



Novas tendências do *Vinho Verde* tinto

Nídia Telma Navarro de Noronha

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Química e Bioquímica

2018

Orientadora

Doutora Natércia Teixeira, Investigadora, FCUP

Co-orientadores

Doutor Victor de Freitas, Professor Catedrático, FCUP

Dr. António Luís Cerdeira, Enólogo





Universidade do Minho



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

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

A Deus pela saúde e pela capacidade de superação que sempre me tem dado para tornar cada revés numa oportunidade de crescimento.

Ao meu marido, filha e a toda a minha família, pelo carinho, compreensão, ajuda e incentivo que sempre me deram durante este percurso.

À Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes na pessoa do Dr. António Luís Cerdeira pela oportunidade de fazer o estágio com um estudo inovador e útil para a Região, pela paixão contagiante que transmitiu e por todo o apoio dado para a realização deste estudo.

Ao Professor Doutor Victor de Freitas, pela oportunidade que me proporcionou em desenvolver este estudo com o apoio do seu grupo de investigação.

À Doutora Natércia Teixeira pelos ensinamentos, apoio técnico, disponibilidade, mas sobretudo paciência dispensada ao longo de todo o trabalho laboratorial e na revisão deste relatório.

Ao Laboratório da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes na pessoa da Dr^a Patrícia Porto, pela oportunidade de realização das análises físico-químicas, de estagiar no laboratório e por todo o apoio ao longo do estágio.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo apoio e boa disposição para a realização de um bom trabalho e desculpem o mosto ter fermentado.....

Às analistas do Laboratório da CVRVV, a Cátia, a Celeste, a Francelina, a Sandra e a Susana pelos ensinamentos, mas sobretudo pela paciência e boa disposição que permitiu acordar todos os dias com um sorriso.

À Estação Vitivinícola Amândio Galhano pelo apoio logístico durante a estadia em Ponte da Barca.

À Adega Cooperativa de Ponte da Barca na pessoa do Eng. José Oliveira a oportunidade de fazer no estágio, um estudo inovador, útil e interessante.

A todos os colaboradores da Adega Cooperativa de Ponte da Barca, por me ajudarem a levantar em cada queda..., mas em especial à Eng.^a Iveta Rodrigues e à Dr^a Patrícia Pereira pelo carinho e amizade que me dispensaram, e tornou esta experiência inesquecível.

Resumo

O presente trabalho teve como principal interesse a experimentação da maceração pré-fermentativa a frio na produção de *Vinho Verde* Tinto proveniente, em exclusivo, da casta Vinhão, e a capacidade de extrair seletivamente os compostos fenólicos presentes nas uvas.

Para melhor conhecimento do processo de vinificação e consequentes alterações no perfil fenólico, foram retiradas amostras de uvas, mostos e vinhos que foram analisadas no laboratório da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes e no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Os compostos fenólicos foram determinados e caracterizados ao longo dos 2 processos de vinificação, através da avaliação de vários parâmetros nomeadamente índice de fenóis totais, intensidade de cor, tonalidade, antocianinas livres e totais, quantificação de antocianinas monoméricas, taninos proantociânicos, índice de diálise e poder tanante, tendo-se constatado que com o processo de maceração pelicular pré-fermentativa a frio se consegue a extração seletiva dos compostos fenólicos.

Foram também realizadas análises físico-químicas aos vinhos obtidos nomeadamente grau alcoólico e acidez (volátil, fixa e total) que demonstrou a capacidade de produzir um *Vinho Verde* tinto de menor acidez e maior grau alcoólico quando comparado ao *Vinho Verde* tinto tradicional.

Os resultados obtidos confirmaram a obtenção de um *Vinho Verde* tinto de perfil antociânico diferente do tradicional, com menor intensidade de cor (7 vs 31), menor teor de taninos (poder tanante 45 vs 461NTU/mL vinho), menor adstringência, maior grau alcoólico (12.0% vs 11.7%), maior suavidade de boca, mais aromático, mais equilibrado, mais harmonioso, e maior aceitação por parte de um painel de provadores qualificados.

Palavras-chave: maceração a frio, polifenóis, Vinhão, *Vinho Verde* tinto

Abstract

The present work had as main interest the experimentation of cold soak in the production of red *Vinho Verde*, exclusively from the Vinhão variety, and the ability to selectively extract the phenolic compounds present in the grapes.

To better understand the winemaking process and consequent changes in the phenolic profile, samples of grapes, musts and wines were analyzed and analyzed in the laboratory of the Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes and in the laboratory of the Department of Chemistry and Biochemistry of the Faculty of Sciences of the University of Porto.

Those phenolic compounds were determined and characterized during the winemaking process, through the evaluation of various parameters such as total phenol index, color intensity, hue, free and total anthocyanins, quantification anthocyanins, proanthocyanin tannins, dialysis index and tanning power, and it was verified that with the process of cold soak the selective extraction of the phenolic compounds is obtained.

Physicochemical analyzes were also carried out on the wines obtained, namely alcoholic degree and acidity (volatile, fixed and total), which demonstrated the ability to produce a red *Vinho Verde* with a lower acidity and a higher alcoholic degree when compared to traditional red *Vinho Verde*.

The results confirmed the obtaining of a red *Vinho Verde* with an anthocyanic profile different from the traditional one, with less colour intensity (7 vs 31), lower tannin content (tanning power 45 vs 461 NTU/mL wine), lower astringency, greater alcoholic degree (12.0% vs 11.7%), more softness of mouth, more aromatic, more balanced, more harmonious, and greater acceptance by part of a panel of qualified tasters.

Key words: cold soak, polyphenols, red *Vinho Verde*, Vinhão,

Índice

Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	8
Índice	9
Índice de Tabelas.....	16
Lista de abreviaturas.....	17
I. Introdução.....	19
1. A Vinha	20
1.1. Vitis vinifera.....	20
1.2. Castas Tintas	21
1.2.1 Casta Vinhão	21
2. A cor.....	22
2.1. Os polifenóis	22
2.1.1. Compostos flavonóides.....	23
2.1.2. Compostos não flavonóides	27
2.2. Sistema CIELab	30
3. Método de processamento – Operações pré-fermentativas	31
3.1. Maceração a frio	32
3.1.1. Efeito do tempo de duração	34
3.1.2. Efeito da temperatura	35
3.1.3. Efeito do número de remontagens e frequência das mesmas.....	35
3.1.4. Efeito da forma de arrefecimento.....	37
3.1.5. Efeito do equipamento	37
3.1.6. Efeito do uso de enzimas.....	37
4. Método de processamento - Fermentação alcoólica	38
4.1. Bioquímica da fermentação alcoólica	38
4.2. Fatores que influenciam a fermentação alcoólica.....	39
4.2.1. Temperatura da fermentação alcoólica.....	39
4.2.2. Leveduras com ou sem inoculação.....	40
4.2.3. Taninos naturais ou adicionados	42
4.2.4. Adição de paredes de levedura / glutatião	43
5. Método de processamento - Operações pós-fermentativas.....	44

5.1.	A fermentação malo-láctica com ou sem inoculação de bactérias lácticas	44
5.2.	Adição de paredes de levedura	46
5.3.	Micro-oxigenação	46
	Objetivo	49
II.	Material e métodos	50
1.	Plano experimental.....	50
2.	Amostras	51
2.1.	Preparação das amostras	52
3.	Métodos	52
3.1.	Análises físico-químicas.....	52
3.1.1.	Acidez fixa	53
3.1.2.	Acidez total	53
3.1.3.	Acidez volátil.....	53
3.1.4.	Ácido L-málico	54
3.1.5.	Ácido tartárico.....	55
3.1.6.	Açúcares totais (glucose + frutose).....	55
3.1.7.	Álcool provável	56
3.1.8.	Densidade de líquido	57
3.1.9.	Dióxido de enxofre livre, combinado e total.....	57
3.1.10.	Extrato seco total	57
3.1.11.	Extrato não redutor	58
3.1.12.	Massa volúmica	58
3.1.13.	pH.....	58
3.1.14.	Título alcoométrico volúmico adquirido	59
3.1.15.	Título alcoométrico volúmico total.....	59
3.2.	Análise de cor	60
3.2.1.	Determinação de polifenóis totais	60
3.2.2.	Características cromáticas das amostras.....	61
3.2.3.	Constituição antociânica das amostras	62
3.2.4.	Doseamento global de taninos.....	64
3.2.5.	Precipitações com origem na constituição fenólica das amostras	67
3.3.	Análise sensorial	67
III.	Resultados e Discussão.....	68
1.	As uvas	68
1.1	Análises físico-químicas.....	68
1.2	Análise de cor	68

1.2.1	Determinação de polifenóis totais	68
1.2.2	Características cromáticas das uvas	69
1.2.3.	Constituição antociânica das uvas	73
1.2.4.	Doseamento global de taninos.....	78
1.3.	Análise sensorial	79
2.	Os mostos	80
2.1.	Análises físico-químicas.....	80
2.2.	Análise de cor	80
2.2.2.	Características cromáticas dos mostos	82
2.2.3.	Constituição antociânica dos mostos	91
2.2.4.	Doseamento global de taninos.....	99
2.3.	Análise sensorial	105
3.	Os vinhos	106
3.1.	Análises físico-químicas	106
3.2.	Análise de cor	108
3.2.2.	Características cromáticas dos vinhos	109
3.2.3.	Constituição antociânica dos vinhos	116
3.2.4.	Doseamento global de taninos.....	121
3.3.	Análise sensorial	126
3.3.1.	Avaliação Visual	126
3.3.2.	Avaliação olfativa.....	127
3.3.3.	Avaliação gustativa.....	129
IV.	Conclusões.....	131
V.	Referências Bibliográficas	133
VI.	Anexos	143

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura geral dos principais flavonoides [10]	24
Figura 2 - Catião flavílio	24
Figura 3 - Estrutura das antocianidinas correspondentes para os diferentes substituintes	25
Figura 4 - Estrutura das antocianinas em equilíbrio	25
Figura 5 – Estrutura geral dos flavan-3-óis.....	26
Figura 6 - Estrutura dos flavan-3-óis mais abundantes no vinho	26
Figura 7– Ácidos benzoicos [adaptado de [6]]	28
Figura 8 - Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados mais importantes [9]	28
Figura 9 - Fórmula geral dos ácidos hidroxicinamiltartáricos [9]	29
Figura 10 – Estrutura e fórmula química geral dos estilbenos [17]	29
Figura 11 - Definição da cor usando o sistema L^* , a^* e b^*	30
Figura 12 - Definição da cor usando o sistema L^* , C^* e H^*	31
Figura 13 - Evolução da intensidade da cor e da conversão dos compostos	34
Figura 14 - Cuba com pumping over	36
Figura 15 - Cuba com repisa mecânica.....	36
Figura 16 – Via de conversão da glucose em ácido pirúvico	38
Figura 17- Conversão do ácido pirúvico em etanol	39
Figura 18 - Estrutura molecular do glutatíon (GSH).....	43
Figura 19 - Estrutura molecular da glutatíon dissulfito (GSSG)	43
Figura 20 - Conversão do ácido málico em ácido láctico.....	44
Figura 21- Evolução das fases organoléticas dos vinhos durante a aplicação do processo de micro-oxigenação [54].....	47
Figura 22 – Representação esquemática de um sistema de micro-oxigenação [55]	48
Figura 23 - Equilíbrio da antocianina com o anidrido sulfuroso	62
Figura 24 – Gráficos comparativos da intensidade de cor de uvas Vinhão	69
Figura 25 – Gráficos comparativos do índice de cor vermelha de uvas Vinhão.....	70
Figura 26 – Gráfico comparativos da tonalidade do extrato de uvas Vinhão	70
Figura 27 – Gráfico comparativo da cor dos extratos de uvas no sistema CIELab (L^* , a^*b^*).....	71
Figura 28 – Gráfico comparativo da cor dos extratos de uvas no sistema CIELab (a^*b^*).....	72
Figura 29 - Gráfico comparativo da cor dos extratos de uvas nas coordenadas L^* vs C^*	72
Figura 30 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais nas uvas Vinhão (mg/L) ..	73
Figura 31 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais para as uvas Vinhão (mg/kg uva).....	73
Figura 32 - Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes nas uvas Vinhão	74

Figura 33 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas.....	75
Figura 34 - Representação comparativa do teor de antocianinas monoméricas mg/Kg uva Vinhão entre vários estudos.....	76
Figura 35 – Representação comparativa do teor de antocianinas monoméricas nas uvas Vinhão entre vários estudos.....	77
Figura 36 – Gráfico da correlação IFT vs antocianinas (bissulfito) para uvas.....	77
Figura 37 - Gráfico comparativo do poder tanante das uvas Vinhão de 19 e 20 de Setembro	79
Figura 38 - Gráfico comparativo do índice de fenóis totais dos mostos de Vinhão	80
Figura 39 – Evolução do índice de fenóis totais/ tempo de maceração/ processo de vinificação ..	81
Figura 40 – Evolução do índice de fenóis totais/ tempo de maceração/ processo de vinificação ..	82
Figura 41 - Gráfico comparativo da intensidade de cor dos mostos	83
Figura 42 – Evolução da intensidade de cor / tempo de maceração	84
Figura 43 - Gráfico comparativo do Índice de cor vermelha dos mostos	85
Figura 44 – Evolução do índice de cor vermelha dos mostos / tempo de maceração	85
Figura 45 – Gráfico comparativo da tonalidade dos mostos /cuba	86
Figura 46– Evolução média da tonalidade durante a maceração a frio	86
Figura 47 - Gráfico comparativo da cor dos mostos no sistema CIELab. (a^* vs b^*).....	87
Figura 48 - Gráfico da evolução de cor dos mostos no sistema CIELab. ($L^*a^*b^*$) por tempo de maceração para cada uma das cubas de maceração a frio	88
Figura 49 - Gráfico comparativo da cor dos mostos nas coordenadas L^* vs C^*	89
Figura 50 - Evolução cromática do mosto na cuba 68.....	89
Figura 51 – Evolução cromática do mosto na cuba 69.....	90
Figura 52 – Evolução cromática do mosto na cuba 70.....	90
Figura 53 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais nos mostos.....	91
Figura 54– Evolução comparativa do teor de antocianinas nos mostos/ tempo de maceração com outros estudos	92
Figura 55 – Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes nos mostos	93
Figura 56 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos mostos Vinhão	94
Figura 57 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos mostos Vinhão	94
Figura 58 - Evolução do total de antocianinas / tempo de maceração em cada cuba	95
Figura 59 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos mostos Vinhão / tempo de maceração.....	95
Figura 60 – Evolução da extração das antocianinas monoméricas glicosadas	96
Figura 61 – Evolução da extração das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas.....	97

Figura 62 – Correlação entre o IFT e o teor de antocianinas (HPLC).....	97
Figura 63 – Correlação entre o IFT e o teor de antocianinas (método bissulfito).....	98
Figura 64 - Evolução do total de antocianinas / tempo de maceração.....	98
Figura 65 – Representação gráfica do índice de diálise dos mostos.....	99
Figura 66 - Evolução do índice de diálise dos mostos / tempo de maceração.....	100
Figura 67 – Representação gráfica do poder tanante dos mostos	101
Figura 68 - Evolução do poder tanante dos mostos /tempo de maceração	101
Figura 69 – Correlação entre o poder tanante e o IFT	102
Figura 70 – Correlação entre o poder tanante e o índice de diálise	103
Figura 71 – Correlação entre o poder tanante e o total de antocianinas (HPLC).....	104
Figura 72 – Correlação entre o poder tanante e o total de antocianinas (bissulfito)	105
Figura 73 – Gráfico comparativo de acidez, ácido tartárico e pH para os 3 tipos de vinificação ..	108
Figura 74- Gráfico comparativo do índice de fenóis totais dos vinhos / processo de vinificação .	109
Figura 75 - Gráfico comparativo da intensidade de cor dos vinhos /processo de vinificação.....	110
Figura 76 - Gráfico comparativo do Índice de cor vermelha dos vinhos segundo os processos de vinificação	111
Figura 77 – Gráfico comparativo da tonalidade dos vinhos / processo de vinificação	112
Figura 78 - Gráfico comparativo da cor dos vinhos no sistema CIELab ($L^*a^*b^*$)	113
Figura 79 - Gráfico comparativo da cor dos vinhos em garrafão no sistema CIELab. ($L^*a^*b^*$)	113
Figura 80 - Gráfico comparativo da cor dos vinhos no sistema CIELab. (a^*b^*)	114
Figura 81- Gráfico comparativo da cor dos vinhos nas coordenadas L^* vs C^*	115
Figura 82 -. Representação gráfica de ΔL^* vs ΔC^* para diferenciar os vinhos	116
Figura 83 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais nos vinhos.....	117
Figura 84 – Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes nos vinhos VT e MF.....	118
Figura 85 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos vinhos.....	118
Figura 86 – Representação comparativa do perfil antociânico entre uvas e vinhos da casta Vinhão	119
Figura 87 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos vinhos Vinhão	120
Figura 88 – Representação gráfica da relação entre o Índice de fenóis total (IFT) e o teor de	121
Figura 89 – Gráfico comparativo do teor de taninos proantociânicos totais nos vinhos por processo de vinificação	122
Figura 90 – Representação gráfica do índice de diálise dos vinhos / processo de vinificação	123
Figura 91 – Gráfico comparativo do poder tanante dos vinhos / processo de vinificação	124
Figura 92 – Representação gráfica da relação entre poder tanante vs IFT	126

Figura 93 – Resultados obtidos para os parâmetros cor e limpidez na análise sensorial	127
Figura 94 – Resultados obtidos na avaliação olfativa aos vinhos por processo de vinificação ...	128
Figura 95 – Resultados obtidos na avaliação olfativa- aromática aos vinhos por processo de vinificação	128
Figura 96 – Resultados obtidos na avaliação gustativa aos vinhos por processo de vinificação .	129
Figura 97 – Resultados obtidos na avaliação gustativa aos vinhos por processo de vinificação .	129

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas totais.	64
Tabela 2 - Índice de fenóis totais para as uvas da casta Vinhão (média $\pm$ desvio padrão)	68
Tabela 3 - Características cromáticas das uvas Vinhão (média $\pm$ desvio padrão)	69
Tabela 4 - Parâmetros cromáticos no sistema CIELab para os extractos de uvas Vinhão	71
Tabela 5 - Resultado do Índice de diálise para o extrato de uvas (média $\pm$ desvio padrão)	78
Tabela 6- Índice de fenóis total para os mostos de Vinhão (média $\pm$ desvio padrão)	80
Tabela 7 - Intensidade de cor dos mostos (média $\pm$ desvio padrão)	83
Tabela 8 - Índice de cor vermelha dos mostos (média $\pm$ desvio padrão).....	84
Tabela 9 - Tonalidade dos mostos (média $\pm$ desvio padrão)	86
Tabela 10 - Parâmetros cromáticos no sistema CIELab para os mostos	87
Tabela 11 - Resultados do Índice de diálise para os mostos (média $\pm$ desvio padrão).....	99
Tabela 12- Resultados do poder tanante para os mostos	100
Tabela 13 – Resultados das análises físico-químicas dos vinhos em garrafão na forma de média $\pm$ incerteza	106
Tabela 14 – Resultados das análises físico-químicas dos vinhos	107
Tabela 15 - Parâmetros cromáticos no sistema CIELab para os vinhos/processo de vinificação	112

Lista de abreviaturas

a* – Coordenada colorimétrica (Verde - Vermelho)
Abs – Absorvância
ACS – acetil- co-enzima A sintetase
ADP – adenosina difosfato
APB – Adega Cooperativa de Ponte da Barca
ATP – adenosina trifosfato
AV – acidez volátil
b* – Coordenada colorimétrica (Amarelo - Azul)
BSA – Albumina sérica bovina
C* - Coordenada colorimétrica - Cromaticidade
CIELab – Commission Internationale de l'Eclairage – sistema L*, a*, b*
CoA – co-enzima A
CVRVV – Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
DAD – Detetor de barra de díodos (Diode array detector)
equiv. - equivalente
ENR – extrato não redutor
FA – fermentação alcoólica
FCUP – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
f.d. – fator de diluição
FML – fermentação malo-láctica
G6P - glucose-6-fosfato
G6PDH – glucose-6-fosfato desidrogenase
GSH – glutatião na forma reduzida
GSSH – glutatião na forma oxidada
H* - coordenada colorimétrica de tonalidade (Hue)
HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência (High performace liquid chromatography)
HQ – enzima hexoquinase
IC – Intensidade de cor
ICV – intensidade de cor vermelha
ID – Índice de diálise
IFT – Índice de fenóis totais
L* – Luminosidade
L-MDH - enzima L-malato desidrogenase
Malv-3-glu - malvidina -3-O-glucósido
MF – maceração a frio

MFG – maceração a frio e fermentações em garrafão
MFG média – média das macerações a frio e fermentações em garrafão
min – Minutos
NAD⁺ - nicotinamida e adenina dinucleótido no estado oxidado
NADH - nicotinamida adenina dinucleótido
NADP – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NTU - Unidades de turbidez (Nephelometric Turbidity Units)
p – Nível de significado estatístico
PGI – enzima fosfoglucoase isomerase
PT – poder tanante
R² – quadrado do índice de correlação
S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*
T - tonalidade
TA – teor de antocianinas
TAV – Título Alcoométrico volúmico
TAV adq – Título alcoométrico volúmico adquirido
TAV tot – Título alcoométrico volúmico total
TN – Touriga Nacional
TPA – Taninos proantociânicos totais
UV-Vis – Ultra-violeta/ Visível
Vs - *versus*
VT – Vinhão tradicional
 ΔC^* – Diferença da Cromaticidade entre duas amostras
 ΔE – Diferença da percepção de cor entre duas amostras
 ΔL^* – Diferença da Luminosidade entre duas amostras
6PG - 6-fosfogluconato
68G – vinho em que a maceração a frio ocorreu na cuba 68 e fermentação em garrafão
69G – vinho em que a maceração a frio ocorreu na cuba 69 e fermentação em garrafão
70G – vinho em que a maceração a frio ocorreu na cuba 70 e fermentação em garrafão

I. Introdução

O sector do vinho constitui em Portugal um dos mais importantes sectores, seja a nível económico, social ou até mesmo cultural.

A origem da marca *Vinho Verde* remete para as características naturais da região que o produz, densamente verdejante, mas também para o próprio perfil do vinho que pela sua frescura e leveza se diz verde em alusão à sua juventude e por oposição a outros vinhos mais complexos e pesados.

O *Vinho Verde* é exclusivamente produzido na Região Demarcada dos Vinhos Verdes, no noroeste de Portugal, na zona tradicionalmente conhecida como Entre-Douro-e-Minho, somente a partir de castas autóctones da região preservando a sua tipicidade de aromas e sabores tão diferenciadores a nível mundial. Desde o Vinho Verde produzido a partir da criteriosa junção de várias casas selecionadas, ao Vinho Verde varietal, produzido a partir de uma única casta, a oferta da Região é diversificada [1].

A Região Demarcada dos Vinhos Verdes, sempre teve tradição na produção de vinho tinto.

Trata-se de um vinho diferente de todos os outros: cor vermelha intensa, aroma vinoso com destaque para os frutos silvestres, baixo teor alcoólico, mais acídulo e agressivo (adstringência por vezes excessiva) muito adaptado à gastronomia da Região, e sem grande capacidade de conservação e envelhecimento, o que obriga o viticultor a ter um período de tempo de venda muito restrito, o ano seguinte à vinificação, e um mercado alvo de consumo extremamente limitado.

O *Vinho Verde* tinto sempre foi um vinho de lote com características próprias, consoante cada uma das nove sub-regiões, devido às diferentes variedades, condições geográficas e edafo-climáticas [2].

Recorrentemente premiado em concursos nacionais e internacionais, o *Vinho Verde* de hoje não é certamente o mesmo de há uma década, em resultado do investimento da Região dos Vinhos Verdes em novas vinhas, novos sistemas de condução da vinha, uma nova geração de enólogos e a profissionalização de toda a atividade. Ano após ano, os produtores da Região dos Vinhos Verdes surpreendem os mercados com vinhos mais inovadores e de qualidade superior.

Considera-se que um vinho apresenta elevados índices de qualidade quando se verifica um equilíbrio entre todos os seus constituintes, salvaguardando obrigatoriamente uma fatia importante no estabelecimento desse equilíbrio, para o gosto pessoal do consumidor.

Realça-se, contudo, que o equilíbrio entre os vários constituintes pode ser atingido através da utilização de castas apropriadas a cada tipo de vinho, pelo controlo da maturação das uvas e através de uma tecnologia eficaz [3].

1. A Vinha

A qualidade de um vinho depende de variadíssimos fatores. Genericamente começa na planta (casta e porta-enxertos), a qual é influenciada pelos fatores ambientais (clima e solos) e pela tecnologia vitícola (sistemas de condução, fertilizações,...). Por fim a tecnologia enológica irá produzir o produto final, o vinho, que exprimirá o efeito de todos estes fatores.

1.1. *Vitis vinifera*

Sob o ponto de vista sistemático, todas as espécies de videira pertencem à ordem das Ramnales, família das Vitáceas ou Ampelídeas. As espécies da família das Vitáceas são plantas fanerogâmicas, angiospérmicas, dicotiledóneas, cuja característica mais importante é a de serem arbustos sarmentosos, isto é, lianas herbáceas ou lenhosas, com gavinhas opositifólias simples ou ramificadas, nalguns géneros ou substituídas por ventosas. As folhas das videiras são inteiras ou lobadas, por vezes com vários folículos geralmente peciolados. As inflorescências são normalmente opositifólias, raramente pseudo-axilares, com flores hermafroditas, salvo em espécies dioicas, sendo tetrâmeras ou pentâmeras, com cálice em cúpula, geralmente com 4-5 sépalas e corola caduca na ântese, formada frequentemente por 4-5 pétalas. O androceu é constituído por 5 estames, raramente 4-7, com antenas biloculares introrsas. O ovário é súpero, geralmente com dois carpelos, contendo 2 óvulos anatópicos cada um.

A família das Vitáceas inclui 19 géneros.

O género mais importante é o *Vitis* que se subdivide em 2 subgéneros, O *Muscadinea*, com 40 cromossomas e o *Euvitis* com 38 cromossomas. Este último é composto, por 4 grandes grupos de espécies, em função da sua localização geográfica, adaptação climática e aptidões agronómicas.

- Tronco americano de zonas temperadas (ex: *V.labrusca*, *V.riparia*, *V.rupestris*)
- Tronco americano de climas tropicais e equatoriais (ex: *V.coriaciae*, *V.caribaea*)
- Tronco asiático oriental (ex: *V.amurensis*, *V.armata*)
- Tronco eu-asiático de climas temperados – *Vitis vinifera* [4]

1.2. Castas Tintas

As castas tintas aptas à Denominação de Origem Vinho Verde são:

Alicante-Bouschet, Alvarelhão (sinónimo Brancelho), Amaral (sinónimo Azal Tinto), Baga, Borraçal, Espadeiro, Grand-Noir, Padeiro (sinónimo Padeiro de Basto e Tinto Cão), Pedral, Pical Pôlho (sinónimo de Pique-poul-Noir), Rabo de Anho (sinónimo de Rabo de Ovelha), Touriga Nacional, Trincadeira (sinónimo de Tinta Amarela e Trincadeira Preta), Vinhão, e ainda as 8 castas autóctones da região: Doçal, Doce (sinónimo de Doçal de Refóios), Espadeiro-mole, Labrusco, Melhorio (sinónimo Verdeal), Mourisco, Seção (sinónimo Sousão Forte) e Verdelho (sinónimo de Verdelho Tinto) [1,2,5].

As castas autóctones são variedades perfeitamente adaptadas às sub-regiões onde vegetam há muitos anos, surgiram por mutação ou cruzamentos naturais, são mais resistentes às alterações climáticas ou a outro tipo de acidentes. Algumas delas revelam elevado rendimento e boa relação álcool/acidez, outras baixas ou elevada acidez, características que poderão satisfazer diversos objetivos de produção, podendo contribuir para a identidade de vinhos diferentes pelo facto do *Vinho Verde* tinto ser normalmente um vinho de lote [2].

1.2.1 Casta Vinhão

A casta Vinhão é recomendada em toda a Região Demarcada porque é de elevada qualidade, sendo a mais importante das castas tintas. [5]

É uma casta vigorosa bastante regular na produção, com um índice de fertilidade médio e uma produtividade mediana. Tardia no abrolhamento mas precoce na maturação portanto de ciclo vegetativo curto e maturação intermédia. O cacho é médio e por vezes compacto. O bago é médio, uniforme e de forma arredondada bastante suculento, de lágrima corada e com sabor especial. A folha de tamanho médio apresenta como característica peculiar o perfil em goteira, e o seio peciolar faz um V perfeito. As varas apresentam entre-nós curto na base, alongando-se para a parte terminal dos mesmos [5].

A casta Vinhão é a única casta regional tintureira, tem boa produção e dá origem a vinhos de cor vermelha granada, de aroma vinoso, onde se evidenciam os frutos silvestres (amora e framboesa), encorpados, harmoniosos, saborosos e ligeiramente adstringentes [1,3].

2. A cor

Em certa medida, a cor permite avaliar a qualidade de um alimento, pois pode influenciar significativamente a apreciação do aroma e do gosto do produto, com uma forte participação na

apreciação global. A cor é um dos atributos mais importantes para avaliar a qualidade do vinho, é a primeira característica a ser notada. Através dela pode-se ter uma ideia da sua idade, da sua evolução no tempo e também de possíveis defeitos. O consumidor espera determinadas características cromáticas em função do produto adquirido.

A cor do vinho vem do facto de ele ser capaz de absorver diferencialmente as radiações que o atravessam. Um vinho é tinto porque absorve as radiações verde e azul e apresenta a cor complementar.

Quimicamente, a cor dos vinhos é devido aos compostos polifenólicos presentes nas uvas, que passam para o vinho durante o processo de vinificação e de numerosas reações que têm lugar durante o envelhecimento. As maiores mudanças na composição da cor ocorrem durante o primeiro ano após a vinificação. Estes compostos encontram-se sobretudo nas películas e na polpa das castas tintureiras. No vinho tinto, as antocianinas são os principais pigmentos responsáveis pela sua coloração, e no vinho branco os responsáveis são os flavonóis e as formas quinónicas dos derivados dos ácidos fenólicos e outros polifenóis.

2.1. Os polifenóis

Os polifenóis constituem um grande grupo de moléculas dispersas na natureza e produzidas como resultado do metabolismo secundário das plantas.

Os compostos fenólicos revestem-se de fundamental importância nas características dos vinhos pois são responsáveis pela sua cor, corpo e adstringência e pelas diferenças entre uvas ou vinhos tintos e brancos devido à presença ou ausência de antocianinas. Têm propriedades benéficas para a saúde como bactericida, vitamínicas, antioxidante que permite considerá-los protetores de doenças cardiovasculares. Estas moléculas encontram-se em várias partes do cacho e são extraídas durante o processo de vinificação [6].

Este amplo grupo de substâncias permite a caracterização varietal. São substâncias sintetizadas nas células das uvas em estreita dependência do seu património enzimático, que por sua vez é uma expressão da informação codificada a nível dos genes [7]. De facto, quer as antocianinas quer os ácidos hidroxicinamílicos tartáricos das películas das uvas, enquanto metabolitos secundários estão diretamente ligados à componente genética varietal [8].

As características ambientais sob as quais decorre o desenvolvimento dos bagos têm grande influência na quantidade dos compostos responsáveis pela cor, mas a natureza e as percentagens relativas destas substâncias obedecem a um determinante genético que as torna mais ou menos constantes [8].

A reatividade dos compostos fenólicos advém de uma característica estrutural comum a todos eles que é a presença de um anel aromático hidroxilado. A forma mais simples deste elemento estrutural é o fenol, que assim dá o nome a esta série de compostos.

As uvas e os vinhos contêm uma série de compostos fenólicos, todos derivados desta estrutura básica, sendo que os teores totais de compostos fenólicos são maiores nas uvas que nos vinhos [9].

Uma das possíveis classificações dos polifenóis das uvas e dos vinhos é a sua divisão em compostos flavonóides e em não flavonóides. Entre os compostos flavonóides encontram-se as antocianinas, flavonas, flavan-3-óis, flavonóis e os flavanonóis. Nos compostos não-flavonóides encontram-se os ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e os estilbenos.

2.1.1. Compostos flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano, - núcleo flavânico, Figura 1.

Os flavonóides são os principais responsáveis pelas sensações gustativas dos vinhos e pela cor, e encontram-se nas grânhas, na polpa e na película das uvas. . De entre todos eles, as antocianinas, os flavan-3-óis e as proantocianidinas, são quantitativamente os mais importantes e são os principais responsáveis pela cor dos vinhos.

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

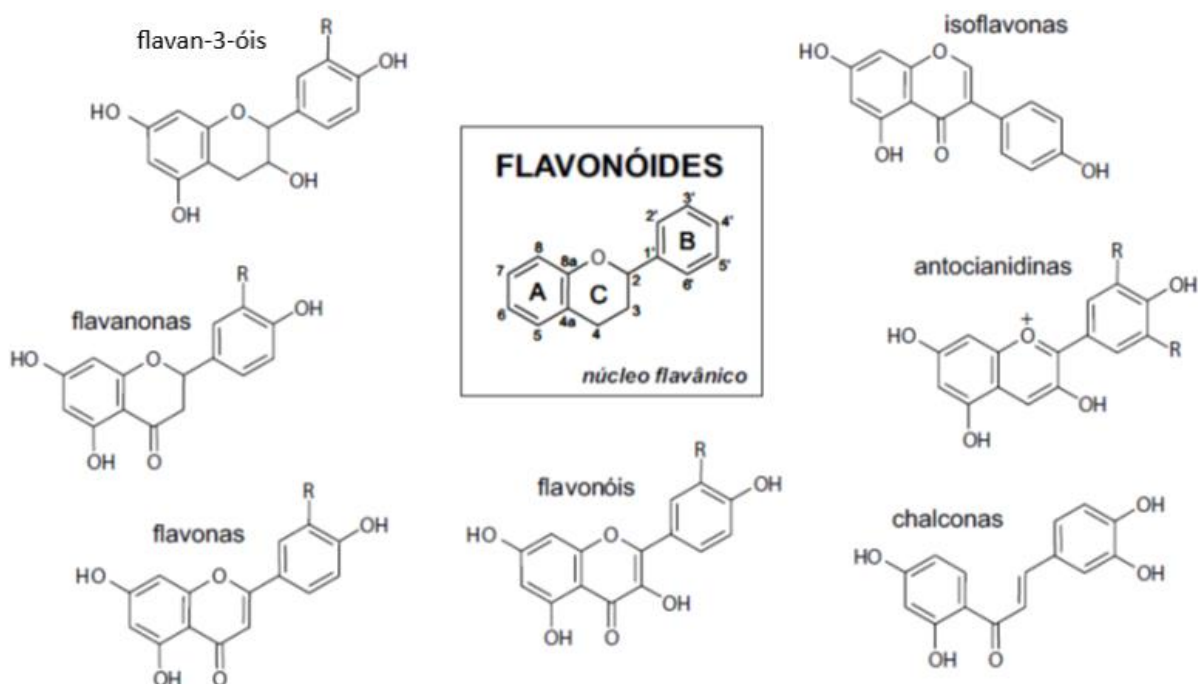


Figura 1 - Estrutura geral dos principais flavonoides [10]

2.1.1.1. Os pigmentos antociânicos – as antocianinas

Os pigmentos antociânicos são responsáveis pela pigmentação de cor viva, vermelha, azul ou violeta encontrada na maioria das espécies do reino das plantas, nomeadamente nas películas das uvas negras e têm uma estrutura baseada no catião flavílio (2-fenil-benzopirilo), representado na Figura 2.

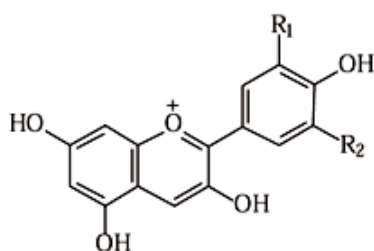


Figura 2 - Catião flavílio

O catião flavílio é normalmente glicosilado na posição 3 (característico da *Vitis vinifera*) e 5 e os açúcares mais frequentes são os monossacarídeos (glucose, galactose, ramnose e arabinose), os dissacarídeos e os trissacarídeos. Estes açúcares podem ser acilados pelos ácidos cinâmico, *p*-cumárico, cafeico, ferrúlico e sinápico. A aglicona da antociana denomina-se **antocianidina**. Nas castas e vinhos tintos, cinco antocianidinas têm sido identificadas: cianidina

(vermelho alaranjado), peonidina (vermelho), delphinidina (vermelho azulado), petunidina e malvidina (vermelho azulado) - Figura 3. A malvidina é considerada o composto mais representativo em variedades *Vitis vinífera* [11].

Quimicamente, as antocianinas são antocianidinas glicosiladas correspondendo à antocianidina aglicona obtida por hidrólise. A glicosilação permite uma maior estabilidade da molécula de antocianidina [6]. As antocianinas diferem entre si, pela presença de grupos (-OH, -O-CH₃) ligados aos cromóforos alterando o comprimento de onda de absorção máximo no visível e consequentemente as diferenças de cor na zona do vermelho [12].

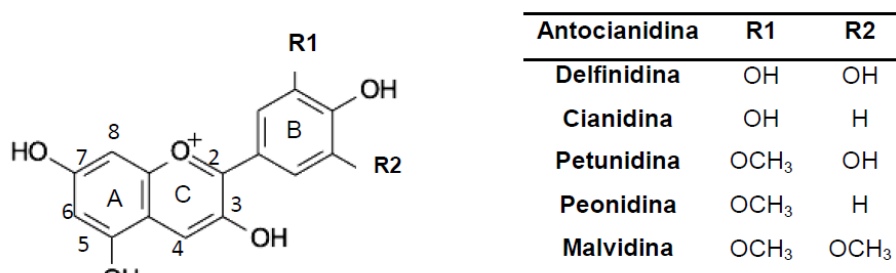


Figura 3 - Estrutura das antocianidinas correspondentes para os diferentes substituintes

Em solução aquosa, a 25°C e com pH variando entre 0 e 6, quatro espécies de moléculas de antocianinas existem em equilíbrio, a anidrobases A, o catião flavílio AH⁺, a pseudobases carbinol B, e a forma chalcona C, cujas estruturas se mostram na figura 4.

