalidade amarela, em relação aos de 2018, não sendo a diferença significativa.

De forma geral, a relação dos parâmetros entre as cubas não alterou de ano para ano. Se se observar a relação de VMAT e as cubas de maceração, vê-se que  $L^*$  diminuiu e  $C^*$  aumentou no que corresponde ao período de prensagem, o que está de acordo com o facto de haver uma maior extração de antocianinas e estas aumentarem a densidade do mosto, e diminuir a luminosidade.

Nota-se ainda que a amostra VMAT é mais semelhante à média das cubas de 2017 que de 2018, o que se percebe bem pela coluna da cor, e que sugere ainda que o mosto prensado de 2017 obteria valores ainda mais altos dos mesmo parâmetros. Concluindo, a diferença de cor global entre os dois anos é mais acentuada na cuba 68F, registando-se um  $\Delta E = 18,2$ , seguida pela cuba 69F, com  $\Delta E = 14,1$ , e por fim a 70F, com  $\Delta E = 3,4$ .

Outros autores analisaram a evolução da cor do mosto ao longo da fermentação, e a Figura 39 apresenta a comparação com os dados obtidos de  $L^*$  e  $C^*$  para mosto de maceração a frio de outras castas.



**Figura 39:** Comparação dos parâmetros L\* e C\* para mostos de maceração a frio de diferentes castas.

Pela observação do gráfico anterior, percebe-se que o valor de L\* apresenta uma variabilidade muito grande, possivelmente associada à casta ou a pequenas variações de temperatura, visto se tratarem todos de mostos de maceração a frio, ao fim de 3 dias. A casta *Syrah* tem o mosto mais carregado de todos os apresentados, resultando, possivelmente, num vinho bastante escuro e denso. O mosto de Vinhão parece apresentar um resultado intermédio. Relativamente ao parâmetro C\*, este mede a contribuição de a\* e b\*, pelo que um valor maior que 50, como já referido, constitui uma cor viva. Isto acontece para todos os vinhos exceto o *Syrah*, que apresenta um valor menor que a referência.

Alguns destes autores estudaram ainda a diferença destes resultados de maceração a frio com os de vinificação tradicional, e retiraram algumas conclusões: no início da maceração, os parâmetros L\*, C\* e H° sobem mais rápido nos mostos de vinificação tradicional, mas ao fim de alguns dias já se encontram equiparados em ambos o métodos<sup>92</sup>; os mostos de maceração a frio apresentam uma menor tonalidade amarela que os de tradicional<sup>97,98</sup> e, de forma geral, uma maior luminosidade<sup>24</sup>. Em alguns, a maceração a frio aumentava, ainda que pouco, a componente vermelha (a\*) do mosto<sup>98</sup>.

## Vinhão – Vinhos (VMF e VT)

As amostras VMF e VT referem-se aos vinhos da casta Vinhão obtidos por maceração pré-fermentativa a frio e vinificação tradicional, respetivamente; a amostra VFF refere-se ao vinho no final de ambas as fermentações, alcoólica e malolática.

### 1. Controlo dos parâmetros de vinificação

A Tabela 13 apresenta os valores de vários parâmetros analisados no laboratório da Adega ao vinho de maceração a frio, para acompanhar a finalização das fermentações e definir a trasfega para a cuba de conservação.

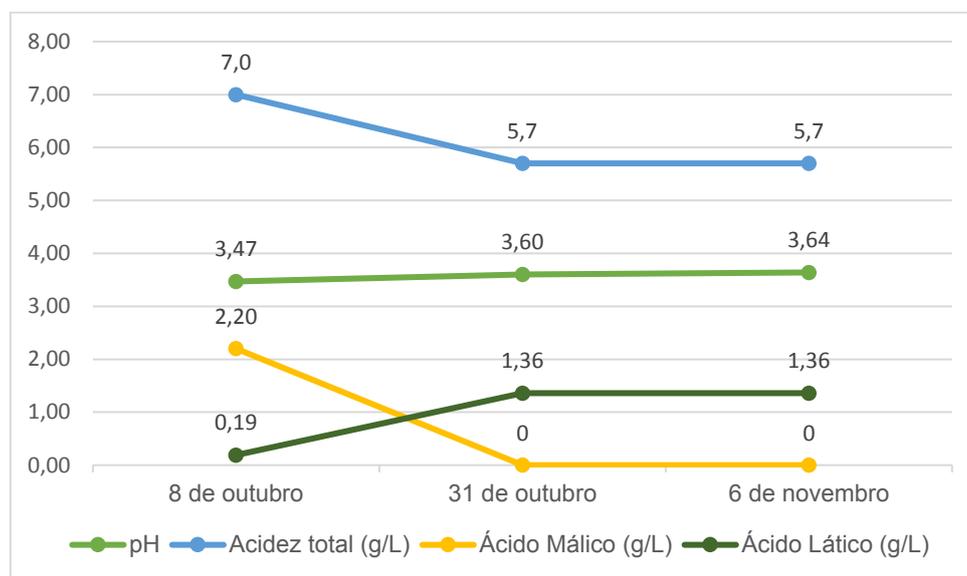
**Tabela 13:** Resultados das análises físico-químicas realizadas ao vinho VMF após o término da fermentação alcoólica (8/out), malolática (31/out) e em conservação (6/nov).

VMF (CUBA 68)			
Parâmetros	08/out	31/out	06/nov
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,9942	0,9920	0,9922
Temperatura (°C)	18,0	19,5	16,5
Densidade corrigida a 20 °C (g/cm <sup>3</sup> )	0,9938	0,9919	0,9914
Grau alcoólico (%v/v)	13,0	-	-
pH	3,47	3,60	3,64
Acidez total (g/L)	7,0	5,7	5,7
Acidez volátil (g/L)	0,16	0,24	0,27
Acidez fixa (g/L)	6,8	5,4	5,4
SO <sub>2</sub> Livre (g/dm <sup>3</sup> )	11	9	26
SO <sub>2</sub> Total (g/dm <sup>3</sup> )	41	29	54
Ácido Tartárico (g/L)	1,3	-	-
Ácido Málico (g/L)	2,20	s/ málico	s/ málico
Ácido Cítrico (g/L)	0,46	-	-
Ácido Lático (g/L)	0,19	1,36	-
Açúcares (g/L)	s/ açúcar	-	-

O grau alcoólico foi determinado apenas no fim da fermentação alcoólica e obteve-se o valor de 13,0 % v/v de álcool. Este valor é superior ao grau provável obtido nas uvas (12,0 °Be), o que indica que essa amostra não seria representativa do

conteúdo das cubas, algo que era esperado devido à variabilidade da composição das uvas das diferentes dornas e produtores.

A Figura 40 apresenta a evolução do pH, acidez total, ácido málico e ácido láctico ao longo do mesmo período. Note-se que os valores correspondentes a zero podem não ser exatamente zero, mas são sim valores abaixo do quantificável pelo método.



**Figura 40:** Evolução do pH, acidez total, concentração de ácido málico e ácido láctico após o término da fermentação alcoólica, malolática e em conservação.

Como era de esperar, o pH foi aumentando à medida que o ácido málico foi transformado em ácido láctico, que é um ácido mais fraco. Por todos estes fatores, a acidez total diminuiu também, atingindo um valor constante de 5,7 g/L.

Comparando os valores mais tardios do vinho de 2018, ou seja, de 6 de novembro, com os de 2017 pode dizer-se que o grau do vinho de maceração a frio é maior em 2018 (13,0 %v/v, em comparação com 12,0 %v/v em 2017); o pH é ligeiramente maior (3,64, em comparação com 3,44 em 2017), o que poderia indicar uma menor acidez total, que não parece ser o caso pois este parâmetro era menor em 2017 (5,5 g/L, em comparação com 5,7 g/L em 2018). O vinho de 2018 apresenta ainda um valor de acidez volátil de 0,27 g/L, um valor um pouco mais alto que o de 2017, de 0,24 g/L, o que pode indicar uma maior suscetibilidade ao ataque de bactérias acéticas, sendo uma diferença sem grande significado. Quanto ao teor de açúcares no vinho final, os de ambos os anos apresentam um valor inferior a 1,5 g/L, sendo, por isso, considerados vinhos secos<sup>99</sup>.

Os dados das análises de rotina efetuadas para VT encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14:** Resultados das análises físico-químicas realizadas ao vinho VT após o término da fermentação alcoólica (15/out).

VT (BALÃO 2)	
Parâmetros	15/out
Grau alcoólico (%v/v)	12,0
pH	3,45
Acidez total (g/L)	7,4
Acidez volátil (g/L)	0,43
Acidez fixa (g/L)	6,9
SO <sub>2</sub> Livre (g/dm <sup>3</sup> )	11
SO <sub>2</sub> Total (g/dm <sup>3</sup> )	36
Ácido Tartárico (g/L)	1,4
Ácido Málico (g/L)	s/ málico
Ácido Cítrico (g/L)	s/ cítrico
Ácido Lático (g/L)	1,81
Açúcares	s/ açúcar

Comparativamente com VMF, o grau alcoólico de VT é menor por 1 %v/v. G. González-Neves *et al.*, em 2014, reportaram ainda que vinhos provenientes de maceração pré-fermentativa a frio apresentavam maior grau alcoólico, o que parece estar de acordo com os dados obtidos para o Vinhão. No entanto, é importante lembrar que as uvas utilizadas em ambos os vinhos tinham, possivelmente, diferentes características e teores de açúcares, que pode ser o maior contributo para esta diferença. Relativamente à acidez total, a comparação não é possível pois as análises não foram realizadas aos dois vinhos no mesmo dia, e o valor deste parâmetro para VMF variou neste período. Já a acidez volátil de VT parece apresentar um valor maior que VMF no mesmo período, indicando que o primeiro pode estar mais suscetível ao ataque das bactérias acéticas.

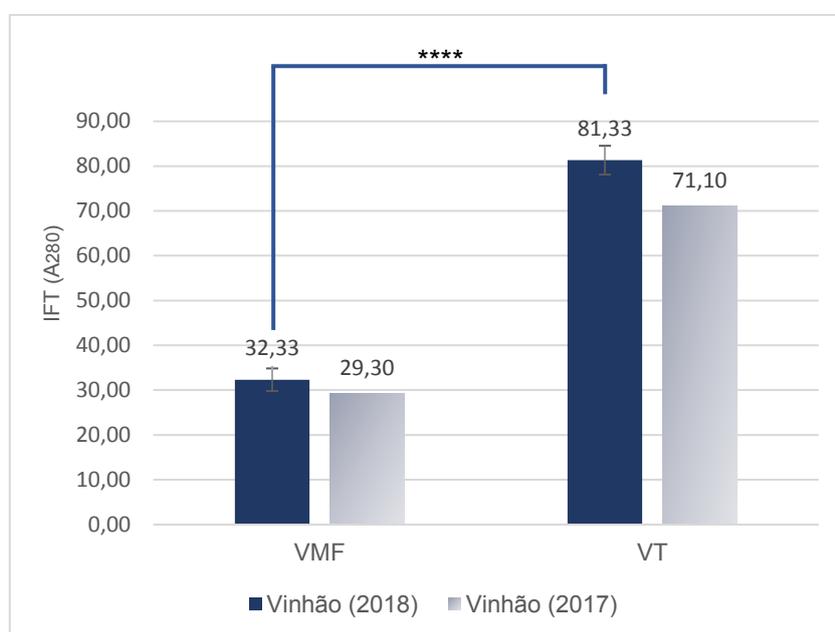
Em 2006, e para vinhos da casta *Monastrell* com grau alcoólico semelhante, I. Alvaréz *et al.* registaram valores de pH menores em vinhos de maceração pré-fermentativa a frio, comparativamente com vinhos de vinificação tradicional, o que está de acordo com o observado por outros autores<sup>26</sup> para a casta *Tannat* mas não com o observado para a casta Vinhão. Paralelamente, observaram ainda valores de acidez total maiores, como seria de esperar pela relação da acidez com o pH<sup>23,26</sup>. No entanto, estas diferenças foram consideradas não significativas ( $p < 0,01$ ).

## 2. Composição polifenólica

Os parâmetros analisados nos vinhos são os mesmos que nas uvas e nos mostos.

### 2.1 Índice de fenóis totais

Tal como no extrato das uvas e no mosto, o índice de fenóis totais (IFT) foi analisado por dois métodos: análise da absorvância por espectrofotómetro a 280 nm, e pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Os resultados da análise dos vinhos VMF e VT pelo primeiro método nos dois anos consecutivos encontram-se na Figura 41.



**Figura 41:** Comparação dos valores de IFT dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos consecutivos

Como se observa pelo gráfico, os valores de IFT dos dois anos encontram-se muito próximos, nomeadamente no caso do vinho de maceração a frio, sendo o valor de 2017 um pouco inferior, correspondendo a cerca de quase 91 % do valor de 2018. Uma relação semelhante existe no caso do de vinificação tradicional.

Relativamente à amostra VFF, correspondente ao vinho de maceração a frio no final das fermentações que não está apresentada no gráfico, e até ao momento da recolha da amostra VMF, o valor de IFT aumentou (de 26,33 para 32,33 u.a.), apresentando uma diferença significativa (\*,  $p < 0,05$ ), muito possivelmente devido à libertação de compostos fenólicos da madeira incluída na cuba de conservação e à formação de novos compostos.

Comparando os dois vinhos, o VMF apresenta um valor muito mais baixo de IFT, correspondendo a apenas 40 % do valor do VT, relação que se manteve constante desde o ano anterior, tratando-se de uma diferença extremamente significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). Em 2010, E. S. Vázquez *et al.* estudaram também o efeito de maceração pré-fermentativa a frio em vinhos da casta Mencía, nativa do noroeste de Espanha. Observaram que o índice de fenóis totais era mais alto também em vinhos produzidos com vinificação tradicional; no entanto, a diferença entre os métodos era de apenas 10 %, em comparação com os 60 % entre os vinhos VMF e VT<sup>20</sup>. Já G. González-Neves *et al.* encontraram valores mais altos em vinhos de maceração a frio em três dos quatro anos de estudos<sup>26</sup>.

Esta diferença entre os dois métodos seria expectável devido à baixa temperatura de maceração do vinho VMF e à sua curta duração de apenas 3 dias, que decorreu com problemas. Para além disso, a fermentação, realizada a 16-17 °C, não teve contacto pelicular, pelo que não houve extração de polifenóis nessa fase, ao contrário da técnica de vinificação tradicional. No entanto, estas condições favorecem uma extração aquosa, aumentando a concentração de antocianinas, pois estas são compostos hidrossolúveis, o que resulta numa percentagem menor de extração de outros fenóis<sup>93,97</sup>.

Relativamente ao valor de VT, P. Fernandes *et al.*, em 2009 registaram valores semelhantes para a casta Touriga Nacional, com IFT = 63,9 u.a. em vinhos produzidos com uvas de uma parcela situada na Região dos Vinhos Verdes<sup>91</sup>. O valor é relativamente inferior ao obtido para o Vinhão tradicional possivelmente por esta ser uma casta tintureira, possuindo mais compostos fenólicos na polpa da uva.

A Tabela 15 apresenta os valores de IFT obtidos pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

**Tabela 15:** Valores de IFT pelo método de Folin-Ciocalteu para os vinhos, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro.

Casta	IFT ( <i>Folin-Ciocalteu</i> , mg/L)	
	VMF	VT
Vinhão (2018)	429,3 ± 14,1	1167,2 ± 62,1

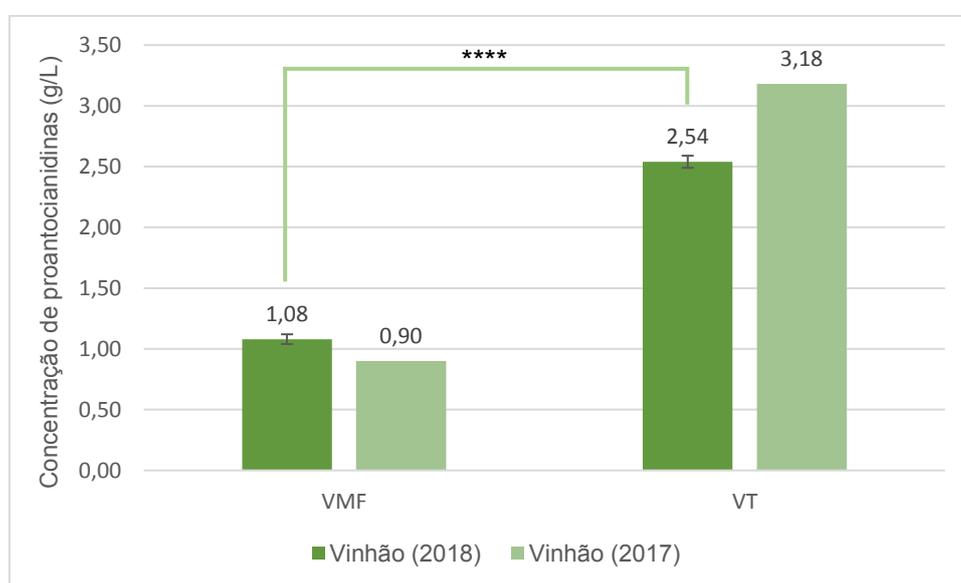
Os resultados obtidos pelo método de *Folin-Ciocalteu* estão alinhados com os obtidos pela leitura a 280 nm, registando-se uma diferença significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ) no valor de IFT de 37 % entre os vinhos VMF e VT, em comparação com os 40 % obtidos pelo outro método. Comparativamente com outros estudos, existem algumas discrepâncias entre os resultados obtidos por este método: no mesmo estudo de P. Fernandes *et al.*, registaram valores de IFT de 2070 mg/mL para a mesma casta referida

em cima, que obtinha valores menores que o VT pelo outro método<sup>91</sup>, o que pode indicar que este método apresenta mais variáveis.

## 2.2 Taninos proantociânicos totais

Para realizar a análise da concentração de proantocianidinas dos vinhos procedeu-se da mesma forma que nas uvas e mostos, e retirou-se o açúcar residual que pudesse ainda existir (pelo método descrito no capítulo dos Materiais e Métodos).

Os resultados obtidos encontram-se na Figura 42, juntamente com os do ano anterior.



**Figura 42:** Concentração de proantocianidinas nos dois vinhos (VMF e VT), nos dois anos consecutivos.

Quando comparados a 2017, o teor de proantocianidinas em 2018 é maior no caso de VMF e menor no de VT. Não há forma de saber se esta relação já existia nas uvas e mostos pois não há dados deste parâmetro nessas amostras no ano 2017. No entanto, no protocolo de vinificação de 2018, constava a adição de taninos enológicos, extraídos diretamente da uva, ao contrário do protocolo de 2017 que seguiu sem esta adição. Isto pode explicar esta diferença de valores de taninos proantociânicos totais.

Existe uma diferença significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ) entre os valores de VMF e VT, sendo que o teor de proantocianidinas do primeiro corresponde a, aproximadamente, 43 % do teor do segundo, ou seja, menos de metade. Em 2017 esta relação era ainda menor, com VMF a corresponder a um terço de VT. Isto era de esperar pois a vinificação tradicional permite uma extração de maior quantidade de taninos, enquanto que a maceração pré-fermentativa permitirá uma extração mais seletiva.

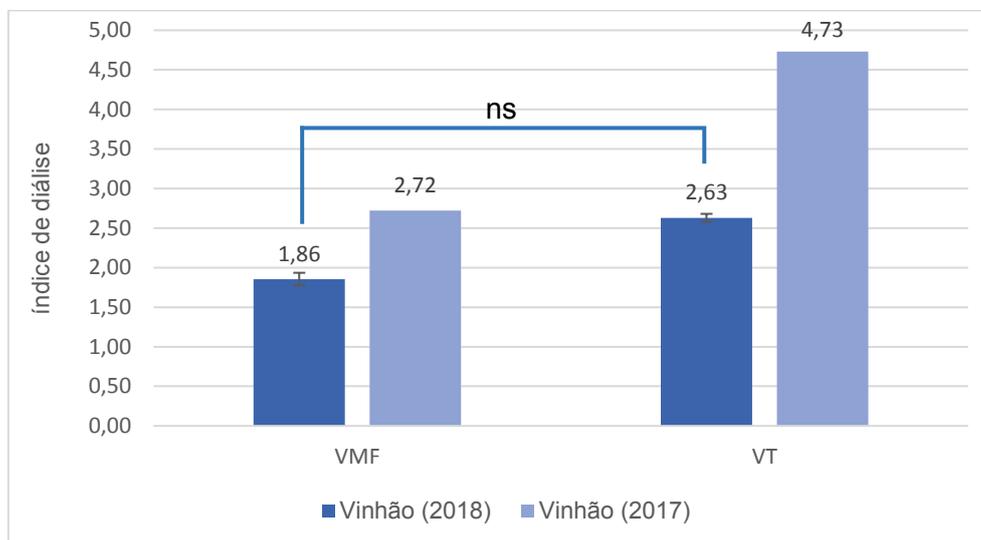
Em 2001, Sun *et al.* obtiveram valores bastante mais baixos para a mesma casta, colhida na mesma região, com concentrações de 0,7 g/L para vinhos provenientes de vinificação tradicional; no entanto realizaram esta análise após um ano de conservação, onde pode ter havido deposição das proantocianidinas poliméricas, as que correspondem a uma maior percentagem do valor total. Além do Vinhão, estudaram ainda o Espadeiro, que registou valores de 3,1 g/L, mesmo após o período de conservação<sup>76</sup>. E. S. Vázquez *et al.*, que estudaram o efeito da maceração pré-fermentativa a frio, registaram um teor de proantocianidinas de 2,05 g/L nos vinhos obtidos por vinificação tradicional e 1,56 g/L nos obtidos por maceração a frio, correspondendo a uma diferença de 24 %, em comparação com a de 57 % obtida para o Vinhão. Esta discrepância pode justificar-se por ser uma casta diferente, e também pelo facto da maceração, no estudo referido, ter durado mais tempo<sup>20</sup>. Alguns autores registaram valores de vinhos de maceração a frio maiores que vinhos de vinificação tradicional<sup>100,101</sup>, e outros observaram diferenças significativas entre vinhos de uvas de uma mesma casta produzidas em sítios diferentes<sup>102</sup>.

A concentração de proantocianidinas durante a fermentação diminuiu um pouco (VMAT = 0,95 g/L e VFF = 0,90 g/L), o que pode ter ocorrido devido a reações entre taninos condensados que aumentaram o seu peso molecular e os fizeram precipitar<sup>103</sup>. Após a desencuba e até ao momento da análise esse valor aumentou, possivelmente devido à polimerização das antocianinas ao longo da conservação do vinho.

A relação entre taninos e antocianinas é ainda importante para perceber a capacidade do vinho de conjugar a adstringência com a cor e, no seu conjunto, viabilidade de conservação. Em 2018, VMF apresenta 3,3 vezes mais taninos que antocianinas, enquanto que em VT esta razão desce para 2,8 vezes.

### 2.3 Índice de diálise

A Figura 43 apresenta os valores de índice de diálise dos vinhos VMF e VT, juntamente com os valores de 2017.