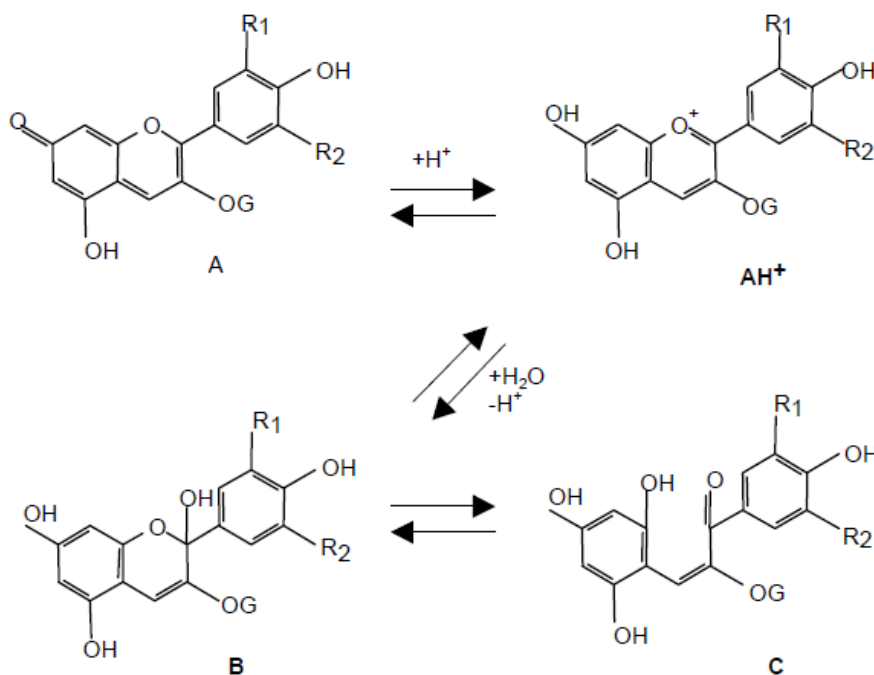
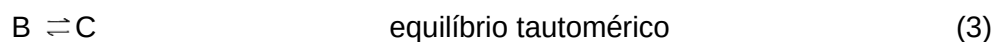
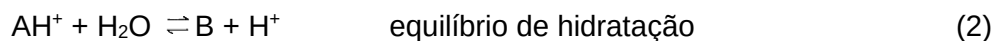
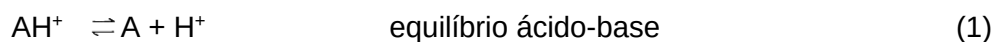


Figura 4 - Estrutura das antocianinas em equilíbrio em função do pH (pH=1-6)

A interconversão entre estas estruturas é dada pelo esquema seguinte [13,14]:



Estas reações são endotérmicas, logo os equilíbrios são função da temperatura.

2.1.1.2. Os flavanóis ou flavan-3-óis

Os flavan-3-óis, também designados de flavanóis, são constituídos por um núcleo flavânico que é composto por dois anéis aromáticos e por um anel heterocíclico pirânico, Figura 5.

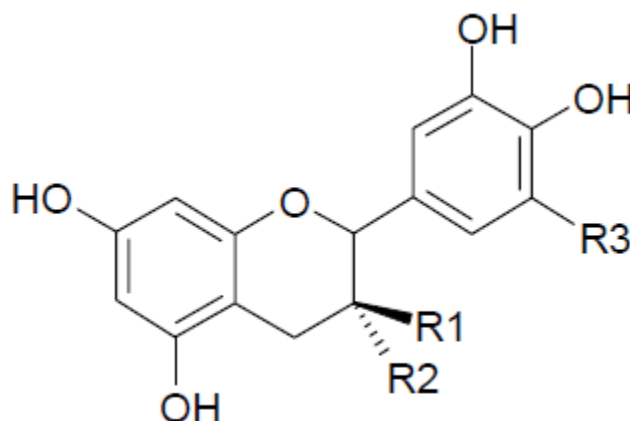


Figura 5 – Estrutura geral dos flavan-3-óis

Os compostos mais simples da família dos flavan-3-óis são as catequinas e as galhocatequinas apresentados na Figura 6.

	R1	R2	R3
(+)-catequina	OH	H	H
(-)-epicatequina	H	OH	H
(+)-galhocatequina	OH	H	OH
(-)-epigalhocatequina	H	OH	OH

Figura 6 - Estrutura dos flavan-3-óis mais abundantes no vinho

A importância desta classe de compostos reside também no facto de serem a unidade estrutural constituinte dos taninos, muito abundantes na natureza.

Os taninos enológicos podem ser classificados em dois grupos: taninos condensados ou proantocianidinas e taninos hidrolisáveis que são compostos por taninos elágicos e taninos gálicos, que libertam respetivamente o ácido elágico e o ácido gálico após hidrólise ácida. São constituídos também por glucose. Estas moléculas são hidrossolúveis e passam rapidamente para solução no meio hidro alcoólico como o vinho. Este grupo de taninos encontra-se principalmente na madeira de carvalho, castanheiro e outras espécies vegetais. No vinho, o ácido elágico resulta do contacto do vinho com madeira ou através da adição de taninos enológicos. O ácido gálico encontra-se nas películas e nas grânhas, existindo assim no vinho, podendo, no entanto, provir de taninos enológicos ricos em taninos gálicos ou ainda da perda dessa molécula previamente esterificada em unidades monoméricas de epicatequina ou de epigallocatequina.

Os taninos caracterizam-se por possuírem a capacidade de se combinarem com as proteínas e outros polímeros, característica esta que explica o seu poder adstringente provocado pela precipitação das proteínas e glucoproteínas da saliva. Por outro lado, os taninos comportam-se como clarificantes quando associados a proteínas formando produtos insolúveis e floculentos que ao atravessarem as massas, englobam as partículas em suspensão, tornando o líquido límpido.

Os taninos têm também um papel preponderante na evolução dos vinhos devido à sua intervenção nos fenómenos de oxidação-redução, associação e co-pigmentação.

Durante a maturação das uvas verifica-se uma evolução da constituição em taninos, sendo esta diferente e não paralela à das antocianinas. [6]

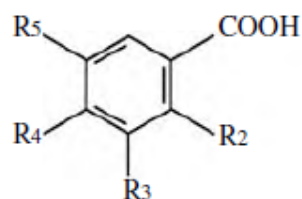
Por outro lado, a estrutura dos taninos das películas, grânhas e engaço é diferente, o que implica que a composição dos vinhos em taninos seja dependente do processo de vinificação [11].

2.1.2. Compostos não flavonóides

Nos compostos não flavonoides encontram-se os ácidos benzoico e cinâmico e seus derivados, assim como os estilbenos.

2.1.2.1. Os ácidos fenólicos e seus derivados

Foram identificados nas uvas e no vinho 7 ácidos benzoicos, que se diferenciam pelos substituintes no anel benzénico, Figura 7.



Ácidos benzoicos	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ácido p-hidroxilbenzoico	H	H	OH	H
Ácido protocatéquico	H	OH	OH	H
Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido sirínico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido salicílico	OH	H	H	H
Ácido gentísico	OH	H	H	OH

Figura 7 – Ácidos benzoicos [adaptado de [6]]

Os ácidos benzoicos apresentam-se na uva de *Vitis Vinifera* combinados a uma molécula de glucose ou na forma de ésteres. Dos ácidos derivados do ácido benzoico, os mais importantes são os ácidos vanílico, sirínico e salicílico que aparecem ligados às paredes celulares e principalmente o ácido gálico que se encontra sob a forma de éster dos flavan-3-óis.

Os outros ácidos benzoicos existem em menor quantidade nas uvas na forma de ésteres e no decurso da elaboração e conservação do vinho, vão sofrendo uma hidrólise lenta e assim, no vinho encontram-se quer livres quer combinados [9].

Na Figura 8 encontra-se representado o ácido cinâmico e os seus derivados mais importantes: o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico.

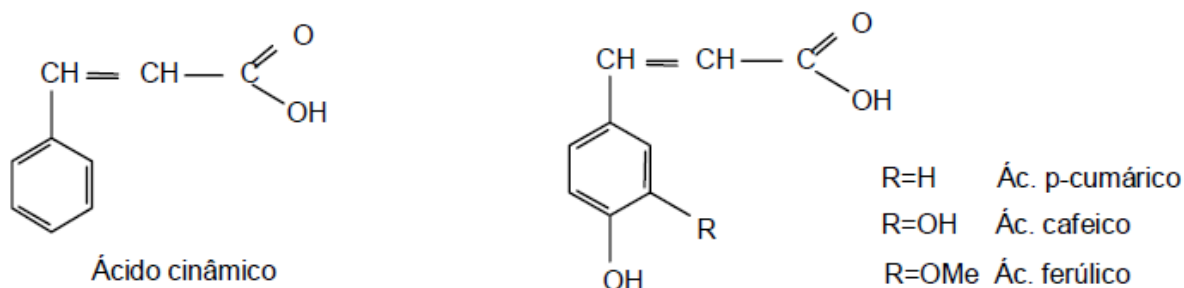


Figura 8 - Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados mais importantes [9]

Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos das células das películas e polpas, sob a forma de ésteres tartáricos designando-se então por ácidos hidroxicinamiltartáricos de estrutura representada na Figura 9 [15].

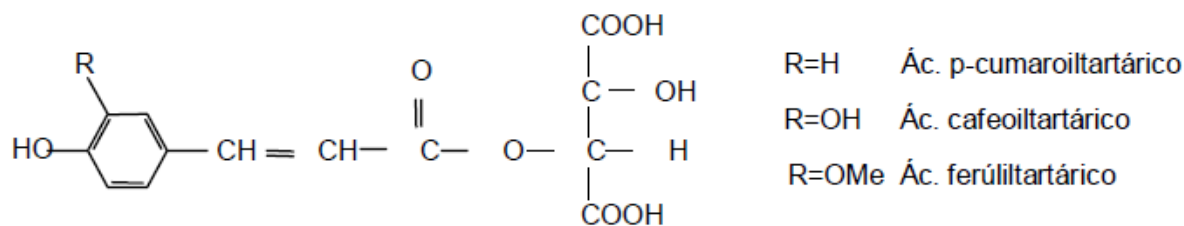
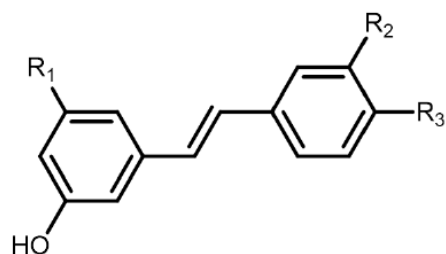


Figura 9 - Fórmula geral dos ácidos hidroxicinamiltartáricos [9]

Os ácidos cinâmicos combinam também com antocianinas monoglucósidos formando antocianinas aciladas. Do ponto de vista organolético, estes compostos não têm odor nem gosto diferenciador, são, no entanto, precursores de aroma, sendo responsáveis por aromas como couro, guache, fumo, tosta, etc.

2.1.2.2. Estilbenos

Os estilbenos têm 2 anéis benzénicos geralmente ligados por uma cadeia de etano, ou possivelmente etileno. Quase todos os estilbenos possuem duas formas isoméricas (*cis* e *trans*), sendo a forma *trans* a mais estável. Entre os isómeros *trans*, acredita-se que o resveratrol, ou 3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno, Figura 10, seja produzido por videiras em resposta a uma infeção fúngica [16]. O resveratrol, está localizado nas películas e, portanto, quanto maior for o processo de maceração pelicular, maior será a quantidade extraída deste tipo de compostos. Assim, o resveratrol é extraído principalmente durante a fermentação dos vinhos tintos e parece ter algumas propriedades benéficas [6].



Estilbeno	R ₁	R ₂	R ₃
Resveratrol	OH	H	OH
Resveratrolósido	OH	H	O-glucósido
Picetanol	OH	OH	OH
Astringina	OH	OH	O-glucósido

Figura 10 – Estrutura e fórmula química geral dos estilbenos [17]

2.2. Sistema CIELab

O sistema CIELab foi o sistema utilizado para a quantificação e medição da cor de acordo com a Commission Internationale de l'Eclairage. Está organizado segundo um sistema de coordenadas cartesianas representadas por 3 eixos ortogonais que traduzem com maior precisão a sensibilidade humana em relação à cor: a luminosidade (L^*), a^* e b^* .

A luminosidade (L^*) corresponde à transmitância e varia inversamente com a densidade corante do vinho. Os valores de luminosidade oscilam entre 0 (para uma amostra completamente opaca) e 100 (para uma amostra completamente transparente), a^* é a componente verde/vermelho ($a^* > 0$ vermelho, $a^* < 0$ verde) e b^* é a componente azul/amarelo ($b^* > 0$ amarelo, $b^* < 0$ azul), Figura 11.

A percepção cromática de uma amostra é definida essencialmente pela sua tonalidade e pelo seu croma. A cromaticidade (C^*) corresponde à maior ou menor intensidade da cor do vinho e a tonalidade (H^*) corresponde ao seu comprimento de onda dominante, Figura 12.

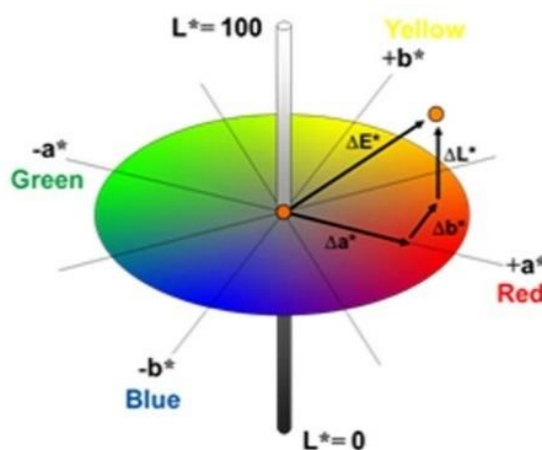


Figura 11 - Definição da cor usando o sistema L^* , a^* e b^*

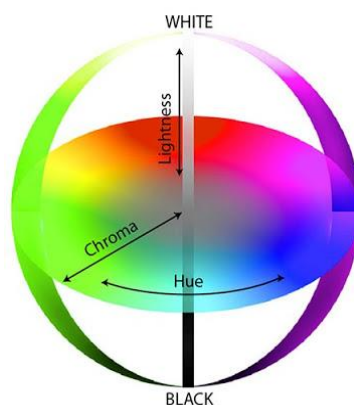


Figura 12 - Definição da cor usando o sistema L*, C* e H*

3. Método de processamento – Operações pré-fermentativas

O processo de vinificação é um factor marcante para a obtenção de vinhos de qualidade, conjuntamente com as práticas culturais que levam à produção de uvas de qualidade.

O vinho tinto é um vinho de maceração. A duração e a intensidade da extração a partir das películas, grânhas e pecíolos, acompanhada ou não da fermentação alcoólica do sumo depende das uvas utilizadas e do vinho que se pretende obter. A maceração é o meio pelo qual o enólogo pode personalizar o vinho. Os vinhos Primeur são pensados para se beberem jovens, logo a frescura e os aromas a frutos sobrepõem-se às concentrações fenólicas, enquanto que os vinhos Premium, requerem uma concentração de taninos suficiente para se desenvolverem ao longo do tempo [6].

A vinificação de vinhos tintos na Região dos Vinhos Verdes é realizada com tecnologia tradicional, salvo algumas exceções.

O processo tradicional de vinificação do vinho tinto consiste nas seguintes etapas:

- operações mecânicas após colheita da uva (receção, desengace, esmagamento)
- encubação, onde ocorre a maceração e a fermentação alcoólica simultânea
- separação do vinho a partir do mosto, por defecação, sedimentação ou prensagem
- fermentações finais (fim da fermentação alcoólica e fermentação malo-láctica)

Estas etapas de vinificação são flexíveis e podem ser adaptadas a diferentes situações, conceitos e tipos de vinho, conforme o desejado. Existem por isso, técnicas de vinificação que seguem uma outra ordem cronológica e que procuram especialmente separar a fase de maceração da fase de fermentação alcoólica.

3.1. Maceração a frio

A maceração é a etapa da vinificação na qual os compostos fenólicos e aromáticos são transferidos ao vinho. A qualidade organolética do vinho tinto está diretamente relacionada aos procedimentos adotados nesta etapa. Trata-se da cinética da maceração.

Os fenómenos envolvidos são complexos e não são a causa direta da extração dos constituintes da uva. Aliás, existem alguns fatores que aumentam a extração dos compostos fenólicos e outros diminuem essa concentração.

A maceração é controlada por vários mecanismos: [6]

- a extração e a dissolução dos constituintes
- a difusão das substâncias extraídas
- re-fixação das substâncias extraídas no meio: películas, leveduras, grainhas, engaço
- modificação das substâncias extraídas

Os fatores que favorecem a extração dos compostos durante a maceração podem ser separados em 3 categorias:

Fatores químicos

- dióxido de enxofre devido ao seu poder dissolvente
- etanol devido ao seu poder dissolvente dos compostos fenólicos

Fatores bioquímicos

- preparados enzimáticos para favorecer a extração dos componentes da película

Fatores físicos

- tempo de maceração
- controlo térmico da maceração, remontagem, “delestage”
- temperatura da massa vínica
- afundamento das partes sólidas
- número e frequência das remontagens
- volume de líquido remontado/unidade de tempo
- relação fase sólida/fase líquida
- sistema de maceração /equipamento

A maceração a frio é uma técnica de vinificação de origem francesa, criada para a uvas da casta Pinot Noir [18] que permite a obtenção de vinhos mais aromáticos, nos quais as características varietais da uva são ressaltadas, obtendo-se vinhos diferentes pelo seu carácter frutado, pela sua fineza de boca e menores concentrações de acetato de isoamila, quando comparados com os elaborados pelo método tradicional.

A técnica tem sido usada com o objetivo de melhorar duas das mais importantes características do vinho: a cor e o aroma, aumentando a extração em meio aquoso de compostos fenólicos e aromas das películas das uvas para os vinhos por extração seletiva de antocianinas e taninos que possa resultar num sabor menos agressivo, pois os taninos são mais solúveis em álcool e os maiores responsáveis pela adstringência. Assim, a extração, nesta técnica, ocorre na ausência de etanol devido às baixas temperaturas de maceração que impedem a fermentação de começar [19,20,21].

A concentração de antocianinas e fenóis totais com uvas da casta Cabernet Sauvignon não aumentou com a maceração a frio, levando a considerar que a maceração clássica é a mais adequada para a obtenção de vinhos de Cabernet Sauvignon, mais ricos em compostos fenólicos [22]. Por sua vez, os resultados obtidos com a casta Pinot Noir consistentemente mostram que a maceração a frio por si só não tem efeito ou tem efeito negativo na composição fenólica, a não ser que se aumente a concentração de SO_2 para 250 mg/L. Os mesmos resultados foram obtidos para as castas Pinotage e Sangiovese [23].

Em estudo realizado para a casta Syrah, a maceração a 15°C durante 7 dias, extraiu um teor de antocianinas praticamente constante ao longo do tempo, ao contrário de outros estudos que mostraram diminuição do teor a partir do 3º dia de maceração e provou que esta técnica aumenta a extração de antocianinas e outros compostos fenólicos obtendo vinhos mais escuros, azulados e menos castanhos [24].

Verificou-se, num ensaio realizado com a casta Merlot, que a maceração a frio pareceu não induzir melhorias a nível aromático, mas acima de tudo contribuiu para o aumento de corpo e estrutura dos vinhos [25].

Em relação à análise sensorial, Aleixandre *et al* em 2012 destacou a importância da maturação da uva Bobal e a duração da maceração pré-fermentativa a frio na qualidade do vinho [26].

Para uma melhor análise desta técnica vejamos o efeito de alguns fatores físicos, mais facilmente controláveis.

3.1.1. Efeito do tempo de duração

A dissolução de compostos fenólicos a partir dos sólidos existentes no mosto varia com o tempo de maceração, mas não existe proporcionalidade entre o tempo da maceração e a concentração de compostos fenólicos conseguida [6], Figura 13.

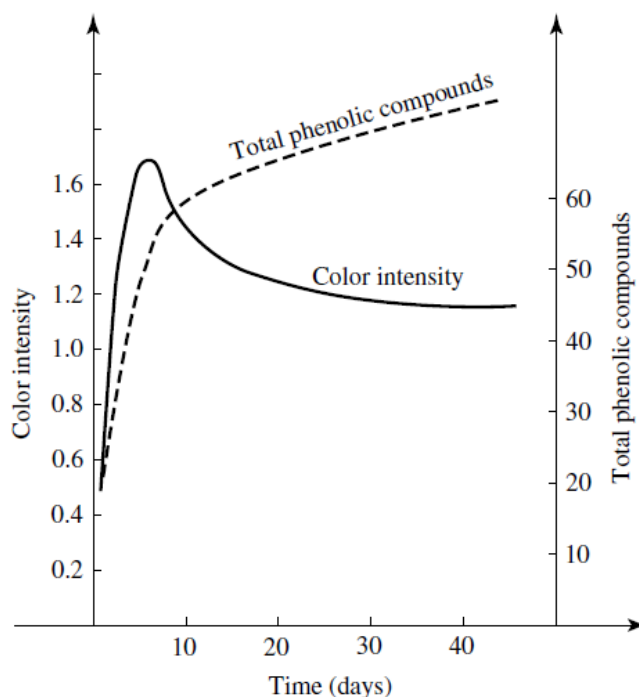


Figura 13 - Evolução da intensidade da cor e da conversão dos compostos

O tempo de duração da maceração a frio é normalmente de 3-10 dias antes da fermentação alcoólica [18]. O tempo de duração da maceração é o fator que mais afeta a extração de compostos fenólicos, [27] mas também de outros compostos (proteínas e polissacáridos) que podem participar em posteriores reações de condensação.

Quanto maior o tempo de maceração, maior o índice de polifenóis totais e a concentração em taninos polimerizados, mas menor cor e menor concentração em antocianinas, nos vinhos tintos da casta Bobal [26].

A extração de catequina e proantocianidinas aumenta com o tempo de maceração ao contrário da extração de antocianinas que diminui após alguns dias de maceração em mostos da casta Babić. A diminuição da concentração de antocianinas, pode ser explicado pela formação de compostos de co-polimerização com outros polifenóis, normalmente proantocianidinas [27].

Com maceração a frio, realizada numa sala arrefecida, a extração de compostos fenólicos em vinhos da casta Mencia, é favorecida pelo tempo de duração da maceração [28] mas não existe diferença no seu teor em compostos voláteis [29].

A duração da maceração a frio num ensaio realizado com a casta Cabernet Sauvignon não teve efeito na extração de compostos aromáticos, mas sim na extração de ácido gálico, catequinas, epicatequina, taninos totais e cor. No entanto, no fim da fermentação não existiam diferenças devidas à duração da maceração a frio. Os vinhos produzidos com 7 e 10 dias de maceração a frio tinham mais taninos de grão e taninos totais do que os vinhos sem este tratamento, o que poderá potenciar o aumento de adstringência [30].

A maceração a frio de 12 dias em vinhos Syrah resultou em vinhos com maior teor de compostos fenólicos e maior estabilidade da cor com tonalidades vermelho azulado do que a maceração a frio com 8 dias ou a maceração tradicional [31].

3.1.2. Efeito da temperatura

A maceração a frio ocorre normalmente a temperaturas entre 5-15°C [18,21,28].

A temperatura influencia a extração de polifenóis na casta Babić, sendo significativa a diminuição da extração de antocianinas (12%), fenóis totais (8%) e proantocianidinas (32%) quando a maceração ocorre entre 20-24°C comparada com a maceração sem controlo de temperatura (19-29°C). A diferença na extração afetou a intensidade mas não o tom de cor [27].

A maceração a frio, a temperatura controlada entre 5-10°C, durante 5 dias, realizada em mosto de uvas da casta Tannat levou a uma extração inferior de antocianinas que o obtido por maceração tradicional. Tal facto poderá ser explicado pela cinética de extração ser mais lenta em meio frio, devido à menor solubilidade das antocianinas a essa temperatura [21].

Heatherbell et al em 1997, demonstrou que a maceração a 10°C em vez de 4°C, a partir da casta Pinot Noir, tem pouco efeito na composição, mas a cor visível é inferior, aumenta o aroma a tabaco e amargor e reduz o aroma a frutos silvestres [32]. Tal está de acordo com o estudo realizado para a casta Pinotage: a maceração a frio (4 dias a 10°C) é altamente recomendada pois produz um vinho de alta qualidade com aroma intenso bagas/ameixa ao contrário da maceração a 15°C durante 4 dias ambas combinadas com fermentação pelicular a 25°C, que produz vinhos de menor intensidade aromática e teor de polifenóis totais [33].

3.1.3. Efeito do número de remontagens e frequência das mesmas

Durante a maceração tradicional recorre-se frequentemente a meios mecânicos que intensificam a extração dos constituintes das partes sólidas. A repisa é a operação realizada com

os pés humanos ou com massas de madeira, com a função de mergulhar a manta (as películas, grainhas e engaços) evitando o desenvolvimento de bactérias acéticas, homogeniza a temperatura, a concentração de açúcares, a população de leveduras, permitindo uma boa difusão das substâncias extraídas. Esta técnica está associada a vinhos de alta qualidade.

Para maiores produções, a movimentação do mosto é realizado por bombagem, - remontagem - aspiração pela parte inferior e entrega pela parte superior da cuba, de modo que o líquido irrigue toda a superfície da manta – pumping over , como se mostra na figura 14 ou por repisa mecânica da manta que recorre a dispositivos hidráulicos que procuram imitar a repisa manual, como na Figura 15 [34].



Figura 14 - Cuba com pumping over



Figura 15 - Cuba com repisa mecânica

O mergulho da manta é usualmente de 2-3 vezes/dia, com ou sem oxigenação do mosto de modo a facilitar o desenrolar da maceração. Do ponto de vista físico-químico, as remontagens favorecem a dissolução da matéria corante e dos taninos, dando origem a vinhos mais corados e com um teor em compostos fenólicos mais elevado [3]. Tal é suposto acontecer na maceração a frio: mais remontagens, maior extração de cor e compostos fenólicos [6].

3.1.4. Efeito da forma de arrefecimento

Uma das primeiras técnicas de arrefecimento das massas vínicas envolveu o uso de permutadores de calor e cubas arrefecidas. Hoje em dia, baixas temperaturas são conseguidas usando salas arrefecidas ou usando agentes congelantes. O agente congelante mais usado é o gelo seco (CO_2 no estado sólido) que tem a vantagem de induzir um choque térmico, inibir a atividade oxidativa das polifenoloxidasas, remover o oxigénio do meio pela sublimação do gelo seco, protegendo da oxidação os compostos aromáticos e os pigmentos [29,35]. O congelamento superficial das uvas da casta Syrah, em salas arrefecidas, antes do esmagamento levou a vinhos com concentrações mais elevadas de antocianinas e compostos fenólicos do que os vinhos obtidos com gelo seco [35].

3.1.5. Efeito do equipamento

O efeito da maceração a frio, no perfil aromático depende do tipo do fermentador utilizado: o fermentador pumping-over é mais efetivo na melhoria geral do perfil aromático em vinhos da casta Cabernet Sauvignon quando comparado com o fermentador com repisa mecânica [18]. Para outras castas como a Pinot Noir a repisa mecânica produz melhor resultado que o pumping over [6].

3.1.6. Efeito do uso de enzimas

O efeito da utilização de enzimas ou de preparados enzimáticos que contêm pectinases, celulasas, hemicelulasas e proteases pectolíticas na maceração a frio não está documentado, só existem estudos de maceração à temperatura ambiente.

As substâncias pécticas do mosto encontram-se nas paredes celulares da película do bago. Após o seu rompimento, estas substâncias, libertam-se no mosto associadas aos destroços das paredes celulares. Uma grande parte é rapidamente hidrolisada por ação das enzimas pectolíticas da uva. O restante precipita posteriormente no final da fermentação por ação do etanol. Assim, o vinho estará praticamente desprovido das substâncias pécticas existentes no mosto. Atendendo ao facto de usualmente existir um deficit destas enzimas no mosto, tem-se revelado de alguma utilidade a sua aplicação nas massas vínicas, no início da maceração, donde resulta teoricamente uma maior extração dos compostos fenólicos, um ligeiro aumento nos teores de taninos e antocianinas, proporcionando maior intensidade corante e melhor estabilização da cor dos vinhos.

Os estudos apontam para um aumento na cor e no teor de fenóis totais nas castas Grenache, Carginane, Zinfandel, Petite Sirah, Merlot e Monastrell. Na maioria dos estudos as

pectinases não tendem a aumentar o teor em antocianinas mas sim em aumentar o teor de outros fenóis nomeadamente em taninos, levando ao aumento de pigmentos polimerizados. O uso de enzimas em maceração pré-fermentativa é capaz de modificar o perfil aromático de vinhos da casta Mencia [29]. A pureza da enzima é importante pois caso estejam presentes as β -glucosidases, as antocianinas podem ser convertidas em compostos instáveis, resultando na diminuição da cor [3,23,36].

4. Método de processamento - Fermentação alcoólica

4.1. Bioquímica da fermentação alcoólica

O primeiro conjunto de reações envolvidas na fermentação alcoólica é designado por glicólise, trata-se da transformação das hexoses (glucose e frutose) em ácido pirúvico e está esquematizado na Figura 16. A glicólise inicia-se com a fosforilação dos açúcares, isto é, a sua esterificação com ácido fosfórico, fornecido por duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato), sendo o composto resultante a frutose-1,6-bisfosfato. Seguidamente, este composto é cindido em duas trioses – a di-hidroxiacetonafosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato, por sua vez, é oxidado por ação do NAD^+ , dando origem, sucessivamente ao 1,3-bisfosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfofenolpiruvato e finalmente ao ácido pirúvico.

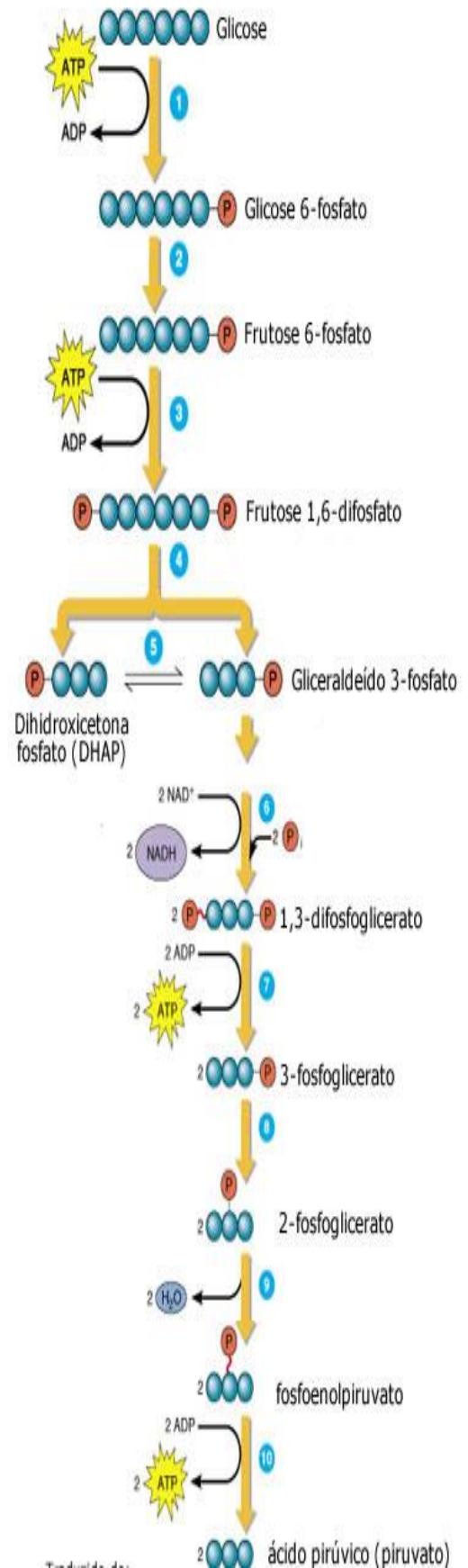


Figura 16 – Via de conversão da glucose em ácido pirúvico

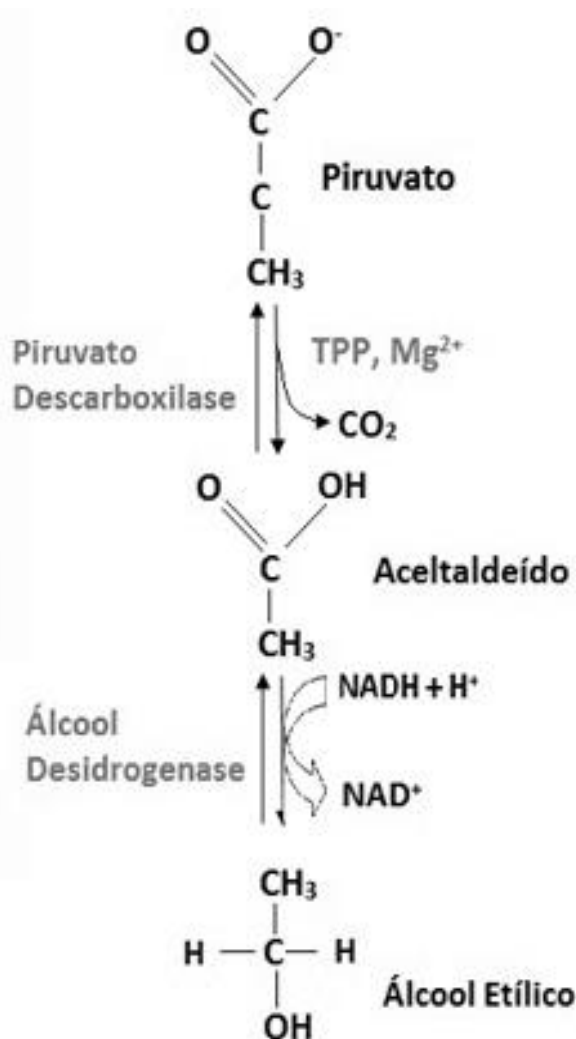


Figura 17- Conversão do ácido pirúvico em etanol

Durante a glicólise houve formação de 4 moléculas de ATP, duas das quais são consumidas na fosforilação dos açúcares. Há um ganho de 2 moléculas de ATP na conversão da glucose em piruvato. É este ganho que explica a liberação de calor, característica da fermentação alcoólica.

O ácido pirúvico resultante da glicólise é descarboxilado, originando-se etanal (também designado por acetaldeído ou aldeído acético) e dióxido de carbono, e o etanal é reduzido a etanol (álcool etílico) – Figura 17 [34].

4.2. Fatores que influenciam a fermentação alcoólica

4.2.1. Temperatura da fermentação alcoólica

Tendo em conta o mecanismo de extração e o da fermentação alcoólica, não é de admirar que elevando a temperatura da fermentação alcoólica do vinho, haja maior extração de compostos fenólicos. Assim, vinhos produzidos a partir de Pinot Noir e Cabernet Sauvignon eram mais coloridos conforme eram produzidos às temperaturas de 11.8°C, 21.3°C e 26.9°C. Mais tarde, outros estudos revelaram que não há grande diferença no teor de antocianinas se a fermentação ocorreu entre 15-30°C, mas há uma grande diferença no teor de compostos fenólicos - pigmentos polimerizados. O aumento destes compostos deve-

se ao aumento de extração de taninos. Se o tanino não estiver presente, haverá menor teor de pigmentos polimerizados. A formação de pigmentos polimerizados aumenta quando a fermentação aumenta de 20°C para 30°C [23].

No que concerne à temperatura de fermentação alcoólica para a vinificação tradicional de vinhos tintos, os melhores resultados obtêm-se entre os 25-28°C. Diversos trabalhos demonstraram que a temperatura influencia marcadamente a concentração de etanol, de ácido acético, de glicerol, de acetaldeído e de açúcar residual [3].

Em estudo realizado com a casta Syrah, a extração de antocianinas aumentou com a maceração a frio (2°C durante 10 dias) quando combinada com a fermentação a baixa temperatura (15-20°C) mas tal não sucede quando combinada com fermentação a temperatura mais elevada (30°C) [37].

O aumento de extração de compostos fenólicos a temperaturas mais elevadas é devido ao aumento da permeabilidade das células da película à antocianina, ao aumento da solubilidade dos compostos fenólicos no mosto, e ao aumento de extração dos taninos durante a fermentação. O aumento de pigmentos poliméricos é devido ao aumento em taninos para se combinar com as antocianinas [23].

4.2.2. Leveduras com ou sem inoculação

Ainda que toda a microflora contribua para a química do vinho, as leveduras detêm o papel principal, já que promovem a fermentação alcoólica transformando açúcar em etanol e dióxido de carbono, produzindo uma enorme quantidade de outros produtos. Atualmente são inoculadas estirpes selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, mas anteriormente a fermentação era espontânea, ocorria através de uma série de processos desempenhados por várias leveduras/estirpes presentes nos bagos, que depende de uma vasta gama de fatores, tais como as condições climáticas, entre as quais temperatura, queda de chuva, localização geográfica da vinha, aplicações de fungicidas, variedade e idade da vinha, bem como o tipo de solo numa palavra ao “terroir” [38,39].

Existem leveduras com atividades metabólicas variáveis, que permitem a elaboração de vinhos com características sensoriais diferentes [12,40]. O maior interesse na aplicação de estirpes selecionadas é a repetibilidade e a fiabilidade do processo de vinificação. A seleção de estirpes mostra impacto na concentração de antocianinas ou outros compostos fenólicos em vinho tinto [41,42].

Existem muitos estudos para determinar o efeito das leveduras no perfil fenólico do vinho tinto, no entanto, nenhum deles refere que o meio se encontrava estéril antes da inoculação da levedura de modo a garantir que a levedura inoculada é a única levedura presente ou é aquela que se encontra em maior concentração durante a fermentação.

Num estudo realizado com vinhos das castas Gaglioppo e Magliocco, com 3 estirpes da *Saccharomyces cerevisiae* foi interessante descobrir que as leveduras parecem exibir uma aptidão diferente para adormecer antocianinas e taninos e a estirpe que obteve valores mais elevados nos parâmetros de cor, não é a mesma que obteve valores mais elevados no teor de taninos. Além disso, a interação entre a casta e a estirpe é importante, porque a composição fenólica da casta define a atividade de adsorção da levedura. Assim, a escolha da estirpe levará a diferentes perfis fenólicos, ainda que em termos globais os parâmetros observados foram semelhantes: 150mg/L fenólicos totais, de ácido gálico e antocianinas em unidades equivalentes de malvidina -3-glucosido de 50mg/L [43].

Um estudo realizado com a casta Syrah com diferentes estirpes de *S.cerevisiae* indica que a escolha da estirpe tem uma forte influência na composição do vinho, reconhecendo como que uma “assinatura” da estirpe no perfil aromático e não aromático, assim como no teor de taninos no vinho [44].

O perfil aromático de vinho Cabernet Sauvignon de fermentação espontânea é completamente diferente do perfil do vinho fermentado com leveduras inoculadas. A fermentação espontânea é caracterizada por grandes quantidades de ácidos gordos de cadeia média, ésteres, terpenos e C13- norisoprenóis, e a fermentação com leveduras inoculadas tem mais aldeídos e álcoois de cadeia longa. A mistura de leveduras espontâneas, como as *Candida stella*, *Pichia fermentans* e *Metschnikowia pulcherrima*, com *Saccharomyces cerevisiae* melhora o perfil aromático, a complexidade do vinho e a definição de uma região [40].

Em estudos conduzidos em mostos de Merlot, a *Schizosaccharomyces pombe* mostrou ter capacidade para levar a fermentação alcoólica até ao fim e provou ser capaz de reduzir o teor de ácido málico enquanto aumentou o de piranoantocianinas, que é muito positivo na estabilização da cor do vinho. Outras estirpes não-*Saccharomyces* como *Metschnikowia pulcherrima* (*M. pulcherrima*), *Lachancea thermotolerans* (*L. thermotolerans*) e *Torulaspora delbrueckii* (*T. delbrueckii*) foram inoculadas em sequência com a *S. cerevisiae* influenciando as propriedades sensoriais do vinho [45].

4.2.3. Taninos naturais ou adicionados

Os taninos elágicos têm capacidade de reagir com o oxigénio apresentando (OH) em posição orto, conferindo-lhes a propriedade de atuar como antioxidantes. Estes fenómenos têm igualmente como efeito a diminuição dos riscos de oxidação da matéria corante.

Graças ao efeito protetor, face ao oxigénio, das proantocianidinas das uvas e do vinho, as antocianinas de cor vermelha (forma de catião flavílio) são mais resistentes à oxidação, contrariando assim a polimerização dos taninos e diminuindo a sua precipitação. Para que a matéria corante seja estável, é necessário que as antocianinas sejam estabilizadas por combinações com taninos, sendo portanto preferível ter um vinho onde existem mais taninos que antocianinas [25]. A adição de taninos ao mosto é uma proposta para aumentar a intensidade e a qualidade da cor dos vinhos tintos. Num estudo realizado com vinhos da casta Tannat, a adição de taninos promoveu a produção de vinhos com mais proantocianidinas e catequinas que a maceração fermentativa pelicular tradicional, mas não aumentou a intensidade de cor. Os vinhos com maior teor de antocianinas e melhor cor foram os da vinificação tradicional. Tal pode explicar-se porque os processos de polimerização podem conduzir à formação de moléculas suficientemente grandes para precipitar, ou seja, não há garantia de que os taninos comerciais, ainda que de origem natural, normalmente de gráinha e película de uva, se integrem e comportem no vinho da mesma forma que os naturalmente extraídos durante a vinificação. Sachi [23] é de opinião que começar a fermentação com altos teores de antocianinas e taninos favorece a sua estabilização por possível reação com metabolitos da fermentação como acetaldeído e ácido pirúvico. No entanto, o aumento da concentração de taninos, por adição, desde o início da maceração não conduziu a resultados que se possam considerar positivos a nível da composição fenólica e cor quando comparado com o processo tradicional para a uvas da casta Tannat [46].

Num estudo com casta Merlot o resultado sensorial, não apresentou grandes diferenças quer a nível de aromas, gosto ou avaliação global entre os vinhos em que se adicionaram taninos elágicos e os que se adicionaram taninos condensados. Do ponto de vista analítico as diferenças foram visíveis, sendo que os vinhos em que se adicionaram apenas taninos elágicos apresentaram valores mais elevados de cor, antocianinas totais, pigmentos totais, fenóis totais, taninos totais e poder tanante, devido à co-pigmentação.

Pode-se assim concluir que os taninos elágicos contribuem positivamente para o aumento de todos estes parâmetros, conforme era pretendido, com a vantagem adicional de serem substancialmente mais baratos que os taninos condensados [25].

4.2.4. Adição de paredes de levedura / glutatião

O glutatião é um tripéptido composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina, com um forte poder antioxidante. A nível celular existe em 3 formas:

- na forma reduzida (GSH) cerca de 90% - Figura 18
- na forma oxidada (GSSG) – Figura 19
- mistura

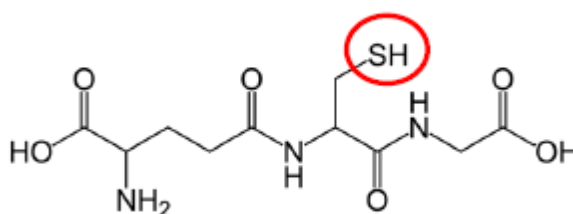


Figura 18 - Estrutura molecular do glutatião (GSH)

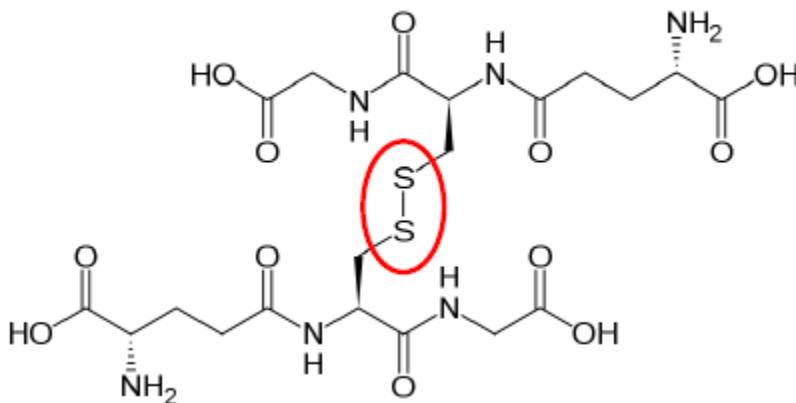


Figura 19 - Estrutura molecular do glutatião dissulfito (GSSG)

O GSH, Figura 18, combina-se com o-quinonas formadas na oxidação fenólica, limitando essa oxidação. Este é sintetizado pela videira e encontra-se nas uvas, logo no mosto e no vinho. Vários fatores podem influenciar a concentração de GSH no mosto, como por exemplo, a exposição ao oxigénio, a atividade da tirosinase, o processo da maceração pelicular. A concentração de GSH pode aumentar ou diminuir durante a fermentação alcoólica e não tem relação com a estirpe em causa, mas sim com o metabolismo da estirpe, da quantidade inicial de GSH, do stress durante a fermentação, além dos

parâmetros de crescimento de leveduras como pH, temperatura, pressão osmótica, etc. A existência de GSH no mosto, poderá levar à formação de H_2S , sulfídrico, que tem um odor desagradável a ovos podres. GSH adicionado a Cabernet Sauvignon branco mostrou ser eficaz a limitar a concentração de 4,5- dimetil-3-hidroxi-2(5)H-furanone, que é um composto volátil com forte odor a caril.

A adição de GSH pura ao mosto ou ao vinho é proibida. Mas a adição de preparações secas de leveduras inativas, paredes de levedura, extratos de leveduras ou leveduras auto-lisadas, aumentam o teor de GSH no vinho, seja pela libertação direta, seja por permitir a assimilação de precursores de GSH pela levedura, levando ao aumento de produção de GSH durante a fermentação alcoólica, limitando a oxidação da cor, protegendo os compostos aromáticos como tióis, ésteres e terpenos [47].

5. Método de processamento - Operações pós-fermentativas

5.1. A fermentação malo-láctica com ou sem inoculação de bactérias lácticas

A fermentação malo-láctica (FML) corresponde à descarboxilação do ácido málico em ácido láctico, pelas bactérias lácticas do vinho. Embora se designe de fermentação tal termo não é exato, pois na realidade trata-se de uma reação bioquímica atérmica de origem enzimática – a enzima malo-láctica [3].

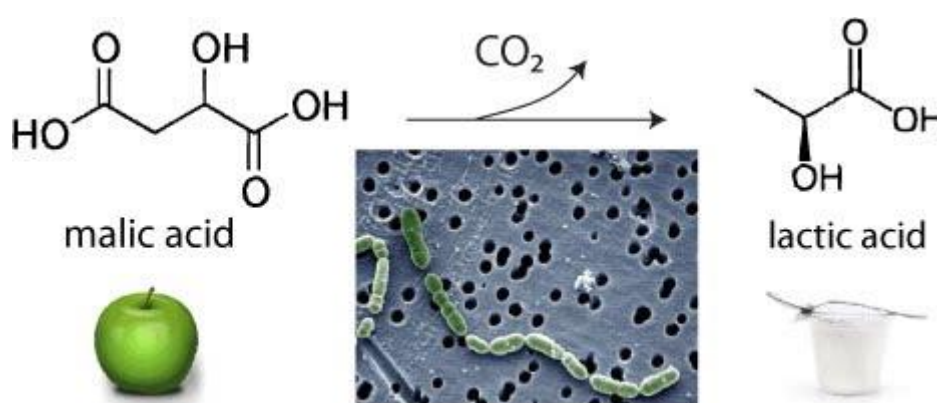


Figura 20 - Conversão do ácido málico em ácido láctico

A enzima malo-láctica é um complexo proteico que catalisa a conversão do ácido L-málico a ácido pirúvico e este a ácido L-láctico, sem que o ácido pirúvico seja libertado do complexo proteico, Figura 20, e apresenta as seguintes características principais:

- peso molecular elevado
- para a sua atividade precisa da coenzima NAD^+ (nicotinamida e adenina dinucleótido no estado oxidado)
- a partir do ácido L-málico forma exclusivamente ácido L-láctico
- o ião Mn^{2+} é ativador
- o pH ótimo para a sua atividade é 5.75

Logo, os fatores condicionantes da atividade malo-láctica, são o pH, a temperatura (inferior a 18°C sofre atraso), o SO_2 que tem uma ação inibidora, a concentração em etanol, açúcares redutores, aminoácidos e ácidos gordos também influem no crescimento das bactérias.

Nos mostos existem bactérias lácticas de diversas espécies, nomeadamente, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus*. Em geral, quanto mais madura se apresenta a uva, tanto mais rico é o mosto em bactérias lácticas. A população média do mosto é em média de 10^4 células/mL. A fermentação alcoólica determina a queda dessa população para 10^2 células/mL, com predomínio da espécie *Oenococcus oeni*.

Para ocorrer a FML poderemos estimular as bactérias indígenas ou inocular estirpes selecionadas. Para estimular as bactérias indígenas é comum manter o vinho novo em contacto com borras de fermentação, que contém microrganismos, que em condições favoráveis de temperatura e SO_2 se desenvolvem. Atualmente é normal a inoculação, após uma fase intermédia de aclimação das bactérias ao vinho a inocular de modo a aumentar o sucesso da inoculação [34].

É frequente que, após a FML, os vinhos contenham aminas biogénicas, isto é, histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina e cadaverina. As aminas biogénicas resultam da descarboxilação dos aminoácidos. A histamina, por exemplo, deriva da histidina. Uma forma de limitar o aumento do teor de histamina no vinho consiste na sulfitação e trasfega imediatamente após o termo da FML ou na realização de maceração a frio pré fermentativa, que inicialmente aumenta a extração de aminoácidos e a formação de aminas biogénicas, mas que resulta no menor teor das mesmas no vinho final [48].

As principais modificações organoléticas do vinho devidas à FML é a diminuição da acidez total, que em muitos casos se traduz num equilíbrio gustativo mais favorável, e no aumento do teor de diacetilo. A este composto está associado o descritor de aroma característico de manteiga, que é tido como negativo na valorização do vinho [34].

Os constituintes fenólicos de baixo peso molecular resultantes da FML são independentes do facto desta ter decorrido espontaneamente ou por inoculação assim como da estirpe inoculada [49,50]. O mesmo não se pode dizer quanto ao papel que as bactérias lácticas têm na formação de aromas, nomeadamente a variabilidade da atividade de algumas enzimas como as glicosidasas, estearases, protéases que produzem quantidades significativas de compostos aromáticos, tendo-se conseguido determinar a relação entre a espécie/estirpe e os compostos aromáticos que produz [51].

5.2. Adição de paredes de levedura

Os vinhos brancos e rosés, assim como a maior parte dos vinhos tintos, são instáveis do ponto de vista das precipitações tartáricas no fim do estágio. A possibilidade de os estabilizar sem proceder ao tratamento pelo frio, mas unicamente à adição de um coloide protetor biológico e estável (que faz parte da sua composição natural) é perfeitamente possível com a utilização de manoproteínas extraídas das paredes de leveduras [52].

5.3. Micro-oxigenação

A micro-oxigenação pode ser aplicada durante a vinificação e no envelhecimento.

Durante a vinificação, deve ser aplicada após a fase log de crescimento das leveduras, e permite melhorar a tolerância destas ao etanol, melhorar a atividade fermentativa, diminuir a formação de compostos sulfurosos e o tempo de duração da FA. A micro-oxigenação não deve continuar após atingir 10% de álcool, pois a partir deste teor as leveduras consomem cada vez menos nutrientes, O₂ incluído e o excesso de O₂ no meio pode levar a alterações na matriz [53].

A micro-oxigenação no envelhecimento, tem como finalidade trazer mudanças desejáveis ao vinho, como estabilizar a cor do vinho, melhorar a boca (estrutura e textura), diminuir a adstringência, reduzir o vegetal indesejável e aromas herbáceos, aumentar notas frutadas, remover sulfitos e diminuir a presença de características de redução. A micro-oxigenação no envelhecimento, ocorre após a FA, e antes e durante a FML, já que desta forma é garantida uma maior produção de etanol, indispensável para a formação de novos pigmentos [54].

A aplicação desta técnica permitiu definir três fases essenciais dentro da evolução dos vinhos – Figura 21. A primeira fase é denominada “fase de estruturação”, durante a qual

a presença de aromas de vinhos jovens diminui, havendo um correspondente aumento do carácter tânico reforçando assim o poder redutor. Os vinhos ganham intensidade havendo um aumento das absorvâncias a 520 e 620 nm. A segunda fase denomina-se por “fase de harmonização”, assiste-se a um aumento da complexidade aromática dos vinhos, um desaparecimento do carácter herbáceo, e diminuição da adstringência. E por último a “fase de saturação” [54].

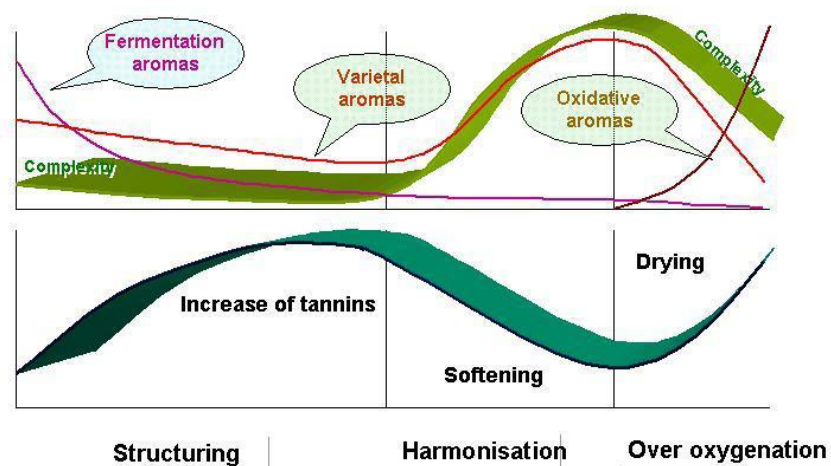


Figura 21- Evolução das fases organoléticas dos vinhos durante a aplicação do processo de micro-oxigenação [54]

A primeira fase da micro-oxigenação é denominada por estruturação quando os taninos e antocianinas ainda estão na sua maioria na forma monomérica simples e é caracterizada por um aumento na agressividade e intensidade de taninos no paladar. Ao mesmo tempo verifica-se um declínio correspondente na intensidade aromática e complexidade do vinho. O fim desta fase é determinado pela inversão destas tendências organoléticas levando a um amaciar do vinho. As características aromáticas vegetativas diminuem também neste momento. O sucesso desta fase depende das condições de temperatura que se relacionam diretamente com a velocidade de consumo de oxigénio. Se não houver presença de oxigénio nesta fase, é natural que o vinho em questão apareça mais reduzido e mais “duro” em boca.

A fase de harmonização tem como principais objetivos:

- Atingir as qualidades desejadas ao nível aromático;
- Melhorar as qualidades sensoriais principalmente ao nível dos taninos;
- Estabilizar os aromas redutores;
- Eliminar algumas características herbáceas e outros defeitos restantes.

A fase de harmonização é posterior à fase de estruturação: é o período de tempo que vai do fim da FML até ao engarrafamento do vinho. Esta fase é caracterizada por um aumento de suavidade dos taninos e complexidade do vinho de uma forma geral. Todas as modificações que ocorrem são irreversíveis ao contrário do que acontece na fase de estruturação. A fase de harmonização contrasta muitas vezes com a fase de estruturação, uma vez que quanto mais longa for a fase de estruturação mais necessária é a fase de harmonização. Esta fase, duma forma geral é sempre a mais longa e a mais difícil de seguir, porque o vinho se torna cada vez mais sensível. Os riscos são o desenvolvimento duma adstringência e/ou uma maturação excessiva acompanhada pela perda de frescura e expressão aromática que se reduz. A temperatura tem também um papel importante nesta fase. A dose ideal de oxigénio aplicada é determinada normalmente por prova, na procura do maior benefício aromático, sem causar secura.

Se o vinho é micro-oxigenado por muito tempo, os taninos tendem a secar bastante e tornam-se demasiado adstringentes. Vários fatores podem afetar os resultados obtidos quando a micro-oxigenação é aplicada nos vinhos tintos, destacando-se como mais importantes o momento de aplicação, as doses de oxigénio a aplicar e as características fenólicas do vinho [54].

O equipamento básico para este tratamento inclui uma garrafa de oxigénio, um sistema de dosagem e um micro difusor, como está esquematizado na Figura 22. A temperatura tem um papel importante na solubilidade do oxigénio e nas reações de oxidação. O tratamento deve ocorrer a temperatura de cerca de 15°C [55].

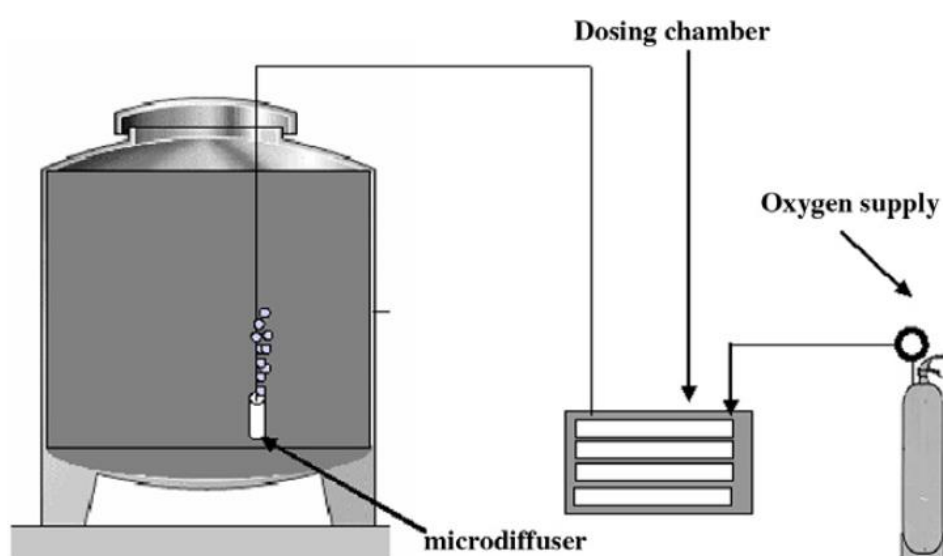


Figura 22 – Representação esquemática de um sistema de micro-oxigenação [55]

Objetivo

O presente trabalho teve como principal objetivo a obtenção de um *Vinho Verde* tinto a partir exclusivamente da casta Vinhão, de maior grau alcoólico, alguma intensidade de cor mas estável, de componente aromática característica, sem ser excessivamente marcante, menor acidez e adstringência, maior capacidade de conservação e envelhecimento, mais suave, mais equilibrado quando comparado com o Vinho Verde tinto tradicional de modo a obter maior aceitação por parte do mercado nacional e internacional atual.

Para tal, realizaram-se 2 ensaios, no primeiro optou-se pela maceração pré-fermentativa de películas, polpa e grânhas, durante um curto período de tempo, 2 dias, a frio, 10°C, seguida de fermentação alcoólica, sem maceração pelicular, em cuba inox, aberta, a baixa temperatura, 16°C seguida de fermentação malo-láctica a 20°C e no segundo seguiu-se o processo de vinificação tradicional em autovinificador, com maceração pelicular fermentativa a 25-28°C durante 5 dias.

Para ambos os ensaios efetuaram-se diferentes análises físico-químicas e espectralométricas de modo a caracterizar os diferentes compostos fenólicos, presentes nas uvas, mostos e vinhos.

Por fim, e visto tratar-se de um *Vinho Verde* tinto para o consumidor atual, os vinhos foram analisados sensorialmente por um painel de provadores qualificados.

II. Material e métodos

1. Plano experimental

O trabalho experimental foi realizado durante a vindima de 2017, na Adega Cooperativa de Ponte da Barca (APB) a partir de uvas da casta Vinhão.

O ensaio incidu em todas as etapas do processo de vinificação, nomeadamente:

- as uvas da casta *Vinhão*, foram desengaçadas/esmagadas de modo a ferir as películas o suficiente para a sua abertura e libertação da polpa, mas sem esmagamento da grânha;
- como operação pré-fermentativa foi ensaiada a maceração a frio, durante dois dias a 10°C na presença de películas e grânhas, numa “cama” de engaço de modo a permitir a remontagem e o arrefecimento exterior do mosto, durante este período. A maceração a frio foi realizada em 3 cubas refrigeradas;
- O mosto de cada uma das cubas foi retirado após os 2 dias de maceração a frio, sem películas e grânhas, pela base e trasfegado para uma única cuba, cuba – mãe;
- a fermentação alcoólica foi realizada com controlo de temperatura, $16 \pm 1^\circ\text{C}$, numa cuba de aço inoxidável, com sistema de circulação de água, em parede dupla, ligada ao sistema de refrigeração da adega constituído por um Schiller, até a densidade ter atingido 1.001, num total de 14 dias;
- foi utilizada a micro-oxigenação com o equipamento MicroOX, com caudal de 5-6 mg/L de O_2 para arejamento do mosto, de modo a evitar aromas reduzidos ou a ácido sulfídrico;
- para a fermentação malo-láctica (FML) foi inoculada bactéria láctica durante a fermentação alcoólica (FA) a 16°C;
- após o término da FA, decorreu a FML durante 5 dias, à temperatura de 16-21°C;
- seguiu-se o repouso, durante 40 dias, em cuba de cimento selada situada na cave da adega, após correção de SO_2 livre para 60mg/L e colocação de pastilha Antiflor.

Controlo bi-diário de temperatura, densidade e características organoléticas, através de análises físico-química e sensorial, durante todo o período de FA e FML. Como coadjuvantes enológicos, foram adicionadas leveduras inativas OPTIRED, nutrientes de fermentação FERMAID O e FERMAID E, levedura comercial Biodiva (*Torulaspora delbrueckii*), levedura comercial Levedura HPS (*Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*), enzima pectolítica Prozym Thermo, bactéria láctica VP41-1STEP para FML e aparas de madeira Blend Aragonês (Oenochêne)). O vinho será designado por vinho de MF ou vinho MF.

Foi retirada para garrações, uma amostra de 5L do mosto de cada cuba de maceração pré-fermentativa a frio, assim como da cuba-mãe, num total de 4 garrações, que seguiram o processo de vinificação da cuba-mãe mas sem controlo de temperatura. A vinificação decorreu a uma temperatura média de 23-25°C, até consumo total de ácido málico e densidade 0,995, num total de 17 dias. Os vinhos obtidos são designados por 68G, 69G, 70G e MFG. Espera-se que a realização desta vinificação rudimentar em garração confirme os resultados do ensaio.

Em simultâneo decorreu o processo de vinificação tradicional, ver no anexo I, com uvas da casta Vinhão dos mesmos dias. A maceração aconteceu concomitantemente à fermentação alcoólica, num auto-vinificador de cimento, a uma temperatura variada entre 24-28°C, tendo o vinho sido prensado quando a densidade atingiu 0.998, num total de 5 dias. A FML realizou-se em simultâneo com a FA com a inoculação da bactéria *Oenococcus Oeni* Sparta.(Chr.Hansen). Como coadjuvantes enológicos foi adicionada levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* Fermol Clarifiant, nutriente de fermentação hidrogenofosfato de diamónio, enzima pectolítica Endozym Rouge, taninos Fermotan liquid (40% taninos elágicos + 60% TPA). Este é o controlo do ensaio – designado por vinho de VT ou vinho VT

2. Amostras

As uvas utilizadas neste estudo são da casta *Vinhão*, em perfeito estado sanitário e de maturação, entregues na Adega Cooperativa de Ponte da Barca durante os dias 19 e 20 de Setembro de 2017. Como amostra das uvas recebidas e utilizadas foram recolhidas aleatoriamente cerca de 1Kg de uvas inteiras, que foram congeladas em saco de plástico.

Foram retiradas tomas ao longo do ensaio que foram congeladas a $-15-18^{\circ}\text{C}$, caso dos mostos, ou refrigeradas a $4-6^{\circ}\text{C}$ caso do vinho, segundo o esquema - Anexo I.

2.1.Preparação das amostras

As análises às uvas foram realizadas ao seu extrato obtido segundo o procedimento descrito por Darné e Madero-Tamargo [56]. Este consiste em:

Pesagem de 20 bagos congelados de uvas da casta Vinhão de cada um dos dias de recolha, congeladas e colocadas em pequenos sacos de plástico para cada dia de colheita. Os sacos foram colocados em congelador a -80°C durante cerca de 1 hora. Após esse período os sacos foram colocados no liofilizador BenchTop Pro with Omnitronics até à extração total da água. Neste caso cerca de uma semana.

Os bagos liofilizados foram pesados e a extração foi realizada com 3 porções de 100ml de uma mistura de água/etanol (1:1 v/v) usando um liquidificador (Ultra-Turrax, 19500 rpm), durante 2 min. De seguida as soluções foram filtradas com algodão e centrifugadas a 4°C , 6000 rpm, 5 min. O etanol foi removido usando um evaporador rotativo até à obtenção de um volume inferior a 100ml. Perfez-se o volume de 100 ml de solução com água desionizada em balão volumétrico.

Para as análises de cor aos mostos foi decidido filtrar. Utilizamos filtros descartáveis de seringa, de poliéster Chromafil Xtra Pet 45/25 de porosidade 0,45micron.

Para a realização das análises físico-químicas aos vinhos foi decidido centrifugar as amostras, numa centrífugadora Kubota KS-8000 durante 5 minutos a 3100 rpm.

3. Métodos

3.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no laboratório da APB para controlo da matéria-prima e do processo de vinificação e foram realizadas aos vinhos finais no laboratório da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV).

Os métodos utilizados pelas 2 entidades são por vezes diferentes, e disso se dá conhecimento ao longo deste capítulo.

3.1.1. Acidez fixa

A acidez fixa é dada pela diferença entre a acidez total e a acidez volátil, expressas nas mesmas unidades [57].

3.1.2. Acidez total

Segundo a OIV designa-se por acidez total de um vinho a acidez titulável a $\text{pH}=7$, não sendo compreendida a devida ao ácido carbónico, sendo necessário desgaseificar previamente [57].

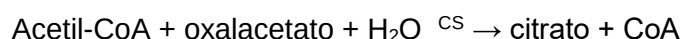
2.1 Na APB o método consiste numa titulação potenciométrica com agitação constante de 25,0mL de amostra, usando solução padrão de hidróxido de sódio 0,1M até à obtenção de $\text{pH}=7,0$. Foi utilizado o titulador automático Crison TitroMatic 2S, equipado com bureta de 10 mL de resolução 0,01 mL e elétrodo de pH 50 51 com sensor de temperatura para compensação automática da mesma, em duplicado. O resultado é calculado internamente pelo equipamento e é apresentado em g/L ácido tartárico [58].

2.2 No laboratório da CVRVV o método consiste numa análise por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de compostos que apresentam bandas de absorção na região da radiação infravermelha do espectro eletromagnético característico das ligações químicas presentes na amostra. Foi utilizado um espectrómetro AVATAR 370 FTIR/UV-VIS Multispec equipado com o módulo Peltier e amostrador automático MSU. A amostra é previamente desgaseificada em vácuo e utilizado um volume de cerca de 10 mL, em duplicado. O espectro da amostra analisada apresenta bandas de absorção características de determinados compostos que são comparadas com os usados na calibração de cada um deles e assim determinado o seu valor analítico. O cálculo é realizado pelo software do equipamento em função da calibração [59].

3.1.3. Acidez volátil

A Acidez volátil é constituída pelo conjunto dos ácidos da série acética presente nos vinhos, quer no estado livre quer na forma de sal.

3.1 Na APB a análise é realizada através de um método enzimático, com um analisador automático Miura One: a enzima acetil-CoA sintetase (ACS) catalisa a reação do ácido acético com a co-enzima A na presença de adenosina-5'-trifosfato (ATP) produzindo acetil-CoA.



O oxalacetato consumido nesta reação forma-se a partir de ácido málico na presença de malato desidrogenase (ver análise de ácido málico na APB).

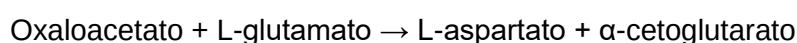
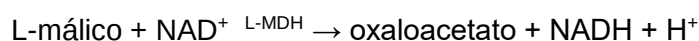
O aumento da absorvância a 340nm devido à formação de NADH é diretamente proporcional à concentração de ácido acético. O teor em ácido acético é calculado pelo software do equipamento em função da calibração [58].

3.2 No laboratório da CVRVV o equipamento e o tratamento dos dados é o mesmo que para a acidez total. A acidez volátil é calculada pelo software do equipamento em função da calibração [59].

3.1.4. Ácido L-málico

O ácido málico natural da uva é o isómero L(-)-málico [60]. É um dos ácidos orgânicos mais difundidos na natureza. É considerado um ácido fraco.

4.1 Na APB a análise é realizada através de um método enzimático, com um analisador automático Miura One: a enzima L-malato desidrogenase (L-MDH) cataliza a oxidação do ácido málico a oxalacetato com redução simultânea de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)



O aumento da absorvância a 340nm devido à formação de NADH é diretamente proporcional à concentração de ácido L-málico. O teor em ácido málico é calculado pelo software do equipamento em função da calibração [58].

4.2 No laboratório da CVRVV o equipamento e o tratamento dos dados é o mesmo que para a acidez total. O teor em ácido málico é calculado pelo software do equipamento em função da calibração [59].

3.1.5. Ácido tartárico

O ácido tartárico da uva é o isómero L(+)-tartárico encontrado em poucas espécies vegetais, sendo a videira uma das poucas plantas onde ele está presente em quantidade elevada [60]. A concentração varia em função da variedade da uva e do solo da vinha. É um ácido forte que interfere diretamente no pH do vinho.

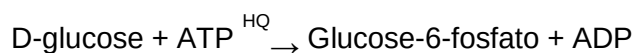
5.1. Na APB a análise é realizada através de um método colorimétrico, com um analisador automático Miura One: reação do ácido tartárico ou o sal com ácido vanádico para formar um composto alaranjado em meio ácido que pode ser medido a 492 nm. O aumento deste composto é proporcional à quantidade de ácido tartárico ou tartaratos existentes na amostra. O teor em ácido tartárico é calculado pelo software do equipamento em função da calibração [58].

5.2. No laboratório da CVRVV o equipamento e o tratamento dos dados é o mesmo que para a acidez total. O teor em ácido tartárico é calculado pelo software do equipamento em função da calibração [59].

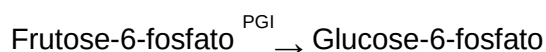
3.1.6. Açúcares totais (glucose + frutose)

A D-glucose e a D-frutose são os principais açúcares redutores na uva. A relação entre a D-glucose e a D-frutose na uva madura é de 1, mas pode oscilar entre 0,74 e 1,12 dependendo da variedade da uva, a maturação e as condições de fermentação.

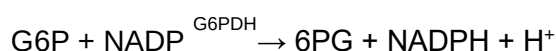
6.1. Na APB a análise é realizada através de um método enzimático UV, com um analisador automático Miura One: a enzima hexoquinase (HQ) catalisa a fosforilação de D-glucose e de D-frutose mediante a adenosina-5'-trifosfato (ATP)



A frutose-6-fosfato converte-se em glucose-6-fosfato na presença da enzima fosfoglucoase isomerase (PGI).



Em presença da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a glucose-6-fosfato (G6P) oxida e forma-se a 6-fosfogluconato (6PG) com redução simultânea de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato:



O aumento da absorvância a 340nm devido à formação de NADPH é diretamente proporcional à concentração de D-glucose+D-frutose existente na amostra. O teor em D-glucose+D-frutose é calculado pelo software do equipamento em função da calibração [58].

6.2. No laboratório da CVRVV o equipamento e o tratamento dos dados é o mesmo que para a acidez total. O teor em açúcares totais (glucose+frutose) é calculado pelo software do equipamento em função da calibração [59].

3.1.7. Álcool provável

Este parâmetro é avaliado em duas fases iniciais do processo de vinificação: numa primeira fase é verificado o teor de álcool provável das uvas, e numa segunda fase, anterior à etapa de fermentação.

O teor alcoólico provável, como o nome indica, representa o teor de álcool que se obterá no final da fermentação do mosto em análise. Este é determinado através de um

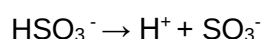
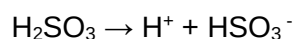
refratómetro cujo princípio se baseia na determinação do teor de açúcares presentes (Grau Brix) e assim, o conteúdo potencial de álcool no vinho [58].

3.1.8. Densidade de líquido

A densidade é a razão entre a massa volúmica do líquido a analisar e a massa volúmica da água destilada a 4°C, que é igual a 1. Na APB o equipamento usado foi um densímetro de vidro [58].

3.1.9. Dióxido de enxofre livre, combinado e total

Entende-se por “dióxido de enxofre livre” o que se encontra sob as seguintes formas: H_2SO_3 , HSO_3^- e SO_3^{2-} , cujo equilíbrio é função do pH e da temperatura:



Entende-se por “dióxido de enxofre combinado” o que se encontra sob todas as outras formas. Entende-se por “dióxido de enxofre total” o conjunto das diferentes formas de dióxido de enxofre presentes no vinho, no estado livre ou combinado com os seus constituintes, sendo por isso a soma do dióxido de enxofre livre e dióxido de enxofre combinado.

O método utilizado na APB e no laboratório da CVRVV é o método de Ripper duplo.

O teor de dióxido de enxofre livre e combinado são doseados por titulação potenciométrica, usando um Titulador Automático Crison (CVRVV) e Crison TitroMatic 2S (APB) equipados com uma bureta de 10 mL de resolução 0.01mL, eléctrodo de platina e amostrador automático, com uma solução padronizada de iodo. A quantidade analisada é de 25.0 mL, em duplicado.

O teor de dióxido de enxofre livre, combinado e total é calculado automaticamente pelo software do equipamento [58,59].

3.1.10. Extrato seco total

Segundo a OIV, designa-se por extrato seco total de um vinho, o conjunto de todas as substâncias que não se volatilizam, em condições físicas tais que os componentes desse extrato sofram o mínimo de alteração durante o ensaio.

O extrato livre de açúcar é a diferença entre o extrato seco total e os açúcares totais (glucose + frutose).

O extrato reduzido é o extrato seco total diminuído dos açúcares totais excedendo 1g/L, do sulfato de potássio excedendo 1g/L, do manitol (se se encontrar presente) e de todas as substâncias eventualmente adicionadas ao vinho.

O extrato seco total é calculado indiretamente a partir de densidade específica do mosto e no caso do vinho da densidade específica do vinho, livre de álcool [57].

3.1.11. Extrato não redutor

O extrato não redutor (ENR) é o extrato seco total subtraído dos açúcares totais (glucose + frutose) [57].

3.1.12. Massa volúmica

A massa volúmica (p_{20}) é o quociente entre a massa de um determinado volume de vinho ou de mosto a 20°C e esse volume.

O método em causa consiste numa análise por FTIR. A amostra é previamente degaseificada em vácuo e utilizado um volume de cerca de 10 mL, em duplicado. O equipamento e o tratamento dos dados é o mesmo que para a acidez total [59].

3.1.13. pH

11.1 Na APB a determinação de pH é realizada pelo titulador automático Crison Matic 2S equipado com eletrodo de pH 50 51 com sensor de temperatura integrado, após calibração com soluções tampão, pH =7,0 e pH=2,0 [58].

11.2. No laboratório da CVRVV o método, o equipamento e o tratamento de dados é o mesmo que para a acidez total [59].

3.1.14. Título alcoométrico volúmico adquirido

Entende-se por título alcoométrico adquirido (TAV_{adq}), o número de L de etanol contidos em 100L de amostra, ambos medidos à temperatura de 20°C.

12.1 Na APB o método de análise utilizado é o método Ebulliométrico que se baseia na diferença entre a temperatura de ebulição da água (100°C) e do etanol (78,3°C), à pressão atmosférica (1atm). Com a temperatura obtida para a ebulição do vinho, interpola-se o disco ebulliométrico e vê-se o teor alcoólico correspondente [58].

12.2 No laboratório da CVRVV o método, o equipamento e o tratamento de dados é o mesmo que para a acidez total [59].

3.1.15. Título alcoométrico volúmico total

Entende-se por:

1. Título alcoométrico volúmico total é a soma do título alcoométrico volúmico adquirido e título alcoométrico volúmico em potência.
2. Título alcoométrico volúmico em potência é o número de volumes de álcool puro à temperatura de 20°C suscetíveis de serem produzidos por fermentação total dos açúcares contidos em 100 volumes do produto considerado, a essa temperatura.

A legislação Vitivinícola da União Europeia assume que o teor em açúcar do mosto, em g/L, multiplicado pelo fator 0,05943 corresponde à obtenção de 1% vol. de álcool.

O título alcoométrico volúmico total (TAV_{Tot}) é expresso pela seguinte formula

$$TAV_{Tot} = TAV_{adq} + TAV_P$$

em que:

TAV_{Tot} – é o título alcoométrico volúmico total, expresso em %vol.;

TAV_{adq} – é o título alcoométrico volúmico adquirido, expresso em %vol.;

TAV_P – é o título alcoométrico volúmico em potência, expresso em %vol [59].

3.2. Análise de cor

A análise de cor a todas as amostras foi realizada no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

A análise de cor é tradicionalmente realizada por espectrofotometria de UV-Vis porque os compostos fenólicos têm capacidade de absorver UV e na luz visível, visto serem maioritariamente compostos coloridos.

A intensidade do espectro UV-Vis é atribuída à transição das orbitais tipo π , que depende do número e da localização dos grupos OH, OCH₃ e do glucósido das diferentes classes de polifenóis. As interações intermoleculares e as condições do meio (pH, metais, SO₂) definem a absorção da matriz fenólica no UV-Visível [55].

3.2.1. Determinação de polifenóis totais

1. Índice de fenóis totais

O método do Índice de fenóis totais baseia-se na capacidade que os anéis benzénicos têm em absorver radiação na região do ultra-violeta, sendo o seu comprimento de absorção máxima a 280nm.