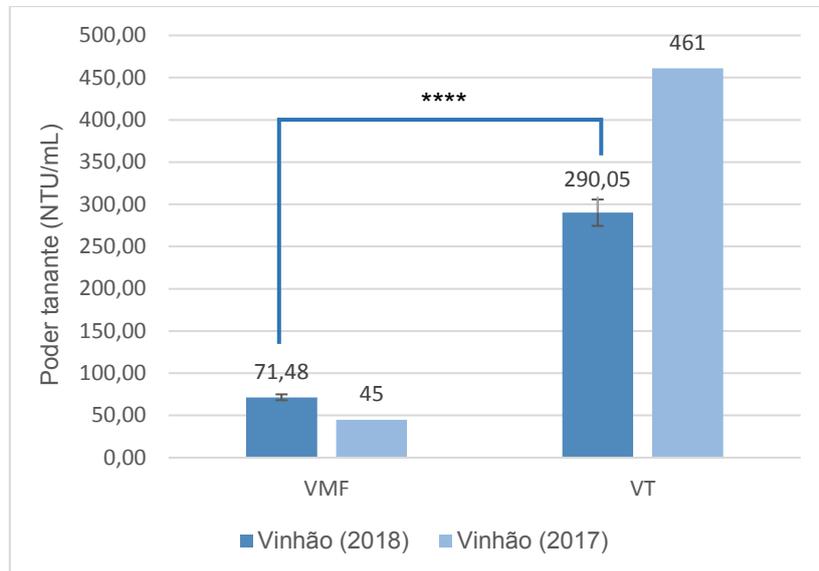
**Figura 43:** Comparação do índice de diálise dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos.

Os valores obtidos em 2018 são inferiores aos obtidos no ano anterior pelos mesmos vinhos, havendo uma diferença de 32 % para o VMF e 44 % para VT entre os dois anos, valores ainda significativos. Uma possível explicação desta diferença será a utilização, em 2017, de engaços de uva como filtro do mosto, o que pode ter transferido alguns taninos condensados de maior massa molecular<sup>76</sup>. No entanto, isto não vem alinhado com o que se registou nos mostos, onde os resultados eram bastante semelhantes. Tal pode derivar de alterações que tenham ocorrido durante a fermentação.

A diferença entre os dois vinhos é notória a nível da quantidade de compostos de maior massa molecular: VT apresenta maior índice de diálise logo apresenta um maior teor de compostos polimerizados com capacidade tanante. Tal facto vem reforçar a ideia de que a temperatura tem, de facto, grande impacto na produção do vinho, com implicações não só na extração de compostos, mas nas fases seguintes, nas reações de condensação e polimerização e, conseqüentemente, na copigmentação. No entanto, estatisticamente, a diferença entre os vinhos é considerada não significativa (ns,  $p < 0,05$ ), embora com um valor de  $p$  muito próximo do limite de significância ( $p = 0,0565$ ).

## 2.4 Poder tanante

A Figura 44 apresenta os dados de poder tanante para os dois vinhos, VMF e VT, juntamente com os valores do ano anterior.



**Figura 44:** Comparação do poder tanante dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos.

A capacidade dos taninos de formar agregados insolúveis com as proteínas, o chamado poder tanante, é significativamente maior em VT, registando uma diferença entre os vinhos de 75 % em 2018 e 90 % em 2017. Isto era de esperar e está de acordo com o observado no índice de diálise. No entanto, a diferença de poder tanante entre os vinhos é extremamente significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ), e bastante superior à diferença de índice de diálise. Isto pode indicar que um menor poder tanante pode também advir da existência de taninos condensados mais polimerizados e, conseqüentemente, com menor flexibilidade, dificultando a ligação às proteínas<sup>41</sup>.

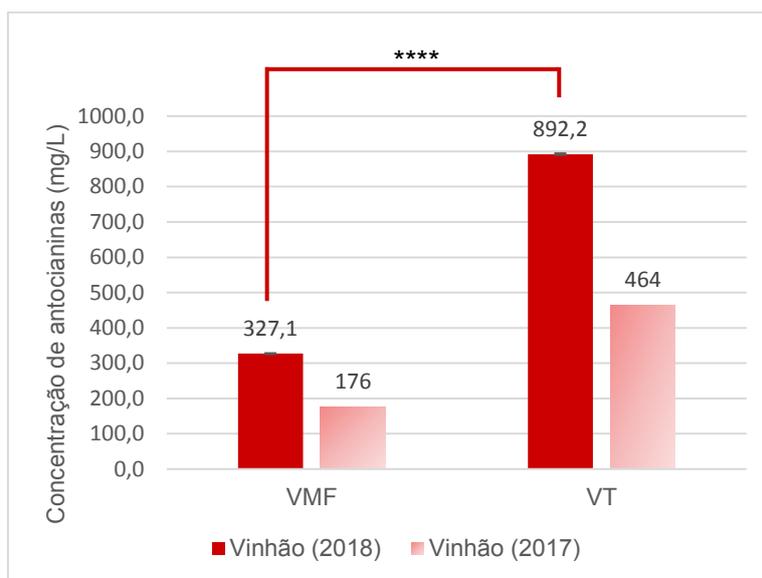
Fernandes *et al.* registaram valores semelhantes aos de 2017 em vinhos de Touriga Nacional<sup>91</sup>, e valores mais próximos dos de 2018 em vinhos *Syrah*, ambos obtidos por vinificação tradicional e provenientes de uma parcela de terreno na Região dos Vinhos Verdes. Isto demonstra o efeito conjunto da casta e do tipo de vinificação.

### 3. Análise da cor

#### 3.1 Antocianinas livres: quantificação e caracterização por HPLC

##### a) Método do bissulfito

A Figura 45 apresenta os dados de concentração de antocianinas nos dois anos consecutivos.



**Figura 45:** Comparação da concentração de antocianinas de VMF e VT nos dois anos consecutivos.

Existe uma diferença bastante grande e extremamente significativa estatisticamente (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ) entre os vinhos resultantes das diferentes técnicas de vinificação, o que era esperado devido ao efeito na extração de antocianinas de uma maceração fermentativa a temperatura mais alta, no caso de VT. O resultado para este vinho é maior que a maioria encontrada em outros artigos com outras castas, nomeadamente por Fernandes *et al.*, que registaram valores de 437 mg/L para a Touriga Nacional<sup>91</sup>; também E. S. Vázquez *et al.* obtiveram valores de 643 mg/L para um vinho da casta *Mencía*, por vinificação tradicional, e de 578 mg/L para um vinho da mesma casta produzido por maceração a frio<sup>102</sup>. Este valor é maior que o obtido para o Vinhão possivelmente devido à maior duração do período de maceração.

Comparando os valores obtidos em diferentes anos observa-se uma diferença bastante grande: embora a percentagem de diferença entre os dois vinhos (VMF e VT) seja constante nos dois anos (aproximadamente 37 %) a concentração de antocianinas em 2017 corresponde, em ambos os vinhos, a pouco mais que 50 % da concentração do ano seguinte. Tal relação não está de acordo com os resultados obtidos para os mostos nas cubas de maceração onde, em 2017, se obtiveram concentrações de

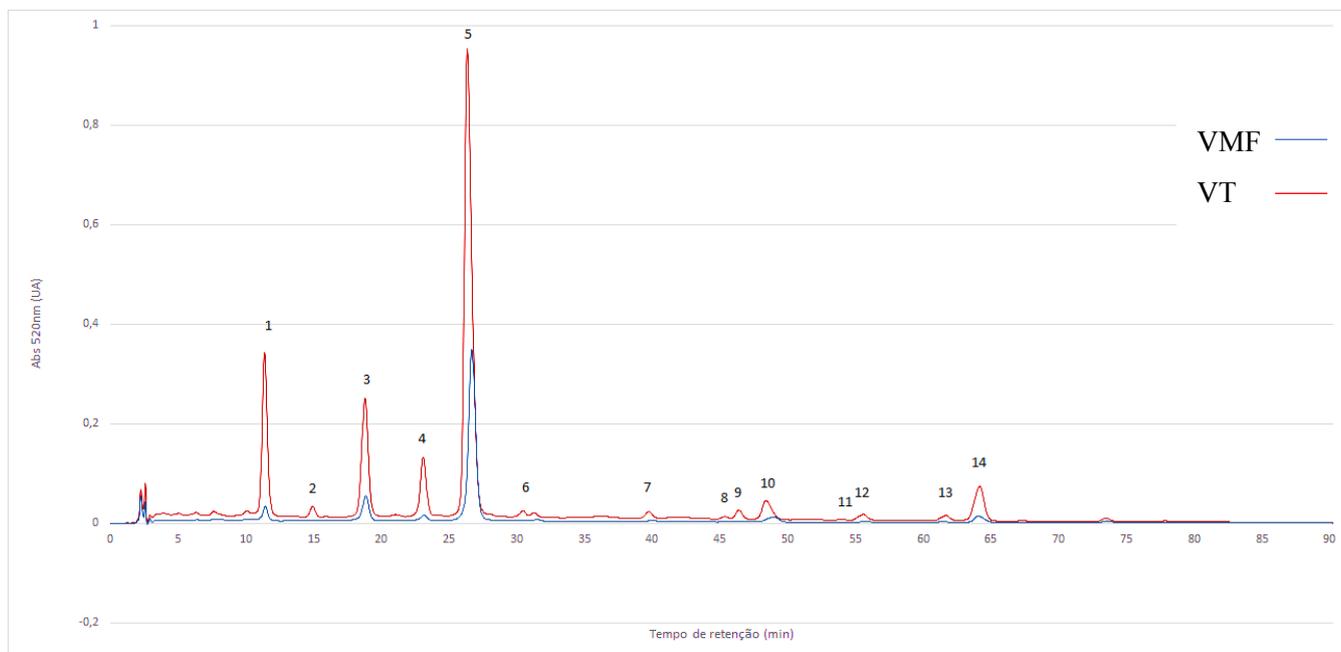
antocianinas livres totais maiores que em 2018. Algumas razões podem justificar esta discrepância: o facto de, em 2017, não haver menção de se ter realizado prensagem das massas, algo que foi feito no ano seguinte e que levou a um aumento da extração de antocianinas; a possibilidade de que a recolha das amostras possa ter sido realizada passado mais tempo do vinho em conservação, o que poderia realmente diminuir a quantidade de antocianinas livres devido à sua contribuição na formação de novos compostos corados mais polimerizados e resistentes ao efeito descorante do bissulfito<sup>92</sup>; e ainda o efeito que o SO<sub>2</sub> possa ter tido na diminuição da taxa de degradação das antocianinas, fenómeno observado por alguns autores<sup>104</sup> já que, em 2018 o vinho registava um valor maior de dióxido de enxofre que em 2017 (16 g/L, em comparação com 54 g/L). Relativamente ao vinho VT e à diferença do teor de antocianinas livres totais nos dois anos, esta pode ainda dever-se a outros fatores como a composição das próprias uvas utilizadas para produzir este vinho.

Olhando para os valores obtidos pelo VMF e pelo mosto (VMAT) nota-se que há uma descida esperada da concentração de antocianinas livres, devido à sua possível condensação com proteínas e outros compostos<sup>92</sup>, e que se fez notar também na evolução da cor do mosto durante a fermentação.

Uma grande conclusão que se retira destes resultados é que a diferença a nível de concentração de antocianinas entre os dois vinhos é enorme, e pode desvalorizar um pouco o vinho de maceração a frio, pelo que se relembra que uma maceração mais longa e realizada sem percalços pode aumentar este valor, como vemos nos resultados de alguns estudos, por exemplo, M. J. Cejudo-Bastante *et al.*, em 2014, que concluíram que uma maceração a frio de 12 dias em oposição a 8 seria mais produtiva em termos de extração de antocianinas e outros compostos<sup>24</sup>.

## b) HPLC

A Figura 47 apresenta os cromatogramas de ambos os vinhos, VMF e VT, sobrepostos, de modo a perceber melhor as diferenças de concentração das diferentes antocianinas. A Tabela 16 fornece a informação relativa à concentração de cada antocianina 3-monoglucósida em cada amostra, bem como a sua contribuição para a totalidade.



**Figura 46:** Cromatograma obtido por HPLC-DAD das antocianinas 3-monoglucósidas e respetivos derivados nos vinhos VMF (azul) e VT (vermelho).

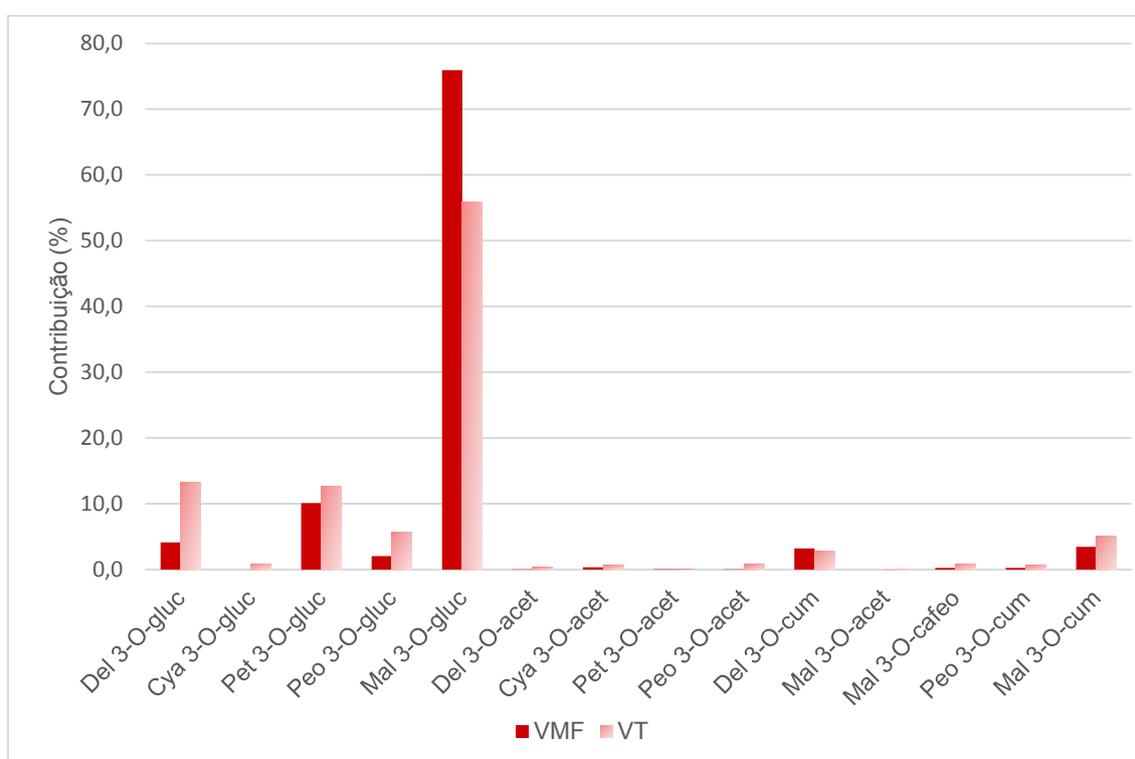
**Tabela 16:** Identificação de cada pico e respetiva concentração e contribuição de antocianina nos vinhos VMF e VT.

Identificação	VMF		VT		
	Concentração (mg/L)	Contribuição (%)	Concentração (mg/L)	Contribuição (%)	
1	3-glucósido de delphinidina	17,8 ± 3,6	4,1	220,9 ± 12,1	13,3
2	3-glucósido de cianidina	Não quantificável		14,5 ± 0,8	0,9
3	3-glucósido de petunidina	44,2 ± 6,1	10,1	210,0 ± 10,6	12,7
4	3-glucósido de peonidina	9,2 ± 0,8	2,1	95,4 ± 4,6	5,7
5	3-glucósido de malvidina	330,1 ± 34	75,9	924,0 ± 43,9	55,9
6	3-acetilglucósido de delphinidina	0,3 ± 0,1	0,05	6,6 ± 0,2	0,4
7	3-acetilglucósido de cianidina	1,6 ± 0,2	0,4	10,6 ± 0,6	0,7
8	3-acetilglucósido de petunidina	0,3 ± 0,2	0,1	2,1 ± 0,2	0,1
9	3-acetilglucósido de peonidina	0,1 ± 0,4	0,02	13,3 ± 0,9	0,8
10	3-cumaroilglucósido de delphinidina	14,2 ± 1,3	3,2	47,3 ± 2,0	2,8
11	3-acetilglucósido de malvidina	Não quantificável		1,0 ± 0,1	0,1
12	3-cafeoilglucósido de malvidina	1,2 ± 0,3	0,3	13,6 ± 0,9	0,8
13	3-cumaroilglucósido de peonidina	1,1 ± 0,7	0,3	11,0 ± 0,7	0,7
14	3-cumaroilglucósido de malvidina	15,3 ± 1,3	3,5	83,8 ± 5,2	5,1

Apenas pela observação da tabela já se notam grandes diferenças entre os vinhos: VT apresenta valores bastante superiores de todos os compostos encontrados na análise por HPLC-DAD, superiores ainda aos valores totais encontrados pelo método do bissulfito (concentração total = 892 mg/L, em comparação com 1654 mg/L determinados por HPLC), como aconteceu com as restantes amostras, como referido anteriormente.

VT registou ainda valores quantificáveis de todas as antocianinas, enquanto que VMF não tem valores quantificáveis de cianidina-3-monoglucósido e malvidina-3-acetilglucósido.

Para se perceber melhor estas diferenças registou-se os valores de contribuição de cada antocianina para a totalidade da concentração nas amostras na Figura 47.



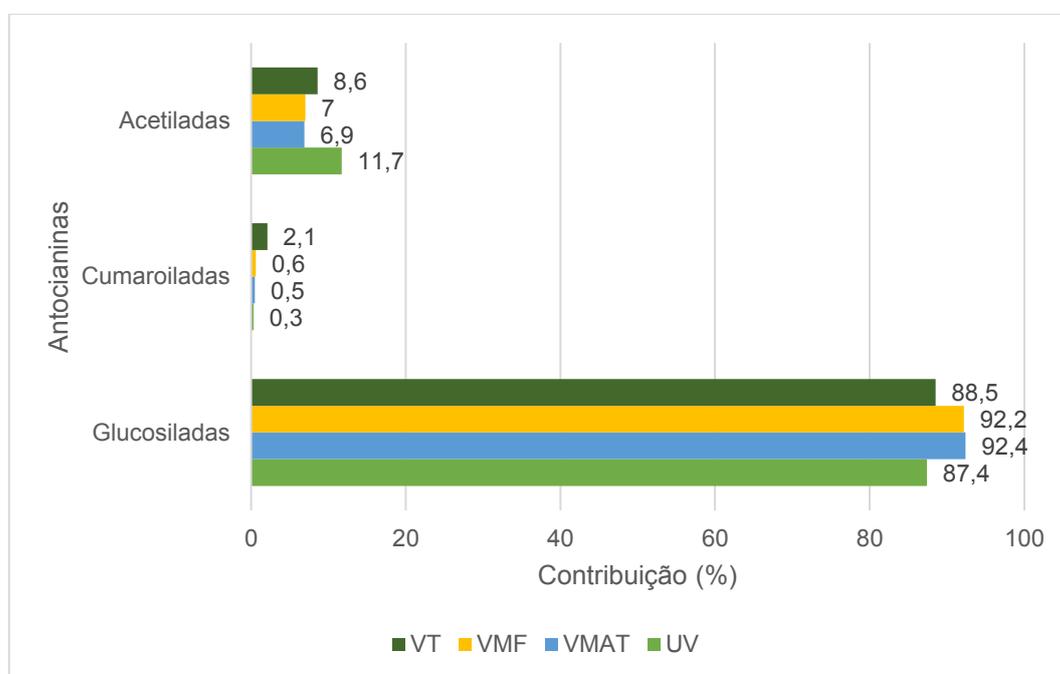
**Figura 47:** Contribuição (em %) de cada antocianina 3-monoglucósida para a concentração total dos vinhos VMF e VT.

Apesar de VT registar valores muito maiores de concentração das antocianinas em geral, a percentagem do glucósido de malvidina é superior em VMF, correspondendo a 76 % da totalidade dos compostos em análise, o que está alinhado com resultados obtidos para outras castas<sup>20,26</sup>, em comparação com 56 % para VT. Este valor para VT é semelhante ao obtido por J.X. Castillo-Sánchez *et al.*, em 2007, para a mesma casta, recolhida na mesma região, registando que a malvidina-3-monoglucósido corresponde a 60 % da totalidade de antocianinas<sup>89</sup>.

A segunda antocianina mais abundante é também diferente em ambos os vinhos, sendo a delphinidina-3-monoglucósido no caso de VT e a petunidina-3-

monoglucósido no caso de VMF. A ordem de abundância de VT está de acordo com os resultados encontrados nas uvas, o que significa que a maceração a frio realmente provoca uma extração de compostos diferente da vinificação tradicional, resultando em vinhos com perfis antociânicos bastante variados.

Em ambos os vinhos, as antocianinas glicosiladas são as mais abundantes, correspondendo a 92,2 % em VMF e 88,5 % em VT da totalidade, estando associadas a uma melhor absorção pelo organismo devido à presença da glicose<sup>105</sup>; são seguidas pelas cumariladas, com 7,0 % em VMF e 8,6 % em VT; e, por fim, as acetiladas, correspondendo a 0,6 % em VMF e 2,1 % em VT. Estes resultados estão completamente de acordo com os encontrados para o mosto (VMAT), com valores de percentagem muito semelhantes a VMF. A Figura 48 demonstra esta relação entre as uvas, o mosto e os vinhos.



**Figura 48:** Contribuição (%) de cada tipo de antocianinas-3-monoglucosilada nas uvas (UV), mosto (VMAT) e vinhos (VMF e VT).

Esta relação parece ser característica da casta Vinhão, visto não se alterar muito desde as uvas até aos vinhos, mesmo com métodos de vinificação diferentes. Estudos com diferentes castas encontraram composições diferentes e perfis antociânicos distintos dos obtidos para a casta Vinhão, mas semelhantes entre si, independentemente do método de vinificação, o que reforça a ideia de que este é um bom marcador para diferenciar as castas. Por exemplo, G. González-Neves *et al.* observaram, para a casta *Tannat*, uma percentagem de 73 % de antocianinas

glicosiladas, 17 % de acetiladas, e 10 % de cumariladas para ambos os vinhos, de vinificação tradicional e maceração a frio, no ano de 2006<sup>26</sup>. Neste caso, a casta em questão apresenta maior percentagem de antocianinas acetiladas que cumaroiladas, enquanto que o contrário é verdadeiro para Vinhão. No entanto, N. Mateus *et al.*, em 2001, observaram algumas variações nesta relação quando variavam a altitude da vinha, sendo que vinhos produzidos com uvas de vinhas a maior altitude, além de possuírem maior teor de antocianinas totais, este valor tinha uma maior percentagem de antocianinas glicosiladas e, portanto, menor de cumaroiladas e acetiladas. Associaram este fenómeno às diferenças de temperatura e, conseqüentemente, humidade, ocorridas às diferentes altitudes<sup>106</sup>.

Pela observação da Figura 48 nota-se ainda que o valor de antocianinas acetiladas é maior nas uvas que nas restantes amostras. Isto pode ser justificado pela capacidade que estas possuem de adsorção às paredes celulares das leveduras, já referido por outros autores<sup>95,107</sup>.

Comparando com o valor de IFT obtido para os vinhos, conclui-se que as antocianinas livres totais obtidas pelo método do bissulfito correspondem a cerca de 76 % da totalidade dos compostos fenólicos. Um valor relativamente maior que o registado para os mostos, de 51 %; no entanto, o valor de IFT dos mostos também era maior, pelo que o que esta relação nos diz é que a percentagem dos outros compostos fenólicos diminuiu na totalidade da amostra, comparativamente com as antocianinas.

### 3.2 Índice de cor vermelha e intensidade corante

A Figura 49 apresenta os dados de intensidade corante para os dois vinhos, VMF e VT, nos dois anos consecutivos.