Para a determinação do índice de fenóis totais utilizou-se um espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific de duplo feixe Evolution Array e células de quartzo de percurso ótico de 1mm. As diversas soluções foram medidas em relação à água desionizada. Os vinhos foram diluídos a 1:10 com uma solução sintética de vinho (etanol/ água 12% (v/v) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH 3,20).

O Índice de Fenóis Totais (IFT) é calculado através da seguinte expressão [57] :

$$\text{IFT} = \text{Abs (280 nm)} \times \text{f.d.}$$

$$\text{f.d.} = 10$$

3.2.2. Características cromáticas das amostras

1. Intensidade de cor

Para melhor avaliar a cor determinou-se a absorvância a 420nm (absorvância máxima para pigmentos amarelos) 520nm (absorvância máxima para pigmentos vermelhos) e 620 nm (absorvância máxima para pigmentos azuis).

As absorvâncias das amostras foram lidas num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array, e em células de quartzo de percurso ótico de 1 mm.

$$A_{420} = a_{420} / 0.1$$

A intensidade corante é calculada pela soma dessas mesmas absorvâncias [57] :

$$IC = (a_{420} + a_{520} + a_{620}) \times 10$$

2. Índice de cor vermelha

O índice de cor vermelha é a absorvância a 520 nm [57].

3. A Tonalidade

A tonalidade é convencionalmente expressa como sendo [57]:

$$T = A_{420} / A_{520}$$

4. Sistema CIELab

Para a determinação das coordenadas do espaço CIELab procedeu-se à determinação do espectro de transmitância dos vinhos para o espectro visível de luz (360-830 nm). As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific

Evolution Array. Cada ensaio foi realizado em triplicado e a leitura da transmitância foi feita, em relação à água desionizada, em células de vidro de 2 mm de percurso ótico.

Posteriormente, de modo a determinar os valores triestimulares (X, Y e Z) e as respetivas coordenadas L^* a^* b^* para cada vinho, foi utilizado um software desenvolvido pelo Departamento de Física da Universidade do Porto. A determinação dos valores ocorreu com a condição iluminante D65 e um ângulo do observador de 10°.

Para o cálculo dos parâmetros C^* e H^* utilizamos o software da Easyrgb a partir dos dados CIELab anteriormente obtidos.

3.2.3. Constituição antociânica das amostras

1. Antocianinas livres totais (método de bissulfito)

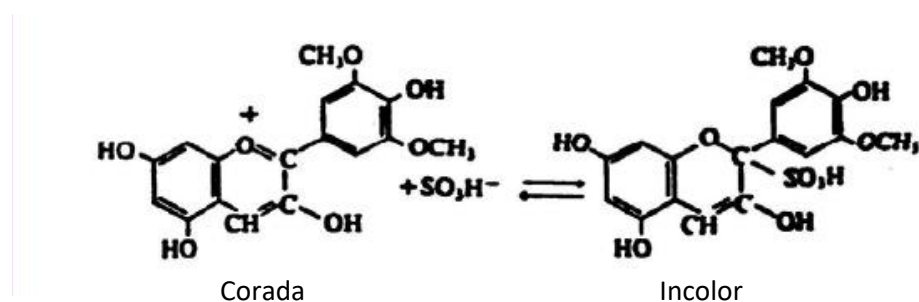


Figura 23 - Equilíbrio da antocianina com o anidrido sulfuroso

As antocianinas livres reagem facilmente com o anião bissulfito dando origem a um aduto incolor, Figura 23. À medida que os vinhos envelhecem, as antocianinas evoluem, levando à formação de novos pigmentos mais polimerizados e mais resistentes à descoloração pelo bissulfito. A quantidade de antocianinas livres totais presente em cada amostra foi determinada através de uma adaptação do método do bissulfito descrito por Sommers e Evans em 1976 [61].

O ensaio consistiu em medir para um matraz 40,0 mL de HCl 2%, 2,00 mL de etanol e 2,00 mL de cada amostra de vinho. Pipetou-se para 3 tubos de ensaio 10,00 mL desta solução e 4,00 mL de solução de bissulfito de sódio 20%. No quarto tubo de ensaio foi preparada a solução de referência, em tudo igual, mas em que a amostra de vinho foi

substituída por água desionizada. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado no vórtex. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 20 minutos. Por fim, procedeu-se à leitura da absorvância da solução de todos os tubos, em células de vidro de 10mm de percurso ótico num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array, a um comprimento de onda de 520 nm.

A quantidade de antocianinas livres que reagiu foi determinada através da diferença entre a absorvância da solução de referência e a absorvância das amostras:

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

O teor em antocianinas livres totais presentes em cada amostra de vinho foi determinado utilizando uma reta de calibração, obtida a partir de uma gama de concentrações de soluções padrão de malvidina-3-glucósido:

$$[\text{Vinho}] \text{ (mg/L)} = (\Delta\text{abs} - 0,00024) / 0,0015$$

2. Quantificação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

A cromatografia líquida de alta eficiência permite a quantificação dos compostos fenólicos com maior precisão. Os compostos são quantificados graças à sua separação após a passagem na coluna HPLC. Após a eluição, os compostos fenólicos podem ser quantificados a diferentes comprimentos de onda usando um detetor UV-Vis [72].

As amostras foram analisadas diretamente e em triplicado por 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.) segundo o método descrito na literatura por Oliveira *et al* em 2006 [62].

Os solventes utilizados foram:

A: H₂O/HCOOH 10% (V/V)

B: H₂O/HCOOH/CH₃CN (60/10 /30%) (V/V/V).

Todos os cromatogramas foram obtidos a um comprimento de onda de 520nm, a 25°C (temperatura do forno), com um fluxo de 1,0 mL/min, de acordo com o gradiente descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas totais.

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

As antocianinas 3-monoglucósidas e respetivos ésteres acetilados foram identificados tendo por base os espectros UV/VIS e os tempos de retenção dos respetivos padrões.

A concentração de antocianinas expressa em mg/L, foi determinada a partir da reta de calibração

$$\text{Conc. malvidina (mg/L)} = 1,53 \times 10^{(-5)} \times \text{área} / 11$$

obtida por análise de padrões de malvidina-3-glucósido.

3.2.4. Doseamento global de taninos

1. Taninos proantociânicos totais

A quantidade de taninos proantociânicos totais foi analisada diretamente nos vinhos, com base no método descrito na literatura [63,64]. Este método baseia-se na reação de Bate-Smith, que consiste na decomposição dos taninos condensados (procianidinas e prodelfinidinas - compostos sem cor) quando sujeitos a um meio ácido e sob a ação do calor, libertando compostos corados – as antocianidinas.

Começou por se preparar soluções 1:50, de cada vinho, com solução sintética de vinho. Pipetou-se 4,00 mL dessa solução diluída para um tubo de hidrólise e adicionou-se

2,00 mL de água desionizada e, por último foi adicionado 6,00 mL de HCL de 37% para assegurar que a decomposição dos taninos apenas se iniciava aquando do aquecimento das soluções. Para cada amostra realizou-se o ensaio em quadruplicado. Os tubos foram rolhados e 3 deles foram aquecidos em banho seco previamente aquecido a 100°C, durante 30 minutos. O quarto tubo não foi sujeito a aquecimento, tendo permanecido o mesmo período de tempo à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o aquecimento, os tubos foram arrefecidos em água fria e mantidos ao abrigo da luz durante 10 minutos. Após esse período de tempo, os tubos foram retirados da água, adicionou-se 1,00 mL de etanol (para estabilizar a cor das antocianinas) e homogeneizou-se a solução no vórtex.

Por fim, mediu-se a absorvância de todas as soluções (aquecidas e de referência) a 520 nm de comprimento de onda, em células de vidro de percurso ótico de 10 mm, num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array.

O valor de absorvância de cada amostra é obtido através da seguinte expressão:

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

O teor em taninos proantociânicos totais (g/L) nos vinhos, foi calculado usando uma recta de calibração obtida a partir de soluções padrão:

$$[\text{Vinho}] \text{ (g/L)} = \Delta\text{abs} - 0,0178 / 0,0456$$

2. Índice de diálise

O índice de diálise permite avaliar a complexidade estrutural dos compostos polifenólicos presentes no vinho, através da determinação da percentagem de compostos polimerizados que ficam retidos no interior de uma membrana de diálise (celulose; diâmetro 6.4 mm; cut off 12-14 KDa de peso molecular; porosidade média de 25 Å de raio). O procedimento experimental foi realizado de acordo com o procedimento descrito na literatura por Glories e Mateus [65,66].

Pipetou-se 5,00 mL de vinho para o interior de uma membrana de diálise, com 25 cm de comprimento, e colocada num frasco de diálise com 50,0 mL de solução sintética de vinho previamente filtrada (0,45 µm). Simultaneamente, preparou-se a solução de referência com 50 mL da solução sintética de vinho e 5 mL da amostra e colocou-se num frasco de

diálise. Os frascos foram fechados e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 24 horas. Após este período de tempo, foi medida a absorvância das soluções a 280 nm, num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array, utilizando-se células de quartzo de percurso ótico de 1 mm.

O índice é calculado através da fórmula seguinte:

$$ID = (d_0 - d) / d_0 * 10$$

em que:

ID – índice de diálise

d_0 – Absorvância da solução de referência

d – Absorvância da solução resultante da diálise

Todas as leituras foram realizadas em triplicado.

3. Poder tanante

O poder tanante dos vinhos caracteriza-se pela capacidade que alguns compostos fenólicos possuem, nomeadamente os taninos, de interagirem com as proteínas formando agregados insolúveis. O poder tanante dos vinhos foi determinado por nefelometria de acordo com o procedimento descrito na literatura por De Freitas & Mateus [67].

Preparou-se uma diluição 1:50 das amostras com uma solução sintética de vinho, previamente filtrada (0,45 µm). Seguidamente pipetou-se 4,00 mL desta solução para 4 tubos de ensaio, homogeneizado num vórtex e efetuou-se a leitura da turbidez (Turbidez branco).

Posteriormente, adicionou-se 150 µL de solução aquosa de proteína albumina sérica bovina (BSA) de concentração 0,8 g/L a cada tubo de ensaio. Homogeneizado num vórtex e guardado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos. Após esse período, efetuou-se a leitura do valor de turbidez máximo (Turbidez amostra).

A leitura da turbidez foi realizada num turbidímetro HACH 2100 N, equipado com um adaptador de células de 100x12 mm.

O poder tanante dos vinhos é expresso em unidades de turbidez (NTU/mL) e foi determinado de acordo com a seguinte expressão:

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

3.2.5. Precipitações com origem na constituição fenólica das amostras

1. Prova de estabilidade (alteração oxidásica)

Para vinhos novos, insuficientemente sulfitados e provenientes de uvas atacadas pela *Botrytis Cinerea* que segrega uma oxi-redutase, a lacase, ocorre frequentemente uma degradação enzimática dos compostos fenólicos, os quais se vão insolubilizando progressivamente. A turvação que ocorre tem uma coloração acastanhada. A tirosinase, poderá ter uma ação semelhante embora com menor intensidade. Os vinhos ficam com as suas características organoléticas alteradas. O teste de estabilidade para a alteração oxidásica consistiu em colocar a amostra ao ar, ao abrigo da luz direta e do calor e verificar a limpidez e a cor, ao fim de 24 horas. Se o vinho se mantiver límpido, não há risco de casse oxidásica [59].

3.3. Análise sensorial

Os vinhos em estudo foram provados, na sala de Prova da CVRVV, por um painel de provadores qualificados constituído por 9 elementos.

A prova sensorial avaliou os parâmetros da cor, e limpidez, as sensações olfativas e gustativas de cada amostra de vinho que foi registado na ficha de prova - Anexo III, onde os provadores puderam classificar os vinhos numa escala de 0-10, em que 0 correspondia a muito mau e 10 a muito bom.

Os vinhos em prova, foram identificados por um código diferente, foram servidos à temperatura ambiente (~20°C) e avaliados independentemente por cada um dos provadores.

III. Resultados e Discussão

1. As uvas

1.1 Análises físico-químicas

Não se realizaram análises físico-químicas aos extratos de uvas devido ao elevado teor de polissacáridos, que atuariam como interferentes nos métodos analíticos utilizados.

1.2 Análise de cor

Efetuuou-se a caracterização completa da cor das uvas, incluindo identificação e doseamento de antocianinas e caracterização global de taninos. Na adega, determinou-se o álcool provável, por refratometria para ter uma indicação do teor de açúcares das uvas Vinhão. O resultado obtido foi de 11.0 ° (% v/v) a 19.3°C o que indica um bom estado de maturação/seleção das uvas para este ensaio.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado a partir dos extratos de uvas anteriormente preparados e os resultados obtidos para as 2 amostras estão apresentados, pela média $\pm$ desvio padrão.

1.2.1 Determinação de polifenóis totais

Para a determinação de polifenóis totais usa-se o índice de fenóis totais (IFT). Os resultados obtidos para as 2 amostras estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Índice de fenóis totais para as uvas da casta Vinhão (média $\pm$ desvio padrão)

	19 Setembro 2017	20 Setembro 2017
Índice de fenóis totais	59.45 $\pm$ 0.05	72.47 $\pm$ 0.06

O resultado obtido para os dois extratos é muito diferente: as uvas de 20 de Setembro são mais ricas 21% em polifenóis que as de 19 de Setembro. Tal facto poderá dever-se à não escolha das uvas, isto é, trata-se de uvas da casta Vinhão em bom estado

sanitário, rececionadas em 2 dias diferentes, de produtores distintos, provavelmente com níveis de maturação diferentes e cada extrato de uva advir somente de 20 bagos. Logo, o extrato de uva obtido é provavelmente pouco representativo do realmente rececionado. No entanto, os resultados obtidos são superiores aos resultados obtidos por Jordão et al em 2010, $IFT_{TN}=45,4$ e semelhantes aos obtidos por Fernandes em 2009 $IFT_{TN}=74,5$ para Touriga Nacional respetivamente. Esperava-se um valor superior ao da Touriga Nacional, visto a casta Vinhão ser uma casta tintureira, isto é, de polpa corada [68,69].

1.2.2 Características cromáticas das uvas

As características cromáticas analisadas estão compiladas na tabela 3, 4 e 5 e representadas nas Figuras 24, 25 e 26.

Tabela 3 - Características cromáticas das uvas Vinhão (média $\pm$ desvio padrão)

	19 Setembro 2017	20 Setembro 2017
Intensidade de cor	25.4 ± 0.3	38.2 ± 0.2
Índice de cor vermelha	161 ± 1	245 ± 2
Tonalidade	0.405 ± 0.003	0.3963 ± 0.0008

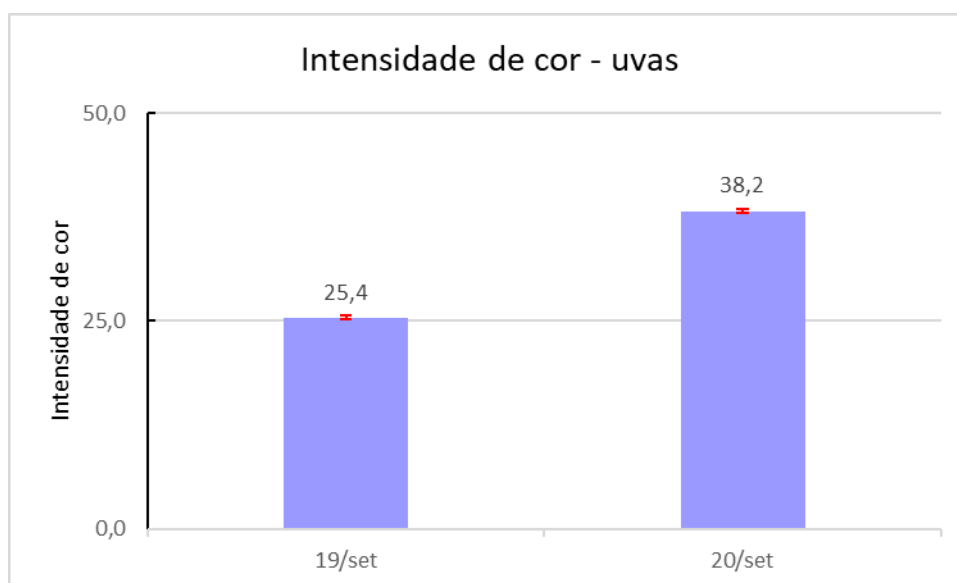


Figura 24 – Gráficos comparativos da intensidade de cor de uvas Vinhão

A Figura 24 mostra que a intensidade de cor das uvas de 20 Setembro é superior em 50% à intensidade de cor das uvas de 19 de Setembro, enquanto o índice de fenóis totais, é superior em 20%. O resultado obtido é superior ao resultado obtido por Fernandes em 2009 para a Touriga Nacional, $IC_{TN} = 21,4$ provando a diferença do Vinhão ser uma casta tintureira [69].

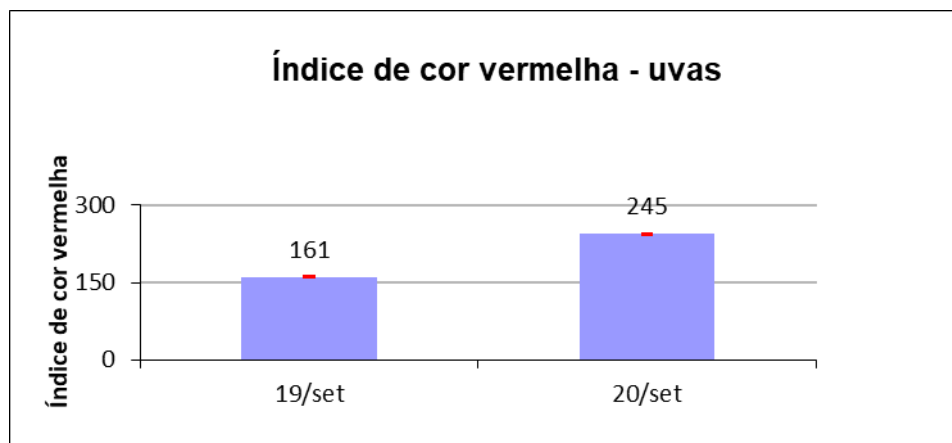


Figura 25 – Gráficos comparativos do índice de cor vermelha de uvas Vinhão

A tendência no índice de fenóis totais entre os extratos de uvas é corroborada na intensidade de cor e no índice de cor vermelha – Figura 25. A relação entre o índice de cor vermelha e a intensidade de cor, designa-se por % vermelho na cor e é a mesma para os 2 extratos, isto é, a % cor vermelha é de cerca de 64% da cor total. Trata-se de extrato de uvas tintureiras, logo entre os constituintes das películas e da polpa encontram-se as antocianinas, o maior responsável pela cor vermelha. A diferença de tonalidade entre os 2 extratos é praticamente nula, como se pode confirmar na Figura 26.

O resultado obtido é inferior ao obtido por Fernandes em 2009 para a TN, $T_{TN} = 0,625$, e deste modo mostra o peso que a componente vermelha tem na cor da uva Vinhão [69].

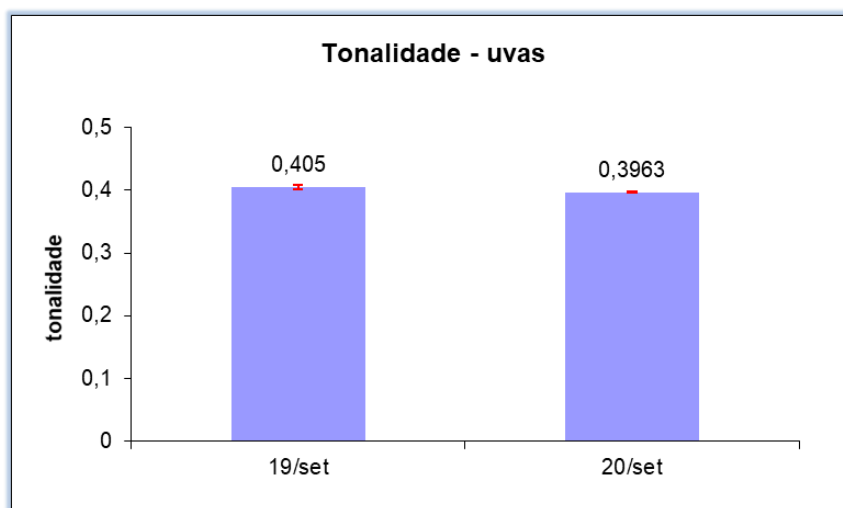


Figura 26 – Gráfico comparativos da tonalidade do extrato de uvas Vinhão

Realizou-se a análise espectrofotométrica dos 2 extratos de uvas de modo a apresentar o resultado no sistema CIELab. Os dados estão apresentados na tabela 4 e representados nas Figuras 27 e 28.

Tabela 4 - Parâmetros cromáticos no sistema CIELab para os extractos de uvas Vinhão

	X	Y	Z	L*	a*	b*	C*	Hº
19-Set	14,29	6,98	2,89	31,76	60,24	22,38	64,26	20,39
20-Set	7,46	3,41	0,22	21,61	52,13	34,05	62,26	33,15

Os resultados são muito diferentes, em todos os parâmetros, dos obtidos por Araújo em 2004 para uvas da mesma casta, da mesma região, com outro método de extração das antocianinas [55].

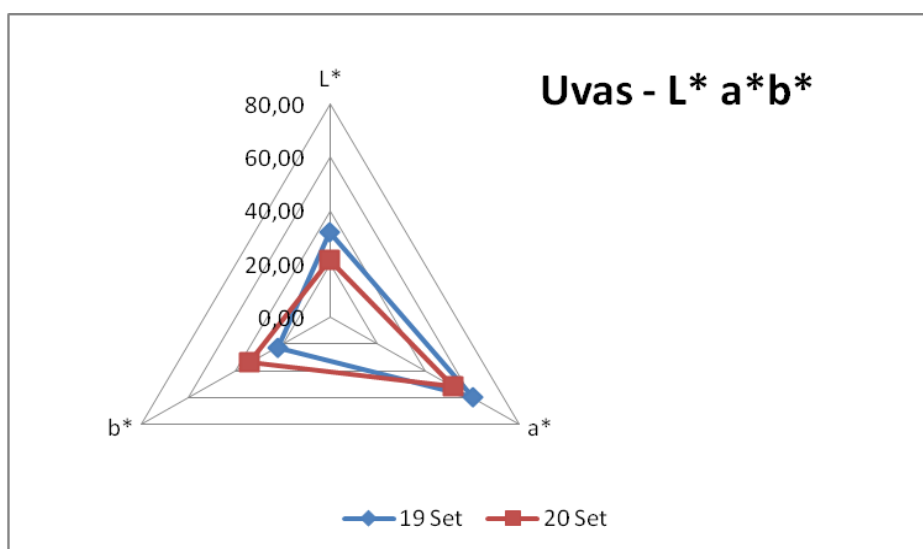


Figura 27 – Gráfico comparativo da cor dos extratos de uvas no sistema CIELab (L*, a*b*)

Os resultados obtidos mostram maior componente vermelha, a*, menor componente amarela, b* e maior luminosidade para o extrato das uvas de 19 de Setembro quando comparada com o resultado da análise para as uvas de 20 Setembro. Tal resultado parece estar em desacordo com os resultados anteriores, nomeadamente, a % de vermelho que é igual para ambos os extratos. A maior luminosidade no extrato do dia 19 confere menor profundidade, menor opacidade que está de acordo com menor teor de polifenóis, menor IFT.

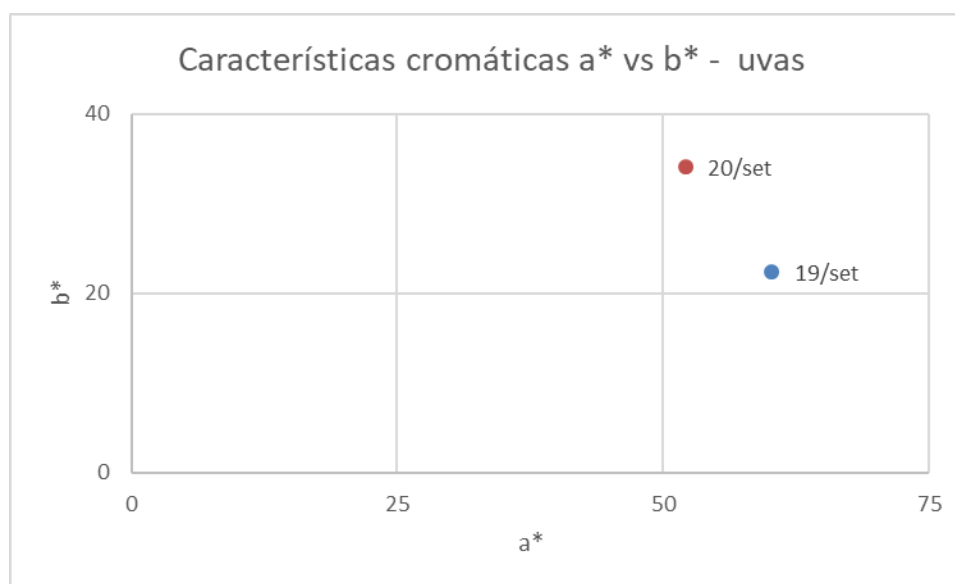


Figura 28 – Gráfico comparativo da cor dos extratos de uvas no sistema CIELab (a^*b^*)

No plano a^* vs b^* , Figura 28, encontramos pequena diferença entre os 2 extratos, podendo considerar-se pertencentes ao mesmo grupo. Tal facto é também perceptível na Figura 29.

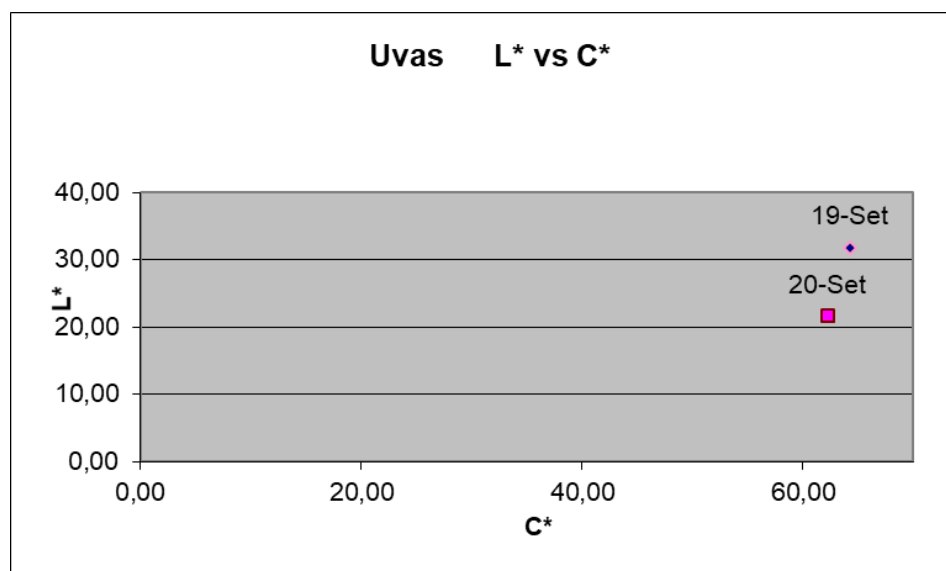


Figura 29 - Gráfico comparativo da cor dos extratos de uvas nas coordenadas L^* vs C^*

A luminosidade corresponde à transmitância e varia na razão inversa da intensidade de cor. A cromaticidade corresponde ao comprimento de onda dominante que caracteriza a tonalidade. A Figura 29 comprova o anteriormente sugerido pois apresenta maior luminosidade, logo menor intensidade de cor para 19 de Setembro e igual cromaticidade.

1.2.3. Constituição antociânica das uvas

1. Antocianinas livres e totais (método de bissulfito)

As antocianinas livres reagem facilmente com o anião bissulfito dando origem a um aduto incolor. A descoloração foi praticamente instantânea. Os resultados obtidos para este ensaio estão representados nas Figuras 30 e 31.

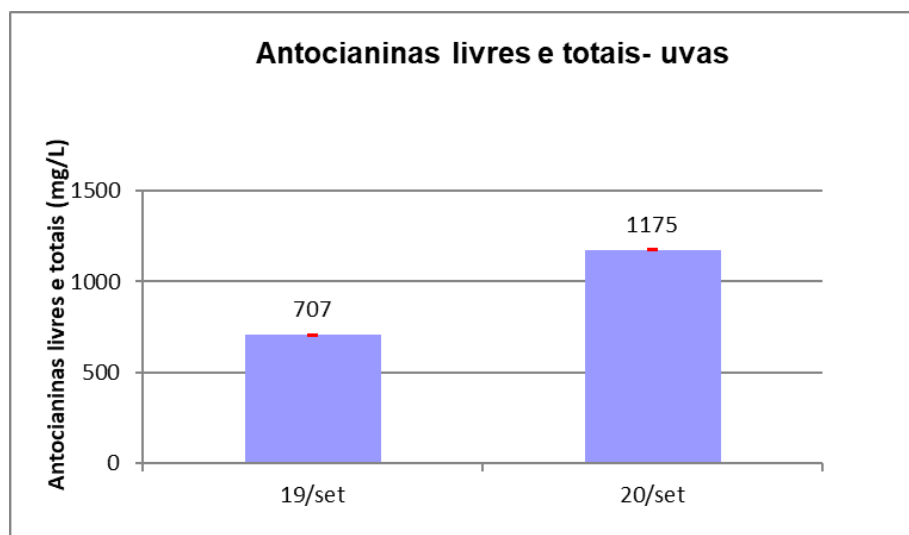


Figura 30 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais nas uvas Vinhão (mg/L)

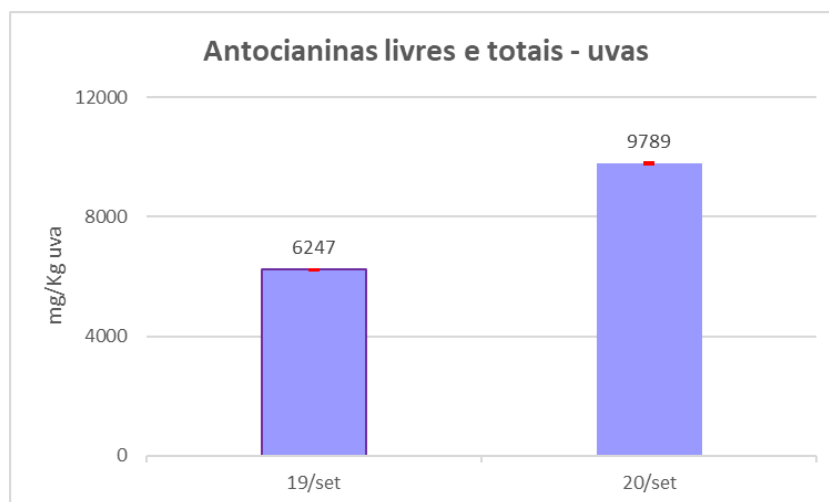


Figura 31 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais para as uvas Vinhão (mg/kg uva)

O teor de antocianinas livres e totais pelo método de bissulfito é superior nas uvas de 20 de Setembro em comparação com as de 19 de Setembro, conforme se pode ver nas Figuras 30 e 31. Tal resultado corrobora os resultados obtidos na intensidade de cor, no índice de cor vermelha e no IFT. Ambos os resultados são inferiores aos obtidos por

Castillo- Sanchez em 2008 para uva da mesma casta que entre 2000-2002 obteve o teor de antocianinas entre 1835 e 2000 mg/L [70].

Comparando com a Touriga Nacional o resultado obtido para o teor de antocianinas é inferior ao obtido por Fernandes et al, em 2010 de 1653 mg/L, mas superior ao valor obtido por Jordão et al no mesmo ano de 1125 mg/Kg uva [68, 71].

2. Quantificação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLP-DAD)

As antocianidinas-3-monoglucósido e respetivos ésteres acilados foram identificados com base no respetivo espectro UV-VIS e tempo de retenção. O cromatograma obtido é igual para ambas as amostras como está apresentado na Figura 32.

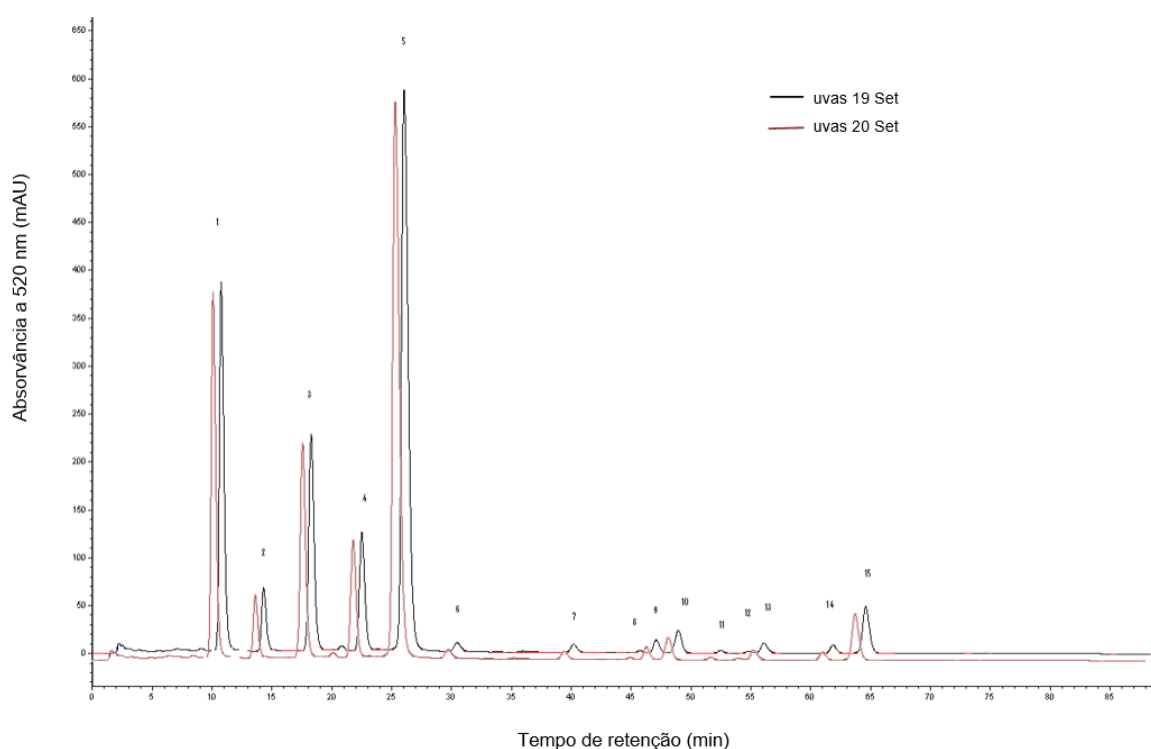


Figura 32 - Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes nas uvas Vinhão

Legenda:

1: delphinidina 3-glucósido	6: delphinidina 3-acetilglucósido	11: cianidina 3-cumaroilglucósido
2: cianidina 3-glucósido	7: petunidina 3-acetilglucósido	12: peonidina 3-cafeoilglucósido
3: petunidina 3-glucósido	8: peonidina 3-acetilglucósido	13: petunidina 3-cumaroilglucósido
4: peonidina 3-glucósido	9: delphinidina 3-cumaroilglucósido	14: peonidina 3-cumaroilglucósido
5: malvidina 3-glucósido	10: malvidina 3-acetilglucósido	15: malvidina 3-cumaroilglucósido

O perfil antociânico é um bom marcador químico para caracterizar diferentes variedades pois é característico da casta e independente do local de produção. Fatores não genéticos, como o ambiente ou as práticas culturais têm relação forte com o teor de antocianinas, mas não no perfil qualitativo das mesmas. [8] A caracterização dos compostos fenólicos (coloridos e não coloridos) das uvas é importante devido ao efeito conjunto para a cor do vinho: durante o processo de vinificação, novos e mais estáveis pigmentos formam-se da reação entre as antocianinas e os flavonóis. Além disso os teores de alguns componentes não coloridos (incluindo flavonóis, ácidos fenólicos e flavan-3-óis) influenciam a co-pigmentação que é a responsável por 30-50% da cor dos vinhos novos [72].

Segundo Dopico-Garcia et al., em 2008, o teor de antocianinas é para a casta Vinhão cerca de 97% do total de compostos fenólicos existentes sendo a casta com menor teor de compostos não coloridos entre 10 castas tintas da região do Vinho Verde [72].

Segundo Dopico-Garcia et al, 2008, e corroborado por Araújo, 2004 a malvidina glucósido é para a casta Vinhão a antocianidina glucósido mais importante (50% foi o resultado obtido) seguida da delfinidina glucósido com um teor esperado de 15-32% (20%), a petunidina glucósido de 13-22% (14%), e para a cianidina glucósido de 1.8-3.5% (3%) e baixo teor de derivados cumáricos, como se pode observar na Figura 33 [72,73].

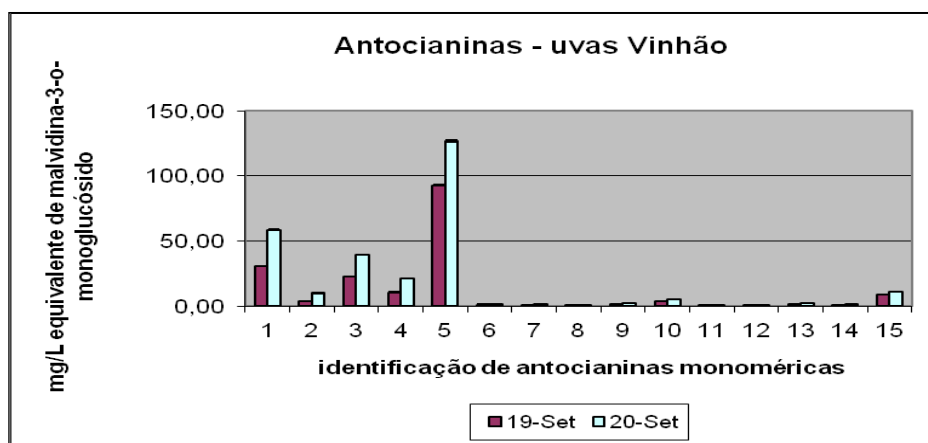


Figura 33 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas identificadas nas uvas Vinhão

As antocianinas glucosiladas (1-5) constituem, em ambas as amostras, o grupo mais importante, 90%, sendo seguidas pelas cumarilglucosiladas (9,11,13-15) 7%. A análise das Figuras 32 e 33, mostra que entre as antocianidinas-3-glucósido, a malvidina e os respetivos ésteres (5,10 e 15), são os que têm maior teor, num total de 50-60%.