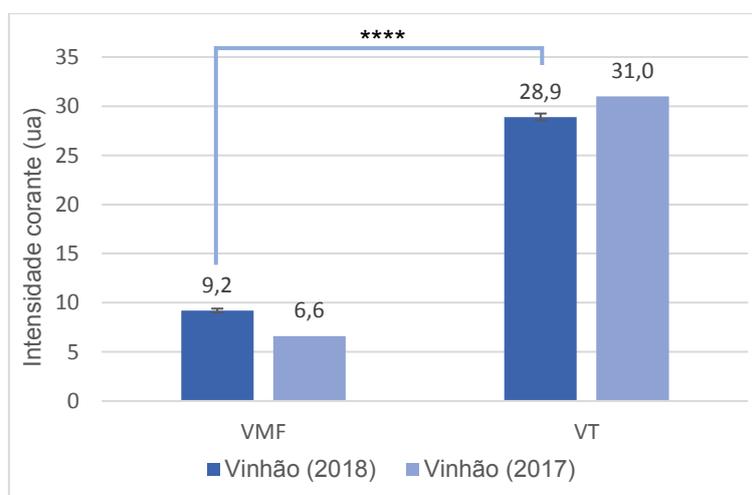


Figura 49: Comparação da intensidade corante dos vinhos (VMF e VT) nos dois anos.

A intensidade da cor do vinho, comparativamente com a do mosto (VMAT), diminuiu (de 13,5 para 9,2 u.a.), o que era de esperar que acontecesse durante a fermentação devido, por exemplo, à condensação de antocianinas com proteínas e fixação de pigmentos na parede celular das leveduras e sua consequente precipitação<sup>92</sup>, provocando uma diminuição da intensidade da cor no vinho. A contribuição da leitura de 520 nm é a maior em ambos os vinhos; no entanto, esta percentagem é menor em VMF que em VT, havendo um aumento na contribuição dos outros comprimentos de onda. Estatisticamente, a diferença da contribuição de cada comprimento de onda e o próprio valor de IC de cada vinho é considerada significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). A Tabela 17 apresenta os dados da contribuição de cada comprimento de onda nos dois vinhos.

**Tabela 17:** Valores de absorvância a 620, 520 e 420 nm de cada vinho.

Vinhão (2018)	VMF	VT
620 nm	1,1	2,8
520 nm	5,0	17,7
420 nm	3,1	8,4

Comparativamente ao ano 2017, os valores de ambos os vinhos são bastante semelhantes, sendo maiores para VMF em 2018, com uma diferença de, aproximadamente, 28 %. Em VT esta diferença cai para os 7 %. A disparidade entre os vinhos, em ambos os anos, era esperada, sendo que a intensidade corante obtida para VMF corresponde a 32 % da obtida para VT. Esta relação está de acordo com os dados obtidos de IFT e concentração de antocianinas para as amostras.

Em 2010, P. Fernandes *et al.* divulgaram valores de IC para a casta Touriga Nacional na ordem dos 12,8 u.a., para vinhos de uvas colhidas na Região dos Vinhos Verdes, provenientes de vinificação tradicional, o que ajuda a realçar a diferença do Vinhão enquanto uma casta tintureira<sup>91</sup>. No mesmo ano, E. S. Vázquez *et al.* observaram que, de facto, havia diferença a nível da intensidade da cor em vinhos da casta *Mencia* quando produzidos por maceração pré-fermentativa a frio ou por vinificação tradicional, tendo a primeira técnica valores mais baixos, embora a diferença entre eles não tenha sido tão grande como no caso do Vinhão<sup>20</sup>. Também I. Araújo *et al.* registaram valores muito semelhantes (IC = 28,4 u.a.) para vinhos da mesma casta, proveniente na mesma região e com o mesmo tipo de vinificação<sup>108</sup>.

A Figura 50 apresenta os valores de índice de cor vermelha obtidos para os dois vinhos no ano de 2018.

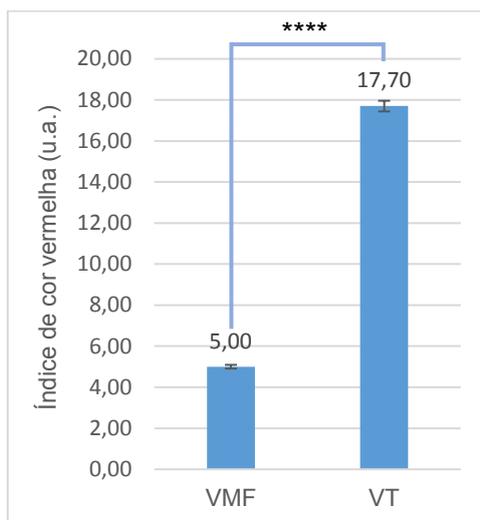


Figura 50: Índice de cor vermelha nos vinhos VMF e VT, em 2018.

A relação do índice de cor vermelha entre os vinhos mantém-se paralela à relação da concentração de antocianinas, bem como a significância da diferença (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ), o que era o esperado visto serem estas os compostos que mais contribuem para a cor vermelha dos vinhos, na medida em que o ICV de VMF corresponde a 28 % do ICV de VT, e esta razão é semelhante no caso da concentração de antocianinas (34 %).

### 3.3 Parâmetros CIELab

Os parâmetros CIELab dos mostos analisados encontram-se na Tabela 18, juntamente com os do ano 2017, bem como uma representação RGB das respetivas cores.

Tabela 18: Parâmetros CIELab e representação RGB da cor dos vinhos de 2018 e 2017.

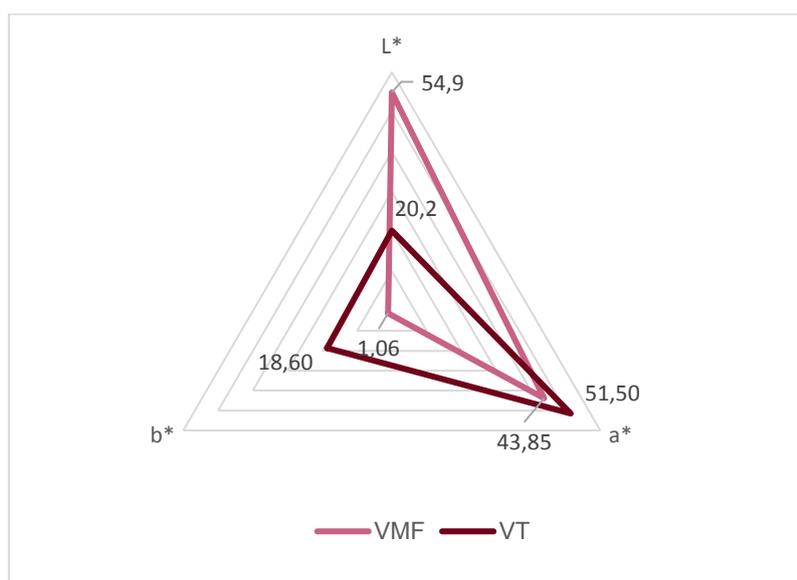
	Amostras	Parâmetros CIELab					Cor
		L*	a*	b*	C*	H°	
Vinhão (2018)	VMF	54,9	43,85	1,06	43,87	1,38	RGB (199,98,132)
	VT	20,2	51,50	18,60	54,75	19,86	RGB (112,0,26)
Vinhão (2017)	VMF	59,2	37,41	4,74	37,71	7,22	RGB (204,115,136)
	VT	20,7	53,56	19,07	56,85	19,59	RGB (116,0,26)

As diferenças entre 2017 e 2018 são mínimas no caso de VT, com valores muito próximos e, possivelmente, indistinguíveis a olho nu, já que se estima que o olho humano apenas consiga distinguir cores com 3,0 ou mais unidade CIELab de

diferença<sup>97</sup>. Já no caso de VMF, estas diferenças são maiores e estão uniformemente espalhadas por todos os parâmetros CIELab, sendo perceptíveis ao olho humano.

Comparando os vinhos, VT apresenta maior tonalidade vermelha ( $a^*$ ) e amarela ( $b^*$ ) que VMF, sendo esta diferença mais significativa nos tons amarelos. No entanto, é provável que, devido ao valor alto de  $a^*$ , a presença dos tons amarelos passe despercebida aquando da observação dos vinhos a olho nu. O VMF de 2018 apresenta maior tonalidade vermelha (facto até referido na Adega, aquando da observação do vinho final) e menos amarela que o de 2017, que são características vantajosas e podem representar uma melhoria, ainda que pequena, do processo.

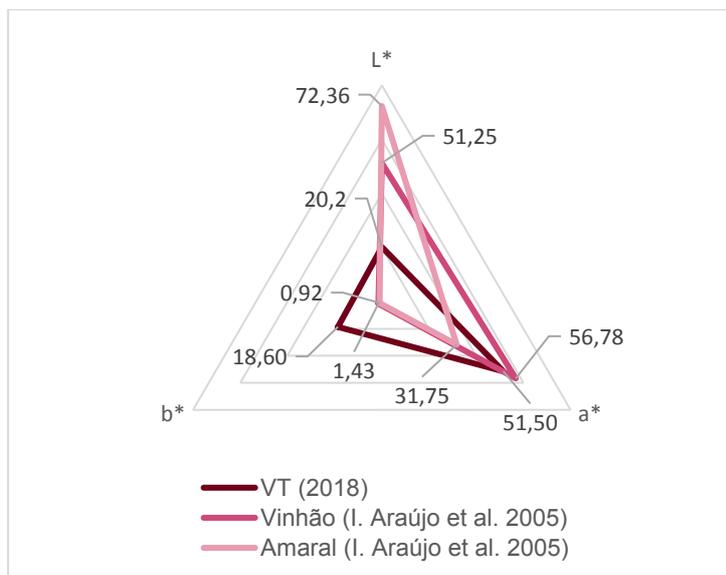
Relativamente à luminosidade ( $L^*$ ), é maior em VMF, sendo mais do dobro da luminosidade de VT, pelo que este último apresentará uma cor mais carregada e escura, como bem se percebe pela representação RGB da tabela anterior, e como era de esperar devido à maior extração de antocianinas, já referido anteriormente. O valor de cromaticidade ( $C^*$ ) é maior em VT, pelo que este apresenta uma cor mais viva relativamente a VMF. Esta diferença entre os vinhos é menor em 2018 que em 2017, indicando que as alterações do processo parecem ter ajudado na obtenção de um vinho de cor mais viva, um atributo de grande importância no sucesso do vinho no mercado. Quanto à tonalidade ( $H^\circ$ ), é bastante maior em VT pelo que tem um maior afastamento da tonalidade vermelha pura em direção ao amarelo. A diferença global entre os dois vinhos de 2018 soma a diferença nos parâmetros  $L^*a^*b^*$  e é  $\Delta E = 39,6$ . Em todos os parâmetros, a diferença é extremamente significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). A Figura 51 ajudará a perceber melhor estas diferenças.



**Figura 51:** Gráfico radar com a comparação dos parâmetros  $L^* a^* b^*$  dos vinhos VMF e VT em 2018.

Em 2005, I. Araújo *et al.*, que estudaram vinhos da mesma casta e de outra (Amaral) obtidos por vinificação tradicional, determinaram valores dos parâmetros um

pouco diferentes dos obtidos para VT, e com algumas semelhanças com VMF. A comparação com esses valores encontra-se na Figura 52.



**Figura 52:** Gráfico radar com a comparação de VT e vinhos Vinhão e Amaral analisados noutra estudo (Características cromáticas de vinhos tintos verdes, Amaral e Vinhão).

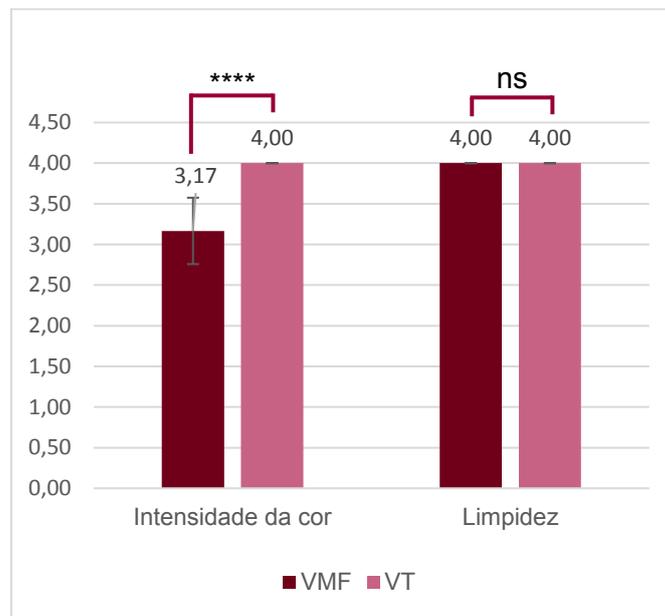
Como se observa pelo gráfico, ambos os vinhos incluídos no estudo de I. Araújo são bastante diferentes de VT que, tal como esses vinhos, foi submetido a uma vinificação tradicional. Aliás, o Vinhão desse estudo parece ser mais semelhante a VMF que a VT, o que parece um pouco estranho. Tal parece indicar que existe algum outro fator a diferenciar os vinhos, que pode ser o facto de terem utilizado um ângulo de utilizador de 2° na análise dos parâmetros de CIELab, em comparação com o ângulo utilizado para VT (10°); e pode ser ainda o tempo decorrido entre o fim da vinificação e a análise dos vinhos, que não é indicado no estudo.

### 3.4 Análise sensorial

Esta análise é importante para perceber o impacto que as diferenças entre os vinhos têm a nível do interesse por parte do consumidor. A análise incluiu uma avaliação visual, olfativa e gustativa pormenorizada e global de cada vinho, utilizando uma escala de 0 a 5 para cada atributo, conforme o indicado na Ficha de Prova.

#### 3.4.1 Avaliação visual

A Figura 53 apresenta os dados obtidos da análise da cor, nomeadamente intensidade corante e limpidez, dos dois vinhos, VMF e VT, em 2018.

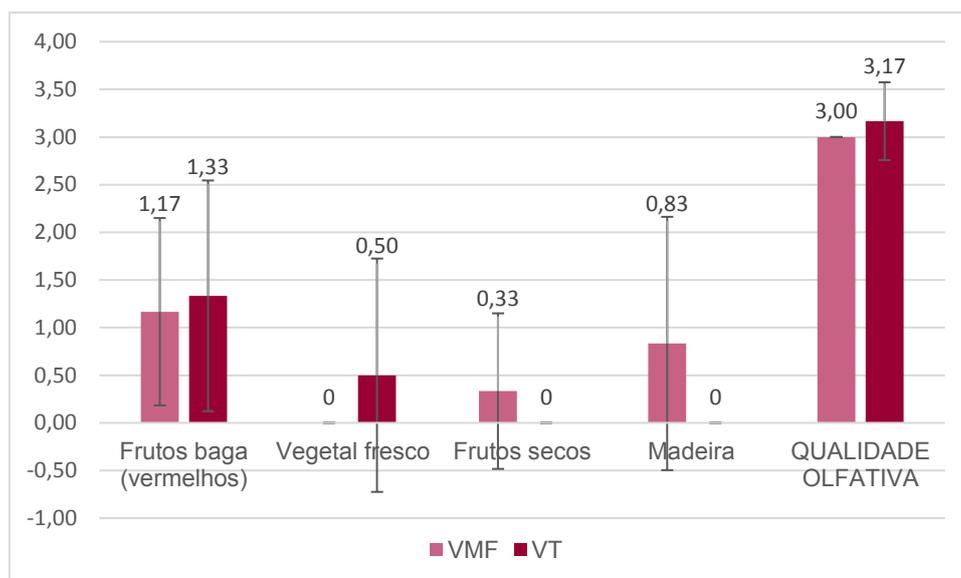


**Figura 53:** Avaliação da intensidade da cor e limpidez dos vinhos VMF e VT.

Note-se que os valores apresentados no gráfico correspondem à média da nota dada pelos seis provadores, daí as duas casas decimais. Como se observa, VT tem maior intensidade de cor percebida pelos provadores, o que é comprovado pelos valores obtidos na análise deste parâmetro. As diferenças são estatisticamente significativas (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). A nível de limpidez, ambos os vinhos obtiveram a mesma nota pelo painel, um resultado igual ao obtido em 2017, e sem diferença significativa (ns,  $p < 0,05$ ).

### 3.4.2 Avaliação olfativa

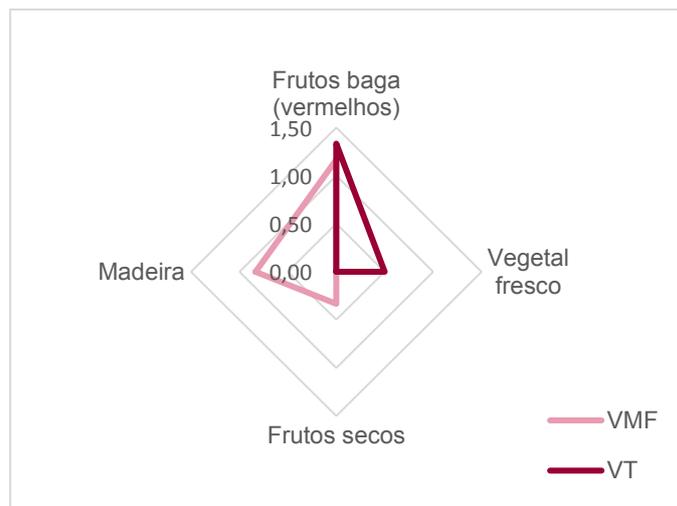
A Figura 54 mostra a avaliação olfativa com recurso aos descritores de aroma encontrados em ambos os vinhos: frutos baga (vermelhos), vegetal fresco, frutos secos e madeira, bem como a avaliação global da qualidade olfativa.



**Figura 54:** Avaliação olfativa pormenorizada e global dos vinhos VMF e VT.

Embora a qualidade olfativa global de VMF e VT seja muito semelhante, diferindo apenas na opinião de um único provador, o perfil olfativo de ambos aparenta ser bastante diferente, embora a diferença de todos os descritores entre os dois vinhos ser não significativa (ns,  $p < 0,05$ ). VMF parece apresentar uma maior diversidade de aromas que VT, ao nele terem sido identificados aromas de frutos secos e madeira que não o foram em VT. O descritor de aroma a madeira é o que apresenta o menor valor de  $p$  ( $p = 0,3417$ ), mostrando que é nesse atributo que há maiores diferenças, ainda que não estatisticamente significativas. Relativamente a VT, este parece apresentar notas de vegetal fresco, ao contrário de VMF. Em relação à perceção de frutos de baga, ambos o apresentam, mas VT com mais intensidade. Tal também aconteceu com os vinhos de 2017. Nenhum dos vinhos foi percecionado como tendo aromas de frutos de árvore ou especiarias.

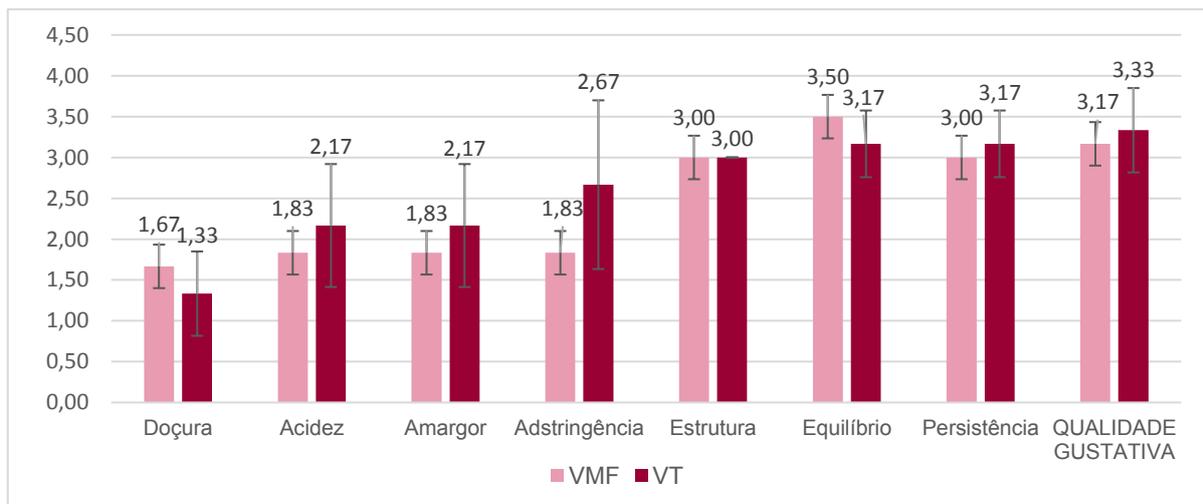
A Figura 55 demonstra esta relação entre os descritores de aroma e os vinhos de forma mais esquemática.



**Figura 55:** Gráfico radar da avaliação olfativa pormenorizada dos vinhos VMF e VT.

### 3.4.3 Avaliação gustativa

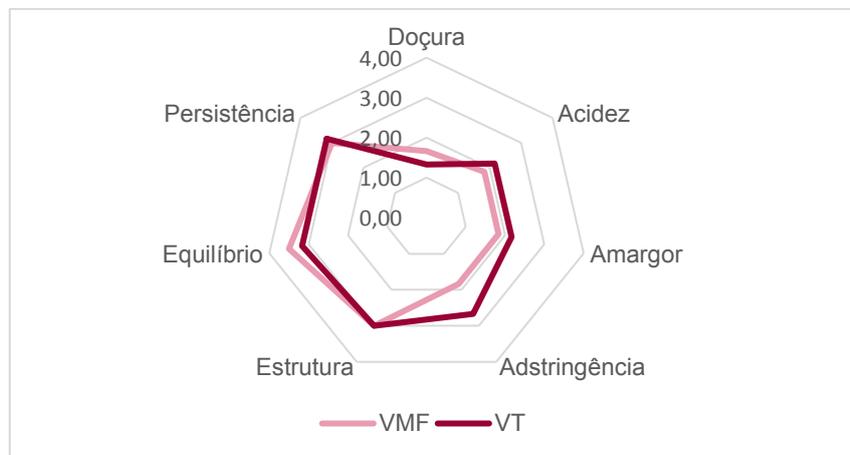
A Figura 56 mostra a avaliação olfativa com recurso aos descritores encontrados em ambos os vinhos: doçura, acidez, amargor, adstringência, estrutura, equilíbrio e persistência, bem como a avaliação global da qualidade olfativa.



**Figura 56:** Avaliação gustativa pormenorizada e global dos vinhos VMF e VT.

A nível gustativo, ambos os vinhos apresentaram as mesmas características, mas com intensidades diferentes: a doçura era maior em VMF, enquanto que a acidez, amargor e adstringência era maior em VT. Relativamente a parâmetros mais gerais, VMF parece apresentar maior equilíbrio e VT maior persistência. A nível de estrutura, ambos os vinhos obtiveram a mesma nota. Globalmente, a qualidade gustativa de VT é ligeiramente melhor que a de VMF, embora a diferença de todos os descritores entre os

dois vinhos ser não significativa (ns,  $p < 0,05$ ). A Figura 57 permite perceber melhor estes dados.



**Figura 57:** Gráfico radar da avaliação gustativa pormenorizada dos vinhos VMF e VT.

Para perceber melhor o impacto sensorial de VMF seria importante realizar a análise sensorial utilizando um painel com um maior número de provadores.

## Loureiro – Uvas (UL)

### 1. Controlo dos parâmetros de vinificação

Não foram realizadas análises às uvas Loureiro antes da sua vinificação.

### 2. Composição polifenólica

As análises foram realizadas ao extrato de uvas obtido por liofilização e trituração de 10 bagos (método descrito na secção Materiais e Métodos).

Os constituintes fenólicos analisados foram os seguintes: Índice de fenóis totais (IFT), concentração de taninos proantociânicos totais, poder tanante e quantificação e caracterização de ácidos orgânicos por HPLC-ESI-MS.

#### 2.1 Índice de fenóis totais

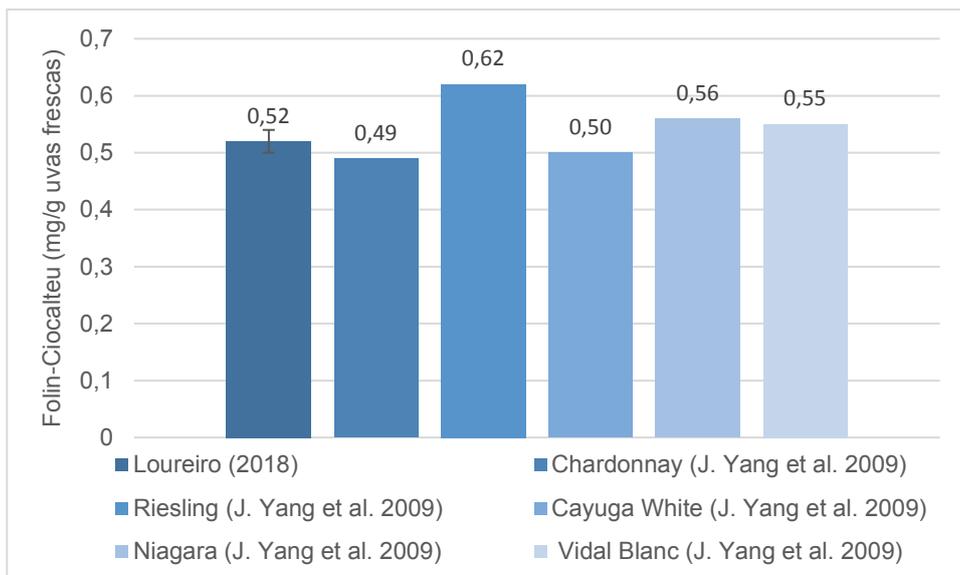
O índice de fenóis totais (IFT) foi analisado por dois métodos: análise da absorvância por espectrofotómetro a 280 nm, e pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Os resultados de ambos os métodos encontram-se na Tabela 19.

**Tabela 19:** Valores obtidos de IFT para as uvas Loureiro, utilizando o método de leitura espectrofotométrica a 280 nm e o método de *Folin-Ciocalteu*.

Índice de fenóis totais (IFT)	
A <sub>280</sub>	<i>Folin-Ciocalteu</i> (mg/L equiv. ác. gálgico)
8,8 ± 0,1	42,1 ± 1,3

O valor de IFT encontrado para o extrato de 10 uvas da casta Loureiro foi de 8,8 pelo método de leitura a 280 nm, e 42,1 mg/L de equivalentes de ácido gálgico pelo método de *Folin-Ciocalteu*, ou 0,52 mg/g de uvas frescas.

A Figura 58 apresenta os dados de IFT para outras castas brancas de forma a facilitar a comparação com o Loureiro.

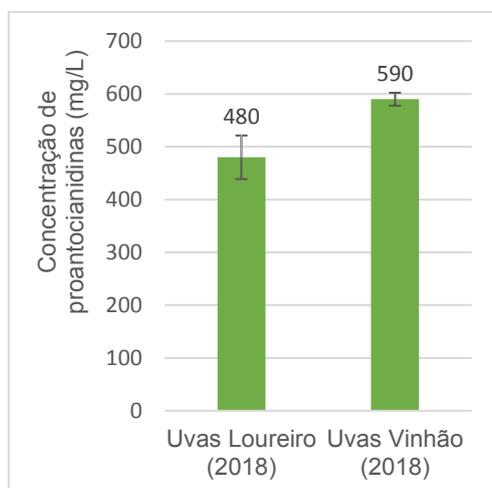


**Figura 58:** Comparação dos valores de IFT obtidos pelo método de *Folin-Ciocalteu* para várias castas brancas.

A composição e quantidade de polifenóis nas uvas pode variar bastante, pois está dependente de fatores genéticos e agronômicos; no entanto, observando o gráfico anterior, nota-se que a diferença entre as castas referidas não é excessivamente grande: a casta em estudo, Loureiro, apresenta um valor de IFT intermédio relativamente às outras castas, sendo a casta *Riesling* a que obteve maior valor de índice de fenóis totais<sup>109</sup>. Em 2015, C. Garcia-Jares *et al.* determinaram o IFT de um extrato grainhas da casta Loureiro, obtendo o valor 112 mg/g de grainhas liofilizadas<sup>110</sup>. Este valor é bastante superior ao obtido utilizando o bago inteiro (2,45 mg/g de uvas inteira liofilizada), o que era de esperar, visto terem utilizado a parte do bago que contém mais compostos fenólicos. No entanto, não permite a comparação com os dados obtidos.

## 2.2 Taninos proantociânicos totais

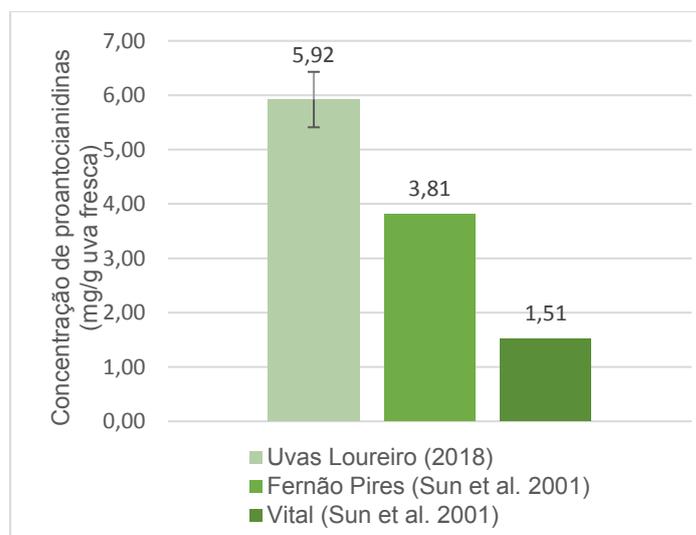
As uvas possuem uma concentração de taninos proantociânicos totais de 480 mg/L. A Figura 59 apresenta a comparação com os dados obtidos das uvas de Vinhão.



**Figura 59:** Comparação das concentrações de proantocianidinas nas uvas Loureiro (branca) e Vinhão (tinta).

O resultado é o esperado, de que as uvas tintas apresentam maior teor de taninos condensados que as brancas, pois estas naturalmente acumulam menos taninos. Esta diferença irá pronunciar-se bastante mais aquando da discussão dos resultados do mosto e vinho final, devido à inexistência de maceração pelicular na produção de vinhos brancos, e consequente baixa extração destes taninos.

Em 2001, Sun *et al.* estudaram o conteúdo em proantocianidinas de várias castas, duas delas variedades brancas: Fernão Pires e Vital. Os resultados desse estudo encontram-se na Figura 60, para melhor comparação com os resultados obtidos para o Loureiro.

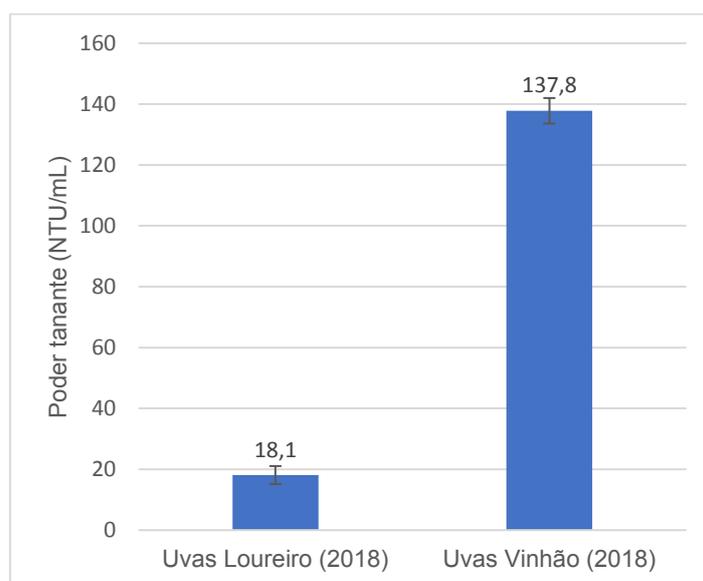


**Figura 60:** Comparação da concentração de proantocianidinas entre diferentes castas brancas: Loureiro, Fernão Pires e Vital<sup>76</sup>.

Observando os valores do gráfico, nota-se uma diferença relativamente grande entre os teores de taninos condensados nas diferentes variedades: Loureiro parece apresentar o maior valor, sendo quase 4x maior que Vital. Fernão Pires aparece no centro, entre as outras duas castas. Estas diferenças podem ser justificadas pelo facto de serem castas diferentes, analisadas em anos diferentes e, portanto, estarem sujeitas a condições muito distintas. Para além disto, Vital e Fernão Pires são castas características de outras regiões que não a Região dos Vinhos Verdes, contrariamente ao Loureiro, o que induz ainda mais variações.

### 2.3 Poder tanante

A leitura do poder tanante do extrato de uvas brancas foi efetuada da mesma forma que nas uvas tintas: quantificação da proteína BSA precipitada por ação dos taninos condensados. Os resultados encontram-se na Figura 61, juntamente com os obtidos para o extrato de Vinhão.



**Figura 61:** Comparação do poder tanante das uvas Loureiro (branca) e Vinhão (tinta).

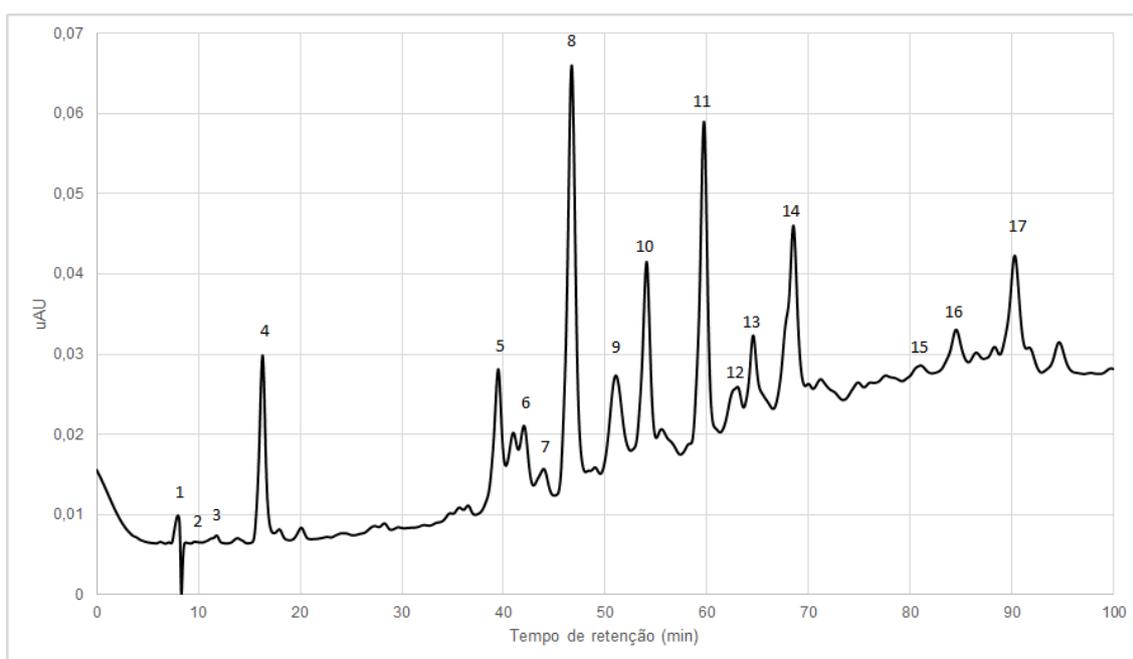
Pela observação do gráfico facilmente se percebe que o poder tanante é esmagadoramente maior no extrato de uvas tintas da casta Vinhão. Isto significa que estas uvas possuem uma capacidade muito maior de precipitar as proteínas e causar a sensação de adstringência, possivelmente por terem uma maior acumulação de proantocianidinas de maior massa molecular que as brancas. Este facto, aliado à inexistência de uma etapa de maceração pelicular na produção do vinho, vai contribuir

para a produção de vinhos brancos com muito pouca capacidade de guarda. Os que a têm deve-se a teores de açúcares ou acidez propícios.

#### 2.4 Quantificação e caracterização de ácidos orgânicos por HPLC-ESI-MS

Identificar os ácidos orgânicos presentes nas uvas é importante para perceber depois, quando comparado com o perfil do vinho, de que forma a vinificação afetou a concentração ou mesmo existência destes compostos no produto final, já que estão associados à prevenção de várias doenças<sup>110</sup>.

O cromatograma resultante da análise das uvas por HPLC-ESI-MS encontra-se na Figura 62, seguido pela Tabela 20 que indica qual poderá ser a identificação do composto segundo os fragmentos causados pela ionização da amostra e respetivo tempo de retenção na coluna.



**Figura 62:** Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas das uvas Loureiro (UL).

**Tabela 20:** Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas das uvas Loureiro (UL).

	Composto	tR (min)	[M] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos (m/z)	Concentração (mg equiv. ác. gálgico/L)
1	Ácido tartárico	7,98	299	149	1,80
	Ácido málico	8,13	133	87; 115	1,80
2	Ácido cítrico	9,75	191	87; 115; 129; 155; 173	2,30
3	Ácido succínico	11,78	117	-	2,35
4	Resveratrol	16,77	227	-	7,13
5	Ácido cafeico + ácido caftárico	41,11	311	179; 132	4,92
6	(epi)catequina-(epi)catequina	43,52	577	203; 245; 287; 289; 299; 327; 408; 426; 437; 452; 515; 533; 559	3,35
7	(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina	45,47	289	109; 125; 149; 165; 180; 203; 206; 231; 245	3,08
8	(Epi)catequina	48,07	289	109; 125; 149; 165; 180; 203; 206; 231; 245	16,99
9	(epi)catequina-(epi)catequina	52,21	577	203; 245; 287; 289; 299; 327; 408; 426; 437; 452; 515; 533; 559	6,52
10	(epi)catequina-(epi)catequina	55,07	577	203; 245; 287; 289; 299; 327; 408; 426; 437; 452; 515; 533; 559	8,00
11	(Epi)catequina	60,46	289	109; 125; 149; 165; 180; 203; 206; 231; 245	12,43
12	(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina	63,54	865	246; 289; 327; 363; 397; 407; 425; 451; 467; 533; 577; 587; 617; 629; 677; 695; 713; 739; 822; 848	3,58
13	(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina	65,03	865	246; 289; 327; 363; 397; 407; 425; 451; 467; 533; 577; 587; 617; 629; 677; 695; 713; 739; 822; 848	3,93
14	(epi)catequina-(epi)catequina-ácido gálgico	68,89	729	269; 289; 299; 340; 381; 407; 425; 433; 451; 516; 541; 559; 577; 603; 630; 669; 686	9,49
15	(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina	81,2	865	246; 289; 327; 363; 397; 407; 425; 451; 467; 533; 577; 587; 617; 629; 677; 695; 713; 739; 822; 848	2,77
16	(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina-ácido gálgico	84,8	1017	313; 451; 525; 559; 575; 677; 729; 739; 847; 865; 891	3,83
17	Glicosídeo de quercetina	90,4	477	151; 179; 301; 302	8,45

Várias conclusões podem advir desta análise: além de estarem presentes vários ácidos orgânicos, existem também várias proantocianidinas (ou taninos condensados) com diferentes graus de polimerização. É de referir que os primeiros compostos a serem

eluídos podem não ter sido completamente identificados ou corretamente quantificados devido à presença de interferentes na coluna, daí que os ácidos tartárico e málico, sendo de presença obrigatória e maioritária na uva, possam não estar totalmente representados.

Os ácidos tartárico, málico e cítrico são os primeiros a aparecer na amostra, como era de esperar visto, teoricamente, corresponderem à maioria dos ácidos orgânicos presentes nas uvas e contribuírem para a definição do pH das mesmas. Durante a maturação das uvas, a concentração de ácido tartárico vai diminuindo, podendo aumentar em período de chuvas<sup>6</sup>. Também o ácido málico é influenciado pelas condições atmosféricas, diminuindo mais rapidamente em regiões mais quentes<sup>68</sup>. A sua presença em teores muito elevados é sinal de uma má maturação e revela-se através de aromas vegetais nos futuros vinhos<sup>6</sup>. De facto, a diminuição da maioria dos ácidos orgânicos durante a maturação é uma realidade e deve-se à respiração da planta<sup>6,68</sup>.

A presença de ácido succínico nas uvas, sendo este um subproduto da fermentação alcoólica, não é bem percebida. O resveratrol, por sua vez, é um metabolito de resposta a fatores de *stress* biótico e abiótico da videira<sup>111</sup>, e um antioxidante de ocorrência natural nas uvas, nomeadamente nas películas<sup>112,113</sup>, pelo que a sua alta concentração parece justificada.

Relativamente às procianidinas detetadas na amostra, a de maior concentração é a (epi)catequina monomérica, com um valor de 29,42 mg/L, seguida do dímero (epi)catequina-(epi)catequina, com 17,87 mg/L, e depois o respetivo trímero, com 13,36 mg/L. Estes compostos aparecem a diferentes tempos de retenção ao longo da análise. Nas uvas existem ainda prodelfinidinas, (epi)galhocatequinas de diferentes dimensões, com duas e três unidades de (epi)catequina, e com concentrações de 9,49 e 3,83 mg/L, respetivamente.

Por fim, as uvas parecem ainda conter glucosídeo de quercetina, um flavonol, em concentrações relativamente altas que, em vinhos tintos, atua paralelamente às antocianinas em reações de copigmentação<sup>61</sup>.

### 3. Análise da cor

#### 3.1 Intensidade corante

A intensidade corante das uvas brancas foi medida com base nas leituras a 320 e 420 nm que, neste caso, são os comprimentos de onda de interesse. O resultado foi IC = 1,36 ± 0,05 u.a., com maior contribuição dos 320 nm, correspondendo a cerca de

92 %. Comparativamente com as uvas tintas apresenta, claramente, uma intensidade de cor muito mais baixa. A Figura 63 apresenta a contribuição de cada comprimento de onda, 320 e 420 nm.

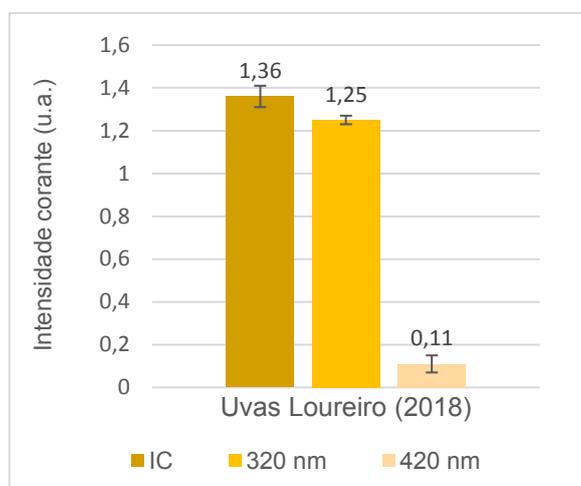


Figura 63: Valores de absorvância a 620, 520 e 420 nm de cada mosto.

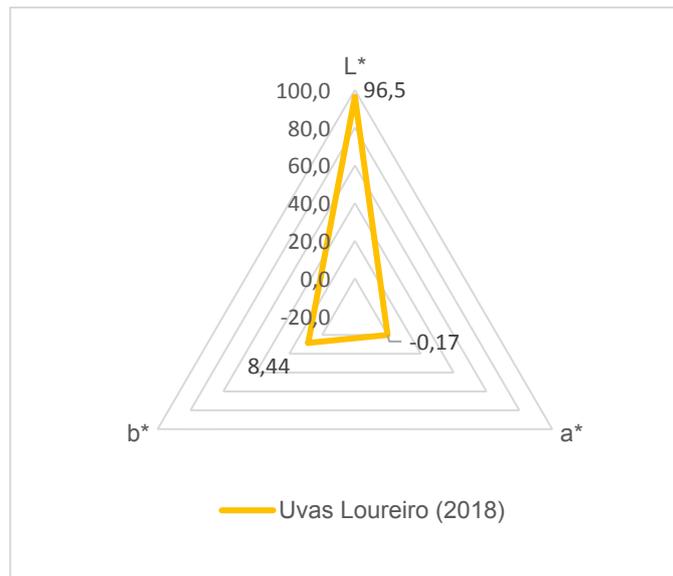
### 3.2 Parâmetros CIELab

Os parâmetros CIELab obtidos encontram-se na Tabela 21. Recorde-se que são correspondentes à cor do extrato de apenas 10 bagos.

Tabela 21: Parâmetros CIELab das uvas Loureiro.

	Parâmetros CIELab				
	L*	a*	b*	C*	H°
Loureiro (2018)	96,5 ± 0,8	-0,17 ± 0,14	8,44 ± 0,33	8,44 ± 0,33	91,13 ± 0,90

Pela leitura das coordenadas CIELab, percebe-se que a amostra do extrato das uvas apresenta um valor negativo do parâmetro a\*, encontrando-se mais perto dos tons verdes; e apresenta um valor de b\* em direção à tonalidade amarela. Relativamente à luminosidade (L\*), apresenta um valor muito alto, quase no valor máximo, pelo que demonstra ter uma cor muito clara. A Figura 64 apresenta estes três parâmetros de forma mais clara.



**Figura 64:** Gráfico radar com as coordenadas L\*a\*b\* do extrato de uvas Loureiro.

O parâmetro  $C^*$  é muito menor que 50, pelo que a cor, como bem se percebe pelos restantes parâmetros e pela representação RGB, não é considerada uma cor viva<sup>92</sup>. O valor de  $H^\circ$  indica que a cor está muito próxima da tonalidade amarelo puro.

## Loureiro - Mostos (LMS, LMC e LMC5)

Nota: alguns parâmetros podem ter a indicação dos valores da amostra LFF, isto é, do vinho no final da fermentação, apenas com o propósito de comparação e análise da evolução da fermentação, visto nessa fase do processo já não se tratar de mosto.

### 1. Controlo dos parâmetros de vinificação

Os parâmetros analisados no mosto são os apresentados na Tabela 22, no dia da sua trasfega do silo para a cuba de fermentação 15F, correspondentes à amostra LMC, isto é, do mosto no início da fermentação.

**Tabela 22:** Resultados das análises físico-químicas realizadas ao mosto de Loureiro (LMC) na ADB.

<b>LMC (CUBA 15F)</b>	
27/set	
Densidade corrigida a 20 °C (g/cm <sup>3</sup> )	1,083
Grau provável	11,2
pH	3,22
Acidez total (g/L)	7,6
Acidez volátil (g/L)	0,07
Acidez fixa (g/L)	7,5
SO <sub>2</sub> Livre (g/dm <sup>3</sup> )	7
SO <sub>2</sub> Total (g/dm <sup>3</sup> )	32
Ácido Málico (g/L)	3,83

O valor da densidade, na ausência da concentração de açúcares, ajuda a perceber em que fase vai o processo, e apenas quando atingir um valor menor que 1,000 g/ cm<sup>3</sup> é que se sabe que a fermentação está terminada. O mosto obteve ainda um grau alcoólico provável de aproximadamente 11 % v/v, relativamente baixo em comparação com o grau pedido no protocolo de vinificação, mas tal não foi possível. Relativamente ao pH, teve um valor de 3,30, associado a uma acidez total de 7,6 g/L. Como se observa na tabela, a acidez volátil é bastante baixa, indicando um valor baixo de ataque pelas bactérias acéticas. Infelizmente não foi feita a análise à concentração de ácido tartárico, mas foi feita sim à do ácido málico, obtendo-se um valor de 3,83 g/L. Calcula-se que a concentração de ácido tartárico seja ainda maior.