A razão entre as antocianinas com três substituições no anel lateral e as antocianinas com duas substituições apresenta o valor médio de 8,0 para as uvas em estudo. Esta razão está relacionada com as atividades enzimáticas responsáveis pela biossíntese das antocianinas. Roggero et al., após estudo do metabolismo das antocianinas durante a maturação de uvas Syrah afirmam que é provável que as diferenças percentuais entre as diferentes antocianinas sejam determinadas por diferentes atividades das enzimas flavonóide-3'-hidroxilase (FH) e metiltransferase (MT) [74]. Assim, por exemplo, uma forte atividade da enzima flavonóide-3'-hidroxilase leva a um aumento de delphinidina se a atividade da enzima metiltransferase for fraca ou a um aumento de malvidina se a atividade desta última enzima for forte. Se a atividade de FH é baixa e a de MT é elevada então é provável que se acumule peonidina e que haja baixa produção de delphinidina. Se a atividade das duas enzimas for baixa então, acumula-se cianidina [75].

O resultado obtido para o teor de antocianinas por este método, HPLC, é muito inferior ao resultado obtido pelo método do bissulfito, (707-1175 mg/L vs 182-285 mg/L). Esta diferença foi previamente documentada por Rivas-Gonzalo et al em 1992 e é atribuída ao facto de o HPLC só detectar antocianinas monoméricas livres, enquanto o método de bissulfito avalia parte dos polímeros que ainda são sensíveis ao efeito do bissulfito [76].

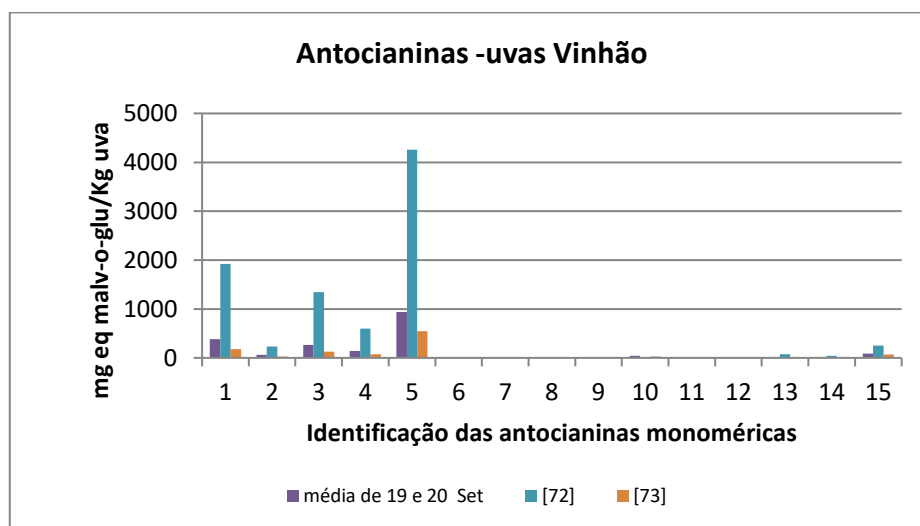


Figura 34 - Representação comparativa do teor de antocianinas monoméricas mg/Kg uva Vinhão entre vários estudos

Comparando os resultados obtidos com os de outros estudos para a casta Vinhão, podemos confirmar que existe uma grande variabilidade no teor de cada antocianina, como está representado na Figura 34. No entanto, a relação quantitativa de cada antocianina relativamente ao total, Figura 35, mostra que essa relação é muito próxima entre os estudos e os resultados obtidos.

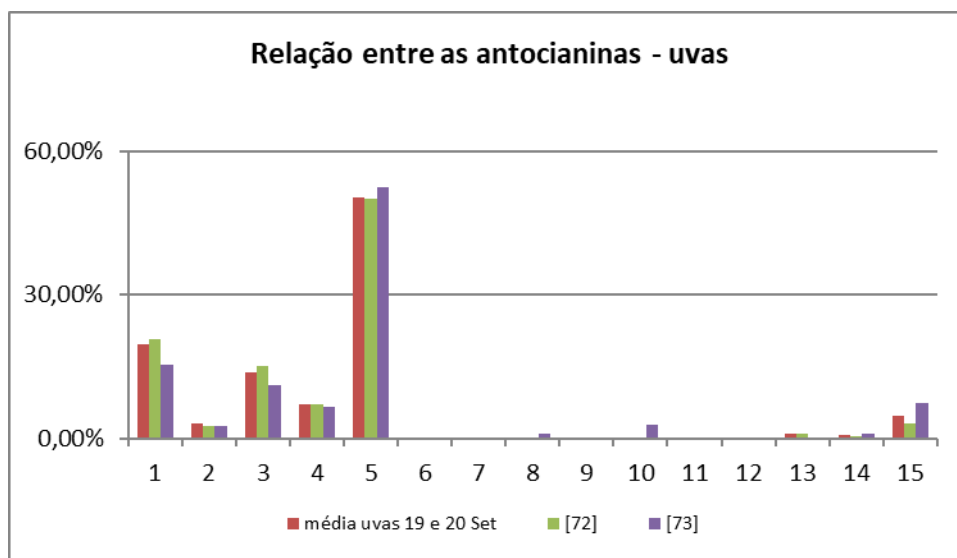


Figura 35 – Representação comparativa do teor de antocianinas monoméricas nas uvas Vinhão entre vários estudos

Apesar de díspares numa primeira leitura, Figura 34, os resultados obtidos a nível qualitativo e quantitativo comparam-se com o perfil de antocianinas obtidos por outros autores para a casta Vinhão, conforme Figura 35.

Segundo Araújo em 2004 existe uma relação forte entre o IFT e o teor de antocianinas. Como só temos os resultados de 2 amostras, comparou-se com a Touriga Nacional [69,73].

Os resultados da TN encontram-se representados na Figura 36 e corroboram a teoria de Araújo ($R^2 = 0,92$, $p < 0.05$). Os resultados obtidos para a casta Vinhão são inferiores aos da Touriga Nacional, mas indiciam um comportamento paralelo, mostrando que nas uvas a cor é devida principalmente às antocianinas.

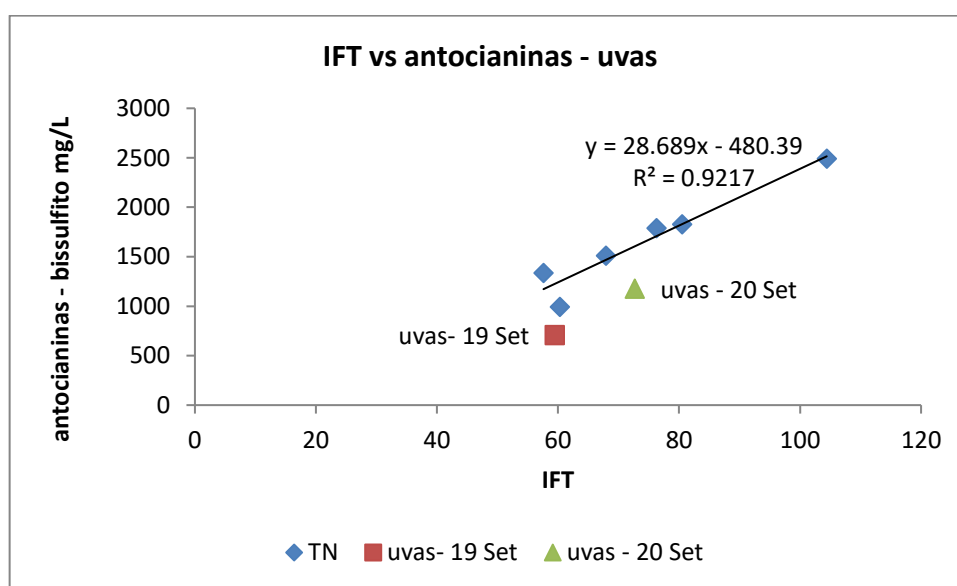


Figura 36 – Gráfico da correlação IFT vs antocianinas (bissulfito) para uvas

1.2.4. Doseamento global de taninos

1. Taninos proantociânicos totais

Não se realizou este ensaio para as uvas devido ao açúcar presente nas mesmas produzirem substâncias secundárias durante o aquecimento que afetam a leitura a 520nm, tornando os resultados inconclusivos [77].

2. Índice de diálise

Este ensaio apenas foi realizado para as uvas do dia 20 de Setembro e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultado do Índice de diálise para o extrato de uvas (média $\pm$ desvio padrão)

	19 Setembro 2017	20 Setembro 2017
Índice de diálise (%)	-	4.10 $\pm$ 0.01

O índice de diálise, está relacionado com a estrutura e a carga dos taninos. Moléculas grandes ou fortemente carregadas passam pelos poros da membrana mais devagar do que moléculas pequenas ou fracamente carregadas. O índice de diálise corresponde á quantidade de compostos fenólicos de maior massa molecular ou maior carga, como taninos condensados poliméricos, complexos tanino-polissacáridos, pigmentos polimerizados, etc, que ficaram retidos na membrana, pois a membrana permite a difusão dos compostos de baixo peso molecular e fracamente carregados mas retém os de maior peso molecular.

3. Poder tanante

O poder tanante caracteriza-se pela capacidade que alguns compostos fenólicos possuem, nomeadamente os taninos, de interagirem com as proteínas formando agregados insolúveis, neste caso a proteína escolhida é albumina de soro bovina (BSA). O poder tanante foi determinado por nefelometria de acordo com o procedimento descrito na literatura por de Freitas & Mateus [67]. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 37.

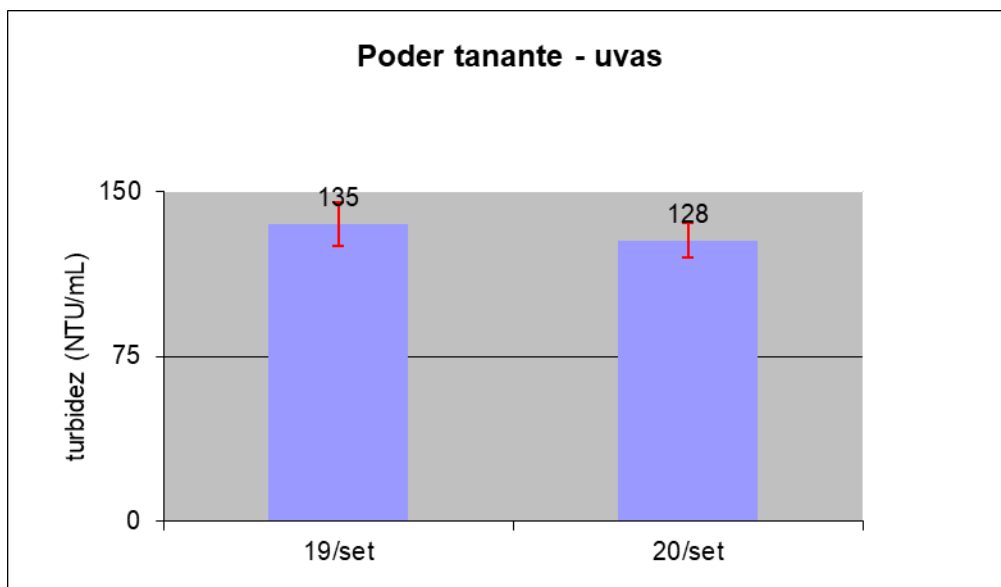


Figura 37 - Gráfico comparativo do poder tanante das uvas Vinhão de 19 e 20 de Setembro

O poder tanante, também designado índice BSA, é proporcional à quantidade [78] e ao tamanho dos taninos que reage com a proteína, na gama de tetrâmero a octâmero, pois crê-se que estruturas mais pequenas que tetrâmero não conseguem precipitar a BSA [79,80]. A ligação dos fenóis com as proteínas pode ocorrer de diversas formas e o mecanismo de interação entre os fenóis e a proteína ainda não é consensual.

Quimicamente, proteínas e polifenóis podem interagir por ligações covalentes, irreversíveis, e não covalentes, reversíveis, que permitem transições estruturais e funcionais dos compostos polifenólicos. Segundo Harbertson em 2014 pode ocorrer um efeito sinérgico em misturas de baixa concentração de taninos [79]. Nas uvas existem taninos na película e nas grânhas (sobretudo condensados), não se trata maioritariamente de compostos fenólicos de massa molecular elevada porque o índice de diálise é baixo, o que confirma que a concentração de taninos condensados é baixa, trata-se sobretudo de taninos pouco polimerizados.

1.3. Análise sensorial

Não realizamos análise sensorial às uvas em questão.

2. Os mostos

2.1. Análises físico-químicas

Só foram realizadas análises físico-químicas ao mosto ao longo do processo para controlo da vinificação. Ver Anexo II.

2.2. Análise de cor

2.2.1. Determinação de polifenóis totais

Para a determinação de polifenóis totais usa-se o índice de fenóis totais.

Os resultados para as 7 amostras estão apresentados na Tabela 6 e representados nas Figuras 38,39 e 40.

Tabela 6- Índice de fenóis total para os mostos de Vinhão (média $\pm$ desvio padrão)

	Cuba 68	Cuba 69	Cuba 70	VT
1 dia	24.3 $\pm$ 0.4	22.9 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 0.3	
2 dias	34.1 $\pm$ 0.1	31.2 $\pm$ 0.1	22.0 $\pm$ 0.4	
5 dias				59.2 $\pm$ 0.1

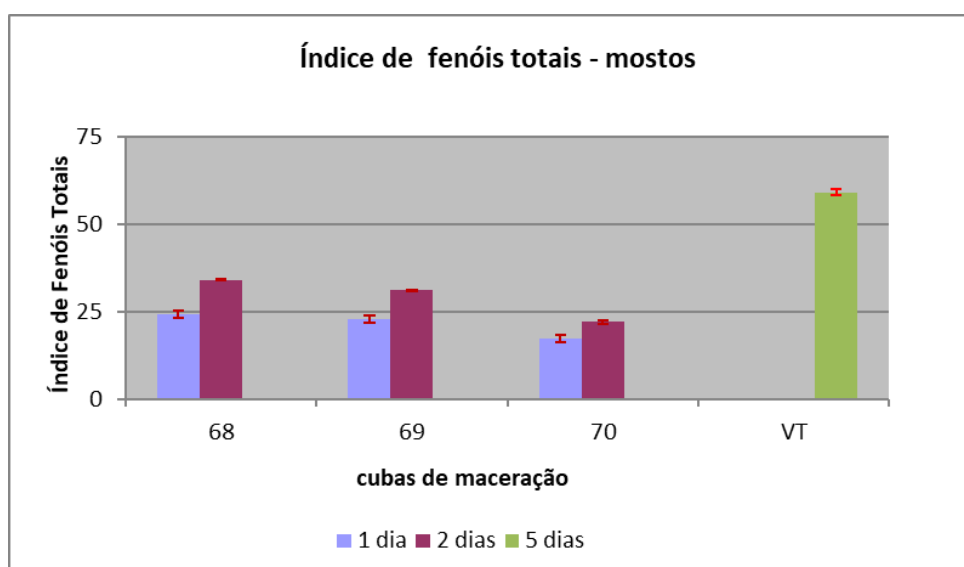


Figura 38 - Gráfico comparativo do índice de fenóis totais dos mostos de Vinhão

Os resultados obtidos para as 3 cubas de maceração a frio são um pouco diferentes entre si, como se pode ver na Figura 38. Tal facto pode advir da não escolha das uvas no enchimento das cubas, isto é, trata-se de uvas da casta Vinhão em bom estado sanitário, rececionadas em 2 dias diferentes, 19 de Setembro, a cuba 68, e 20 de Setembro, as cubas 69 e 70, de produtores distintos provavelmente com níveis de maturação diferentes. As cubas sofreram 3 remontagens durante os 2 dias de maceração a frio.

Para cada cuba, os resultados são concordantes, no sentido em que quanto mais tempo de maceração a frio, maior o teor de fenóis retirados das películas e grânhas, como está representado na Figura 39 [24].

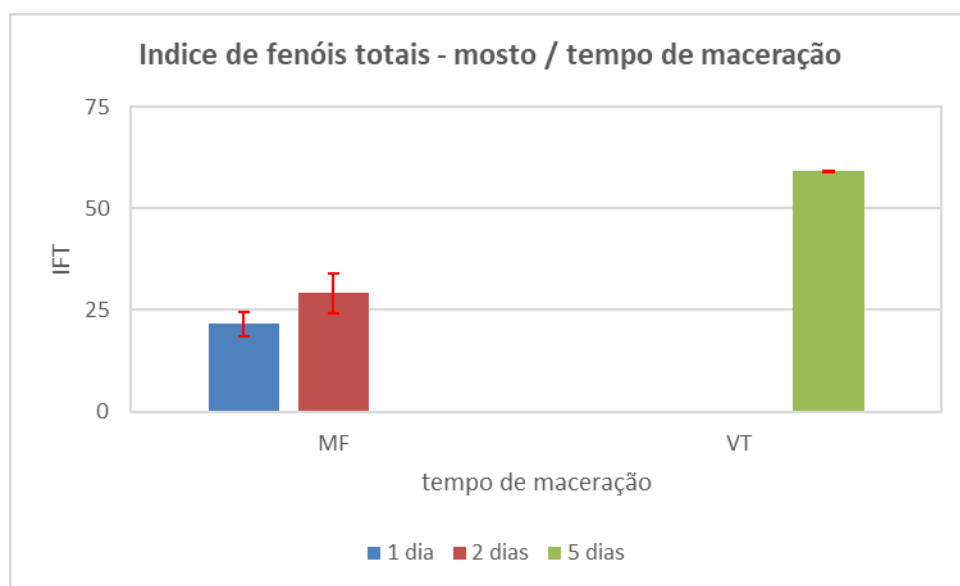


Figura 39 – Evolução do índice de fenóis totais/ tempo de maceração/ processo de vinificação

Se se comparar os resultados obtidos com os de outros estudos de maceração a frio, representada na Figura 40, podemos confirmar que existe variabilidade.

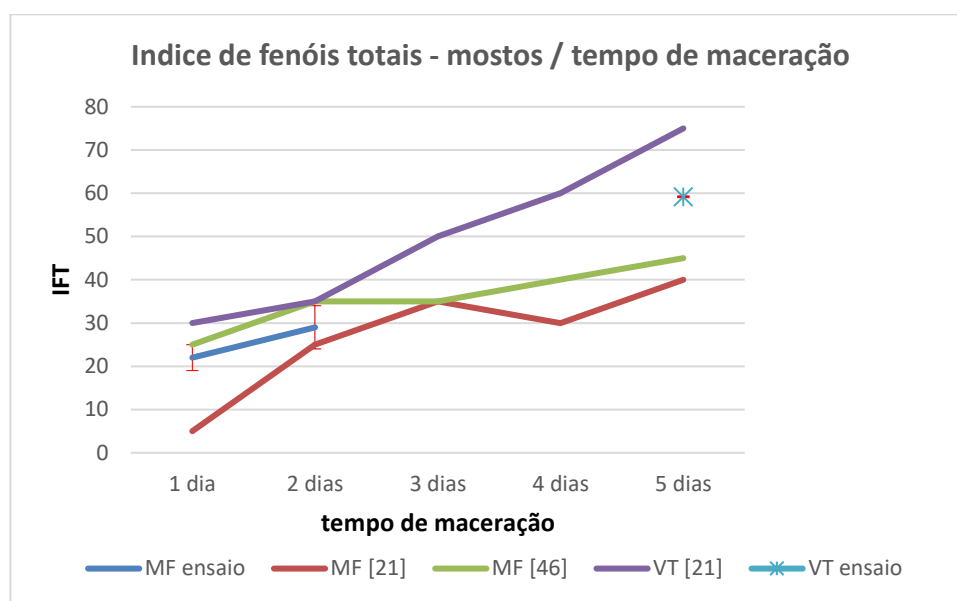


Figura 40 – Evolução do índice de fenóis totais/ tempo de maceração/ processo de vinificação

Assim, quanto à ordem de grandeza está em sintonia com os resultados obtidos para a casta Tannat ($IFT_{\text{uvas}} = 81$), semelhante ao Vinhão ($IFT_{\text{uvas}} = 72$), que numa maceração pré-fermentativa durante 5 dias, a 5°C - 10°C tinha, no fim do 2º dia, um $IFT_{\text{mosto}} = 25$, ou $IFT_{\text{mosto}} = 35$ no fim de 5 dias a 15°C, próximo do IFT_{mosto} do ensaio que em média é de 29, isto é, os resultados obtidos ao fim de 2 dias de maceração pré-fermentativa a 10°C para a casta Vinhão encontram-se no intervalo entre os resultados obtidos para a casta Tannat com maceração pré-fermentativa a 5-10°C e a maceração pré-fermentativa a 15°C [21,46].

O mosto do Vinhão Tradicional (VT) tem um período e uma temperatura superior de maceração, visto incluir a fermentação alcoólica (FA). O IFT obtido encontra-se no intervalo entre a vinificação tradicional para a casta Tannat (VT [21] na Figura 40) e o de maceração pré-fermentativa a frio, podendo considerar-se que a casta Vinhão tem um comportamento semelhante.

2.2.2. Características cromáticas dos mostos

As características cromáticas analisadas estão compiladas nas tabelas 7, 8 e 9 e representadas nas Figuras 41,42 e 43.

Tabela 7 - Intensidade de cor dos mostos (média $\pm$ desvio padrão)

Intensidade de cor	Cuba 68	Cuba 69	Cuba 70	VT
1 dia	8.3 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	4.31 $\pm$ 0.01	-
2 dias	14.3 $\pm$ 0.4	14.0 $\pm$ 0.1	6.54 $\pm$ 0.02	
5 dias				18.46 $\pm$ 0.04

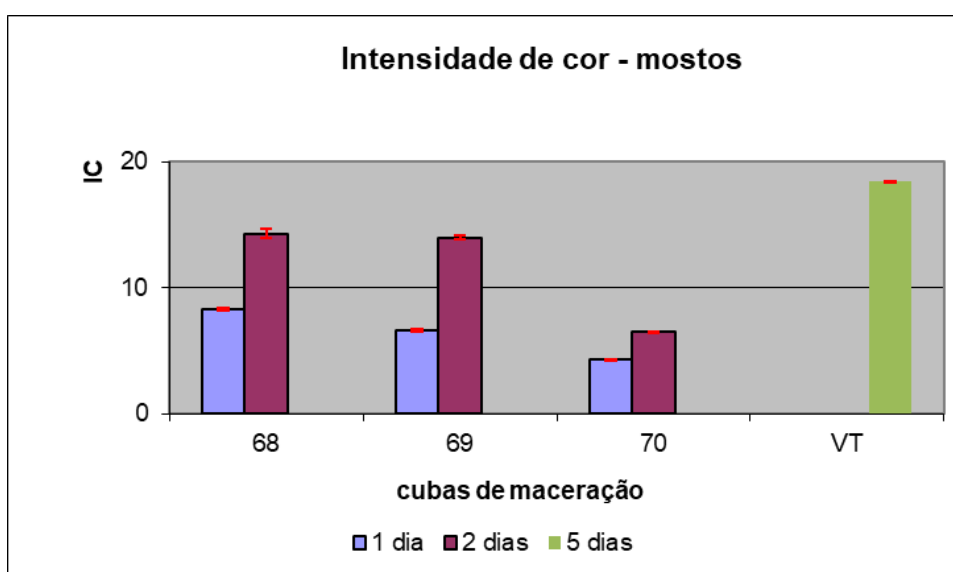


Figura 41 - Gráfico comparativo da intensidade de cor dos mostos

Como se pode ver pela Figura 41, existe uma grande variabilidade entre as cubas. Mais uma vez, a cuba 70 tem um comportamento muito diferente das cubas 68 e 69.

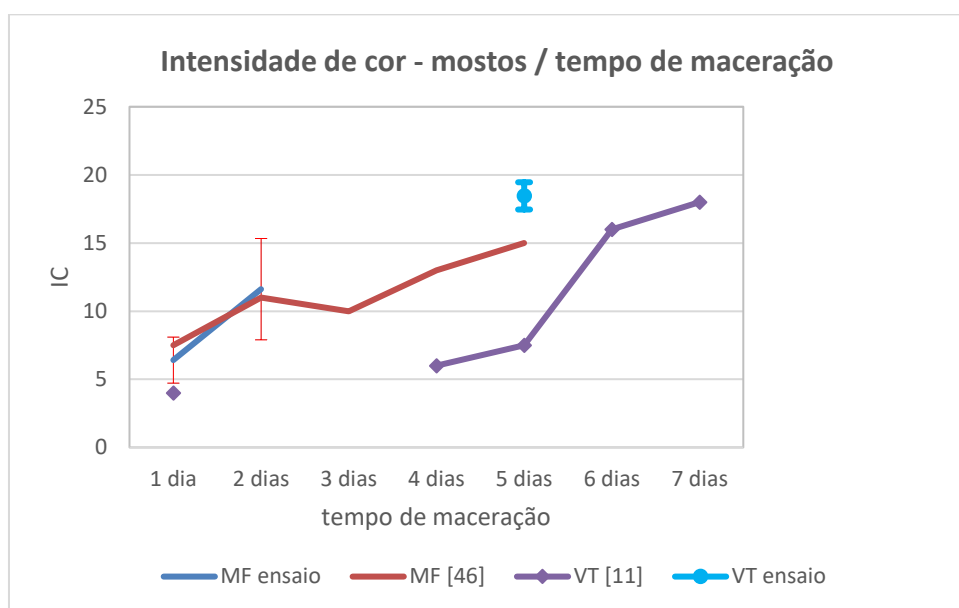


Figura 42 – Evolução da intensidade de cor / tempo de maceração

A intensidade de cor do mosto do ensaio está em concordância com o obtido por Favre em 2013 para a casta Tannat, com maceração pré-fermentativa 5 dias a 15°C ($IC_{Tannat} = 11$ e $IC_{Vinhão} = 12$) [46]. A intensidade de cor para o VT está de acordo com o obtido por Costa em 1999, [11], como se pode ver na Figura 42, $IC_{mosto} = 16$ para Vinhão, 9 dias de fermentação (nos primeiros 3 dias a FA foi realizada pelas leveduras autóctones) e conservação durante 1 mês a -20°C em comparação com o deste ensaio com 5 dias de maceração/FA e conservação a -18°C mais de 5 meses.....

Os resultados obtidos para a intensidade de cor vermelha estão apresentados na Tabela 8 e representados nas Figuras 43 e 44.

Tabela 8 - Índice de cor vermelha dos mostos (média ± desvio padrão)

Índice de cor vermelha	Cuba 68	Cuba 69	Cuba 70	VT
1 dia	56 ± 1	44.1 ± 0.4	26.8 ± 0.1	
2 dias	98 ± 2	94 ± 1	42.3 ± 0.1	
5 dias				120.2 ± 0.3

O índice de cor vermelha é concordante com o IC: o aumento da cor é em parte devido ao aumento das antocianinas, para todas as cubas, como se pode ver representado na Figura 42, muito semelhante à Figura 44.

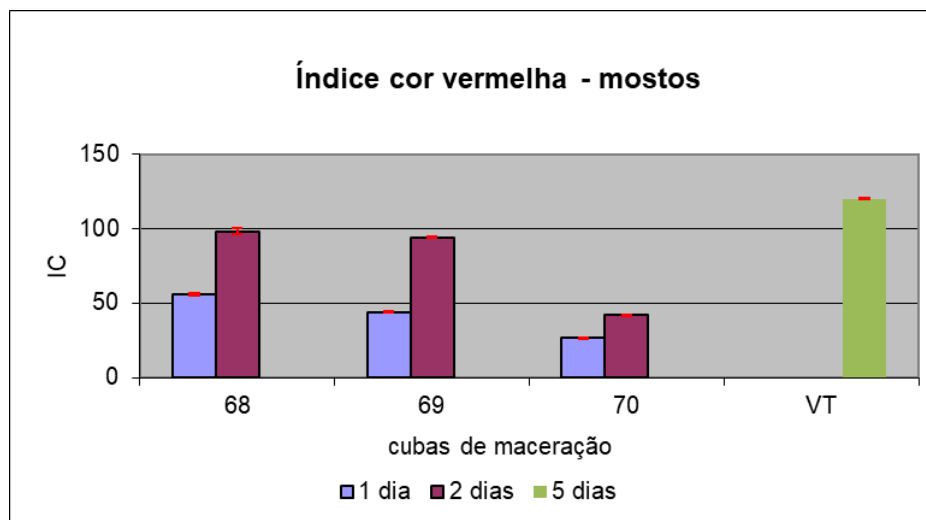


Figura 43 - Gráfico comparativo do Índice de cor vermelha dos mostos

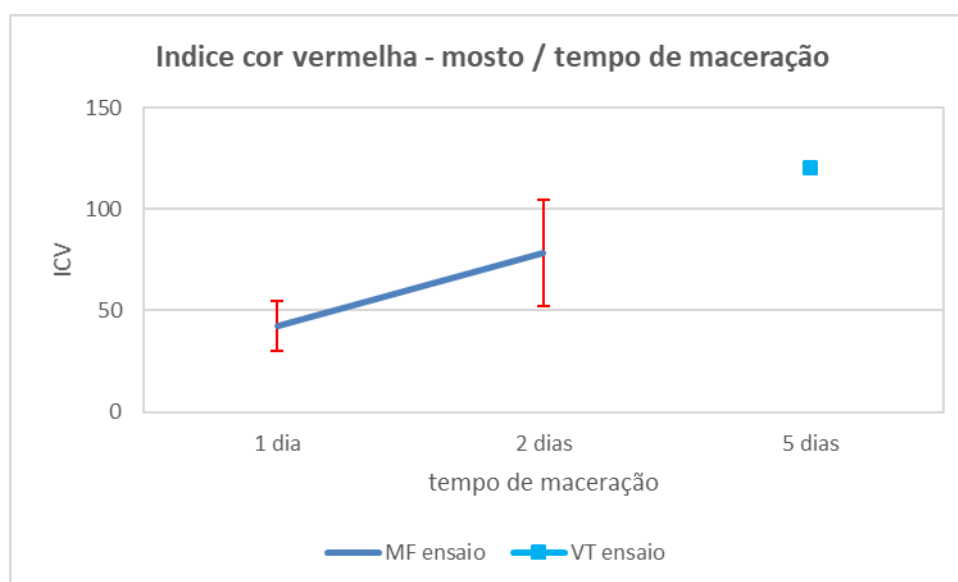


Figura 44 – Evolução do índice de cor vermelha dos mostos / tempo de maceração

As Figuras 43 e 44 mostram mais uma vez, a variabilidade entre as cubas. A diferença no índice de fenóis totais entre as cubas de maceração a frio é corroborada na intensidade de cor e no índice de cor vermelha.

Os resultados obtidos para a tonalidade dos mostos estão apresentados na tabela 9 e representados nas Figuras 45 e 46.

Tabela 9 - Tonalidade dos mostos (média $\pm$ desvio padrão)

Tonalidade	Cuba 68	Cuba 69	Cuba 70	VT
1 dia	0.396 $\pm$ 0.001	0.421 $\pm$ 0.001	0.500 $\pm$ 0.001	-
2 dias	0.362 $\pm$ 0.004	0.387 $\pm$ 0.003	0.436 $\pm$ 0.001	
5 dias				0.407 $\pm$ 0.001

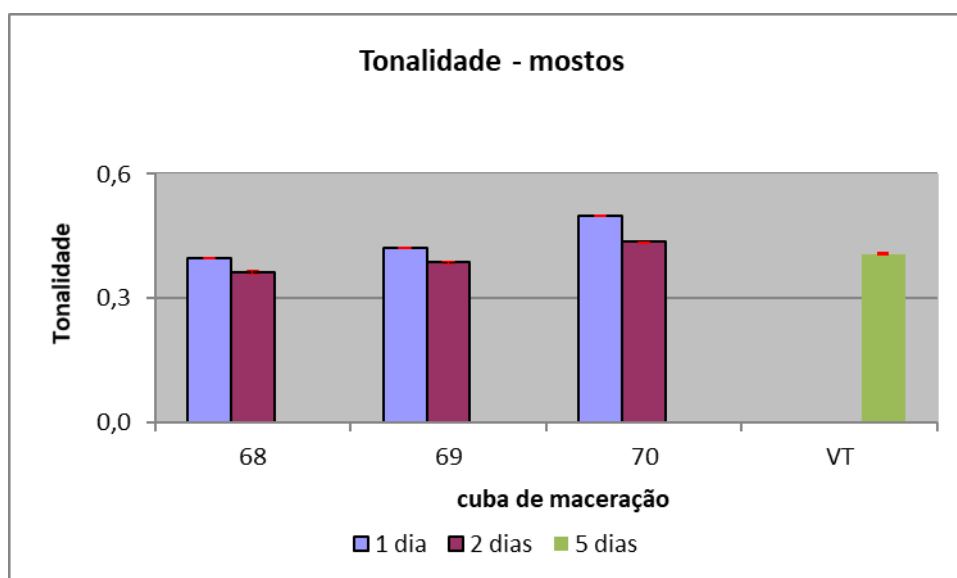


Figura 45 – Gráfico comparativo da tonalidade dos mostos /cuba

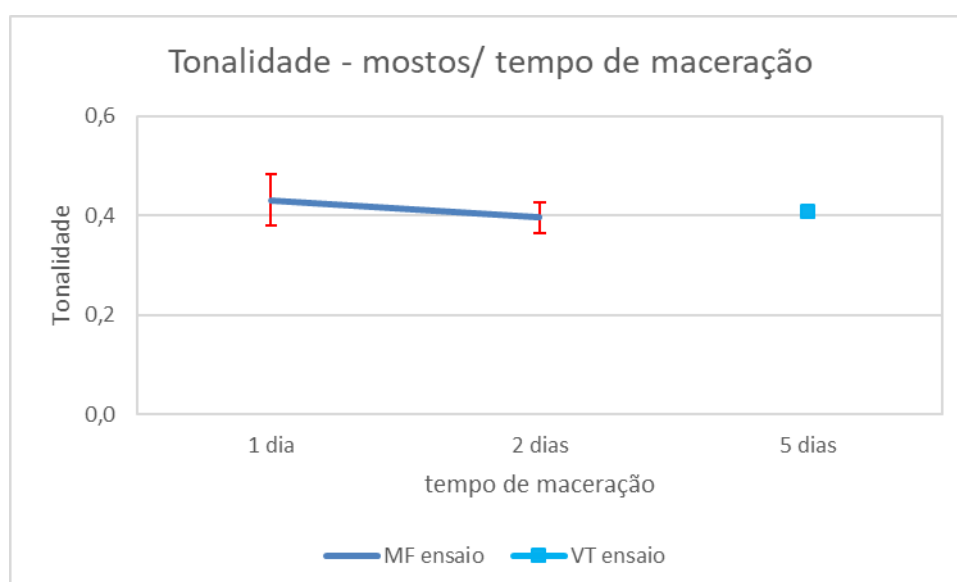


Figura 46 – Evolução média da tonalidade durante a maceração a frio

A variação da tonalidade está de acordo com o esperado, visto que o índice de cor vermelha aumenta, a tonalidade diminui ao longo do tempo de maceração. Surpreendente é a tonalidade ao fim de 2 dias de maceração a frio ser muito próxima da tonalidade do mosto de VT, ao fim de 5 dias – Figuras 45 e 46.

Realizou-se a análise espectrofotométrica dos 7 mostos de modo a apresentar o resultado no sistema CIELab. Os dados estão apresentados na tabela 10 e representados na Figuras 47.

Tabela 10 - Parâmetros cromáticos no sistema CIELab para os mostos

	X	Y	Z	L*	a*	b*	C*	H°
68-1 dia	44,45	29,78	28,94	61,46	54,53	4,34	54,70	4,55
68-2 dias	28,17	15,61	11,77	46,46	64,39	11,96	65,49	10,52
69-1 dia	49,49	35,54	35,92	66,12	48,41	2,80	48,49	3,31
69-2 dias	28,30	15,89	11,73	46,83	63,30	12,71	64,57	11,35
70-1 dia	10,09	4,66	0,90	25,73	57,07	31,29	65,09	28,74
70-2 dias	45,14	32,36	30,73	63,63	47,17	5,47	47,48	6,61
VT- mosto	26,19	14,60	10,60	45,08	62,34	12,88	63,66	11,67

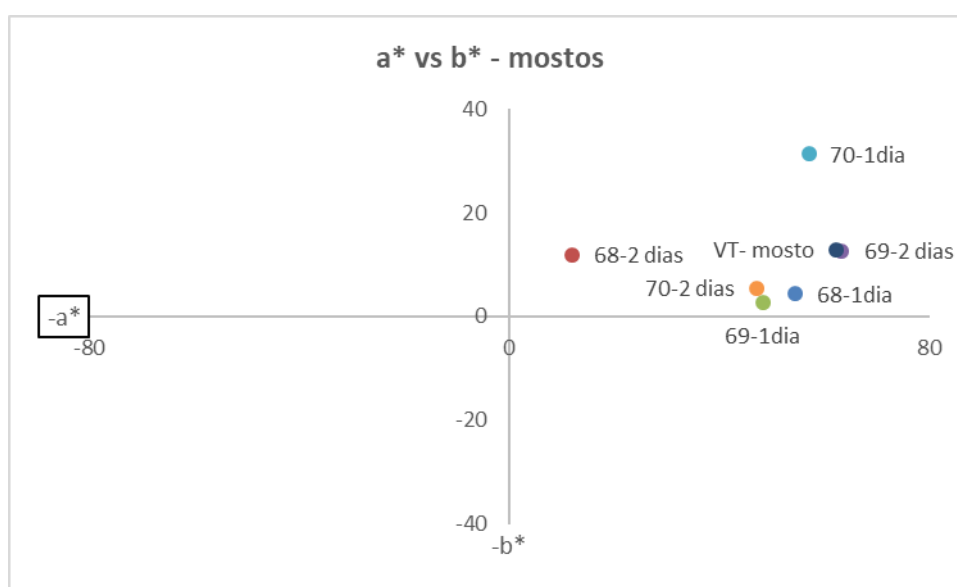


Figura 47 - Gráfico comparativo da cor dos mostos no sistema CIELab. (a*vs b*)

A análise da Figura 47 leva-nos a concluir que a cor é muito semelhante entre todas as amostras, tendo-se conseguido atingir igual relação amarelo/vermelho ao fim de 2 dias de maceração pré-fermentativa a frio, para a cuba 69, que a de VT ao fim de 5 dias de maceração pelicular fermentativa, mostrando, mais uma vez, a variabilidade entre as cubas.

A variabilidade é mais notória se analisarmos a cuba 70, que no fim do 2º dia de maceração atingiu a mesma relação a^* vs b^* que as cubas 68 e 69 ao fim do 1º dia.