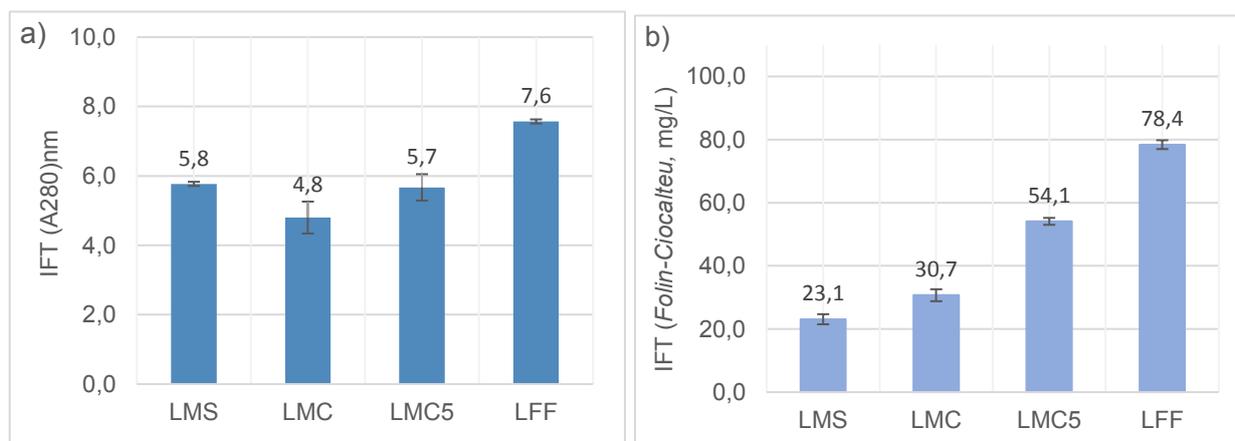
## 2. Composição polifenólica

As análises de composição fenólica foram realizadas ao mosto das amostras LMS (mosto no silo), LMC (mosto na cuba no início de fermentação) e da amostra LMC5 (mosto na cuba 5 dias após o início da fermentação). Por vezes são ainda apresentados os dados do vinho no final da fermentação para perceção da evolução do processo. Os constituintes fenólicos analisados foram os mesmos que para as uvas.

### 2.1 Índice de fenóis totais

Os polifenóis são substâncias muito importantes; porém, nos mostos/vinhos brancos não são desejáveis em grandes quantidades pois podem contribuir com um amargor excessivo e facilitar a oxidação, fornecendo colorações acastanhadas<sup>114</sup>.

Este parâmetro foi novamente analisado pelos mesmos dois métodos: análise da absorvância por espectrofotómetro a 280 nm, e pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Os resultados obtidos, de ambos os métodos encontram-se, respetivamente, nas Figuras 1a) e 1b).



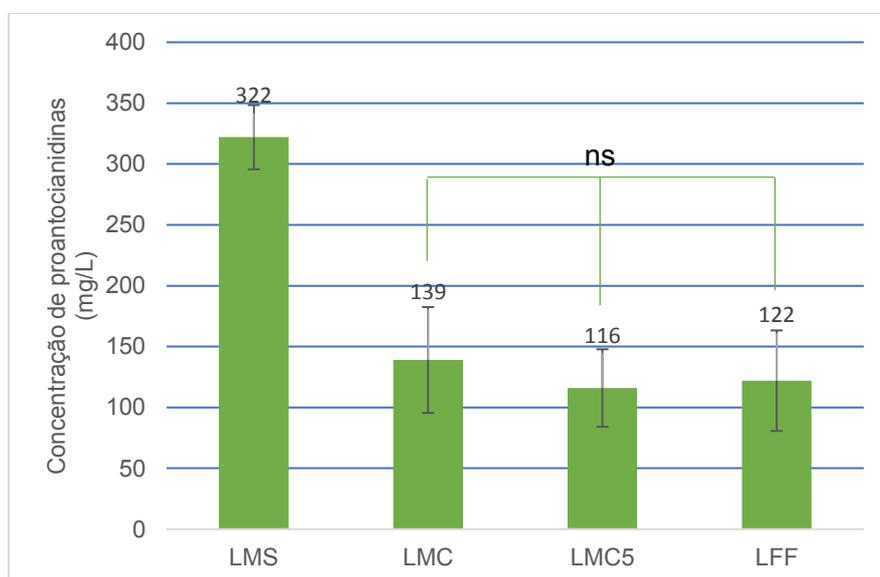
**Figura 65:** Evolução do IFT do mosto, por A280 (a) e Folin-Ciocalteu (b), nos primeiros 5 dias de fermentação.

Como se observa pelo gráfico da leitura a 280 nm, o índice de fenóis totais do mosto desce entre a passagem do silo para a cuba, provavelmente devido ao efeito da flotação na clarificação do mosto. Crê-se que este facto não se observa no método de Folin-Ciocalteu devido a algum erro na análise. Depois desta fase, e nos primeiros 5 dias de fermentação, o valor de IFT sobe. Como não houve contacto com as massas neste período e, portanto, extração de compostos das mesmas, este aumento pode apenas ser justificado pela transferência de compostos fenólicos do *blend* de aparas de madeira adicionado ao mosto aquando do enchimento da cuba.

Em 2004, J. Darias-Martín *et al.* obtiveram valores de IFT  $\approx 5$ , pelo método da leitura a 280 nm, para mosto da casta *Listán Blanco* recolhida nas Canárias, e submetido a valores de pressão próximos dos que foram utilizados para o Loureiro, de aproximadamente 0,5 bar. Estes resultados são muito próximos dos obtidos para LMC, e indicativos de um teor de fenóis totais apropriado.

## 2.2 Taninos proantociânicos totais

A concentração de taninos condensados diminui bastante na passagem do silo (LMS) para a cuba de fermentação (LMC) e depois mantém-se relativamente constante até ao fim da mesma (LFF). A Figura 66 ajuda a visualizar melhor esta evolução.



**Figura 66:** Evolução da concentração de proantocianidinas do mosto desde a saída do silo (LMS) até ao fim da fermentação (LFF).

Desde a saída do mosto do silo e até este se encontrar na cuba de fermentação, há uma descida brusca, em cerca de 57 %, do teor de taninos condensados no mosto. Tal ocorrência faz todo o sentido no seguimento do processo de vinificação do vinho branco e da existência da fase de flotação, como já referido anteriormente, e que tem como objetivo a clarificação do mosto. Para tal foi adicionado um produto enológico de proteína de ervilha (*PK SOL M2*), que tem um efeito positivo na precipitação, e conseqüente diminuição, da concentração de proantocianidinas de baixa massa molecular, como comprovado por outros estudos<sup>115</sup>, diminuindo assim o teor total de taninos proantociânicos do mosto.

Acredita-se que a ligeira diminuição do valor deste parâmetro nos primeiros 5 dias de fermentação se deva a reações de complexação e associação com outros constituintes, provocando a precipitação de mais alguns taninos. Este valor mantém-se, depois, mais ou menos constante até ao fim da fermentação, não havendo diferenças significativas a registar (ns,  $p < 0,05$ ).

### 2.3 Poder tanante

Os valores que o mosto apresenta de poder tanante estão de acordo com o observado no tópico anterior dos taninos proantociânicos totais. A Figura 67 apresenta a evolução desde o mosto no silo, até ao final da fermentação.

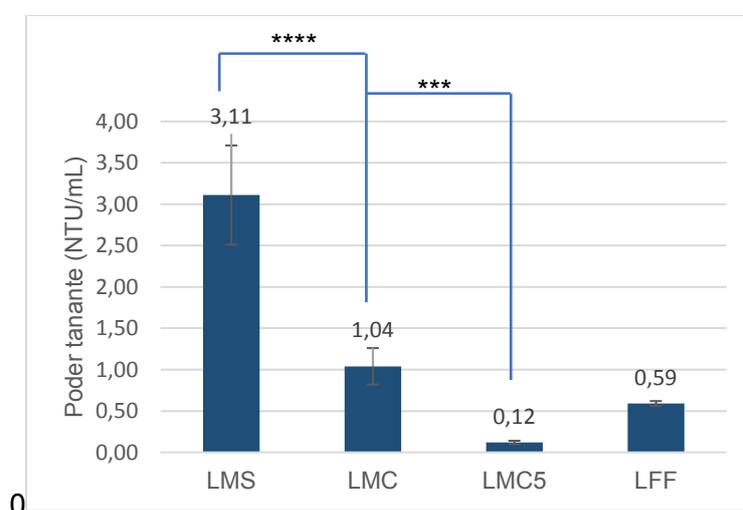


Figura 67: Evolução do poder tanante do mosto desde a saída do silo (LMS) até ao fim da fermentação (LFF).

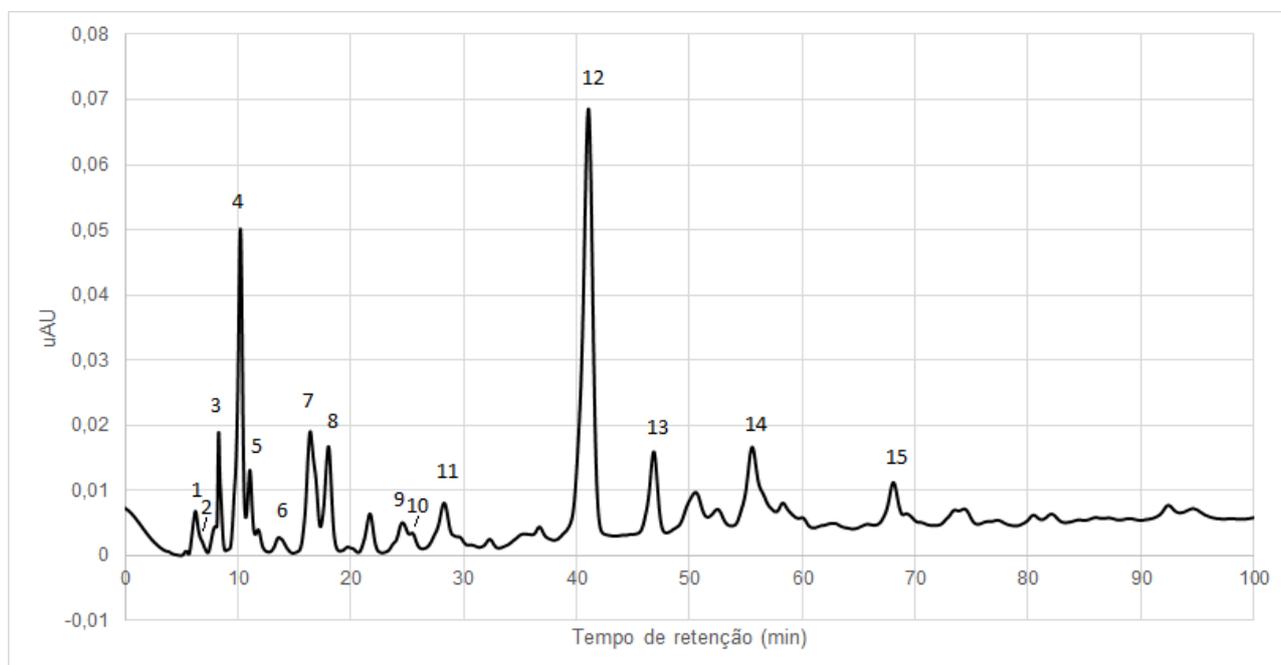
A evolução do poder tanante do mosto está alinhada com a da concentração de proantocianidinas: diminuiu substancialmente da passagem do silo para a cuba devido ao efeito clarificador da flotação e utilização da proteína de ervilha, o que sugere que esta tem efeito em taninos condensados capazes de provocar a precipitação das proteínas. A diferença entre os valores de todos os mostos é significativa (\*\*\*, \*\*\*\*,  $p < 0,05$ ).

Cindo dias após o início da fermentação, o valor do poder tanante é ainda mais baixo que no início da mesma, possivelmente pela mesma razão que faz descer o teor de taninos condensados; no entanto, até ao final da fermentação, o poder tanante aumenta, provavelmente pela ação de transferência de taninos hidrolisáveis do *blend* de madeiras para o mosto, daí este aumento não se registar no teor de proantocianidinas.

## 2.4 Quantificação e caracterização de ácidos orgânicos por HPLC-ESI-MS

Os cromatogramas obtidos para as amostras LMS e LMC não apresentam todos os compostos que deveriam porque a sua análise teve um interferente, e daí que não foram colocados neste capítulo. No entanto, algumas conclusões se podem retirar desta análise: o mosto no silo continua a apresentar resveratrol, embora numa concentração relativamente mais baixa (6,13 mg/L, em comparação com 7,13 mg/L nas uvas); o valor de ácido cítrico mantém-se, bem como o de ácido succínico; o que muda substancialmente é o não aparecimento de proantocianidinas no cromatograma do mosto, ao contrário do das uvas, que apresenta uma grande concentração de catequinas e proantocianidinas poliméricas. Desde a passagem do mosto do silo (LMS) para a cuba (LMC), o valor de ácido cítrico diminuiu; a amostra LMC apresenta ainda um composto desconhecido, de  $[M-H]^- = 1381$  m/z, que se calcula ser uma proantocianidinas, possivelmente galhificada.

A Figura 68 apresenta então o cromatograma do mosto 5 dias após o início da fermentação (LMC5). Logo depois apresenta-se a Tabela 23 que indica qual poderá ser a identificação do composto segundo os fragmentos causados pela ionização da amostra e respetivo tempo de retenção na coluna.



**Figura 68:** Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do mosto após 5 dias de fermentação (LMC5).

**Tabela 23:** Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do mosto após 5 dias de fermentação (LMC5).

	Composto	tR (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos (m/z)	Concentração (mg/L)
1	Ácido tartárico	6,24	149	59; 87; 103	1,81
2	Ácido málico	6,41	133	115	1,81
3	Ácido t-cinâmico	8,30	295	115; 129; <b>147</b>	3,47
4	Ácido cítrico	10,23	191	85; 87; 112; 129; 173	8,89
5	Ácido succínico	11,05	235	<b>117</b>	3,15
6		13,62	235	<b>117</b>	2,94
7	Ácido cafeico	16,41	179	89	6,32
8	Cumarato de metilo	18,02	177	59; 103; 112; 131; 159	4,86
9	Cinamato de metilo	24,59	161	72; 87; 98; 113; 115; 143	2,71
10	Ferrulato de etilo	25,43	221	-	2,37
11	Desconhecido	28,27	206	-	3,88
12	Ácido ascórbico	41,05	175	85; 113; 115; 129; 157	23,27
13	Desconhecido	46,85	1272	973; 1017	5,58
14	Ácido fertárico	55,57	325	113; 131; 149; 193; 208; 282	5,65
15	HexHexNAC	68,07	733	246; <b>366</b> ; 553; 569; 600	3,74

Nesta amostra foram identificados, maioritariamente, ácidos orgânicos, em concentrações muito semelhantes às encontradas nas uvas: o ácido tartárico apresenta a mesma concentração, bem como o ácido málico. Aparecem, no entanto, alguns compostos que não apareciam nas uvas, tais como o cumarato de metilo, cinamato de metilo e ferrulato de etilo, derivados dos ácidos cumárico, cinâmico e ferrúlico, respetivamente. Neste momento do processo de vinificação, o ácido ascórbico é o mais abundante, como aconteceu também nas amostras LMS e LMC, o que é justificado pela sua adição sob a forma de um produto enológico (*Oxyless*), que ajuda a diminuir a quantidade de sulfuroso utilizado devido ao seu efeito protetor da oxidação do mosto.

No mosto LMC5 aparecem ainda dois compostos desconhecidos, com  $[M-H]^- = 206$  m/z e  $[M-H]^- = 1272$  m/z. Crê-se que o segundo seja uma proantocianidina, já que um dos fragmentos (1017 m/z) é uma proantocianidina trimérica galhificada (cat-cat-catgal). O composto HexHexNAC aparece também nesta amostra e nas duas anteriores relativas ao mosto, sendo uma N-acetilglucosamina ligada a uma outra hexose, com concentrações à volta das 3 mg/L.

### 3. Análise da cor

A análise da cor do mosto é importante pois pode ajudar a perceber quais serão as características da cor do vinho, no final do processo. Por esta razão, foi analisada a intensidade corante e determinados os parâmetros CIELab do mosto nas várias fases do processo.

#### 3.1 Intensidade corante

Os valores de intensidade corante do mosto desde o silo até ao fim da fermentação encontram-se ilustrados na Figura 69, onde se pode observar também a contribuição da leitura a ambos os comprimentos de onda (320 e 420 nm).

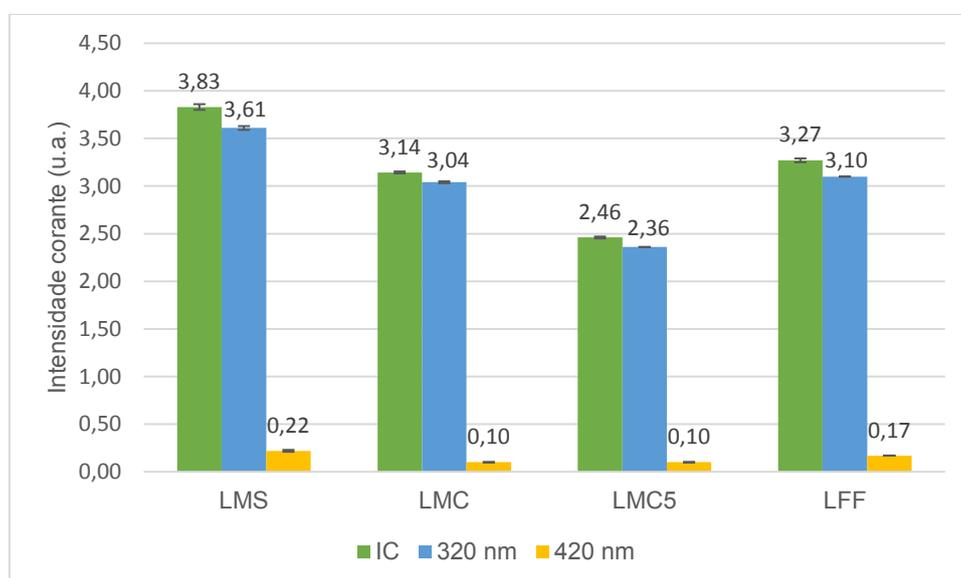


Figura 69: Evolução da intensidade corante do mosto até ao final da fermentação.

A intensidade corante do mosto diminui na passagem do silo para a cuba de fermentação, possivelmente devido ao efeito da flotação na remoção de compostos fenólicos. Esta descida continua até, pelo menos, 5 dias após o início da fermentação. No entanto, o valor no final da fermentação é bastante maior, o que pode ser justificado pela transferência de compostos fenólicos do *blend* de madeiras para o mosto, aumentando a intensidade da sua cor. A diferença entre os valores de todos os mostos é significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ).

Como se observa pelo gráfico, a contribuição de ambos os comprimentos de onda é constante, sendo maior a do 320 nm, como acontece nas uvas, mas ainda com

maiores valores de percentagem (entre 94 e 97 %, em comparação com 92 % nas uvas), não sendo significativo.

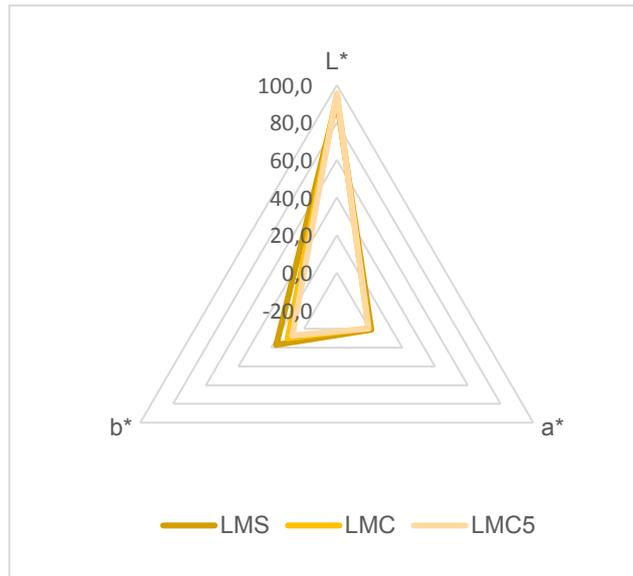
### 3.2 Parâmetros CIELab

Os parâmetros CIELab do mosto no silo (LMS), e na cuba, no início (LMC) e após 5 dias de fermentação (LMC5) encontram-se apresentados na Tabela 24.

**Tabela 24:** Parâmetros CIELab do mosto (LMS, LMC e LMC5).

	Parâmetros CIELab				
	L*	a*	b*	C*	H°
LMS	92,2	1,06	16,93	16,96	86,41
LMC	94,7	-0,54	9,99	10,01	93,03
LMC5	95,6	-0,61	7,14	7,17	94,86

Pela leitura das coordenadas, observa-se um valor de luminosidade (L\*) bastante grande, e que vai aumentando à medida que a vinificação vai evoluindo: aumenta na passagem do mosto do silo para a cuba devido ao efeito clarificador da flotação, e aumenta um pouco mais nos primeiros 5 dias de fermentação, mantendo-se depois constante até ao fim da mesma. Diferenças significativas foram encontradas entre LMS e LMC (\*\*,  $p < 0,05$ ), ao contrário da relação entre LMC e LMC5, que não obteve diferenças significativas (ns,  $p < 0,05$ ). Relativamente ao parâmetro a\*, observa-se, mais uma vez, uma mudança entre LMS e LMC, na medida em que este valor diminui e entra nos valores negativos, em direção à tonalidade verde, não havendo, no entanto, diferenças significativas entre eles (ns,  $p < 0,05$ ). Quanto a b\*, também sofre uma diminuição significativa no mesmo período (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ), afastando-se da tonalidade amarela. A relação destes parâmetros entre as três amostras encontra-se na Figura 70.



**Figura 70:** Gráfico radar com as coordenadas L\*a\*b\* do mosto no silo (LMS), na cuba no início da fermentação (LMC) e após 5 dias (LMC5).

A cromaticidade ( $C^*$ ) varia muito similarmente a  $b^*$ , e com valores muito baixos e longe do 50 para serem consideradas cores vivas<sup>92</sup>; já a tonalidade ( $H^\circ$ ) varia inversamente, tendo aumentado neste período e ultrapassado a marca dos  $90^\circ$ , que corresponde à tonalidade amarelo puro, distanciando-se do vermelho e em direção ao azul, mas ainda na zona do amarelo. No entanto, entre LMC e LMC5, tal como acontece em  $L^*$ , não existem diferenças significativas (ns,  $p < 0,05$ ).

## Loureiro - Vinhos (LP e LT)

### 1. Controlo dos parâmetros de vinificação

Os parâmetros analisados no mosto são os mesmos determinados nos mostos, e estão apresentados na Tabela 25 para o vinho Loureiro *Premium* (LP).

**Tabela 25:** Resultados das análises físico-químicas realizadas ao vinho Loureiro Premium (LP) na ADB.

LP (CUBA 55)	
23/nov	
Densidade corrigida a 20 °C (g/cm <sup>3</sup> )	0,9890
Grau alcoólico (% v/v)	13,7
pH	3,46
Acidez total (g/L)	5,4
Acidez volátil (g/L)	0,31
Acidez fixa (g/L)	5,0
SO <sub>2</sub> Livre (g/dm <sup>3</sup> )	39
SO <sub>2</sub> Total (g/dm <sup>3</sup> )	86
Ácido Málico (g/L)	s/ málico
Açúcares (g/L)	0,29

A densidade é consideravelmente mais baixa que a obtida para o mosto devido à transformação dos açúcares durante a fermentação alcoólica; para além disso, baixou ainda após o fim da fermentação devido à trasfega e remoção das borras grossas. O grau alcoólico é consideravelmente maior que o grau provável obtido para o mosto possivelmente devido a erros na análise deste último. O pH aumentou devido à ocorrência da fermentação malolática e consequente transformação do ácido málico em láctico, um ácido mais fraco. A par disto a acidez total diminuiu também, como esperado, e a acidez volátil aumentou, significando que o ataque das bactérias acéticas é maior no vinho que no mosto. O teor de dióxido de enxofre aumentou pois já procedimento normal regular este parâmetro conforme o necessário para manter o vinho protegido durante a sua conservação.

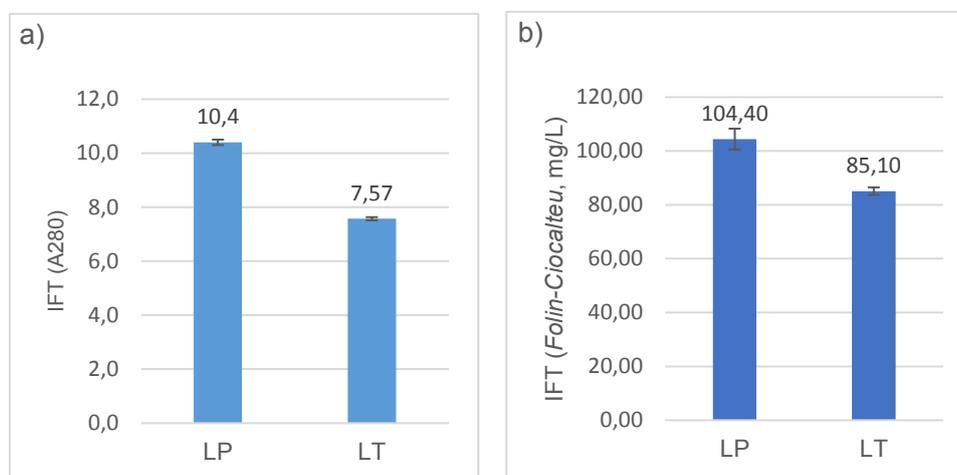
Comparativamente ao LT, este último apresenta um valor de pH mais baixo e, portanto, uma acidez total ligeiramente maior (6,2 g/L, em comparação com 5,4 g/L de LP); a acidez volátil é, no entanto, menor, estando este vinho mais protegido das bactérias acéticas. A nível de açúcares, LP apresenta um valor menor (0,29 g/L), em comparação com LT (0,52 g/L).

## 2. Composição polifenólica

As análises de composição fenólica foram realizadas a ambos os vinhos, LP e LT. Os constituintes fenólicos analisados foram os mesmos que para as uvas e mostos.

### 2.1 Índice de fenóis totais

Este parâmetro foi novamente analisado pelos mesmos dois métodos: análise da absorvância por espectrofotómetro a 280 nm, e pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Os resultados para ambas as amostras, de ambos os métodos encontram-se, respetivamente, nas Figuras 71a) e 71b).



**Figura 71:** Comparação dos valores de IFT dos vinhos Loureiro Premium (LP) e Loureiro Tradicional (LT), por A280 (a) e Folin-Ciocalteu (b).

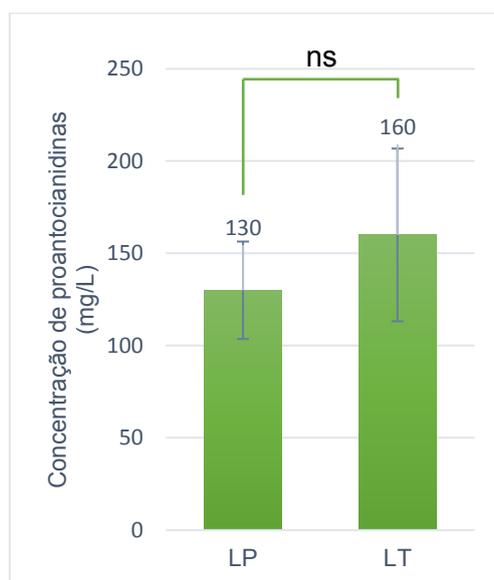
Observando a comparação dos resultados obtidos para ambos os vinhos nota-se que LP apresenta um maior teor de fenóis totais, possivelmente resultante da fermentação em contacto com as aparas e aduelas de madeira, e consequente transferência de compostos fenólicos destes para o vinho. A diferença entre os vinhos, nas duas determinações, é extremamente significativa (\*\*\*\*,  $p < 0,05$ ). Esta diferença é visível nos resultados de ambos os métodos. Desde o fim da fermentação (LFF) que o valor de IFT subiu em cerca de 50 %, resultante do contacto prolongado com as borras finas e com o *blend* de madeiras, que foram transferidos para a cuba de conservação juntamente com o vinho.

Comparativamente a resultados obtidos em outros estudos, o valor de IFT parece ser relativamente baixo: M. N. Mitić *et al.* em 2010 com vinhos brancos sérvios<sup>116</sup>, e N. Paixão *et al.* em 2007 com vinhos brancos madeirenses<sup>117</sup>, parecem ter registado valores muito próximos de índice de fenóis totais para vinhos brancos de diferentes

castas, com valores médios entre 300 e 340 mg/L, cerca de 3x mais que o obtido para o Loureiro. No entanto, o tempo de conservação de cada vinho anterior à análise não é claro em ambos os estudos, e crê-se que mais fatores possam ter tido efeito, para além dos habituais fatores genéticos e culturais<sup>116</sup>. Outra razão para estes valores serem um pouco mais baixos que em outros estudos pode ser o facto de o mosto ter sido oxigenado devido a suspeitas de produção de sulfureto de hidrogénio (o conhecido aroma a ovos podres), e tal procedimento parece ter resultado em valores de IFT menores também em outros estudos<sup>118</sup>.

## 2.2 Taninos proantociânicos totais

A concentração de taninos condensados de ambos os vinhos encontra-se na Figura 72.



**Figura 72:** Concentração de proantocianidinas em ambos os vinhos, LP e LT.

Como se observa pelo gráfico, o vinho LP apresenta menor concentração de proantocianidinas, correspondendo a cerca de 81 % do valor de LT. Isto parece ir ao contrário dos dados encontrados de fenóis totais, mas na verdade essa diferença no IFT pode ser justificada pela utilização de madeira na vinificação de LP, como referido anteriormente; no entanto, a relação dos taninos condensados é inversa pois os taninos que a madeira fornece são os denominados hidrolisáveis, e não contribuem para este valor. Sendo assim, aparenta que o vinho LT apresenta maior valor destes taninos, possivelmente devido a diferenças na composição das uvas que lhe deram origem, e

não propriamente a diferenças no processo de vinificação. No entanto, a diferença entre os valores não é considerada significativa (ns,  $p < 0,05$ ).

No entanto, estes valores são maiores que os obtidos para o índice de fenóis totais, o que parece não fazer muito sentido e, por isso, e em conjunção com os valores obtidos por outros estudos em outras castas, se pensa que o método de *Folin-Ciocalteu* parece admitir alguns erros.

### 2.3 Poder tanante

Os resultados do poder tanante de ambos os vinhos encontram-se na Figura 73.

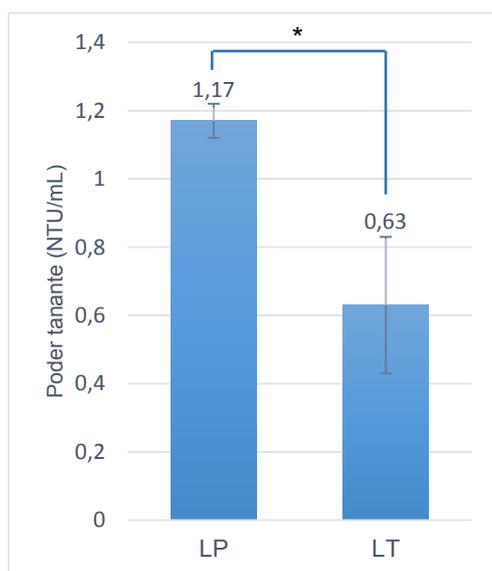
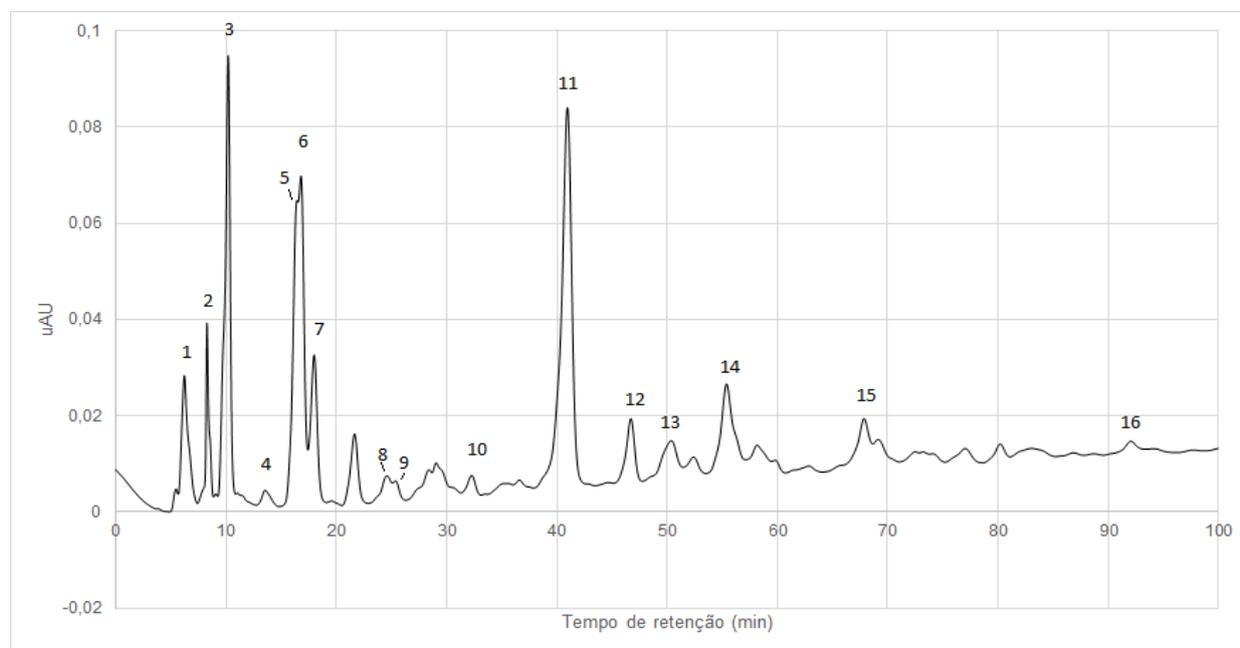


Figura 73: Poder tanante de ambos os vinhos, LP e LT.

O poder tanante de LP é quase 2x maior que o de LT. Devido aos resultados de concentração de taninos condensados, tal facto é justificado pela contribuição de taninos por parte da madeira que, embora sejam hidrolisáveis, contribuem para o poder tanante atuando na precipitação de proteínas e causando a conhecida sensação de adstringência. Note-se que estes valores, embora diferentes, podem não ser suficientemente grandes para causar um grande efeito a nível sensorial, correspondendo a uma diferença significativa, mas de baixo grau (\*,  $p < 0,05$ ), o que mais à frente se irá comprovar pela análise sensorial dos vinhos.

## 2.4 Quantificação e caracterização de ácidos orgânicos por HPLC-ESI-MS

A Figura 74 apresenta o cromatograma obtido para o vinho LP, cuja legenda se encontra na Tabela 26, logo de seguida.



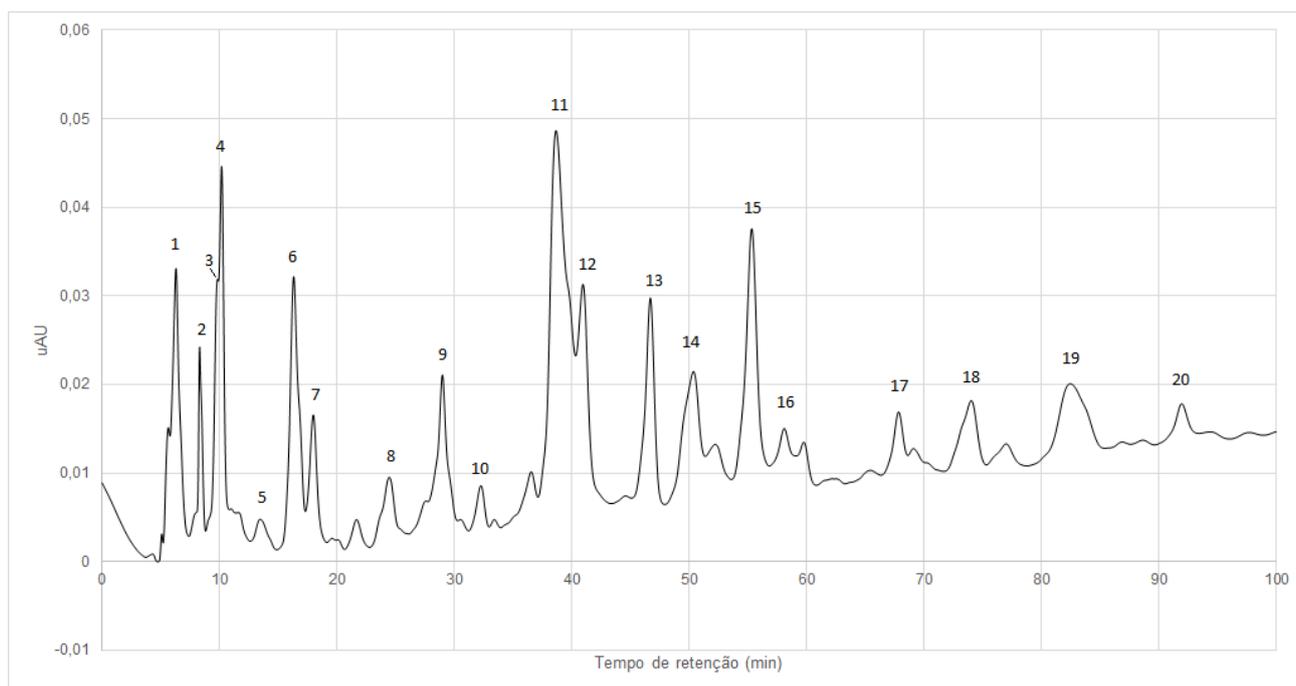
**Figura 74:** Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro *Premium* (LP).

**Tabela 26:** Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro *Premium* (LP).

	Composto	tR (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos (m/z)	Concentração (mg/L)
1	Ácido tartárico	6,23	299	149	7,24
2	Ácido málico	8,28	133	115	5,18
3	Ácido tartárico + málico	10,21	149 / 133	115	17,10
4	Ácido succínico	13,56	235	117	3,11
5	Cumarato de metilo	16,44	177	59; 87; 102; 103; 117; 131; 161	3,32
6		16,80			4,44
7		18,00			6,03
8	Cinamato de metilo	24,60	161	71; 82; 87; 113; 115; 133; 143	2,74
9		25,38			2,47
10	Desconhecido	32,29	219	-	3,15
11	Ácido ascórbico	40,96	175	85; 113; 127; 129; 157	28,11
12	Ácido t-cinâmico	46,71	147	-	5,68
13	Ácido cafeico	50,39	179	89	4,63
14	Ácido fertárico	55,39	325	113; 131; 149; 193; 208; 282	8,38
15	HexHexNAC	67,89	733	366; 389; 429; 478; 569	4,01
16	Ácido múcico	92,06	209	79; 153	2,94

É importante referir que o pico nº 3 se refere à saída de ambos, ácidos tartárico e málico, simultaneamente, ou num intervalo de tempo que impossibilitou a separação dos dois, daí que a concentração de 17,10 mg/L é a totalidade dos dois. Muitos compostos são os mesmos encontrados, principalmente, no mosto, tais como ácido cafeico, cumarato e cinamato de metilo, e ainda o ácido fértrico, mas em concentrações ligeiramente maiores.

A Figura 75 apresenta, agora, o cromatograma obtido para o vinho LT, cuja legenda se encontra na Tabela 27.



**Figura 75:** Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro Tradicional (LT).

**Tabela 27:** Possível identificação de cada pico e respetiva concentração dos ácidos orgânicos e proantocianidinas do vinho Loureiro Tradicional (LT).

	Composto	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos (m/z)	Concentração (mg/L)
1	Ácido tartárico	6,29	149	-	5,90
2	Ácido málico	8,31	133	71; 75; 90	4,10
3	Ácido málico	9,83	133	71; 75; 90	2,72
4	Ácido tartárico	10,17	299	149	4,24
5	Ácido succínico	13,45	235	117	2,77
6	Cumarato de metilo	16,29	177	59; 87; 102; 103; 117; 131; 159	9,12
7		17,98			4,61
8	Cinamato de metilo	24,43	161	71; 82; 87; 113; 115; 133; 143	4,36
9	Desconhecido	28,95	382	115; 135; 187; 206; 232; 251; 266	6,26
10	Desconhecido	32,23	219	-	3,39
11	(epi)catequina-(epi)catequina	38,62	577	203; 245; 258; 287; 299; 328; 340; 381; 407; 425; 437; 451; 468; 493; 517; 533; 559	15,91
12	Ácido ascórbico	40,92	175	85; 113; 115; 129; 147	5,27
13	Ácido t-cinâmico	46,64	147	-	8,56
14	Ácido cafeico	50,32	179	89	7,12
15	Ácido fertárico	55,26	325	113; 131; 149; 193; 208; 282	11,24
16	Desconhecido	58,07	1359	560; 906; 1017; 1085; 1254; 1264	3,18
17	HexHexNAC	67,79	733	281; 366; 414; 450	3,75
18	Cinamato de metilo	73,93	161	71; 82; 87; 113; 115; 133; 143	5,88
19	Desconhecido	82,49	1444	892; 1119; 1203; 1233; 1269; 1313; 1396; 1402	7,91
20	Ácido múcico	82,49	209	79; 153	3,64

A composição do vinho LT é bastante semelhante à do vinho LP, na medida em que a maior parte dos compostos são os mesmos, mas, por vezes, em concentrações diferentes: LP parece ter uma maior concentração de ácido tartárico, málico e succínico; no entanto, LT apresenta maior concentração de ácidos cafeico, cinâmico e fertárico. Relativamente ao ácido ascórbico, está presente em ambos os vinhos, mas em concentrações muito superiores em LP, correspondendo a 5,3 x o valor de LT. Esta diferença resultará da utilização do produto *Oxyless*, como já foi referido anteriormente, na vinificação do vinho Loureiro *Premium*.

O pico nº 3 do cromatograma de LP, já referido anteriormente, e que corresponde à saída dos ácidos tartárico e málico, encontra correspondência nos picos nº 3 e 4 do cromatograma de LT que eluíram separadamente. O vinho Loureiro Tradicional apresenta a eluição de um composto desconhecido, de [M-H]<sup>-</sup> = 382 m/z, aos 28,95

minutos, com concentração relativamente alta (6,26 mg/L) e que não aparece em LP; no entanto, ambos apresentam um outro composto desconhecido por volta dos 32,20 minutos, com  $[M-H]^- = 209$  m/z, com concentrações muito semelhantes. LT apresenta ainda uma (epi)catequina dimérica em concentrações significativas, contrariamente a LP onde não se observa tal composto. Aos 58 minutos, LT volta a apresentar um composto desconhecido com  $[M-H]^- = 1359$  m/z, que se crê ser uma proantocianidina, já que um dos fragmentos (1017 m/z) é uma proantocianidina trimérica galhificada (cat-cat-catgal).

Tal como no mosto, ambos apresentam N-acetilglucosamina ligada a uma outra hexose (HexHexNAC) em concentrações semelhantes, embora ligeiramente maior em LT. Em LT existe ainda outro composto, possivelmente proantocianidinas, com  $[M-H]^- = 1444$  m/z, que não parece aparecer em LP; no entanto, ambos têm concentrações relativamente baixas de ácido múcico, sendo maior em LT. Tal ácido parece ser característico em uvas afetadas pelo fungo *Botrytis cinerea*, o responsável pela conhecida “podridão cinzenta”<sup>119</sup>, o que é um pouco estranho visto não se ter detetado este composto nas uvas.

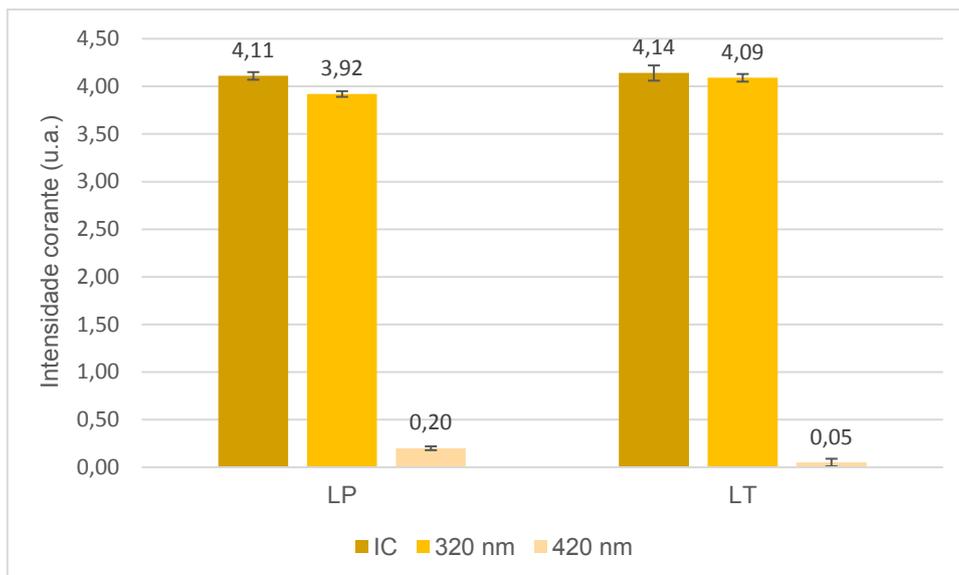
De forma geral, LT parece apresentar maior variedade de compostos orgânicos, enquanto que LP os apresenta em maior quantidade, de forma global, o que parece estar de acordo com os teores de fenóis totais analisados. Vários compostos registados em ambos os vinhos, tais como a maioria dos ácidos, foram também registados em outros estudos com vinhos de diferentes castas brancas<sup>120</sup>; no entanto, quase todos identificaram ácido gálico, embora em baixas quantidades<sup>117,120</sup>, o que não foi observado em nenhuma das amostras de uva, mosto ou vinho da casta Loureiro.

### 3. Análise da cor

A análise da cor do produto final, o vinho, é bastante importante já que esta é uma característica indicativa do estado e qualidade do produto, e tem forte impacto na receção pelo consumidor.

#### 3.1 Intensidade corante

A Figura 76 apresenta os resultados da intensidade corante de ambos os vinhos, bem como a respetiva contribuição de cada comprimento de onda, 320 e 420 nm.



**Figura 76:** Valores de intensidade corante e contribuição de cada comprimento de onda (320 e 420 nm) em ambos os vinhos, LP e LT.