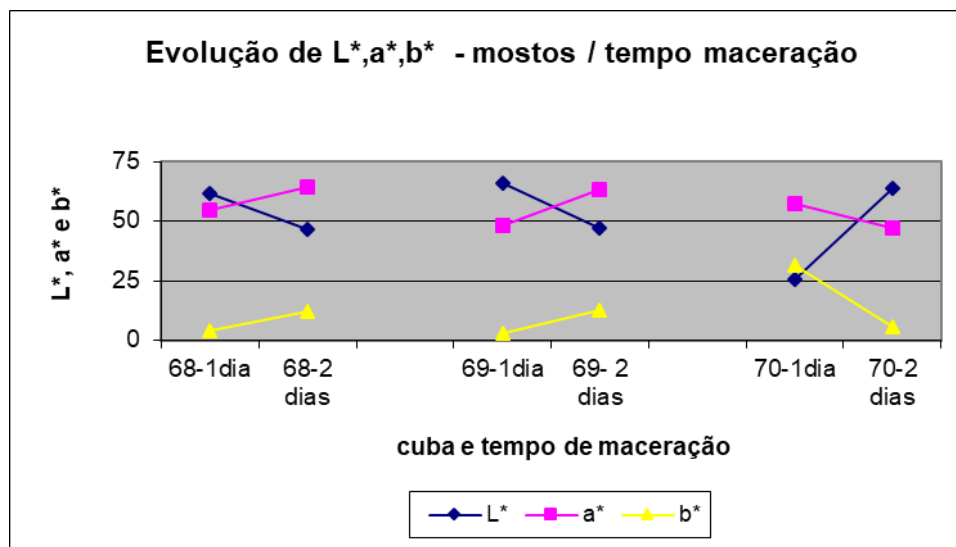


Figura 48 - Gráfico da evolução de cor dos mostos no sistema CIELab. ($L^*a^*b^*$) por tempo de maceração para cada uma das cubas de maceração a frio

Confirma-se a relação do índice de cor vermelha e da luminosidade, L^* , com o tempo de maceração, mas só para as cubas 68 e 69, visto que no caso da cuba 70, o comportamento é exactamente ao contrário. Tal pode explicar-se pelo facto de no caso da cuba 70, e apesar do ICV ter aumentado com o tempo de maceração, como o mostra a Figura 44 tal não ser devido ao aumento de pigmentos vermelhos, mas sim da diminuição significativa do teor de pigmentos amarelos que são o único factor favorável, pois o teor de pigmentos vermelhos diminui e a luminosidade aumenta, isto é, a densidade de cor é menor – Figura 48.

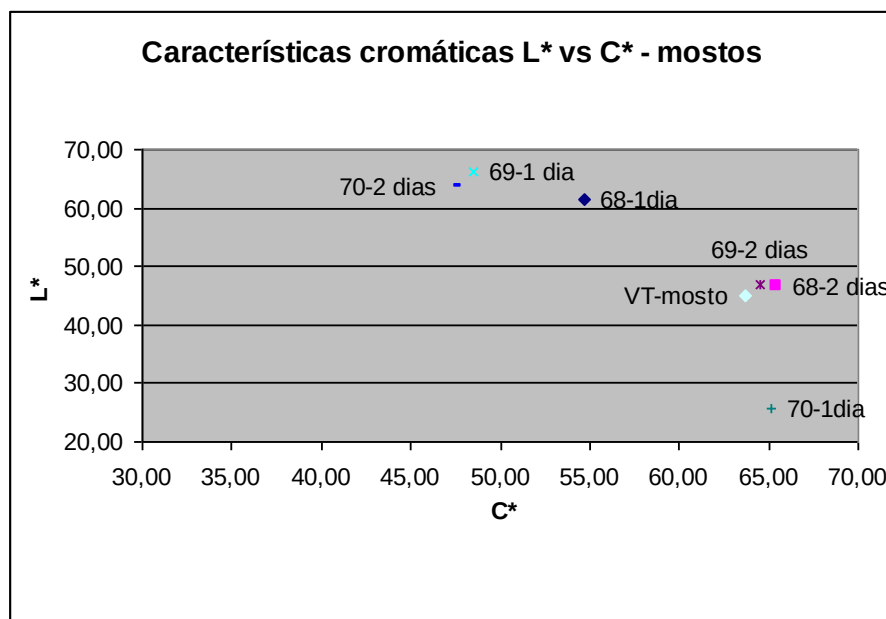


Figura 49 - Gráfico comparativo da cor dos mostos nas coordenadas L* vs C*

A luminosidade vai diminuindo ao longo da maceração, prova do aumento de extração dos compostos fenólicos, tendo-se atingido a mesma cromaticidade que o mosto de VT e só com 2 dias de maceração pré-fermentativa a frio. O comportamento diferenciado da cuba 70 é também notado na Figura 49, L* vs C*.

A evolução cromática em cada cuba, ao longo da maceração a frio, está representada nas Figuras 50, 51 e 52.

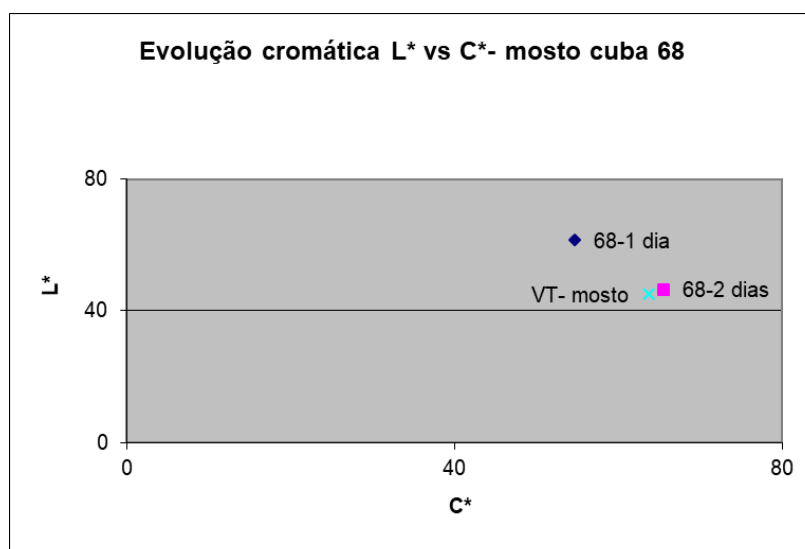


Figura 50 - Evolução cromática do mosto na cuba 68

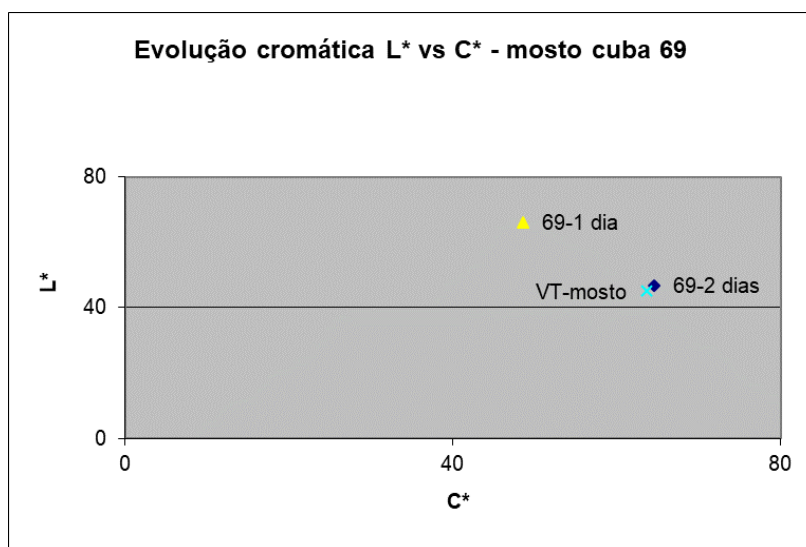


Figura 51 – Evolução cromática do mosto na cuba 69

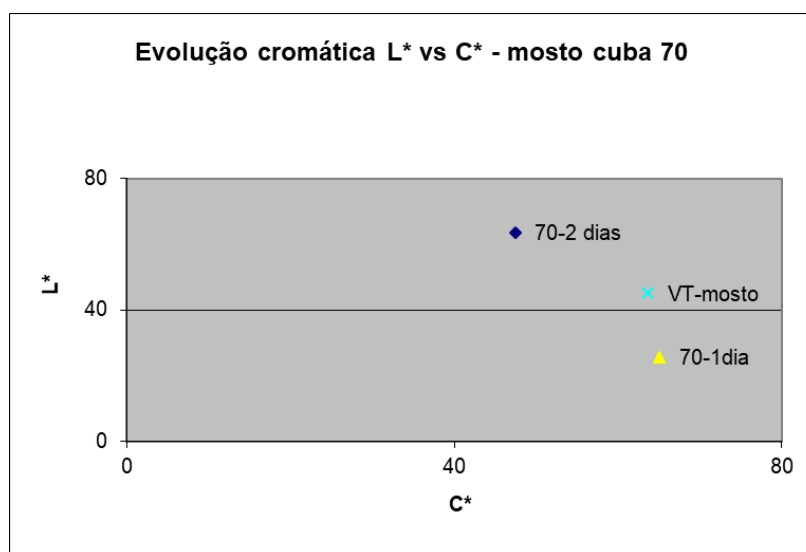


Figura 52 – Evolução cromática do mosto na cuba 70

Pela análise das Figuras 50, 51 e 52 confirmamos que a cor do mosto das cubas 68 e 69 têm uma evolução semelhante durante a maceração a frio e comparável ao Vinhão. A evolução do mosto da cuba 70 é completamente diferente, sem razão aparente. Durante a maceração a frio o mosto vai ficando saturado em polifenóis /antocianinas, o C* aumenta e o L* diminui pois a densidade corante aumenta. Tal evolução é expectável.

A evolução cromática em L^* vs C^* mostra que no fim da maceração a frio a cor obtida é muito próxima da obtida no Vinhão tradicional (VT) no fim da fermentação alcoólica (FA), nas cubas 68 e 69, mas não na cuba 70. Nesta, a luminosidade é muito superior e a cromaticidade obtida é quase igual à cromaticidade das outras cubas no fim de 1 dia de maceração.

2.2.3. Constituição antociânica dos mostos

1. Antocianinas livres e totais (método de bissulfito)

Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 53.

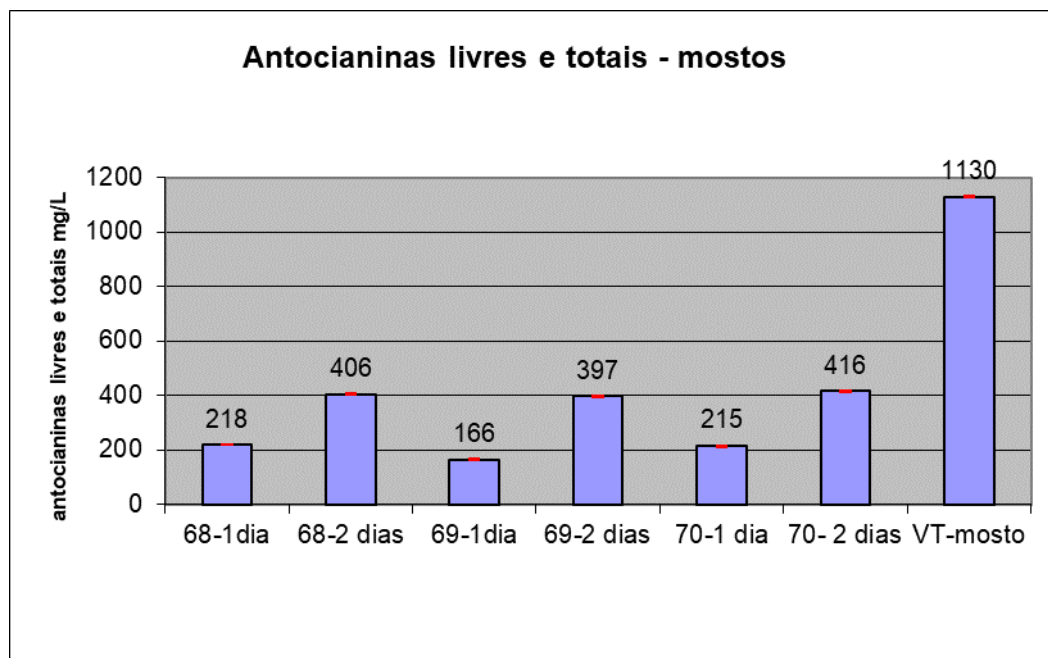


Figura 53 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais nos mostos

O valor de antocianinas vai aumentando com o decorrer da maceração a frio (MF) para todas as cubas, conforme Figura 53. O valor final obtido é muito aproximado entre as várias cubas, no entanto, muito inferior ao valor obtido para o VT, como seria de esperar, pois este estágio do VT teve a maceração pelicular com fermentação.

A comparação da evolução do teor de antocianinas nos mostos de Vinhão ao longo do tempo de maceração a frio e tradicional, com estudos realizados para a casta Tannat, está representada na Figura 54

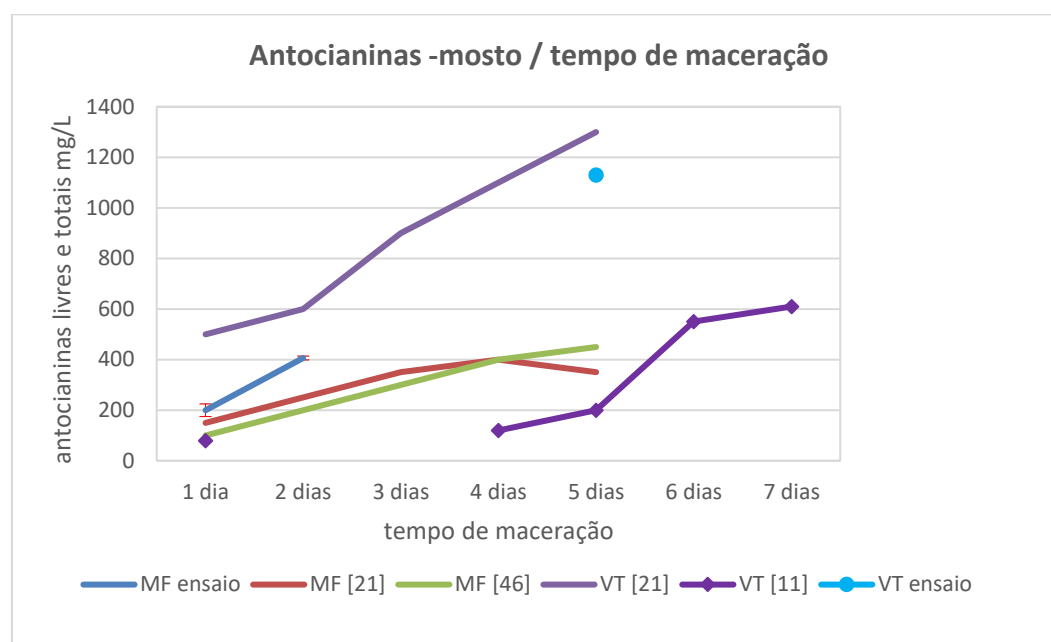


Figura 54– Evolução comparativa do teor de antocianinas nos mostos/ tempo de maceração com outros estudos

Pela análise da Figura 54 vemos que o resultado obtido para o ensaio se encontra entre os resultados obtidos para a casta Tannat em maceração a frio (5-15°C [21], 15°C [46]) e a maceração tradicional VT [21] [21,46].

O teor de antocianinas obtido para o mosto VT é muito superior ao valor obtido por Costa, para a casta Vinhão ao fim de 7 dias de maceração tradicional e 1 mês de conservação a -20°C (614 vs 1130 mg/L equivalente malvidina -3-glucósido). Talvez devido ao facto de a temperatura da FA se ter mantido a 20°C durante 6 dias, no ensaio reportado por Costa ao contrário deste ensaio em que, em média, a temperatura inicial foi de 22-25°C, permitindo uma maior extração de antocianinas, provando que a extração de antocianinas é dependente da temperatura, como referem alguns autores [11,23,33].

2 Quantificação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLP-DAD)

As antocianidinas-3-monoglucósido e respetivos ésteres acilados foram identificados com base no respetivo espectro UV-VIS e o tempo de retenção e o perfil obtido é concordante com os resultados obtidos por Dopico et al., 2008 a 500nm para as antocianinas de maior teor [72],

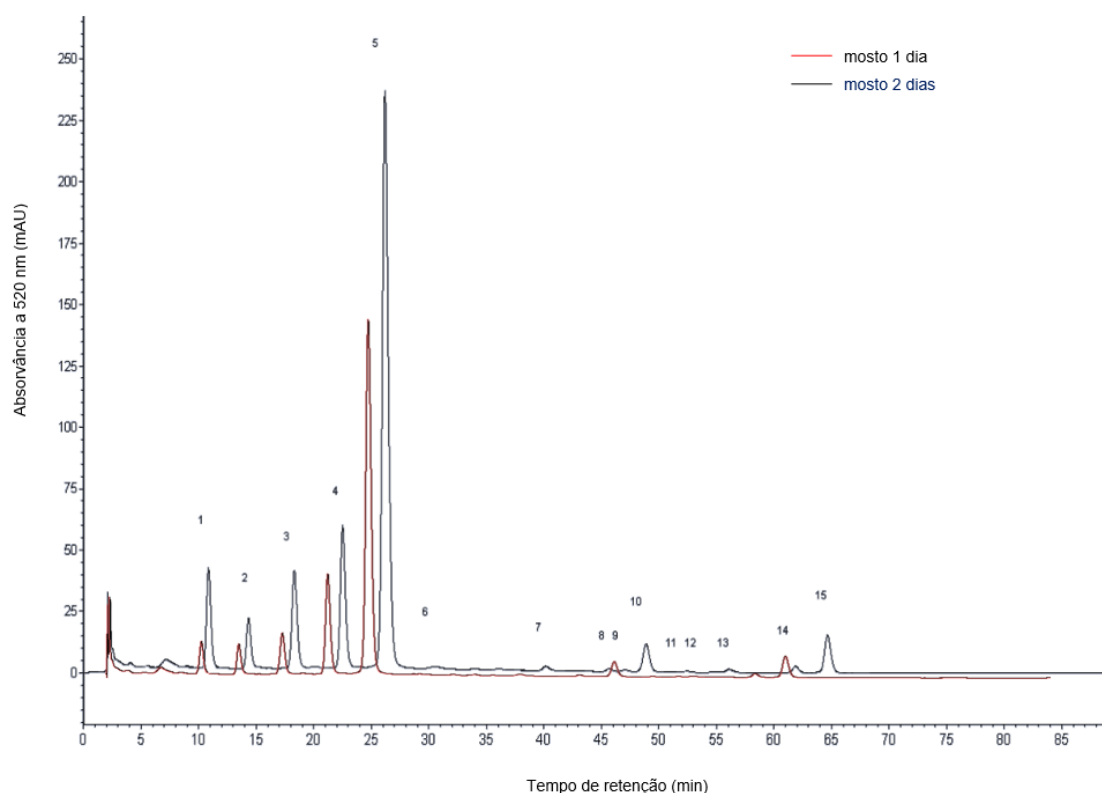


Figura 55 – Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes nos mostos

Legenda:

1: delphinidina 3-glucósido	6: delphinidina 3-acetilglucósido	11: cianidina 3-cumaroílglicosido
2: cianidina 3-glucósido	7: petunidina 3-acetilglucósido	12: peonidina 3-cafeoilglucósido
3: petunidina 3-glucósido	8: peonidina 3-acetilglucósido	13: petunidina 3-cumaroílglicosido
4: peonidina 3-glucósido	9: delphinidina 3-cumaroílglicosido	14: peonidina 3-cumaroílglicosido
5: malvidina 3-glucósido	10: malvidina 3-acetilglucósido	15: malvidina 3-cumaroílglicosido

mas só para o mosto de Vinhão tradicional, não para o mosto de MF, conforme se pode ver nas Figuras 55, 56 e 57: a antocianina de maior teor é a malvidina-3-glucósido para ambos os mostos, a que se segue a delphinidina-3-glucósido e a petunidina-3-glucósido para o mosto VT e a peonidina-3-glucósido seguida da petunidina-3-glucósido para o mosto MF.

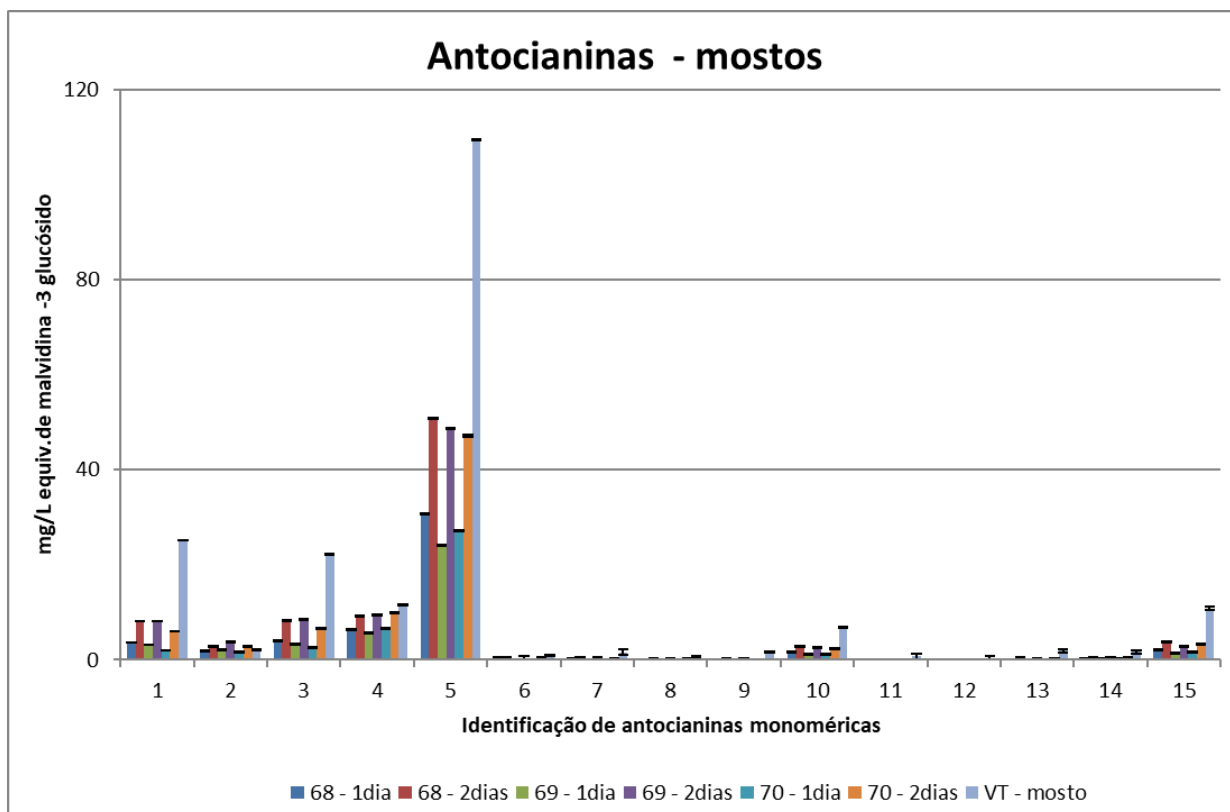


Figura 56 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos mostos Vinhão

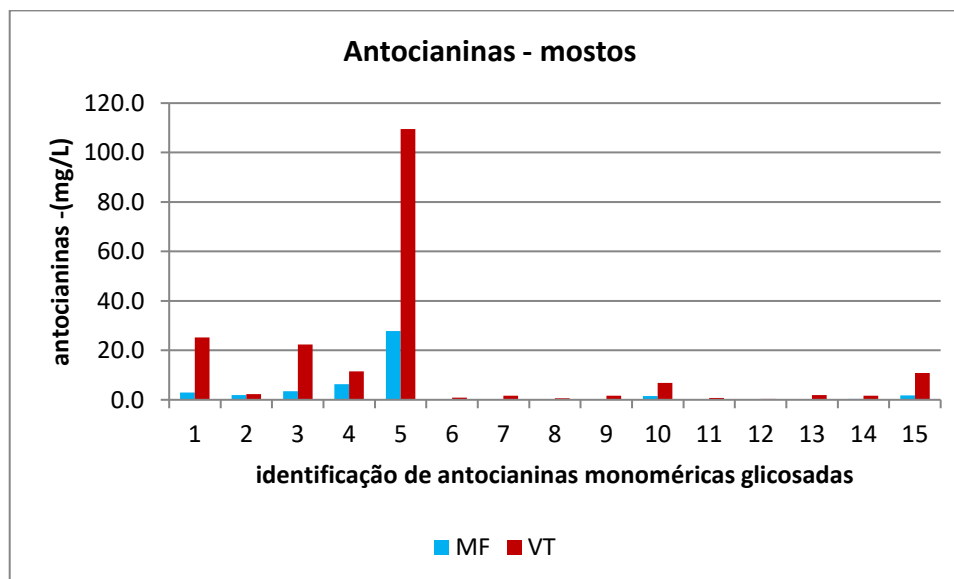


Figura 57 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos mostos Vinhão

Houve uma alteração do perfil antociânico resultante da maceração a frio.

Os resultados obtidos para cada cuba, representados na Figura 58 confirmam que existe aumento do teor de antocianinas durante a maceração a frio, em todas as cubas, que talvez possa ser explicado pelas diferentes solubilidades de cada uma.

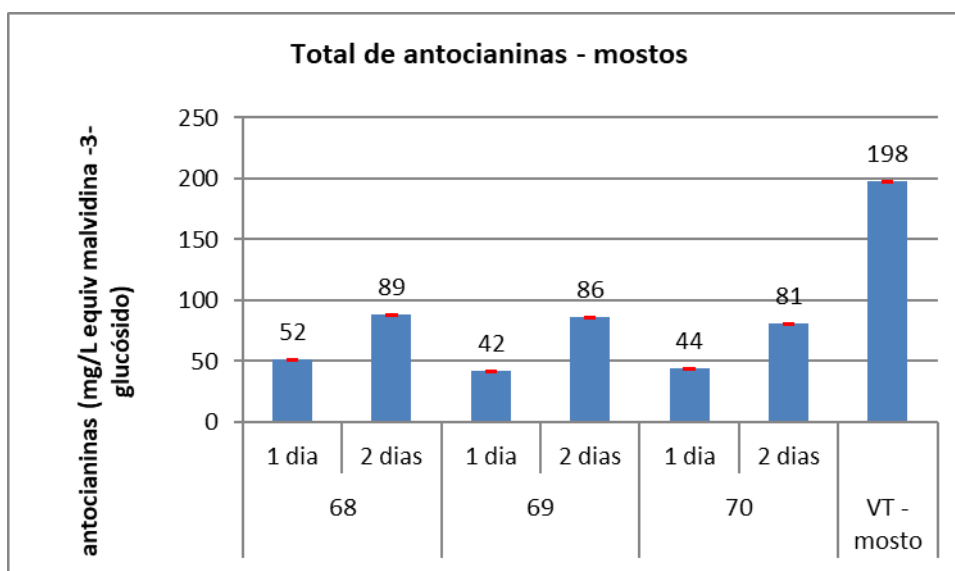


Figura 58 - Evolução do total de antocianinas / tempo de maceração em cada cuba

Numa análise geral, representada na Figura 59, confirma-se que existe aumento do teor de cada antocianina proporcional ao tempo de maceração e que existe diferença de perfil antociânico entre o MF e o VT.

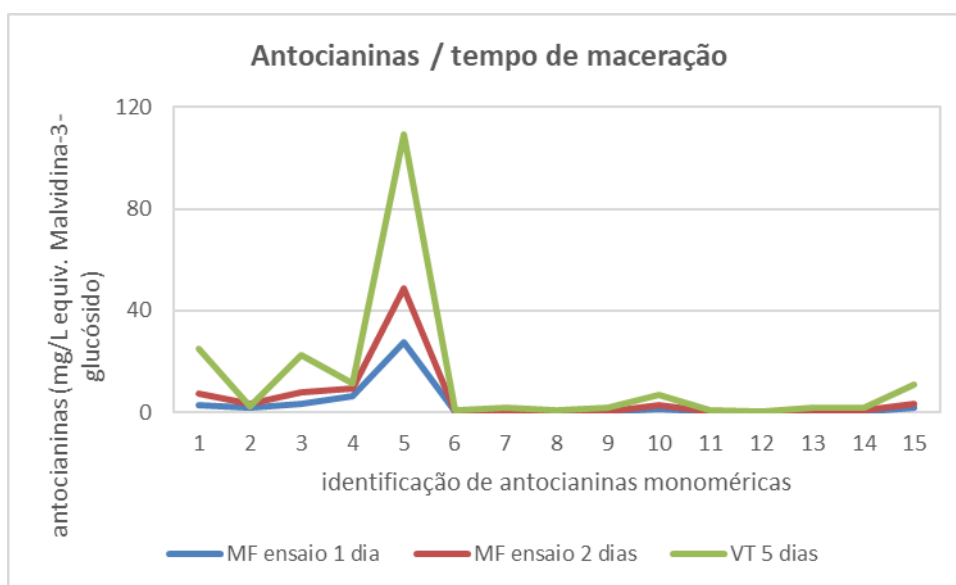


Figura 59 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos mostos Vinhão / tempo de maceração

Para melhor determinar a capacidade de extração considerou-se que o teor máximo de cada uma das antocianinas é o obtido para o mosto VT. A variação da extração ao longo do tempo, apesar de tão curto, foi harmoniosa e homogénea como se pode ver na Figura 59 e 60.

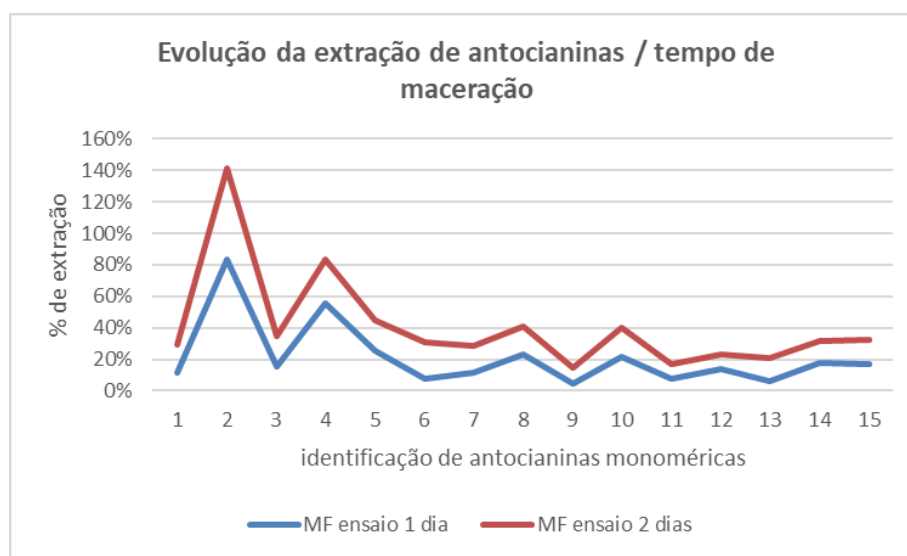


Figura 60 – Evolução da extração das antocianinas monoméricas glicosadas

Tendo em conta a extração ter sido harmoniosa e homogénea ao longo deste curto período de tempo, poderemos pensar que só atingiremos o mesmo perfil que o VT, logo igual às uvas, se pudermos ter maior período de maceração.... Tal teoria é comprovada no estudo de Gómez-Miguez em 2007 para a casta Syrah com maceração a frio a 15°C, durante 7 dias [24]. Como é visível na Figura 61, a grande maioria das antocianinas só atinge o seu máximo de extração, após 3 dias de maceração.

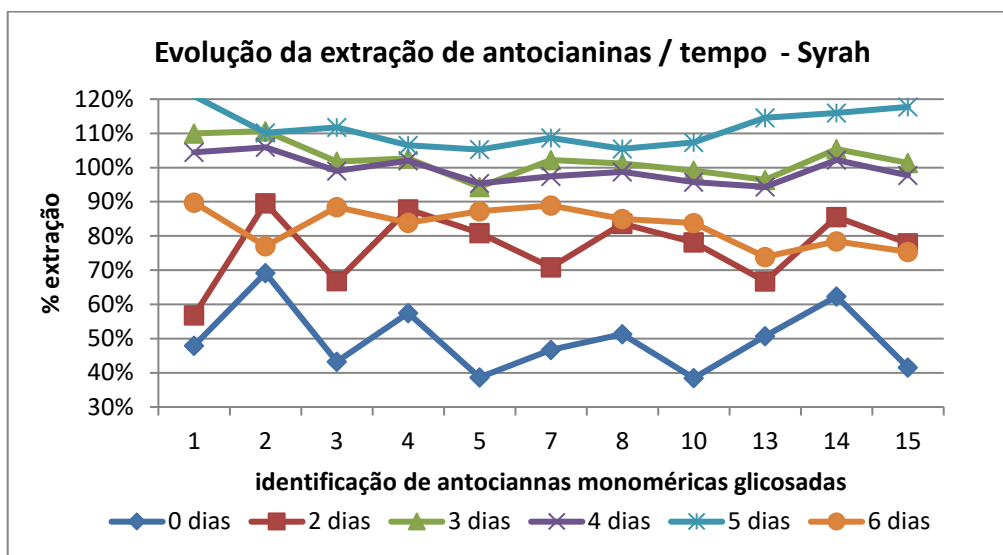


Figura 61 – Evolução da extração das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas

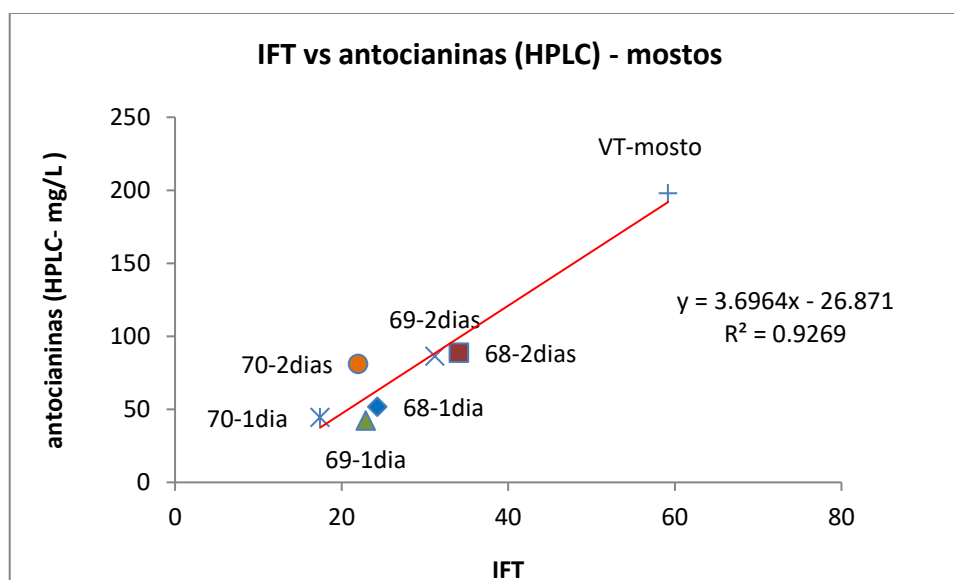


Figura 62 – Correlação entre o IFT e o teor de antocianinas (HPLC)

Segundo Aleixandre-Tudo em 2018 existe uma correlação forte entre o IFT e o teor de antocianinas [55]. Tal é válido para a análise de antocianinas realizada por HPLC ($R^2=0,93$, $p< 0,05$) e pelo método de bissulfito ($R^2=0,90$, $p< 0,05$), como se pode ver nas Figuras 62 e 63. Mostra assim que qualquer um dos métodos é válido e que nesta fase, as antocianinas são o principal elemento responsável pela cor.

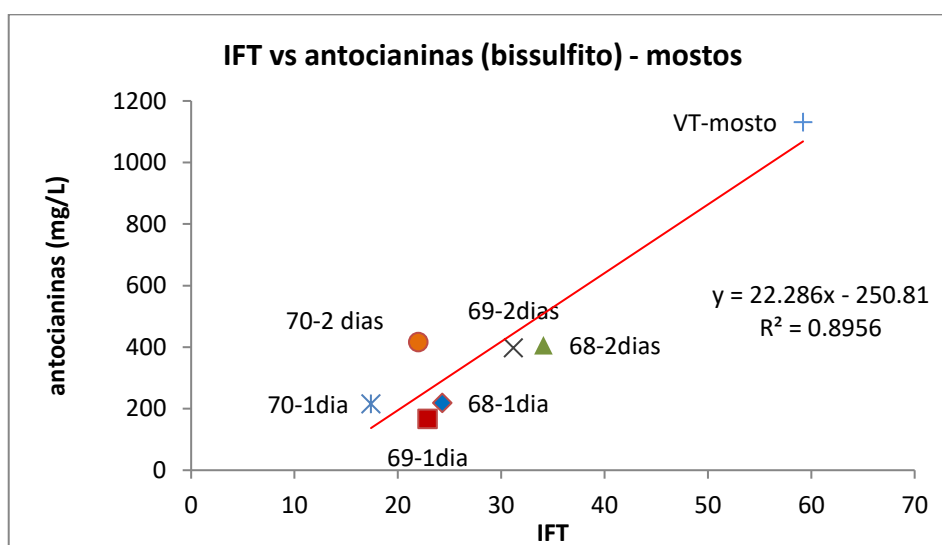


Figura 63 – Correlação entre o IFT e o teor de antocianinas (método bissulfito)

Comparativamente ao método de bissulfito, os teores obtidos pelo HPLC são bastante inferiores mas a proporção é semelhante, isto é, no 2º dia de maceração temos praticamente o dobro do existente no 1º dia e o mosto do VT tem praticamente o triplo do 2º dia de maceração a frio, como se pode confirmar nas Figura 62 e 63.

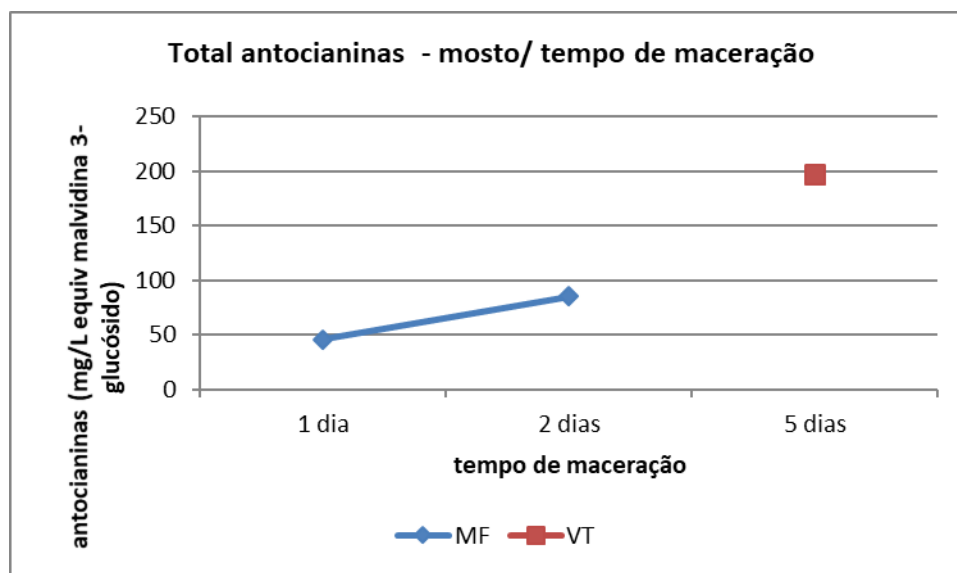


Figura 64 - Evolução do total de antocianinas / tempo de maceração

Na Figura 64 confirma-se, mais uma vez, que o tempo é um parâmetro importante da maceração na extração de antocianinas [23].