Como se observa pelo gráfico, a intensidade corante dos vinhos é bastante semelhante, havendo apenas uma diferença de, aproximadamente, 0,05 %. No entanto, a contribuição dos diferentes comprimentos de onda apresenta mais diferenças: LP parece apresentar uma maior contribuição dos 420 nm que LT, correspondendo a 5 % do IC, comparativamente a 1 % de LT, não correspondendo a diferenças significativas no valor total e nas contribuições dos dois comprimentos de onda (ns,  $p < 0,05$ ).

Desde meados da fermentação que IC tem vindo a subir, estando maior que o valor obtido no final da fermentação, possivelmente devido à extração de compostos da madeira. Talvez seja mesmo esta a explicação para justificar as diferenças entre ambos os vinhos, visto LT não ter estado em contacto com madeira.

### 3.2 Parâmetros CIELab

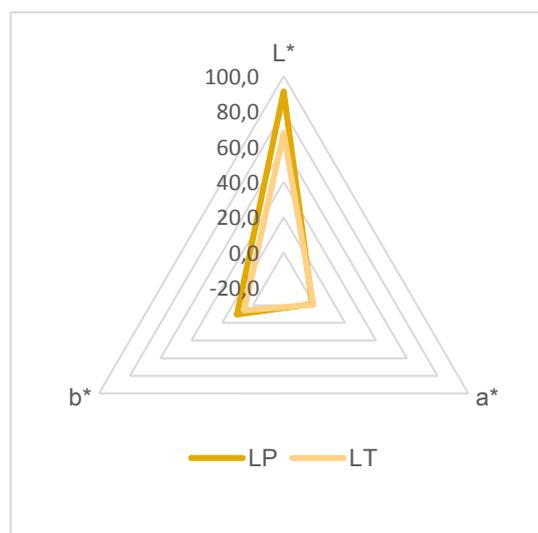
Os parâmetros CIELab de ambos os vinhos, LP e LT, encontram-se apresentados na Tabela 28.

**Tabela 28:** Parâmetros CIELab dos vinhos LP e LT.

	Parâmetros CIELab				
	L*	a*	b*	C*	H°
LP	91,3	-1,42	10,34	10,44	97,79
LT	67,7	-0,71	5,66	5,71	97,18

O valor da coordenada a\* de ambos os vinhos é relativamente semelhante, sem diferença significativa (ns,  $p < 0,05$ ), e encontram-se do lado negativo, pelo que estão

mais perto da tonalidade verde; observando os valores de  $b^*$ , este parâmetro é maior em LP, o que significa que este vinho apresenta maior tonalidade amarela que LT. Relativamente à luminosidade ( $L^*$ ), é significativamente maior em LP, em cerca de 26 %, correspondendo a uma diferença bastante significativa (\*\*\*,  $p < 0,05$ ), significando que este apresenta um vinho mais claro que LT. A relação entre estes três parâmetros nos dois vinhos encontra-se na Figura 77, para facilitar a observação das diferenças entre eles, e que tem um valor global de  $\Delta E = 24,07$ .



**Figura 77:** Gráfico radar com as coordenadas  $L^*a^*b^*$  de ambos os vinhos, LP e LT.

Quando se observa a cromaticidade ( $C^*$ ), repara-se que evolui paralelamente a  $b^*$ , mantendo-se a relação entre os vinhos; no entanto, nenhum é considerado de cor viva, o que se mantém desde as uvas<sup>92</sup>; Relativamente à tonalidade ( $H^\circ$ ), o valor de ambos os vinhos encontra-se bastante perto do amarelo puro, embora mais desviados em direção ao verde que ao vermelho, não existindo diferenças significativas (ns,  $p < 0,05$ ).

Outros estudos em vinhos brancos determinaram valores de  $L^*$  e  $H^\circ$  bastante semelhantes aos de LP e, portanto, semelhantes também aos de LT, sem utilização de madeira, o que parece ser um claro sinal que estes parâmetros não são dependentes desta técnica de vinificação<sup>121</sup>; outros ainda registaram valores de  $b^*$  bastante superiores (até 5x maior) que LP, o que provavelmente são diferenças justificadas pelo facto de serem castas diferentes<sup>122</sup>. J. J. Darias-Martín *et al.* encontraram valores para *Listán Blanco* semelhantes aos obtidos para LT, exceto no parâmetro da luminosidade, que era mais parecido com o obtido para LP<sup>123</sup>. A conclusão que se tira destas comparações é que muitas podem ser as variáveis que alteram os parâmetros da cor,

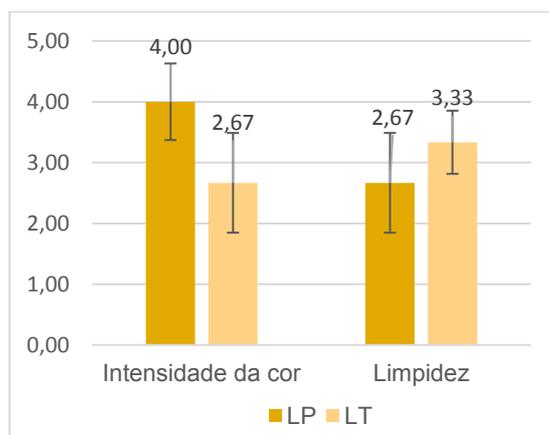
mas que as principais serão as características intrínsecas da casta<sup>121</sup> e o método de vinificação, onde a temperatura e o contacto com madeira<sup>122</sup> têm bastante influência.

#### 4. Análise sensorial

Tal como no caso do Vinhão, a análise sensorial ao Loureiro foi realizada por um painel de seis provadores da CVRVV, um mês e meio após a recolha das amostras das respetivas cubas de conservação. Esta análise é importante para perceber o impacto que as diferenças entre os vinhos têm a nível do interesse por parte do consumidor. A análise incluiu uma avaliação visual, olfativa e gustativa pormenorizada e global de cada vinho, utilizando uma escala de 0 a 5 para cada atributo, conforme o indicado na Ficha de Prova.

##### 4.1 Avaliação visual

A Figura 78 apresenta os dados obtidos da análise da cor, nomeadamente intensidade corante e limpidez, dos dois vinhos, LP e LT.

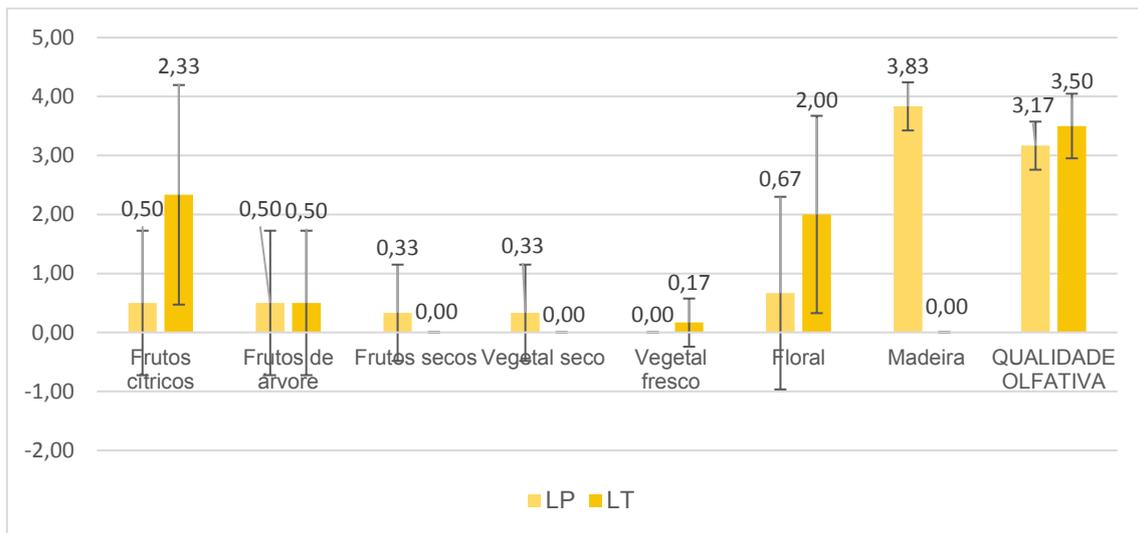


**Figura 78:** Avaliação da intensidade da cor e limpidez dos vinhos LP e LT.

Os valores apresentados correspondem à média das notas dadas pelos seis provadores nos parâmetros de intensidade de cor e limpidez. Por observação do gráfico percebe-se que, para o painel, LP apresenta maior intensidade corante, o que não está de acordo com os resultados da análise deste mesmo parâmetro; quanto à limpidez, LT parece ser um vinho mais límpido que LP.

## 4.2 Avaliação olfativa

A Figura 79 mostra a avaliação olfativa com recurso aos descritores de aroma encontrados em ambos os vinhos: frutos cítricos, frutos de árvore, frutos secos, vegetal seco, vegetal fresco, floral e madeira, bem como a avaliação global da qualidade olfativa.



**Figura 79:** Avaliação olfativa pormenorizada e global dos vinhos LP e LT.

Observando o gráfico, nota-se que são percecionadas algumas diferenças entre os dois vinhos: LP parece apresentar muito menos aroma a frutos cítricos e aroma floral, correspondendo a apenas 21 e 34 %, respetivamente, do aroma de LT; parece ainda apresentar outros aromas, tais como frutos secos, vegetal seco e madeira que não foram percecionados em LT. A existência do aroma a madeira é fácil de perceber, uma vez que o vinho Loureiro *Premium* realizou uma fermentação em contacto com aduelas de madeira, ao contrário do vinho Loureiro Tradicional. Pelo contrário, LT parece apresentar aroma a vegetal fresco, ainda que por apenas um provador, enquanto que este não foi percecionado para LP.

De forma geral, a qualidade olfativa do vinho Loureiro Tradicional parece ser melhor, comparativamente com o vinho Loureiro *Premium*.

### 4.3 Avaliação gustativa

A Figura 80 mostra a avaliação olfativa com recurso aos descritores encontrados em ambos os vinhos: doçura, acidez, amargor, adstringência, estrutura, equilíbrio, persistência, bem como a avaliação global da qualidade olfativa.

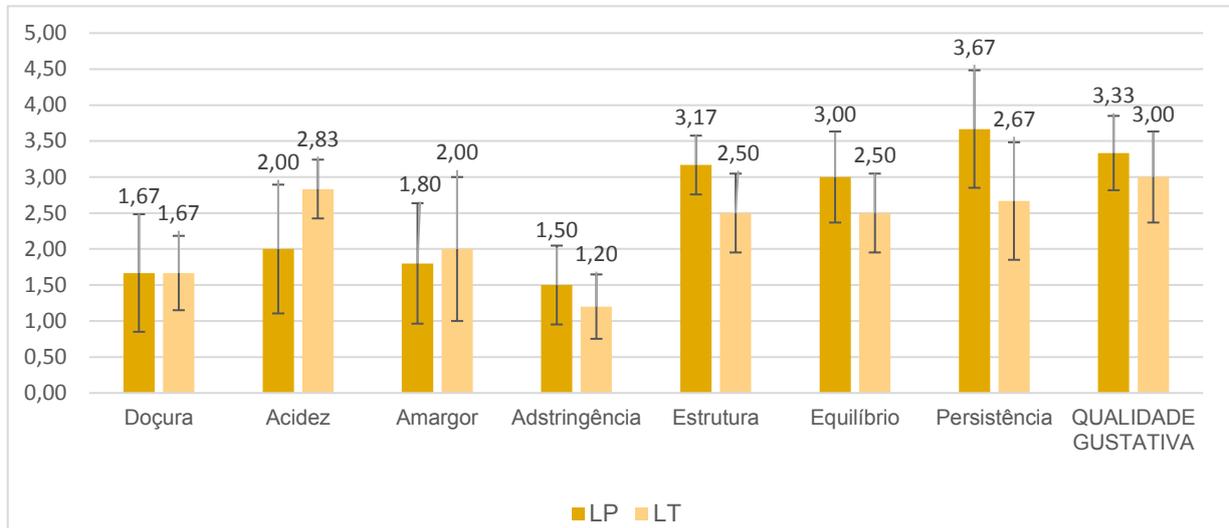


Figura 80: Avaliação gustativa pormenorizada e global dos vinhos LP e LT.

Ao contrário da avaliação olfativa, a avaliação gustativa apresenta mais semelhanças entre os vinhos. A Figura 81 permite perceber melhor estes dados e a relação dos descritores entre os vinhos.

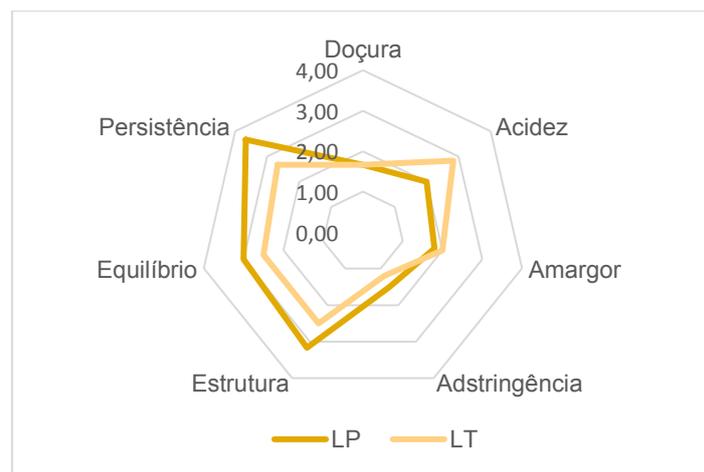


Figura 81: Gráfico radar da avaliação gustativa pormenorizada dos vinhos LP e LT.

Os provadores perceberam o mesmo nível de doçura em LP e LT, mas registaram algumas diferenças a nível dos outros descritores: LT parece apresentar um maior amargor e acidez, o que é comprovado por um maior valor de acidez total, como

visto anteriormente; já LP parece ser mais adstringente que LT, o que também está de acordo com os resultados de poder tanante; parece ainda apresentar maior estrutura, equilíbrio e persistência. Todos estes atributos fazem com que o vinho LP seja o vinho com maior nota de qualidade gustativa.

## V. Conclusão

As análises efetuadas aos diferentes vinhos tintos revelam diferenças significativas entre o Vinhão de Maceração a Frio (VMF) e o Vinhão Tradicional (VT), maioritariamente ao nível de concentração de compostos fenólicos e, por consequência, da intensidade da cor: VMF parece apresentar menor concentração destes compostos, nomeadamente antocianinas e taninos, o que é corroborado pela medida do índice de diálise e do poder tanante, um parâmetro também referido na análise sensorial, onde VT é percecionado como um vinho mais adstringente. No entanto, é interessante referir que a percentagem da antocianina com maior contribuição na concentração total de antocianinas, a malvidina-glicosídeo, pelo método do bissulfito, é maior em VMF, bem como a percentagem de antocianinas glicosiladas total, em comparação com o vinho de vinificação tradicional, o que pode, eventualmente, facilitar a sua absorção pelo organismo.

Relativamente aos vinhos tintos, podemos dizer que o objetivo da realização do protocolo de maceração foi alcançado, na medida em que a maceração a frio promoveu uma extração mais seletiva de compostos aromáticos, e isso é percecionado em VMF, em comparação com VT; mas, essa diferença não significa, necessariamente, que o consumidor o prefira ao invés de VT, como se percebeu pelos resultados da análise sensorial. De futuro, é imprescindível que a logística da etapa de maceração se torne mais eficaz, para permitir uma melhor composição fenólica do vinho obtido, e consequente aprovação pelo consumidor.

Os resultados das análises efetuadas aos vinhos brancos revelam também grandes diferenças na sua caracterização, nomeadamente a nível da acidez e, novamente, do seu perfil fenólico: o vinho obtido pelo protocolo em teste, vinho Loureiro *Premium* (LP), apresenta uma menor acidez, quando comparado com o de vinificação tradicional (LT), o que pode significar que terá menor capacidade de guarda; no entanto, apresenta maior concentração de fenóis totais e poder tanante, o que parece equilibrar esta questão. Os taninos hidrolisáveis extraídos do contacto com a madeira parecem aumentar a capacidade deste vinho em precipitar as proteínas sendo, consequentemente, considerado mais adstringente, o que é corroborado com a análise sensorial do mesmo. Esta análise permitiu ainda perceber que LP, mesmo apresentando maior variedade de aromas que LT, não foi o preferido do painel de provadores no decorrer da análise olfativa, ao contrário do que aconteceu na análise gustativa.

De forma geral, o vinho obtido pelo protocolo *Premium* parece apresentar características favoráveis à aceitação por parte do consumidor, o que parece também ser validado pela avaliação do painel de provadores. O seu sucesso e, possivelmente, a possibilidade de continuar a utilizar o mesmo protocolo será decidida pelo seu desenvolvimento em cuba de conservação. Futuramente, seria adequado ajustar o protocolo com o objetivo de obter um perfil aromático mais apreciado pelo consumidor.

## VI. Referências

1. Lourenço, M. *Caraterização do setor do vinho em Portugal. Banco de Portugal* (2017).
2. Comissão Vitivinícola da Região dos Vinhos Verdes. <http://portal.vinhoverde.pt/>.
3. Adega Ponte da Barca. <https://adegapontedabarca.pt/>.
4. Diário da República. *Portaria 668/2010*. (2010).
5. Estação Vitivinícola Amândio Galhano. *Estudo da EVAG*.
6. Cardoso, A. D. *O Vinho - da uva à garrafa*. (2007).
7. IVV. <https://www.ivv.gov.pt/np4/np4/89>.
8. Rizzon, L. A. & Miele, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. *Ciência Rural* **32**, 511–515 (2005).
9. OIV. Compendium of international methods of wine and must analysis. in *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis* **1**, 497 (2015).
10. Rizzon, L. A. & Sganzerla, V. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. *Ciência Rural* 911–914 (2007).
11. Sindou, E., Vaimakis, V., Vaimakis, T. & Roussis, I. G. Effect of juice clarification by flotation on the quality of white wine and orange juice and drink - Short communication. *Czech J. Food Sci.* **26**, 223–228 (2008).
12. Verdier, B., Blateyron, L. & Granès, D. Aparas e blocos de madeira: como utilizar? *Infowine* 6 (2005).
13. Proenol & Oenochême. *Madeiras*.
14. Pérez-Coello, M. S., Sanz, J. & Cabezudo, M. D. Determination of volatile compounds in hydroalcoholic extracts of French and American oak wood. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 162–165 (1999).
15. Pérez-Coello, M. S. *et al.* Fermentation of White Wines in the Presence of Wood Chips of American and French Oak. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 885–889 (2000).
16. López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I. & Raso, J. Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: Influence of grape variety. *European Food Research and Technology* **227**, 1099–

- 1107 (2008).
17. Puértolas, E., Álvarez, I. & Raso, J. Changes in phenolic compounds of Aragón red wines during alcoholic fermentation. *Food Sci. Technol. Int.* **17**, 77–86 (2011).
  18. Sacchi, K. L., Bisson, L. F. & Adams, D. O. A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 197–206 (2005).
  19. Parley, A., Vanhanen, L. & Heatherbell, D. Effects of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in Pinot Noir wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **7**, 146–152 (2001).
  20. Soto Vázquez, E., Río Segade, S. & Orriols Fernández, I. Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 789–802 (2010).
  21. Razungles, A. *Extraction technologies and wine quality. Managing Wine Quality: Oenology and Wine Quality* (Woodhead Publishing Limited, 2010). doi:10.1016/B978-1-84569-798-3.50020-6
  22. Gerbaux, V., Vuittenez, B., Vincent, B. & L'Heveder, A. Maceração pré-fermentativa a frio e maceração final a quente na elaboração de vinhos Pinot Noir em Bourgogne. *Vinidea* 6 (2002).
  23. Álvarez, I., Aleixandre, J. L., García, M. J. & Lizama, V. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Anal. Chim. Acta* **563**, 109–115 (2006).
  24. Cejudo-Bastante, M. J. *et al.* Effect of the time of cold maceration on the evolution of phenolic compounds and colour of Syrah wines elaborated in warm climate. *International Journal of Food Science and Technology* **49**, 1886–1892 (2014).
  25. Casassa, F., Sari, S., Avagnina, S., Díaz, M., Jofré, V., Fanzone, M. y Catania, C. Influencia de dos técnicas de maceración sobre la composición polifenólica, aromática y las características organolépticas de vinos cv. Merlot. *Enología* 1–8 (2006).
  26. González-Neves, G., Favre, G., Gil, G., Ferrer, M. & Charamelo, D. Effect of cold pre-fermentative maceration on the color and composition of young red wines cv. Tannat. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 3449–3457 (2015).
  27. Budic-Leto, Irena Lovric, Tomislav Vrhovsek, U. Influence of Different Maceration

- Techniques and Ageing on Proanthocyanidins and Anthocyanins of Red Wine cv . Babic ( *Vitis vinifera* , L . ). *Food Technol.* **41**, 299–303 (2003).
28. Cai, J. *et al.* Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chemistry* **154**, 217–229 (2014).
  29. Diego, P. & Gustavo, G.-N. Extracción de polifenoles y composición de vinos tintos Tannat elaborados por técnicas de maceración prefermentativa. *Agrociencia Uruguay* **17**, 36–44 (2013).
  30. Heard, G. M. & Fleet, G. H. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 727–728 (1985).
  31. Egli, C. M., Edinger, W. D., Mitrakul, C. M. & Henick-Kling, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 779–789 (1998).
  32. Torija, M. J. *et al.* Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **85**, 127–136 (2003).
  33. Gao, C. & Fleet, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 405–409 (1988). doi:10.1111/j.1365-2672.1988.tb01909.x
  34. Charoenchai, C., Fleet, G. H. & Henschke, P. A. Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **49**, 283–288 (1998).
  35. Reynolds, A., Cliff, M., Girard, B. & Kopp, T. G. Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 235–240 (2001).
  36. Salmon, J. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. *LWT - Food Sci. Technol.* **39**, 959–965 (2006).
  37. Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B. & Salmon, J. Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 113–121 (2003).