2.2.4. Doseamento global de taninos

1. Taninos proantociânicos totais

Não se realizou este ensaio para os mostos devido ao elevado teor em açúcar dos mesmos, produzirem substâncias secundárias durante o aquecimento que afetam a leitura a 520nm tornando os resultados inconclusivos.

2. Índice de diálise

Realizou-se este ensaio para os 7 mostos e os resultados encontram-se na tabela 10 e representada nas Figuras 65 e 66.

Tabela 11 - Resultados do Índice de diálise para os mostos (média $\pm$ desvio padrão)

Índice de diálise	Cuba 68	Cuba 69	Cuba 70	VT-1
1 dia	2.72 $\pm$ 0.05	2.65 $\pm$ 0.04	2.86 $\pm$ 0.05	
2 dias	2.65 $\pm$ 0.08	2.54 $\pm$ 0.02	2.66 $\pm$ 0.04	
5 dias				2.25 $\pm$ 0.02

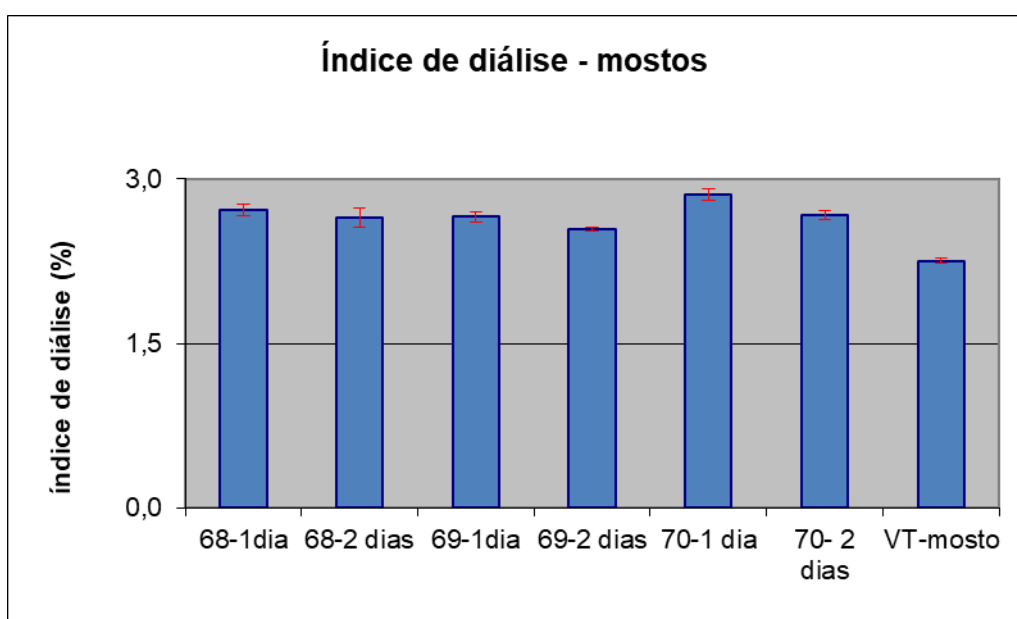


Figura 65 – Representação gráfica do índice de diálise dos mostos

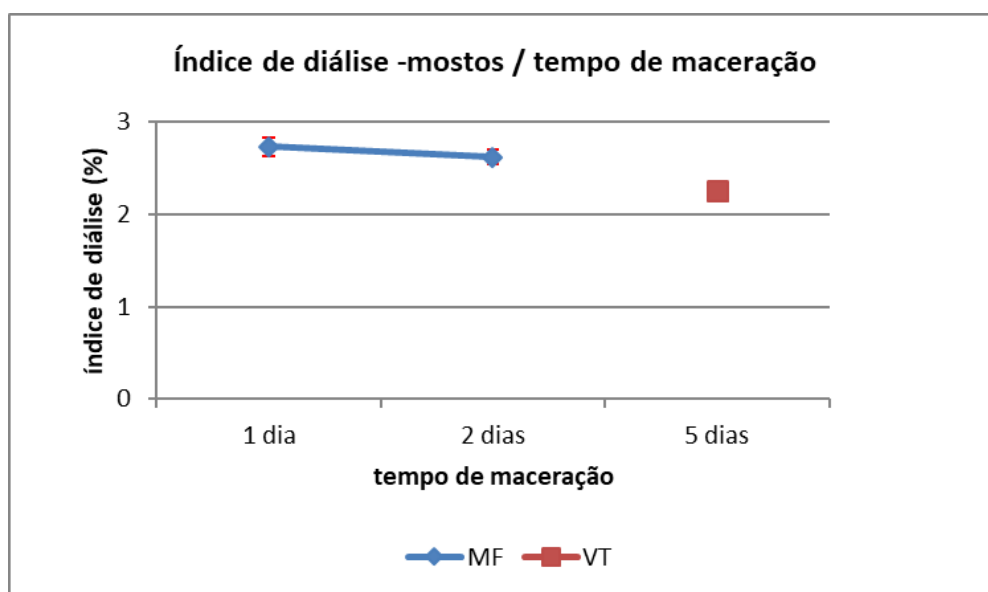


Figura 66 - Evolução do índice de diálise dos mostos / tempo de maceração

A percentagem de taninos condensados é da mesma ordem de grandeza para todos os mostos, independentemente da maceração ser a frio ou não e de ter ou não fermentação pelicular, pois o valor do índice de diálise do mosto do Vinhão tradicional tem a mesma ordem de grandeza da maceração a frio e não há diferenças entre as várias cubas.

Este resultado é o esperado para a MF, tendo em conta o pouco tempo de maceração e a baixa temperatura: só houve extração de compostos fenólicos de pouca complexidade e não houve condições para reações de co-pigmentação, associação ou outras ligações, no entanto, o índice de diálise do mosto de VT deveria ser superior, devido ao maior período de tempo de maceração e a temperatura superior, mas não o é.

3. Poder tanante

O índice do poder tanante mede a reatividade dos taninos na presença da proteína albumina de soro bovina (BSA). Este índice é proporcional à quantidade de taninos que reagem com a proteína. Realizou-se este ensaio para os 7 mostos e os resultados encontram-se na tabela 11 e estão representados nas Figuras 67 e 68.

Tabela 12- Resultados do poder tanante para os mostos

Poder tanante	Cuba 68	Cuba 69	Cuba 70	VT
1 dia	101 ± 8	79 ± 2	91 ± 5	
2 dias	129 ± 5	113 ± 9	151 ± 5	
5 dias				235 ± 8

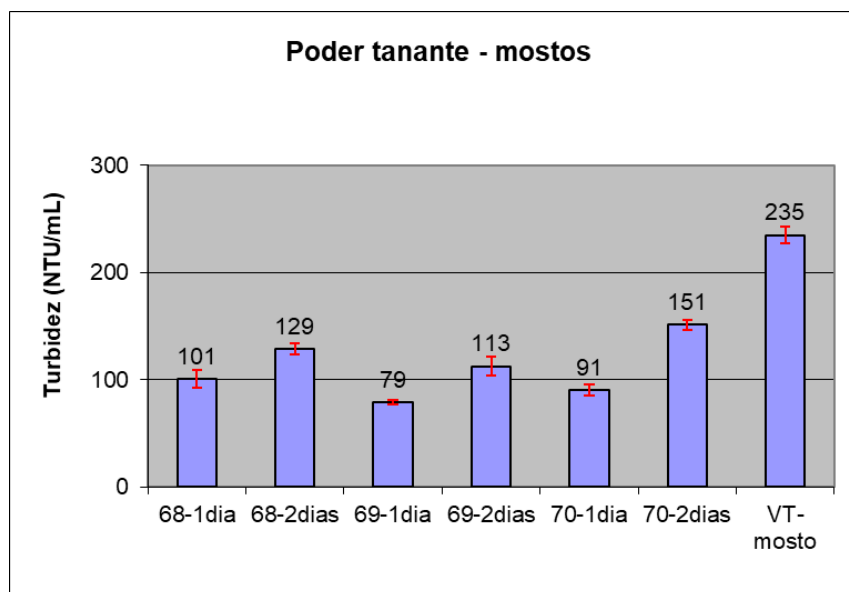


Figura 67 – Representação gráfica do poder tanante dos mostos

Conforme esperado, o teor de compostos fenólicos aumenta com o tempo de maceração para todas as cubas, sendo máximo para a vinificação tradicional devido ao facto de esta amostra, ser de mosto com 5 dias de maceração pelicular fermentativa como é visível nas Figuras 67 e 68.

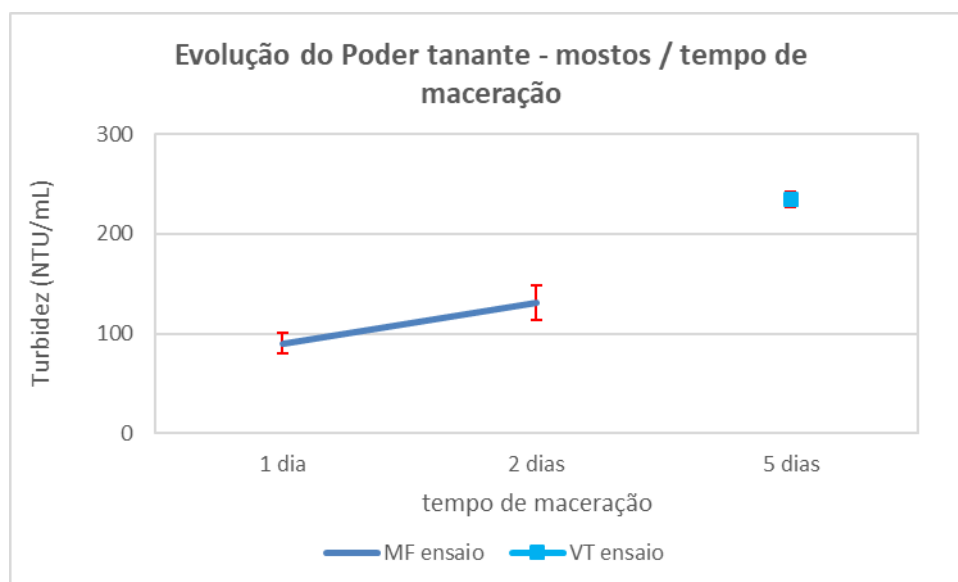


Figura 68 - Evolução do poder tanante dos mostos /tempo de maceração

Segundo Bouin em 2000, a vinificação tradicional permite máxima extração de compostos fenólicos e em particular de taninos e favorece os fenómenos de polimerização e de associações covalentes entre os compostos fenólicos e as antocianinas com a formação de estruturas maiores e mais complexas [77,81]. Para provar tal teoria, o poder tanante e o IFT deverão estar correlacionados. A relação entre estes dois índices é bastante forte ($R^2=0.77$ e $p<0,05$) e encontra-se representada na Figura 69.

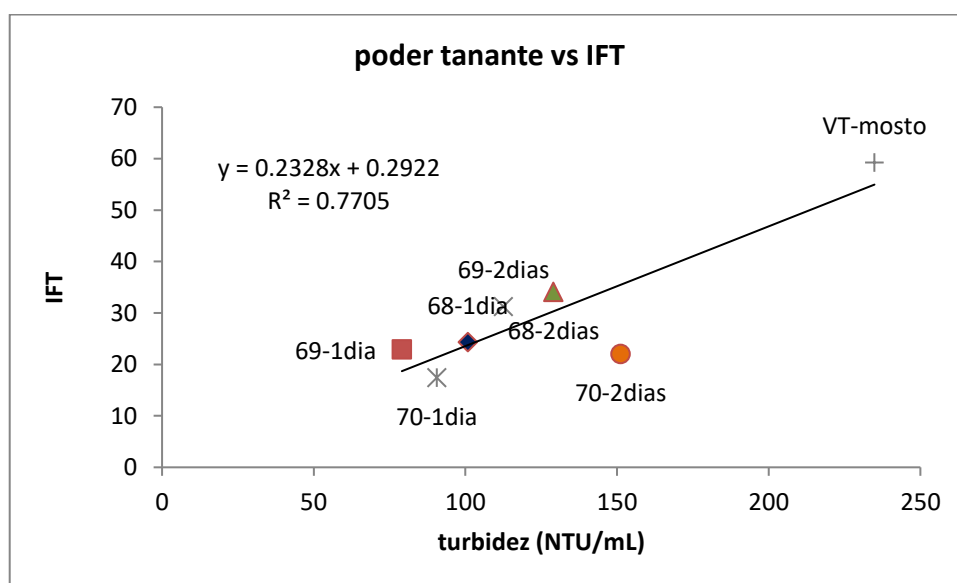


Figura 69 – Correlação entre o poder tanante e o IFT

Tal raciocínio explica também a correlação bastante forte ($R^2=0.71$ e $p<0,05$) entre o poder tanante e o índice de diálise que encontramos nos resultados obtidos, expectável, segundo vários autores [11,55,77]. Essa relação está representada na Figura 70.

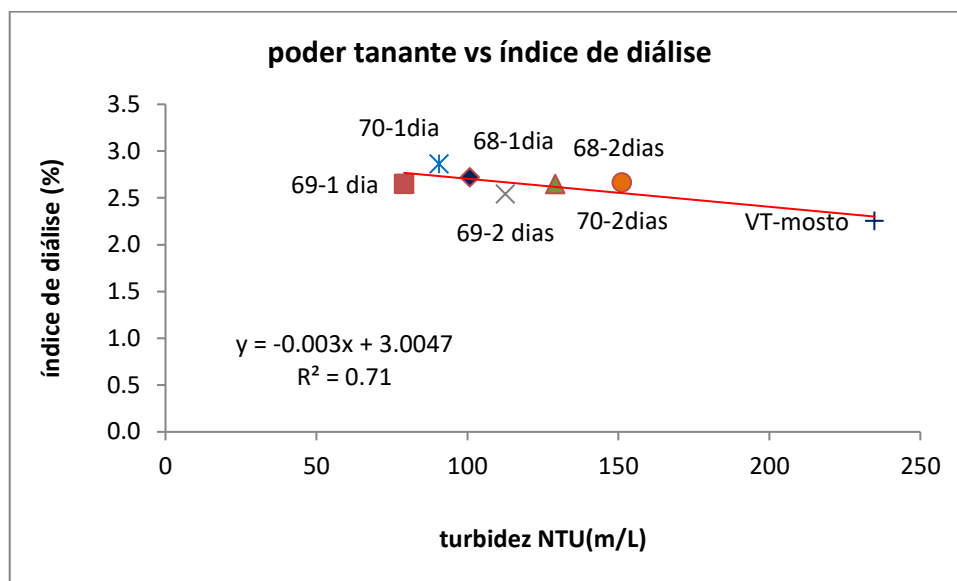


Figura 70 – Correlação entre o poder tanante e o índice de diálise

Pela análise da Figura 70, apesar da correlação, pode-se considerar que não existe relação entre o índice de diálise e o poder tanante, pois para o mesmo índice de diálise ID=2.65, obtivemos 2 valores de poder tanante (PT=79 e PT=129). Assim, o poder tanante não está relacionado com o índice de diálise, nesta fase do ensaio. Além disso, por tudo o anteriormente referido é esperado que o índice de diálise seja superior no mosto de VT relativamente aos mostos de maceração a frio, mas não o é.

Algumas razões podem ser delineadas:

- apesar da quantidade de taninos e antocianinas extraídos durante a maceração pelicular fermentativa, não houve condições para a polimerização e a formação de taninos condensados e estruturas complexas, logo, o VT tem poucos taninos complexos (ID baixo) mas tem muitas estruturas pequenas e intermédias;

- houve condições, nomeadamente mais tempo a temperatura mais elevada, (se se comparar com a maceração a frio) para a formação de estruturas complexas, mas estas apresentam menos flexibilidade, e por sua vez, mais dificuldade em se ligar à BSA, embora sejam capazes de estabelecer algumas ligações [77];

- houve formação de taninos complexos que precipitaram e só existem em solução as estruturas pequenas e intermédias;

- existe mistura de taninos de vários tamanhos e existe um factor sinérgico que não devemos descurar: o tanino maior liga-se à proteína e permite que os pequenos ocupem pontos de ligação desocupados ou a ligação do tanino

complexo leva a uma nova configuração da proteína que expõe pontos de ligação a que os pequenos se podem ligar fracamente [79];

- os mostos foram previamente filtrados com filtros Chromafil Xtra Pet de 0.45 micron e o mosto do VT foi o mais prejudicado.

Tendo em conta que o IFT inclui todos os compostos fenólicos, isto é, corados e não corados, antocianinas e taninos entre os seus grupos principais, é de esperar que se existe correlação do poder tanante com o IFT e deveria haver com o índice de diálise, poderá existir correlação com o teor de antocianinas. Tal relação mostrou ser forte ($R^2=0.93$, $p<0,05$ e $R^2=0,95$ e $p<0,05$) para os 2 métodos de determinação das antocianinas (HPLC e bissulfito) respetivamente e está representada nas Figuras 71 e 72.

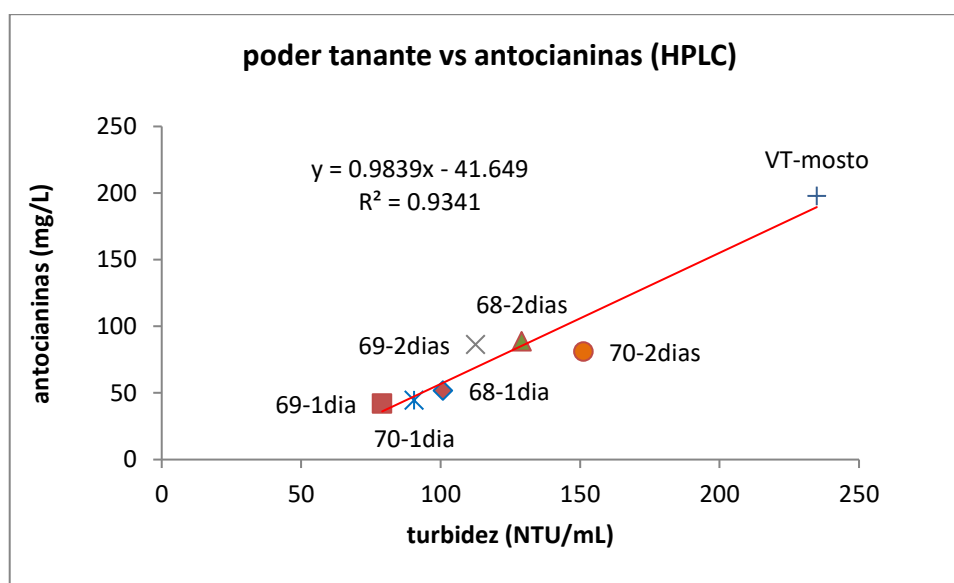


Figura 71 – Correlação entre o poder tanante e o total de antocianinas (HPLC)

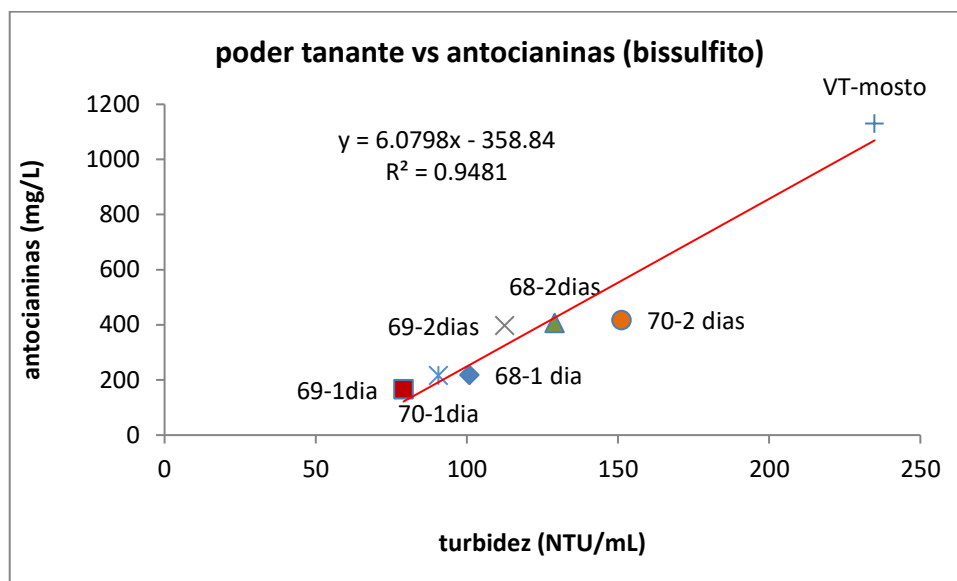


Figura 72 – Correlação entre o poder tanante e o total de antocianinas (bissulfito)

Relações semelhantes foram encontradas por Aleixandre-Tudo, 2018 quando da compilação de dados de 130 amostras de uvas de várias cultivares na África do Sul: proporcionalidade linear entre precipitado de taninos usando metil celulose (MCP taninos) vs teor de antocianinas determinado por HPLC e este vs IFT [55], que já confirmamos nas Figuras 62 e 63.

2.3. Análise sensorial

Não foi realizada análise sensorial aos mostos em questão.

3. Os vinhos

3.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no laboratório da CVRVV.

Os resultados nos vários parâmetros para os vinhos em garrafão estão registados na tabela 12.

Tabela 13 – Resultados das análises físico-químicas dos vinhos em garrafão na forma de média $\pm$ incerteza

Parâmetros / unidades			68 G	69 G	70 G	MF G
Acidez fixa tartárico)	g/L (ácido		5,7 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,3
Acidez total tartárico)	g/L(ácido		6,1 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,3
Acidez volátil acético)	g/L (ácido		0,32 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,06
Ácido L- málico	g/L		< 0,3 (LQ)	< 0,3 (LQ)	< 0,3 (LQ)	< 0,3 (LQ)
Ácido tartárico	g/L		3,2	2,8	2,9	3,2
Açúcares totais	g/L		< 1,5 (LQ)	< 1,5 (LQ)	< 1,5 (LQ)	< 1,5 (LQ)
Dióxido de enxofre livre	mg/L		< 8 (LQ)	< 8 (LQ)	< 8 (LQ)	< 8 (LQ)
Dióxido de enxofre total	mg/L		17 $\pm$ 10	15 $\pm$ 10	20 $\pm$ 10	22 $\pm$ 10
Extrato não redutor	g/L		22,7 $\pm$ 2,7	20,9 $\pm$ 2,5	24,6 $\pm$ 2,9	22,0 $\pm$ 2,6
Extracto seco total	g/L		24,2 $\pm$ 1,3	22,4 $\pm$ 1,2	26,1 $\pm$ 1,4	23,5 $\pm$ 1,2
Massa volúmica	g/mL		0,9928 $\pm$ 0,0009	0,9916 $\pm$ 0,0009	0,9929 $\pm$ 0,0009	0,9923 $\pm$ 0,0009
pH			3,52 $\pm$ 0,07	3,50 $\pm$ 0,07	3,56 $\pm$ 0,07	3,59 $\pm$ 0,07
Título alcoométrico adquirido % vol	volúmico		11,1 $\pm$ 0,2	11,6 $\pm$ 0,2	11,6 $\pm$ 0,2	11,3 $\pm$ 0,2
Título alcoométrico volúmico total % vol			11,2 $\pm$ 0,2	11,7 $\pm$ 0,3	11,7 $\pm$ 0,3	11,4 $\pm$ 0,3

Mais uma vez, os resultados relativos à maceração a frio, ocorrida nas cubas 68 e 69 são muito semelhantes entre si e significativamente diferentes da maceração ocorrida na cuba 70. Nesta última, o valor de acidez volátil é cerca de 60% superior ao das anteriores e cerca de 25% mais elevado que o do ensaio em garrafão, mostrando a variabilidade no ensaio.

Se se considerar que a vinificação realizada em garrafões é um processo de vinificação composto por maceração pré-fermentativa a frio e vinificação a 23-25°C, podemos considerar o vinho dos garrafões como tendo um processo de vinificação igual ao vinho MF mas a temperatura superior. Deste modo, serão consideradas as médias $\pm$ desvio padrão das médias, dos resultados obtidos nas análises aos vinhos dos garrafões para cada

parâmetro de análise. O vinho passa a ser designado por MFG ou MFG média. O resultado encontra-se na Tabela 13, conjuntamente com os resultados obtidos para o vinho MF e VT.

Tabela 14 – Resultados das análises físico-químicas dos vinhos
(média $\pm$ desvio padrão para MFG e média $\pm$ incerteza para MF e VT)

Parâmetros / unidades		MF G média	MF	VT
Acidez fixa	g/L (ácido tartárico)	5,5 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,4
Acidez total	g/L(ácido tartárico)	6,0 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,4
Acidez volátil	g/L (ácido acético)	0,4 $\pm$ 0,1	0,24 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,06
Ácido L- málico	g/L	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Ácido tartárico	g/L	3,0	2,3	4,2
Açúcares totais	g/L	< 1,5	< 1,5	< 1,5
Dióxido de enxofre livre	mg/L	< 8	< 8	< 8
Dióxido de enxofre total	mg/L	18 $\pm$ 3	16 $\pm$ 10	17 $\pm$ 10
Extrato não redutor	g/L	22,6 $\pm$ 1,6	20,7 $\pm$ 2,5	28,7 $\pm$ 3,4
Extracto seco total	g/L	24,1 $\pm$ 1,6	22,2 $\pm$ 1,2	30,2 $\pm$ 1,6
Massa volúmica	g/mL	0,9924	0,9911	0,9946
		$\pm$ 0,0006	$\pm$ 0,0009	$\pm$ 0,0009
pH		3,54 $\pm$ 0,04	3,44 $\pm$ 0,07	3,55 $\pm$ 0,07
Título alcoométrico volúmico adquirido % vol		11,4 $\pm$ 0,2	11,9 $\pm$ 0,2	11,6 $\pm$ 0,2
Título alcoométrico volúmico total % vol		11,5 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 0,3	11,7 $\pm$ 0,3

Pela análise dos dados da Tabela 14, vemos que:

- a média dos resultados das análises físico-químicas aos garrações encontra-se entre os resultados do vinho MF e do VT exceto grau alcoólico (11,5 vs 12 vs 11,7 % vol) e acidez volátil (0,4, vs 0,24 vs 0,39 g/L (ácido acético));
- a acidez volátil (AV) é superior para os ensaios realizados a temperaturas mais elevada (MFG e VT);
- os valores de pH e de acidez total para o vinho de VT são comparáveis aos resultados obtidos por Araújo,2004 para a mesma sub-região do Lima (pH=3,45 e acidez total=8) [73], a acidez volátil é metade (AV= 0,39 vs AV=0,78) e o título alcoométrico volúmico é superior (TAV= 11,7 % vs TAV=9,2%).
- o ácido tartárico é o ácido mais abundante da uva e é o mais importante ácido dos vinhos - pelos teores em que se encontra e pelas suas características químicas e organoléticas; é o ácido orgânico presente mais forte e mais dissociado ($pK_1(25^\circ C)=3.12$),

comandando decisivamente os valores da acidez fixa e do pH, como se confirma na Figura 73.

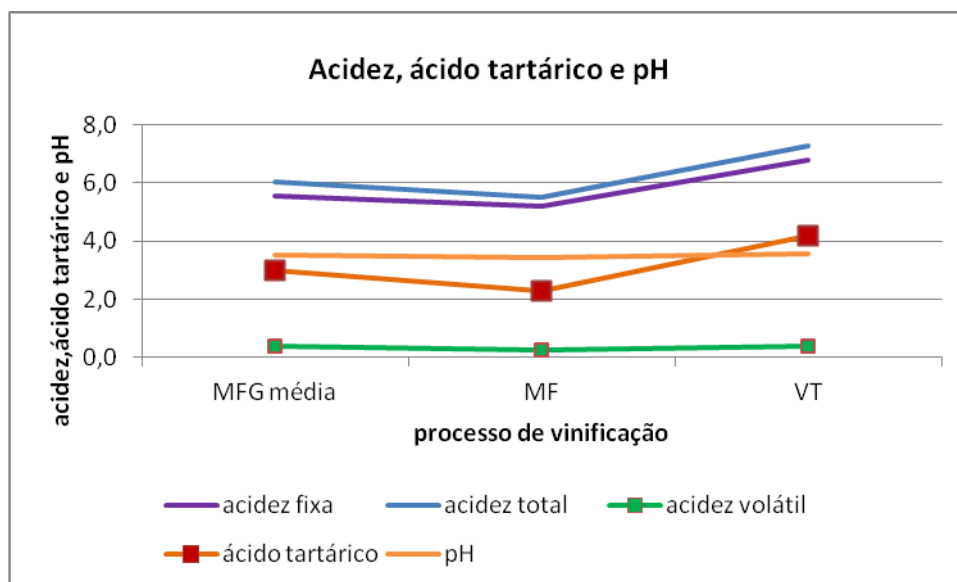


Figura 73 – Gráfico comparativo de acidez, ácido tartárico e pH para os 3 tipos de vinificação

A acidez fixa e o teor de ácido tartárico são inferiores para os ensaios de maceração a frio quando comparados com o processo tradicional, mesmo não havendo praticamente alteração no pH. O teor alcoólico dos vinhos é muito semelhante, o que prova que há aproveitamento praticamente igual dos açúcares das uvas nos processos de vinificação.

3.2. Análise de cor

3.2.1. Determinação de polifenóis totais

Para a determinação de polifenóis totais usa-se vulgarmente o índice de fenóis totais. Os resultados obtidos para as amostras estão representados na Figura 74.

O IFT para os vinhos dos processos de vinificação com maceração a frio (MF) é inferior ao IFT do vinho no processo tradicional, em cerca de 60%, conforme representado na Figura 74. O resultado obtido de IFT para o vinho de VT é da mesma ordem de grandeza que o resultado obtido por Fernandes em 2009 e Araújo, 2015 para vinho tradicional de Touriga Nacional (TN) ($IFT_{TN}=59$ e $IFT_{TN}=70$) respetivamente [17,69].

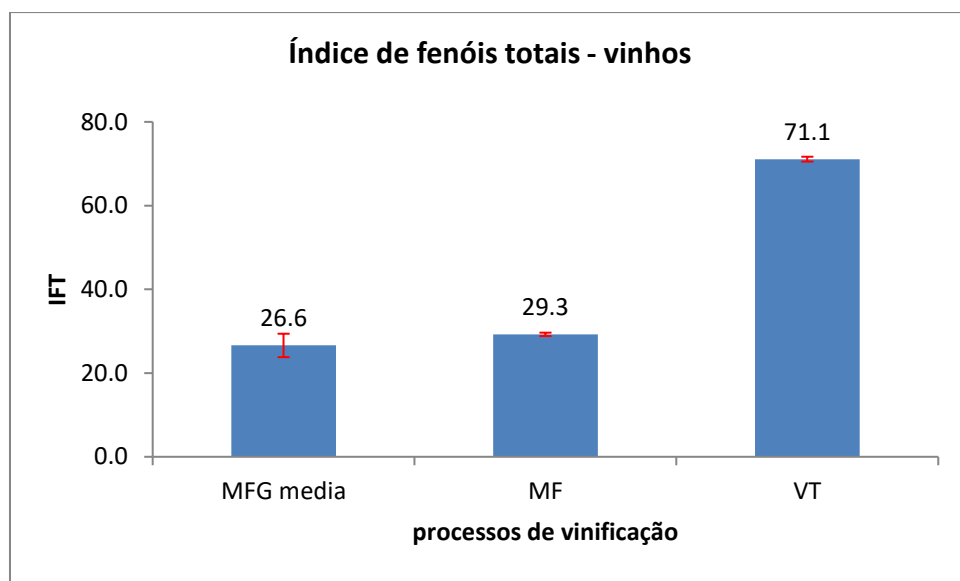


Figura 74- Gráfico comparativo do índice de fenóis totais dos vinhos / processo de vinificação

O facto de IFT ser inferior para os vinhos MF era expectável, tendo em conta o curto período de tempo de maceração (2 dias) a baixa temperatura (10°C) e a FA ter ocorrido sem a presença das películas. Estas condições favorecem a extração de antocianinas por serem moléculas hidrossolúveis, protegem-nas de reações de degradação e permitem menor extração de outros polifenóis [24,46].

3.2.2. Características cromáticas dos vinhos

As características cromáticas analisadas estão representadas nas Figuras 75, 76 e 77.

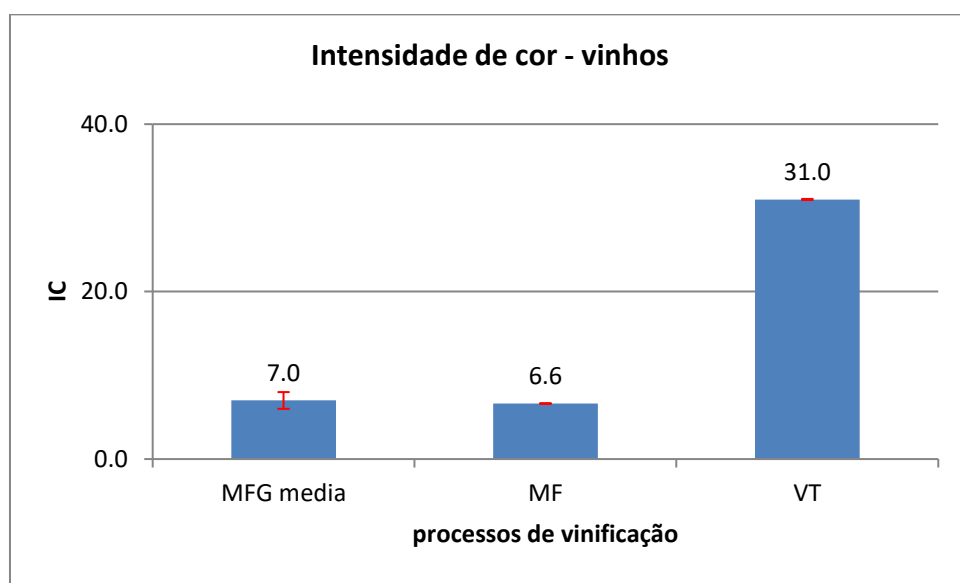


Figura 75 - Gráfico comparativo da intensidade de cor dos vinhos /processo de vinificação

A intensidade de cor para o vinho VT, Figura 75, é superior aos valores obtidos por Costa em 1999 ($IC_{VT}=20$) e Araújo, 2004 ($IC_{VT}=18$) para vinho da mesma casta, na mesma região [11,73].

A intensidade de cor dos vinhos de MF é cerca de 20% da intensidade de cor do vinho de VT, como se pode ver na Figura 75, resultado de acordo com os IFT. O vinho MFG vinificado a temperatura superior tem IC superior à da vinificação a temperatura mais baixa. Tal poderá estar de acordo com o trabalho de Amerine, 1955 que para a casta Pinot Noir concluiu que fermentações a 10°C produzem vinho com menor intensidade de cor que fermentações a 21°C [82]. O resultado de IC obtido para o vinho VT é muito superior ao obtido por Fernandes em 2009 para vinho tradicional de Touriga Nacional ($IC_{TN}=10,0$ [69]).

Os resultados obtidos para o índice de cor vermelha (ICV) estão representados na Figura 76.

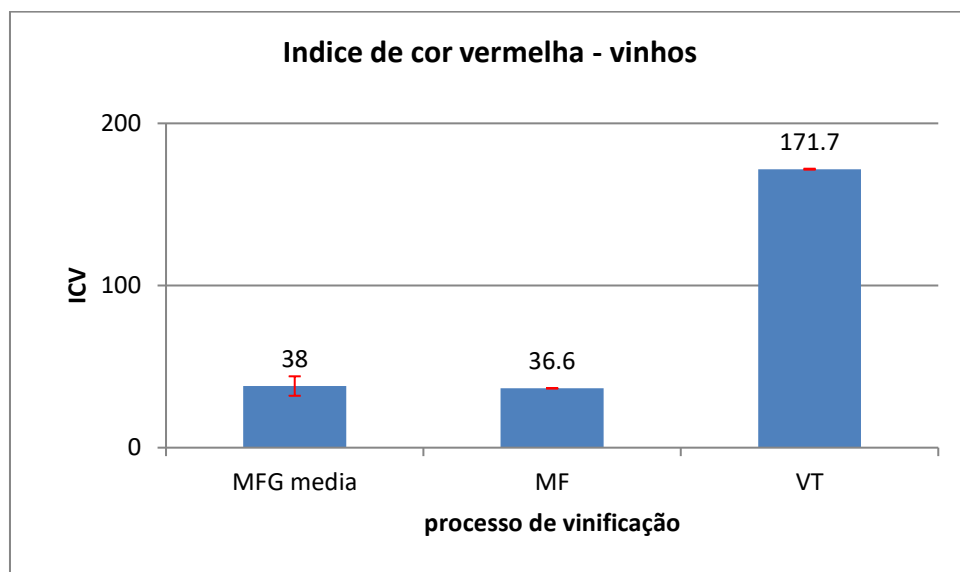


Figura 76 - Gráfico comparativo do Índice de cor vermelha dos vinhos segundo os processos de vinificação

A diferença no índice de fenóis totais entre os processos de vinificação é corroborada no parâmetro intensidade de cor e no índice de cor vermelha, Figura 76, confirmando que a extração de antocianinas é maior no processo tradicional que no processo de MF. O ICV dos vinhos MF é cerca de 20% do do vinho VT, resultado de acordo com a diferença encontrada nas intensidades de cor dos vinhos. A percentagem de vermelho na intensidade da cor é a mesma entre os vinhos MF e VT, 55%, um pouco inferior ao valor obtido por Araújo, 2004, %vermelho=58% e um pouco superior ao valor obtido para o MF em garrafão (%vermelho= 52 %) [73]. A percentagem de amarelo na intensidade da cor é superior nos vinhos de MF (%amarelo_{MF} = 32-35 vs % amarelo_{VT} =30) relativamente ao vinho VT. A percentagem de azul na intensidade de cor dos vinhos fermentados em garrafão (% azul_{MFG} = 17) é superior à percentagem de azul do vinho MF (% azul_{MF} = 10) e do vinho VT (% azul_{VT} = 14). O vinho de MF fermentado a baixa temperatura tem a menor percentagem de azul. Os resultados obtidos para o vinho VT estão de acordo com os resultados obtidos por Araújo, 2004 para o vinho da mesma casta na mesma sub-região do Lima (% amarelo_T =30 e % azul_T = 12) [73]. A percentagem de amarelo e azul na intensidade da cor é nos garrafões mais próxima do vinho VT (% amarelo_G =30-32 e % azul_G = 14-18).

Para o parâmetro tonalidade, os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 77.