38. Cejudo-Bastante, M. J., Castro-Vázquez, L., Hermosín-Gutiérrez, I. & Pérez-Coello, M. S. Combined effects of prefermentative skin maceration and oxygen addition of must on color-related phenolics, volatile composition, and sensory characteristics of Airén white wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 12171–12182 (2011).
39. Proenol. *Punchy*.
40. Sonni, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Riponi, C. & Scollary, G. R. Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 3940–3949 (2011).
41. De Freitas, V. & Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 940–945 (2001).
42. Manfroi, V. *et al.* Aplicação de taninos enológicos na elaboração de vinho Cabernet Sauvignon e seus efeitos sobre a qualidade sensorial. *Ciência Rural* **40**, 175–181 (2009).
43. Cheynier, V. *et al.* Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 298–305 (2006).
44. Álvarez, I., Aleixandre, J. L., García, M. J., Lizama, V. & Aleixandre-Tudó, J. L. Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 501–510 (2009).
45. Parker, M. *et al.* The effect of pre- and post-ferment additions of grape derived tannin on Shiraz wine sensory properties and phenolic composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* **13**, 30–37 (2007).
46. Côrte-Real, D. Efeitos da maceração pré-fermentativa a frio e da aplicação de taninos enológicos na vinificação de tintos. (2009).
47. Britz, T. J. & Tracey, R. P. The combination effect of pH, SO<sub>2</sub>, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 23–31 (1990).
48. Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H. & Fleet, G. H. Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 539–45 (1986).
49. Nielsen, J. C., Pahl, C. & Lonvaud-Funel, A. Malolactic fermentation in wine by

- direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**, 42–48 (1996).
50. Lesica, M. & Košmerl, T. Microoxygenation of red wines. 327–336 (2009).
  51. Parish, M. *et al.* Micro-oxygenation – A review. *Wine Internet Tech. J.* **1**, 1–10 (2005).
  52. Gómez-Plaza, E., Cano-López, M., Pardo-Minguez, F. & López-Roca, J. M. Efectos de la micro-oxigenación de vinos tintos de Monastrell: influencia de la composición polifenólica del vino y del momento de aplicación. *Enólogos* 44–52 (2013).
  53. Nel, L. <https://www.wineland.co.za/the-use-of-the-micro-oxygenation-technique/>.
  54. Lisovets, U.A., Ageeva, N.M, Blozhko, A. . Biochemical processes which take place during battonage in the technology of white table wines. *Food Technol.* (2016).
  55. Fia, G. Wine Lees: Traditional and Potential Innovative Techniques for their Exploitation in Winemaking. in *Grape and Wine Biotechnology* 345–359 (2016). doi:<http://dx.doi.org/10.5772/65043>
  56. Areeba, H. M. *et al.* Specific features of red table wine batonnage. *Tecnol. Prod. Aliment. Aliment.* **8**, 99–104 (2018).
  57. Cabrita, M. J., Ricardo-da-Silva, J. & Laureano, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. in *I Seminário Internacional de Vitivinicultura* 61–102 (1999).
  58. Herrmann, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technology* 433–448 (1976).
  59. Hanlin, R. L., Hrmova, M., Harbertson, J. F. & Downey, M. O. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **16**, 173–188 (2010).
  60. Jurd, L. Reactions Involved in Sulfite of Anthocyanins. *J. Food Sci.* (1962).
  61. Abe, L. T., Mota, R. V. da, Lajolo, F. M. & Genovese, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **27**, 394–400 (2007).
  62. Ribéreau-Gayon, P. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide

- tartrique dans les limbes et les baies de *V. Vinifera*. *C. R. l'Académie des Sci.* 260–341 (1965). doi:10.1590/s0103-84782005000600040
63. Singleton, V. L. & Yokotsuka, K. Interactive precipitation between graded peptides from gelatin and specific grape tannin fractions in wine-like model solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 199–206 (1987).
  64. CORREIA, Ana C. GONÇALVES, Fernando J. SIMÕES, Sylvie JORDÃO, A. M. Estudo do potencial antioxidante de algumas castas tintas da região do Dão e sua relação com a composição fenólica. *Livro Actas - 8º Simpósio Vitiviníc. do Alentejo* 111–121 (2010).
  65. Costa, E., Cosme, F., Rivero-Pérez, M. D., Jordão, A. M. & González-SanJosé, M. L. Influence of wine region provenance on phenolic composition, antioxidant capacity and radical scavenger activity of traditional Portuguese red grape varieties. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 61–73 (2015).
  66. Costa, E., Cosme, F., Jordão, A. M. & Mendes-Faia, A. Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **48**, 51–62 (2014).
  67. Downey, M. O., Dokoozlian, N. K. & Krstic, M. P. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 257–268 (2006).
  68. Jackson, D. I. & Lombard, P. B. Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**, 409–430 (1993).
  69. Wines of Portugal. Available at: <http://www.winesofportugal.com/br/vinhos-e-turismo/wine-regions/vino-verde/overview/>.
  70. Sogrape - Vinhos de Portugal. Available at: <https://www.sograpevinhos.com/regioes/Douro/Solo>.
  71. Bin Du. Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. *J. Med. Plants Res.* **6**, 3381–3387 (2012).
  72. Gomes da Silva, A. S. Avaliação dos compostos fenólicos e voláteis ao longo da vinificação. (Universidade de Aveiro, 2012).
  73. Pozzan, M. S. V., Braga, G. C. & Salibe, A. B. Teores de antocianinas, fenóis totais, taninos e ácido ascórbico em uva 'bordô' sobre diferentes porta-enxertos.

- Revista Ceres* **59**, 701–708 (2012).
74. Sommeliere. A História do Vinho. Available at: <https://sommeliere.com.br/historia-do-vinho>.
  75. Ribéreau-Gayon, P. Évolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **5**, 161–175 (1971).
  76. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. . & Spranger, M. I. Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines. *Ciência Técnica Vitivinícola - J. Vitic. Enol.* **16**, 23–34 (2001).
  77. Mateus, N., Marques, S., Gonçalves, A. C., Machado, J. M. & De Freitas, V. Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley during ripening: Influence of cultivation altitude. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 115–121 (2001).
  78. Hanlin, R. L. & Downey, M. O. Condensed tannin accumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *Am. J. Enol. Vitic.* **60**, 13–23 (2009).
  79. De Freitas, V. Structures moléculaires et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais. (2009).
  80. Porter, L. J. & Woodruffe, J. Haemanalysis: The relative astringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry* **23**, 1255–1256 (1984).
  81. Charlton, A. J. *et al.* Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1593–601 (2002).
  82. Adams, D. O. & Harbertson, J. F. Use of Alkaline Phosphatase for the Analysis of Tannins in Grapes and Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 247–252 (1999).
  83. Harbertson, J. F., Kilmister, R. L., Kelm, M. A. & Downey, M. O. Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation. *Food Chem.* **160**, 16–21 (2014).
  84. Dopico-García, M. S. *et al.* Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds? *Talanta* **75**, 1190–1202 (2008).
  85. Espírito Santo, F. *et al.* *Caracterização Climática - Ano 2007, Portugal.* (2008).
  86. Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). *Caracterização Climática -*

*Ano 2018 Portugal Continental.* (2019).

87. Leeuwen, C. Van *et al.* Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. **55**, 1–8 (2010).
88. Castellarin, S. D., Matthews, M. A., Di Gaspero, G. & Gambetta, G. A. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* **227**, 101–112 (2007).
89. Castillo-Sánchez, J. X. *et al.* Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chem.* **106**, 18–26 (2008).
90. Rivas-Gonzalo, J. C., Gutierrez, Y., Hebrero, E. & Santos-Buelga, C. Comparisons of Methods for the Determination of Anthocyanins in Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 210–214 (1992).
91. Fernandes, P. A. de C. Comportamento Agronómico e Enológico das Castas Syrah e Touriga Nacional em seis ‘Terroirs’ de Portugal. (Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa/Universidade do Porto, 2009).
92. Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E., Martínez, A. & López-Roca, J. M. Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. *Food Res. Int.* **30**, 699–705 (1997).
93. Guzmán, F., Darwin, C. & Gustavo, G.-N. Empleo de taninos enológicos y maceración prefermentativa en frío en una experiencia de elaboración de vinos tintos Tannat. *Agrociencia Uruguay* **17**, 65–73 (2013).
94. Casassa, L. F., Bolcato, E. A. & Sari, S. E. Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food Chem.* **174**, 110–118 (2015).
95. Panprivech, S., Lerno, L. A., Brenneman, C. A., Block, D. E. & Oberholster, A. Investigating the effect of cold soak duration on phenolic extraction during Cabernet Sauvignon fermentation. *Molecules* **20**, 7974–7989 (2015).
96. Gil, M. *et al.* Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color,.pdf. (2012). doi:10.1021/jf302064n
97. Gómez-Míguez, M., González-Miret, M. L. & Heredia, F. J. Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold

- maceration. *J. Food Eng.* **79**, 271–278 (2007).
98. Federico Casassa, L., Bolcato, E. A., Sari, S. E., Fanzone, M. L. & Jofré, V. P. Combined effect of prefermentative cold soak and SO<sub>2</sub> additions in Barbera D'Asti and Malbec wines: Anthocyanin composition, chromatic and sensory properties. *LWT - Food Sci. Technol.* **66**, 134–142 (2016).
  99. Vinho, I. da V. e do. Parâmetros de controlo e limites analíticos. Available at: <https://www.ivv.gov.pt/np4/89/>.
  100. Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G. & La Notte, E. Phenolic content and antioxidant activity of primitivo wine: Comparison among winemaking technologies. *J. Food Sci.* **74**, (2009).
  101. Busse-Valverde, N. *et al.* Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11333–11339 (2010).
  102. Moreno-Pérez, A. *et al.* Influence of winemaking techniques on proanthocyanidin extraction in Monastrell wines from four different areas. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 473–481 (2013).
  103. Somers, T. C. Wine tannins-isolation of condensed flavonoids pigments by gel-filtration. *Nat. Publ. Gr.* **209**, 368–370 (1966).
  104. DALLAS, C., RICCARDO-DA-SILVA, J. & LAUREANO, O. Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis* **34**, 51–56 (1995).
  105. Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. & Katan, Martijn, K. B. Absorption of dietary quercetin glycosides in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1276–1282 (1995).
  106. Mateus, N., Proença, S., Ribeiro, P., Machado, J. M. & De Freitas, V. GRAPE AND WINE POLYPHENOLIC COMPOSITION OF RED *Vitis vinifera* VARIETIES CONCERNING VINEYARD ALTITUDE. *Cienc. y Tecnol. Aliment.* **3**, 102–110 (2001).
  107. Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G. & Ryan, J. M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr. A* **915**, 53–60 (2001).

108. Araújo, I., Linhares, J., Pereira, Ó., Nascimento, S. & Oliveira, J. Características cromáticas de vinhos verdes tintos. in *7º Encontro de Química dos Alimentos* (2005).
109. Yang, J., Martinson, T. E. & Liu, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.* **116**, 332–339 (2009).
110. Garcia-Jares, C. *et al.* Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Antioxidants* **4**, 737–749 (2015).
111. Faitová, k., Hejtmánková, A., Lachman, J., Pivec, V. & Dudjak, J. The contents of total polyphenolic compounds and trans-resveratrol in white Riesling originated in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci.* **22**, 215–221 (2018).
112. Creasy, L. L. & Coffee, M. Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* (1988).
113. Lamikanra, O., Inyang, I. D. & Leong, S. Distribution and Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 3026–3028 (1995).
114. Waterhouse, A. L. Determination of Total Phenolics. in *Current Protocol in Food Analytical Chemistry* **11**, 130–143 (John Wiley & Sons, Inc., 2002).
115. Granato, T. M., Nasi, A., Ferranti, P., Iametti, S. & Bonomi, F. Fining white wine with plant proteins: Effects of fining on proanthocyanidins and aroma components. *Eur. Food Res. Technol.* **238**, 265–274 (2014).
116. Mitić, M. N., Obradović, M. V., Grahovac, Z. B. & Pavlović, A. N. Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of Serbian white wines. *Molecules* **15**, 2016–2027 (2010).
117. Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J. C. & Câmara, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* **105**, 204–214 (2007).
118. Cejudo-Bastante, M. J., Castro-Vázquez, L., Hermosín-Gutiérrez, I. & Pérez-Coello, M. S. Combined effects of prefermentative skin maceration and oxygen addition of must on color-related phenolics, volatile composition, and sensory characteristics of Airén White Wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 12171–12182 (2011).
119. Alpuim, J. P. Aprendendo a Química do Vinho. *Química* **65**, 39 (1997).

120. Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C. & Lamuela-Raventós, R. M. Phenolics in White Free Run Juices and Wines from Penedès by High-Performance Liquid Chromatography: Changes during Vinification. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3040–3046 (1996).
121. Gómez-Míguez, M. J., Gómez-Míguez, M., Vicario, I. M. & Heredia, F. J. Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *J. Food Eng.* **79**, 758–764 (2007).
122. Carvalho, M. J., Pereira, V., Pereira, A. C., Pinto, J. L. & Marques, J. C. Evaluation of Wine Colour Under Accelerated and Oak-Cask Ageing Using CIELab and Chemometric Approaches. *Food Bioprocess Technol.* **8**, 2309–2318 (2015).
123. Darias-Martín, J. J., Andrés-Lacueva, C., Díaz-Romero, C. & Lamuela-Raventós, R. M. Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 871–876 (2008).

## VI. Anexos

Anexo 1: Estrutura de produção do vinho Estreia Vinhão.

	<b>ESTRUTURAS DE PRODUÇÃO DE GARRAFAS</b>		<b>EPG.12</b>
<b>NOME DO PRODUTO</b>	<b>ESTREIA VINHO VERDE TINTO VINHÃO GRANDE ESCOLHA 0,75L</b>		
<b>LOTE</b>	<b>LI/18 - INTERNACIONAL SUPER PREMIUM</b>		
<b>CLIENTE</b>	<b>GERAL</b>	<b>DESTINO MERCADO</b>	<b>MERCADO INTERNO/EXTERNO</b>
<b>RÓTULO</b>			<b>IMAGEM GARRAFA ROTULADA</b>
<b>CONTRA-RÓTULO</b>			
<b>CÁPSULA</b>	<b>PVC ROXO COM GRAVAÇÃO PRATA 29,6 x 65 mm</b>		<b>OBS.</b>
<b>GARRAFA</b>	<b>75 CL BORGONHA ECOVA SED. (REF.ª 6712) CANELA</b>		Altura do rótulo a contar do
<b>ROLHA CORTIÇA</b>	<b>MICROAGLOMERADA 38 x 24 mm VINIVERDE</b>		topo do círculo central: 18 cm.
<b>CAIXA</b>	<b>CX 6 x 750 ML WA ESTREIA ROXA 256 X 172 X 298 mm</b>		Altura do rótulo e contra-rótulo a contar dos cantos superiores: 16,7 cm.

Anexo 2: Resultado  $\pm$  desvio-padrão de todas as análises realizadas às amostras de Vinhão na FCUP.

VINHÃO

		UV	VMAR68F	VMAR69F	VMAR70F	VMAT	VFF	VMF	VT
Índice de fenóis totais	A280 (u.a.)	<b>20,30</b> $\pm$ 0,30	<b>16,67</b> $\pm$ 1,89	<b>18,00</b> $\pm$ 0,00	<b>13,50</b> $\pm$ 0,87	<b>39,83</b> $\pm$ 1,04	<b>26,33</b> $\pm$ 1,15	<b>32,33</b> $\pm$ 2,52	<b>81,33</b> $\pm$ 3,21
	<i>Folin-Ciocalteu</i> (mg equiv. ác. gálico/L)	<b>150,0</b> $\pm$ 19,1	<b>256,1</b> $\pm$ 5,6	<b>250,5</b> $\pm$ 23,0	<b>191,9</b> $\pm$ 12,9	<b>666,8</b> $\pm$ 14,4	<b>423,7</b> $\pm$ 10,7	<b>429,3</b> $\pm$ 14,1	<b>1167,2</b> $\pm$ 62,1
[Antocianinas] (mg/L)		<b>118,5</b> $\pm$ <b>1,03</b>	<b>292,5</b> $\pm$ 2,56	<b>336,4</b> $\pm$ 0,78	<b>257,4</b> $\pm$ 2,30	<b>340,3</b> $\pm$ 0,69	<b>309,8</b> $\pm$ 2,44	<b>327,1</b> $\pm$ 1,22	<b>892,2</b> $\pm$ 2,26
[Taninos proantocianínicos totais] (mg/L)		<b>589,6</b> $\pm$ <b>12,2</b>	<b>641,1</b> $\pm$ 10,0	<b>757,1</b> $\pm$ 72,8	<b>599,2</b> $\pm$ 56,0	<b>950,4</b> $\pm$ 15,8	<b>898,4</b> $\pm$ 72,7	<b>1076,0</b> $\pm$ 39,9	<b>2541,9</b> $\pm$ 50,0
Poder tanante (NTU/mL)		<b>137,83</b> $\pm$ 4,19	<b>114,37</b> $\pm$ 15,51	<b>93,44</b> $\pm$ 3,53	<b>122,89</b> $\pm$ 3,14	<b>125,28</b> $\pm$ 4,70	<b>52,81</b> $\pm$ 4,61	<b>71,48</b> $\pm$ 3,47	<b>290,05</b> $\pm$ 15,64
Índice de diálise		<b>6,171</b> $\pm$ 0,248	<b>3,301</b> $\pm$ 0,314	<b>2,658</b> $\pm$ 0,419	<b>3,228</b> $\pm$ 0,510	<b>2,859</b> $\pm$ 0,128	<b>2,061</b> $\pm$ 0,333	<b>1,855</b> $\pm$ 0,084	<b>2,630</b> $\pm$ 0,051
Intensidade corante (u.a.)		<b>2,69</b> $\pm$ 0,08	<b>9,56</b> $\pm$ 0,14	<b>10,47</b> $\pm$ 0,09	<b>8,58</b> $\pm$ 0,18	<b>13,47</b> $\pm$ 0,15	<b>9,24</b> $\pm$ 0,40	<b>9,16</b> $\pm$ 0,20	<b>28,9</b> $\pm$ 0,35
Índice de cor vermelha (u.a.)		<b>1,74</b> $\pm$ 0,03	<b>6,01</b> $\pm$ 0,05	<b>6,76</b> $\pm$ 0,04	<b>5,40</b> $\pm$ 0,07	<b>8,42</b> $\pm$ 0,07	<b>5,53</b> $\pm$ 0,24	<b>5,00</b> $\pm$ 0,09	<b>17,70</b> $\pm$ 0,26
Parâmetros CIELab	L*	<b>71,8</b> $\pm$ 0,2	<b>57,1</b> $\pm$ 0,1	<b>54,5</b> $\pm$ 0,4	<b>60,3</b> $\pm$ 0,1	<b>47,6</b> $\pm$ 0,1	<b>57,3</b> $\pm$ 1,1	<b>54,9</b> $\pm$ 0,3	<b>20,2</b> $\pm$ 0,2
	a*	<b>41,08</b> $\pm$ 0,08	<b>51,01</b> $\pm$ 0,07	<b>53,38</b> $\pm$ 0,09	<b>46,97</b> $\pm$ 0,17	<b>57,73</b> $\pm$ 0,08	<b>50,66</b> $\pm$ 1,04	<b>43,85</b> $\pm$ 0,07	<b>51,50</b> $\pm$ 0,11
	b*	<b>-2,05</b> $\pm$ 0,14	<b>5,85</b> $\pm$ 0,06	<b>6,28</b> $\pm$ 0,06	<b>4,99</b> $\pm$ 0,09	<b>9,66</b> $\pm$ 0,03	<b>3,51</b> $\pm$ 0,61	<b>1,06</b> $\pm$ 0,10	<b>18,60</b> $\pm$ 0,17
	C*	<b>41,10</b> $\pm$ 0,09	<b>51,34</b> $\pm$ 0,07	<b>53,75</b> $\pm$ 0,09	<b>47,24</b> $\pm$ 0,17	<b>58,53</b> $\pm$ 0,08	<b>50,78</b> $\pm$ 1,08	<b>43,87</b> $\pm$ 0,07	<b>54,75</b> $\pm$ 0,14
	H°	<b>357,1</b> $\pm$ 0,2	<b>6,54</b> $\pm$ 0,07	<b>6,71</b> $\pm$ 0,07	<b>6,07</b> $\pm$ 0,13	<b>9,50</b> $\pm$ 0,03	<b>3,95</b> $\pm$ 0,60	<b>1,38</b> $\pm$ 0,13	<b>19,86</b> $\pm$ 0,14

Anexo 3: Resultado  $\pm$  desvio-padrão de todas as análises realizadas às amostras de Loureiro na FCUP.

		LOUREIRO						
		UL	LMS	LMC	LMC5	LFF	LP	LT
Índice de fenóis totais	A280 (u.a.)	<b>8,83</b> $\pm$ 0,12	<b>5,77</b> $\pm$ 0,06	<b>4,80</b> $\pm$ 0,46	<b>5,67</b> $\pm$ 0,38	<b>7,57</b> $\pm$ 0,06	<b>10,40</b> $\pm$ 0,10	<b>7,57</b> $\pm$ 0,06
	<i>Folin-Ciocalteu</i> (mg equiv. ác. gálico/L)	<b>42,1</b> $\pm$ 1,3	<b>23,1</b> $\pm$ 1,6	<b>30,7</b> $\pm$ 1,9	<b>54,1</b> $\pm$ 1,1	<b>78,4</b> $\pm$ 1,4	<b>104,4</b> $\pm$ 3,9	<b>85,1</b> $\pm$ 1,4
[Taninos proantociânicos totais] (mg/L)		<b>480,0</b> $\pm$ 41,3	<b>322,2</b> $\pm$ 26,4	<b>138,5</b> $\pm$ 43,5	<b>116,0</b> $\pm$ 31,8	<b>122,4</b> $\pm$ 41,3	<b>132,1</b> $\pm$ 26,4	<b>157,9</b> $\pm$ 46,8
Poder tanante (NTU/mL)		<b>18,1</b> $\pm$ 2,96	<b>3,11</b> $\pm$ 0,60	<b>1,04</b> $\pm$ 0,22	<b>0,12</b> $\pm$ 0,02	<b>0,59</b> $\pm$ 0,03	<b>1,17</b> $\pm$ 0,05	<b>0,63</b> $\pm$ 0,20
Intensidade corante (u.a.)		<b>1,36</b> $\pm$ 0,05	<b>3,82</b> $\pm$ 0,03	<b>3,14</b> $\pm$ 0,01	<b>2,47</b> $\pm$ 0,01	<b>3,27</b> $\pm$ 0,02	<b>4,11</b> $\pm$ 0,04	<b>4,14</b> $\pm$ 0,08
Parâmetros CIELab	L*	<b>96,5</b> $\pm$ 0,8	<b>92,2</b> $\pm$ 0,0	<b>94,7</b> $\pm$ 1,1	<b>95,6</b> $\pm$ 1,9	<b>95,3</b> $\pm$ 0,2	<b>91,3</b> $\pm$ 0,6	<b>67,7</b> $\pm$ 1,2
	a*	<b>-0,17</b> $\pm$ 0,14	<b>1,06</b> $\pm$ 0,10	<b>-0,54</b> $\pm$ 0,29	<b>-0,61</b> $\pm$ 0,35	<b>-1,47</b> $\pm$ 0,01	<b>-1,42</b> $\pm$ 0,30	<b>-0,71</b> $\pm$ 0,34
	b*	<b>8,44</b> $\pm$ 0,33	<b>16,93</b> $\pm$ 0,34	<b>9,99</b> $\pm$ 0,43	<b>7,14</b> $\pm$ 0,08	<b>8,92</b> $\pm$ 0,03	<b>10,34</b> $\pm$ 0,34	<b>5,66</b> $\pm$ 0,13
	C*	<b>8,44</b> $\pm$ 0,33	<b>16,96</b> $\pm$ 0,33	<b>10,01</b> $\pm$ 0,44	<b>7,17</b> $\pm$ 0,09	<b>9,04</b> $\pm$ 0,03	<b>10,44</b> $\pm$ 0,38	<b>5,71</b> $\pm$ 0,08
	H°	<b>91,13</b> $\pm$ 0,90	<b>86,41</b> $\pm$ 0,40	<b>93,03</b> $\pm$ 1,48	<b>94,86</b> $\pm$ 2,80	<b>99,40</b> $\pm$ 0,07	<b>97,79</b> $\pm$ 1,36	<b>97,18</b> $\pm$ 3,56

## Anexo 4: Folha de prova utilizada na análise sensorial.



Data: \_\_\_\_\_

Prova de: \_\_\_\_\_ Amostra: \_\_\_\_\_

### Avaliação Visual

	branco	rosado	tinto
Cor - qualidade			

	1	2	3	4	5
Cor - intensidade					

	1	2	3	4	5
Limpidez - intensidade					

(1 - turvo ; 5 - cristalino)

Avaliação Olfativa					
	1	2	3	4	5
frutos citrinos					
frutos baga (vermelhos)					
frutos de árvore					
frutos tropical					
frutos secos					
vegetal seco					
vegetal fresco					
especiarias					
floral					
balsâmico					
empíreumático					
madeira					
Qualidade olfativa					

Avaliação Olfativa <i>Gustativa</i>					
	1	2	3	4	5
doçura					
acidez					
amargor					
adstringência					
estrutura					
equilíbrio					
persistência					
Qualidade gustativa					

Observações: \_\_\_\_\_