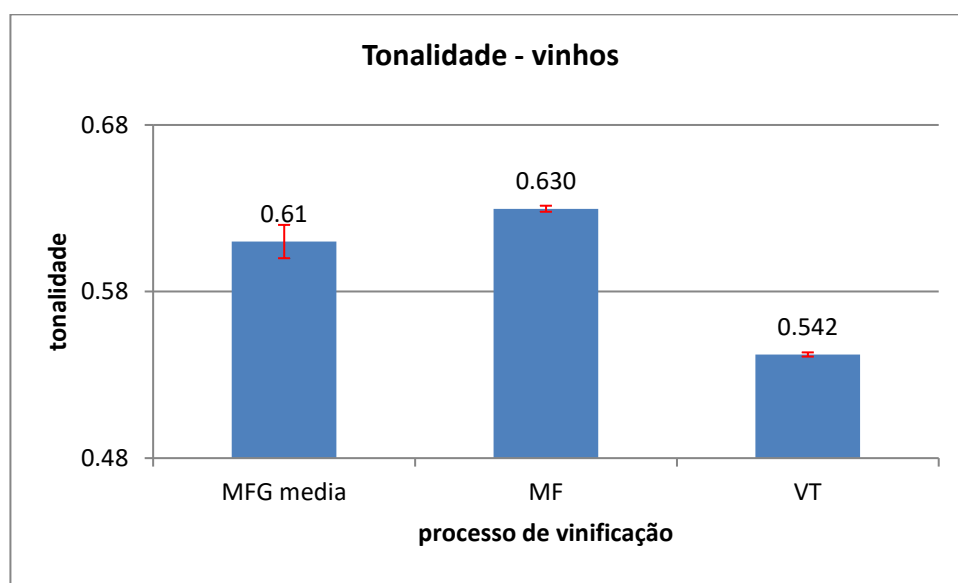


Figura 77 – Gráfico comparativo da tonalidade dos vinhos / processo de vinificação

O resultado obtido para a tonalidade do vinho VT é semelhante ao obtido por Araújo em 2004 para o vinho de maceração tradicional, proveniente da mesma casta, da mesma região e com o mesmo processo de vinificação ($T_{VT} = 0,52$), [73] e muito diferente do valor obtido por Fernandes em 2009 para vinho tradicional de Touriga Nacional ($T_{TN}=0,77$) [69]. Segundo Araújo em 2004, a tonalidade está correlacionada positivamente com a % de amarelo para a casta Vinhão, [73] que se conseguiu provar, pois os vinhos com maior % de amarelo têm tonalidade mais alta, como se pode confirmar na Figura 77.

Realizou-se a análise espectrofotométrica dos vinhos de modo a apresentar o resultado no sistema CIELab. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros cromáticos no sistema CIELab para os vinhos/processo de vinificação

media	X	Y	Z	L*	a*	b*	C*	H°
MFG	36,05	28,60	29,42	59,95	33,38	1,87	33,44	3,20
MF	35,86	27,26	26,16	59,21	37,41	4,74	37,71	7,22
VT	7,18	3,15	1,15	20,65	53,56	19,07	56,85	19,59

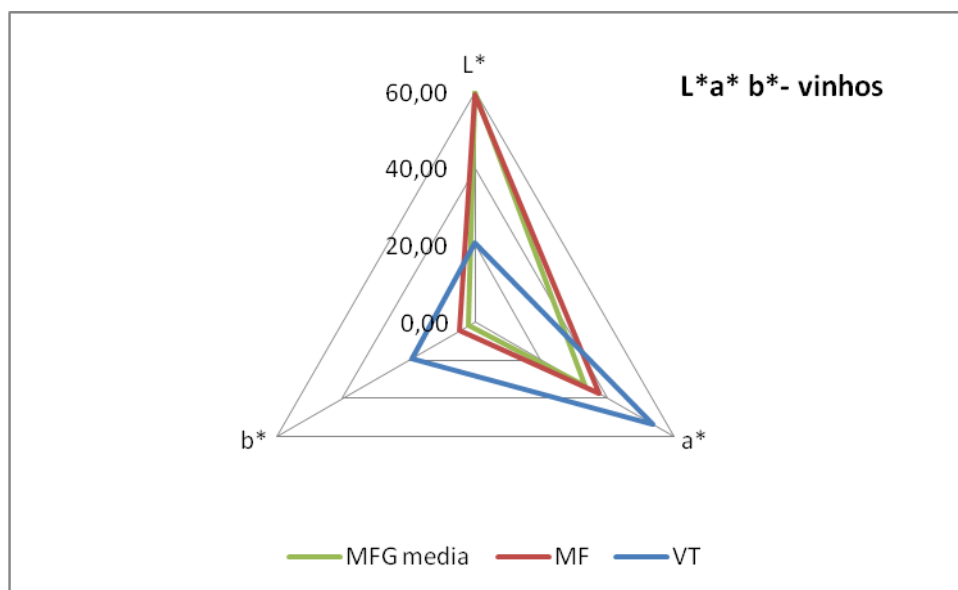


Figura 78 - Gráfico comparativo da cor dos vinhos no sistema CIELab ($L^*a^*b^*$)

Os vinhos MF estão perfeitamente sobrepostos como se pode ver na Figura 78, mostrando perfeita relação entre si e grande diferença quando comparado com o vinho VT.

O vinho VT tem maior valor de a^* e de b^* do que os vinhos MF, logo o vinho VT é mais vermelho e mais amarelo do que os vinhos MF, conforme se pode ver na Figura 79 e 80.

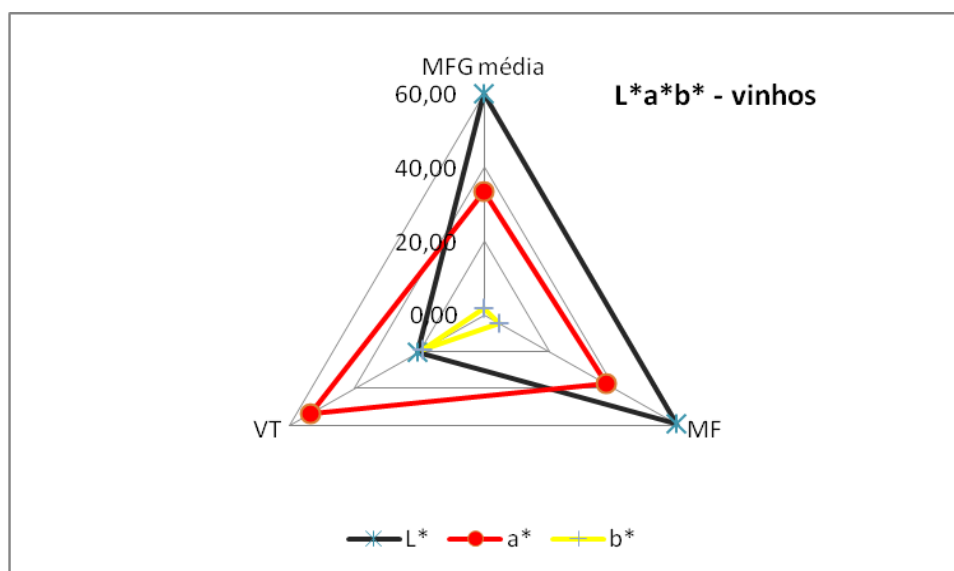


Figura 79 - Gráfico comparativo da cor dos vinhos em garrafão no sistema CIELab. ($L^*a^*b^*$)

Tal facto pode explicar-se do seguinte modo: no processo de vinificação tradicional, a extração é muito violenta e por isso, retira maior quantidade de pigmentos amarelos e vermelhos que nos processos de MF. Os pigmentos amarelos, no entanto, não serão notados devido à massiva quantidade de pigmentos vermelhos presentes, as antocianinas.

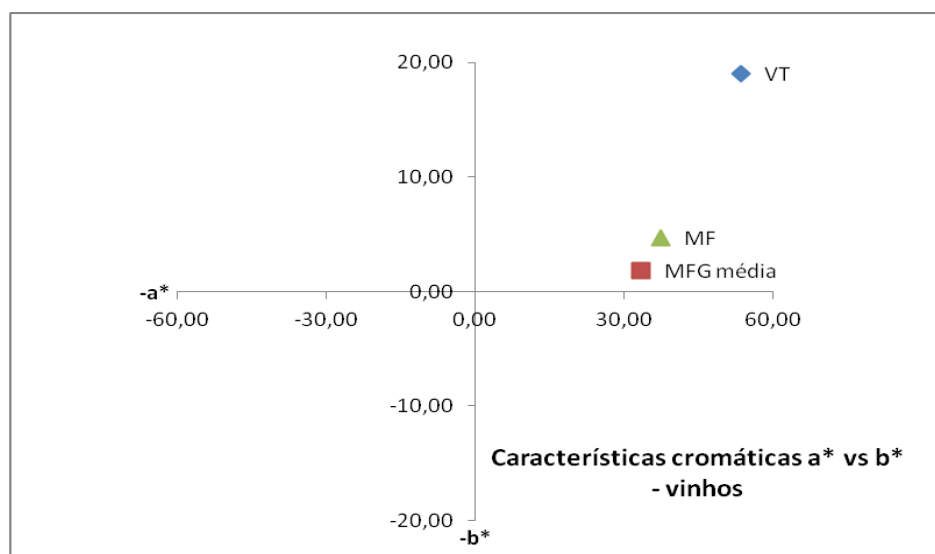


Figura 80 - Gráfico comparativo da cor dos vinhos no sistema CIELab. (a^*b^*)

Na Figura 80, é possível confirmar a existência de uma pequena diferença entre os vinhos MF, definindo um grupo distinto quando comparado com o vinho VT. Os valores obtidos para o vinho VT são um pouco diferentes dos obtidos por Araújo em 2004 para a casta Vinhão na mesma sub-região do Lima. Nesse caso, o vinho apresenta o mesmo valor para a^* (teor de cor vermelha) e teor em azul superior, ($b < 0$) [73], mas não está bem definido quanto tempo mediou entre a vinificação e a análise de cor. No ensaio em estudo, o período é de cerca de 5-6 meses.

Pela análise da Figura 81, características cromáticas L^* vs C^* , podemos confirmar que os vinhos de maceração a frio têm características cromáticas muito diferentes do vinho VT, nomeadamente maior luminosidade e menor cromaticidade.

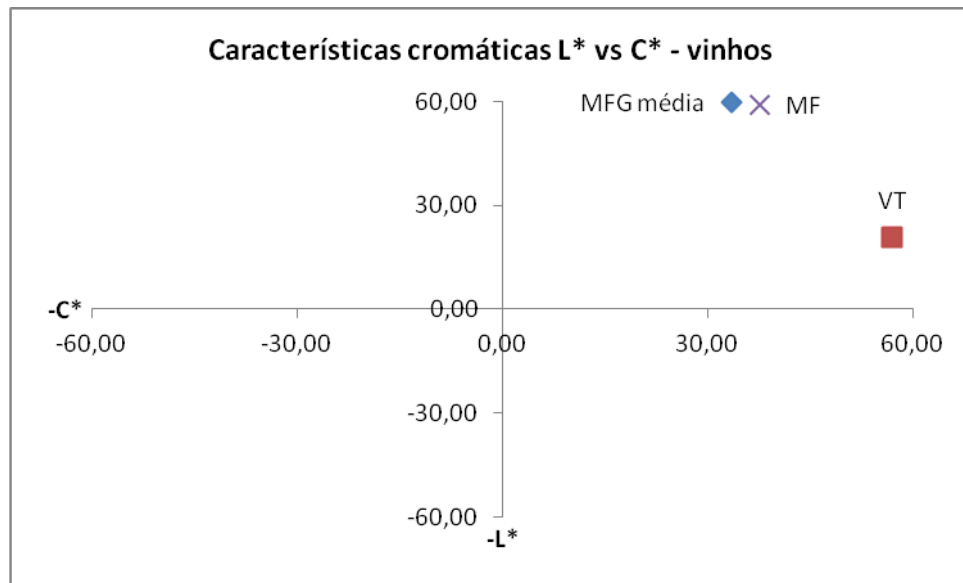


Figura 81- Gráfico comparativo da cor dos vinhos nas coordenadas L* vs C*

Segundo Almela, [83] os valores de $C^* \geq 50$, são sinónimo de cores vivas, logo o vinho de VT tem uma cor viva. Para determinar com maior precisão a diferença de cor entre as amostras, calcula-se a diferença total de cor, ΔE , definida pela seguinte formula.

$$\Delta E = [(L^*_{MF} - L^*_{VT})^2 + (a^*_{MF} - a^*_{VT})^2 + (b^*_{MF} - b^*_{VT})^2]^{1/2}$$

$$\Delta E \text{ (MFG média-VT)} = 47,4 \text{ (unidades CIELab)}$$

$$\Delta E \text{ (MF-VT)} = 44,2 \text{ (unidades CIELab)}$$

A diferença de cor entre os vinhos de maceração pré-fermentativa a frio é praticamente nula, pois estima-se que 3.0 unidades CIELab é a tolerância do olho humano para distinguir diferença de cor entre vinhos, para painel de provadores qualificados [24].

A diferença de cor dos vinhos MF e VT está representada na Figura 82.

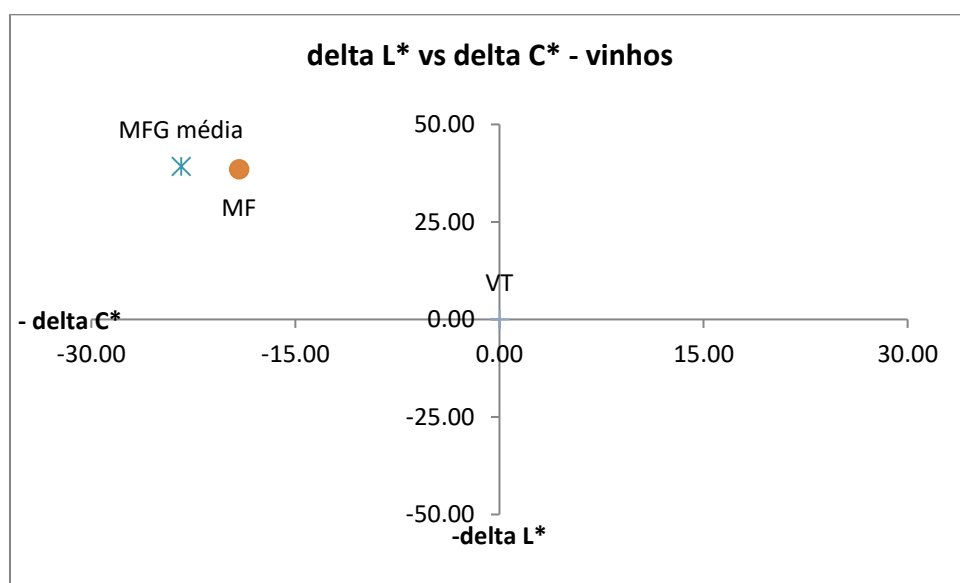


Figura 82 -. Representação gráfica de ΔL^* vs ΔC^* para diferenciar os vinhos

Com a representação gráfica de ΔL^* vs ΔC^* , Figura 82, os parâmetros CIELab são reduzidos a um espaço de cor de 2 dimensões que revela a diferença de cor entre os vinhos [83]: a cor dos vinhos MF é menos profunda que a cor do vinho VT e cromaticidade ligeiramente diferente, resultado de acordo, com os resultados obtidos para os parâmetros intensidade de cor, intensidade de cor vermelha e IFT.

3.2.3. Constituição antociânica dos vinhos

1. Antocianinas livres e totais (método de bissulfito)

Em vinhos jovens a maioria dos pigmentos vermelhos existentes são antocianinas livres que facilmente reagem com o bissulfito, dando origem a adutos incolores. À medida que os vinhos envelhecem, as antocianinas evoluem, levando à formação de novos pigmentos mais polimerizados e mais resistentes à descoloração pelo bissulfito.

Os resultados obtidos para o parâmetro antocianinas livres e totais estão representados na Figura 83.

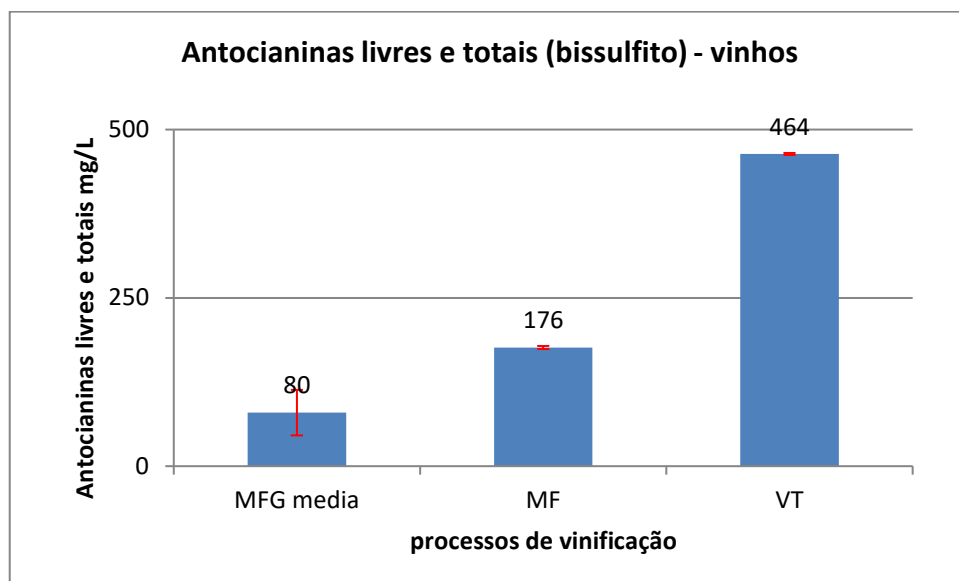


Figura 83 - Gráfico comparativo do teor de antocianinas livres e totais nos vinhos

O teor de antocianinas do vinho MF é 38% do teor obtido para o vinho VT, resultado de acordo com a relação de TA existente entre os mostos ($TA_{MF}/TA_{VT} = 36\%$). O teor de antocianinas dos vinhos MF em garrafão são em média 16% do teor obtido para o vinho VT e cerca de 42% do vinho MF – ver Figura 83.

O teor de antocianinas (TA) do vinho VT é superior ao obtido por Araújo em 2004 para o vinho tradicional (307 mg/L equiv.malv-3-glu), semelhante ao valor obtido por Costa em 1999 (450 mg/L equiv.malv-3-glu), mas muito inferior ao obtido por Castillo-Sanchez (TA= 756 g/L equiv.malv-3-glu) [11,73, 84] para a mesma casta, na mesma região.

O valor obtido é semelhante ao obtido por Fernandes em 2009 ($TA_{TN}=450$) e bastante inferior ao obtido por Araújo em 2015 para o vinho de Touriga Nacional (TN) ($TA_{TN} = 700$) [17,69].

Os resultados obtidos para o parâmetro antocianinas totais estão de acordo com os resultados obtidos de IFT, IC, ICV para os vinhos MF e VT mas não para os vinhos MF em garrafão.

2.Quantificação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLP-DAD)

As antocianidinas-3-monoglucósido e respectivos ésteres acilados foram identificados com base no respectivo espectro UV-VIS e o tempo de retenção e o perfil obtido é concordante com os resultados obtidos por Dopico et al. em 2008 a 500nm para as antocianinas de maior teor para o vinho VT mas não para o vinho MF [72]. Foram analisados

os vinhos de vinificação em garrafão, mas os resultados são inconclusivos. Os cromatogramas obtidos para os vinhos MF e VT estão representados na Figura 84.

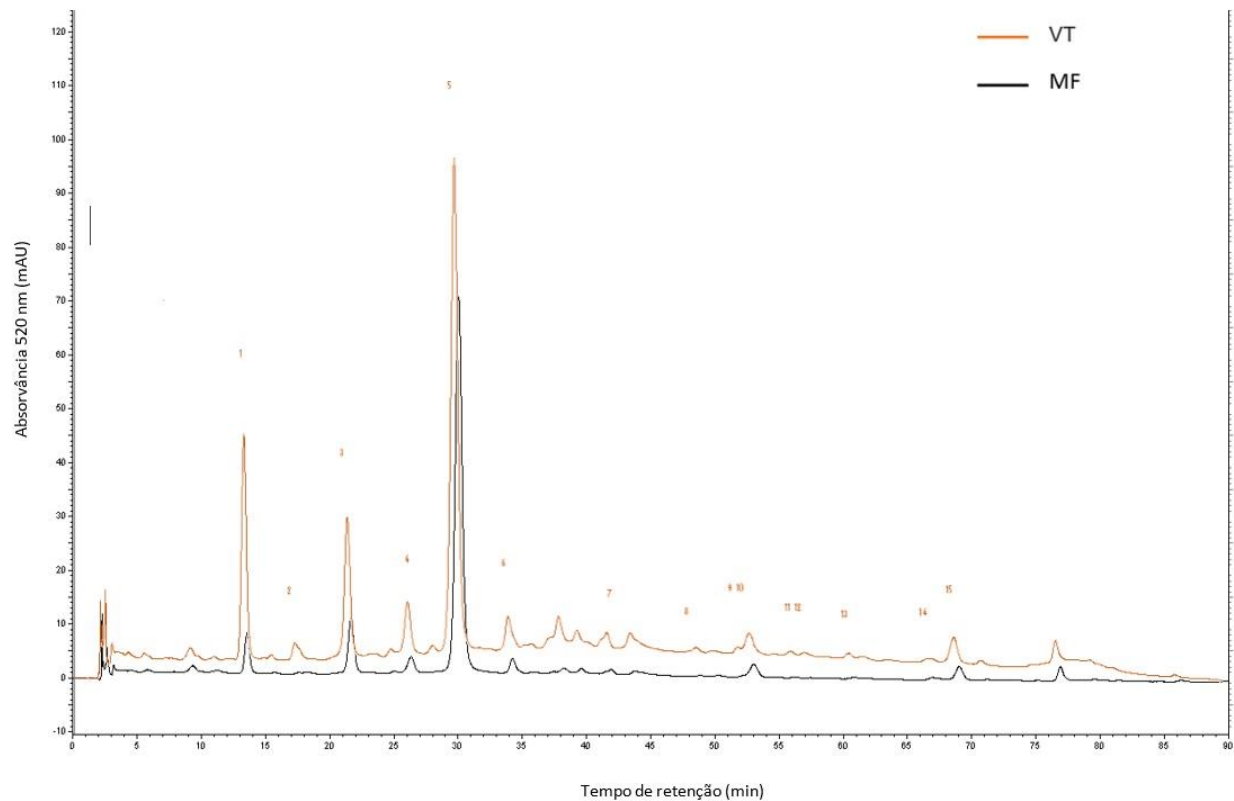


Figura 84 – Cromatograma de HPLC-DAD das antocianinas monoméricas presentes nos vinhos VT e MF

Legenda:

1: delfinidina 3-glucósido	6: delfinidina 3-acetilglucósido	11: cianidina 3-cumaroílgucósido
2: cianidina 3-glucósido	7: petunidina 3-acetilglucósido	12: peonidina 3-cafeoilglucósido
3: petunidina 3-glucósido	8: peonidina 3-acetilglucósido	13: petunidina 3-cumaroílgucósido
4: peonidina 3-glucósido	9: delfinidina 3-cumaroílgucósido	14: peonidina 3-cumaroílgucósido
5: malvidina 3-glucósido	10: malvidina 3-acetilglucósido	15: malvidina 3-cumaroílgucósido

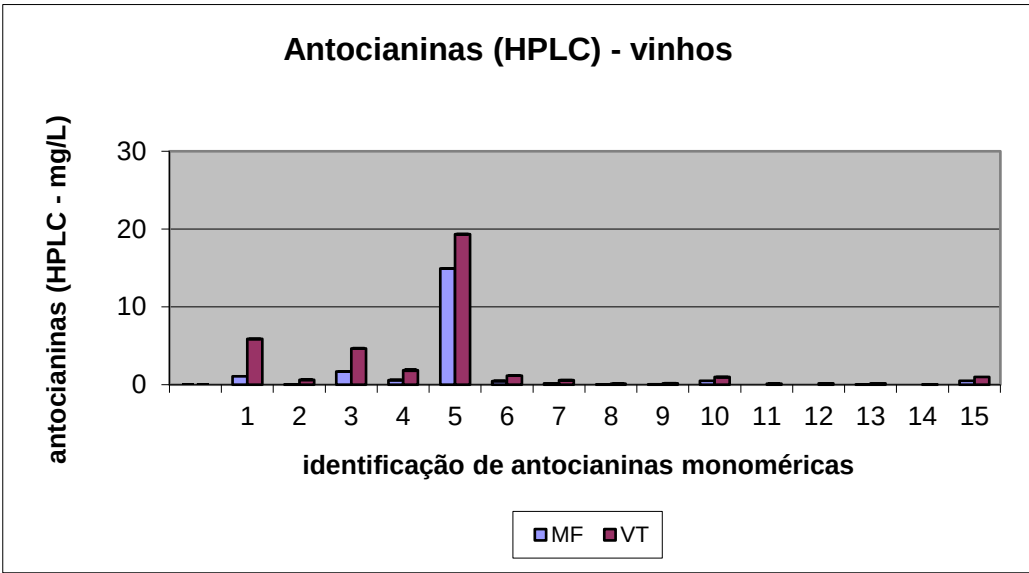


Figura 85 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos vinhos

A Figura 85 mostra que o teor de antocianinas no vinho de VT é superior ao da maceração a frio. Algumas antocianinas existem no vinho de MF num teor de cerca de 75% do existente no vinho VT (caso da malvidina-3-glucósido), outras só 2.5% (caso da petunidina -3 -glucósido) e outras não foram detetadas comprovando alteração de perfil antociânico para o vinho MF, já se tinha encontrado na análise aos mostos, ainda que não mantendo o perfil dos mostos: no vinho MF a segunda antocianina mais importante é a petunidina-3-glucósido a que se segue a delfinidina-3-glucósido enquanto que para o vinho VT se mantém a ordem de importância encontrada nas uvas: malvidina-3-glucósido, delfinidina-3-glucósido e petunidina -3-glucósido. Ver Figura 86.

Quantitativamente, as antocianinas glicosiladas são as predominantes para ambos os processos de vinificação (88-91%) seguem-se as acetiladas (6-8%) e por fim as coumariladas (3-4%)

A análise mostra que em ambos os processos de vinificação, entre as antocianinas, os derivados de malvidina estão em maioria (71% no vinho MF e 58% no vinho VT), sendo a malvidina -3-monoglucósido a que tem maior teor em ambos. É por isso a mais importante, resultado de acordo com a análise anteriormente realizada às uvas e aos mostos. No seu estudo com uvas da casta Vinhão, Araújo em 2004 obteve para vinho dois perfis antociânicos, nenhum deles igual às uvas, mas de ordem de grandeza semelhante ao obtido para o vinho MF [73].

Os resultados obtidos para as antocianinas monoméricas por HPLC, são novamente muito inferiores aos resultados obtidos pelo método de bissulfito, com uma variação de 1:10 mas a proporção é semelhante, isto é, o teor de antocianinas no vinho MF é cerca de 55% do teor de antocianinas no vinho VT.

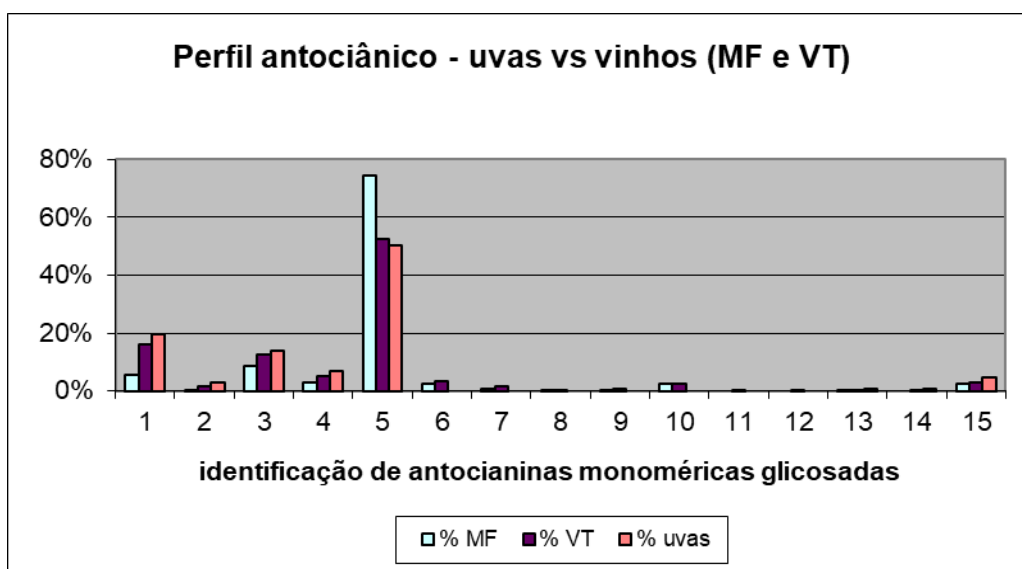


Figura 86 – Representação comparativa do perfil antociânico entre uvas e vinhos da casta Vinhão

O perfil antociânico do vinho MF é diferente do encontrado para as uvas, comprovado na Figura 86, e de acordo com um dos vinhos obtidos por Araújo em 2004I [73].

Essa diferença é também notada segundo o processo de vinificação: em ambos os vinhos a malvidina -3-glucósido é a que tem maior teor mas no vinho MF o teor é de 75% das antocianinas presentes, e no vinho VT é 52%, apesar de na uva esta antocianina estar presente em cerca de 50%. Tal pode ser justificado segundo Revilla *et al* em 2001, pelas diferenças na razão da extração das antocianinas, pelas degradações ou polimerizações durante a fermentação alcoólica ou ainda pela diferente capacidade de adsorção de cada antocianina pelas paredes da levedura: as antocianinas acetiladas têm maior capacidade de adsorção à parede da levedura relativamente às não acetiladas [30,85].

Vimos anteriormente que é possível identificar a casta pelo perfil antociânico na uva, mas parece mais difícil identificar a casta a partir do perfil antociânico do vinho, pois além da elevada quantidade relativa de malvidina-3-O-glucósido, a relação das outras antocianinas é inferior no vinho quando comparado com o teor nas uvas. Por sua vez, e como mostram as Figuras 86 e 87 o processo de vinificação tem também a sua influência, sendo necessário avaliar a relação que cada processo tem em cada antocianina de modo a conseguir determinar a casta de origem através do perfil antociânico do vinho [85].

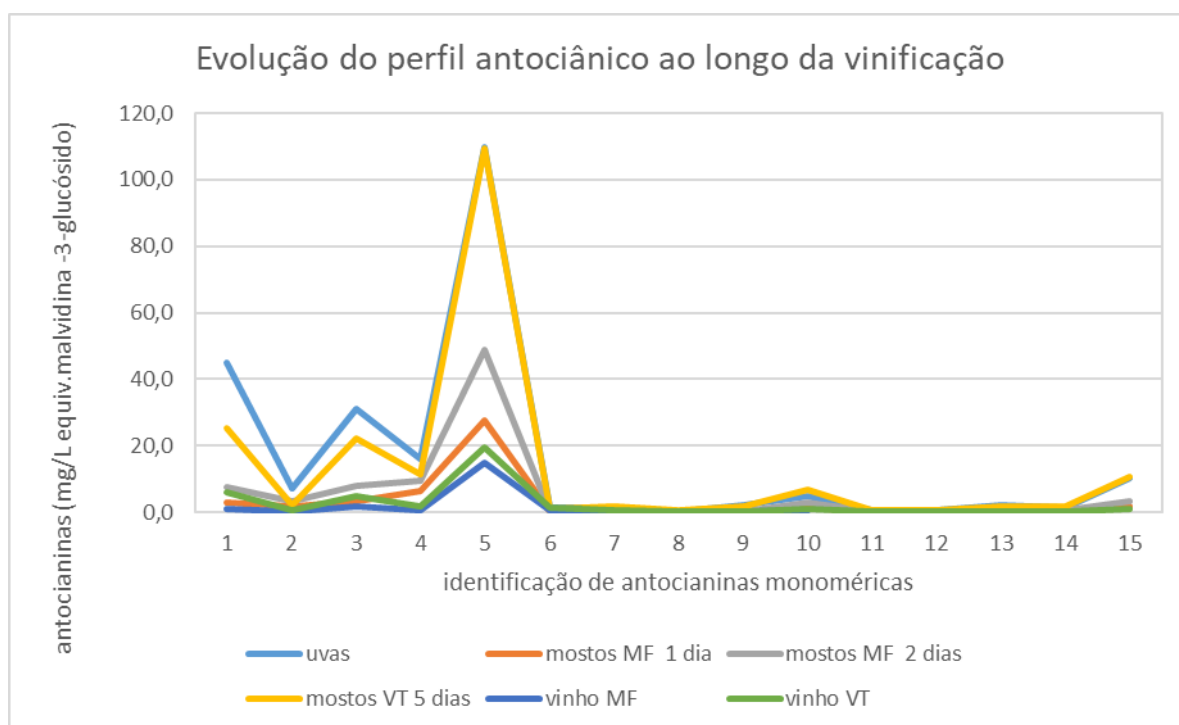


Figura 87 – Representação gráfica do teor das antocianinas monoméricas glicosadas identificadas nos vinhos Vinhão

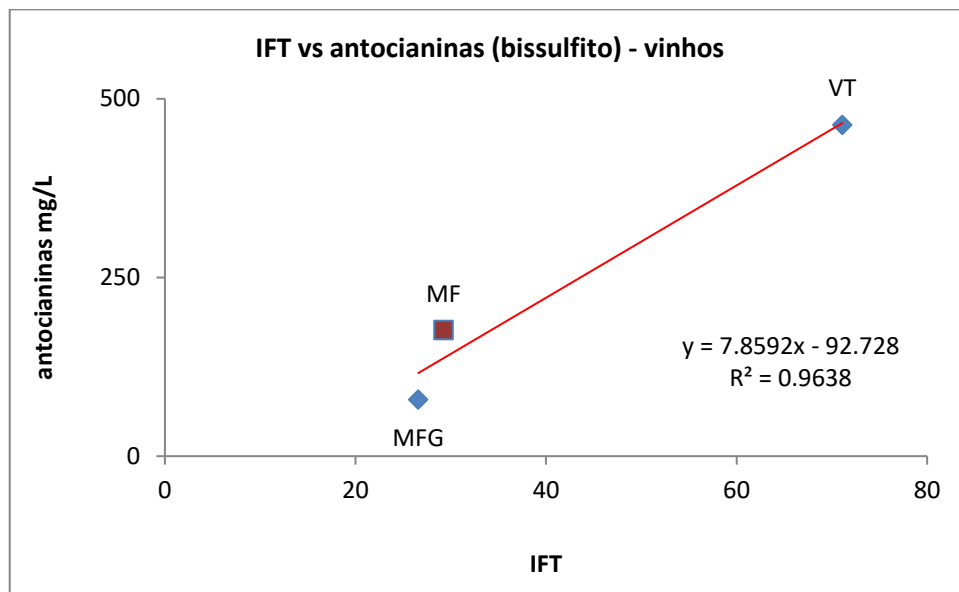


Figura 88 – Representação gráfica da relação entre o Índice de fenóis total (IFT) e o teor de antocianinas nos vinhos determinado pelo método de bissulfito

Segundo Aleixandre-Tudo em 2018 [55] existe uma correlação forte entre o IFT e o teor de antocianinas (pelo método de bissulfito $R^2=0,97$) representado na Figura 88, mas sem significância, ($p>0,05$) provavelmente devido ao número reduzido de amostras. Os vinhos de MF apresentam-se como um grupo diferente do vinho VT. Segundo Blouin em 2000 e confirmada por Pina et al em 2015, a relação entre o IFT e as antocianinas é fraca porque a cor do vinho não é somente função do teor de antocianinas livres [81, 86].

3.2.4. Doseamento global de taninos

1. Taninos proantociânicos totais

O doseamento dos taninos proantociânicos totais (TPA) baseia-se na reação de decomposição destes compostos em meio ácido e por ação do calor (reação Bate-Smith), medindo-se a absorvância das soluções resultantes a 520 nm. Os valores médios obtidos para cada amostra estão representados na Figura 89.

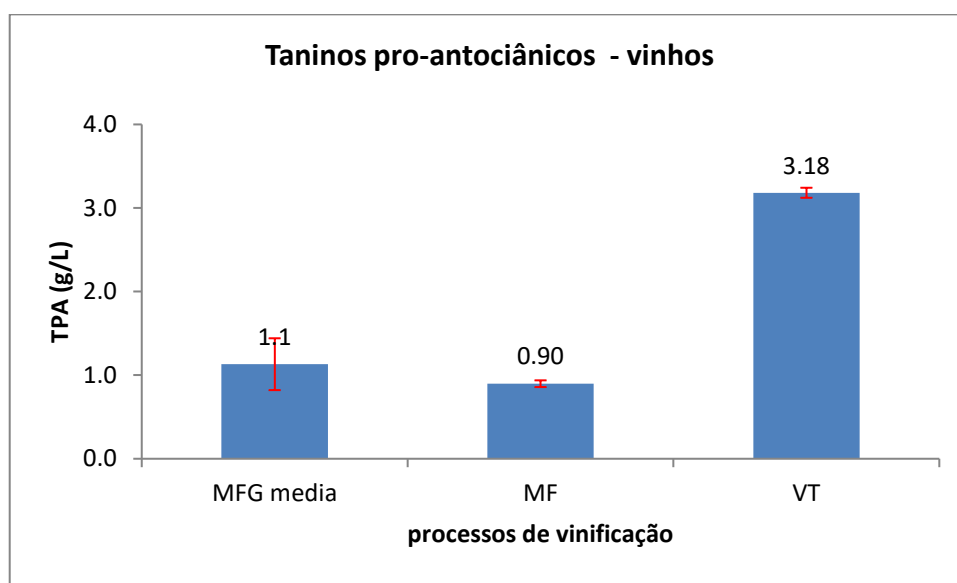


Figura 89 – Gráfico comparativo do teor de taninos proantociânicos totais nos vinhos por processo de vinificação

O teor de taninos proantociânicos é superior no vinho VT quando comparado com o teor nos vinhos de MF, como seria de esperar, tendo em conta que o processo de vinificação tradicional permite uma maior extração destes compostos e de taninos monoméricos quando comparado com o processo de maceração a frio, ver Figura 89. Por sua vez, tendo em conta a elevada concentração de taninos monoméricos é possível a formação de taninos proantociânicos durante a fermentação alcoólica. O teor de TPA do vinho VT é semelhante ao teor para vinho de Touriga Nacional ($TPA_{TN}=3.5$) [17].

A relação do teor de TPA entre os vinhos de MF e o vinho VT é superior a 1:3, isto é, o teor de taninos proantociânicos no vinho VT é o triplo do existente nos vinho MF.

2. Índice de diálise

O índice de diálise (ID) permite avaliar a complexidade estrutural dos compostos fenólicos presentes num vinho. Realizou-se este ensaio para os vinhos e os resultados encontram-se representados na Figura 90.

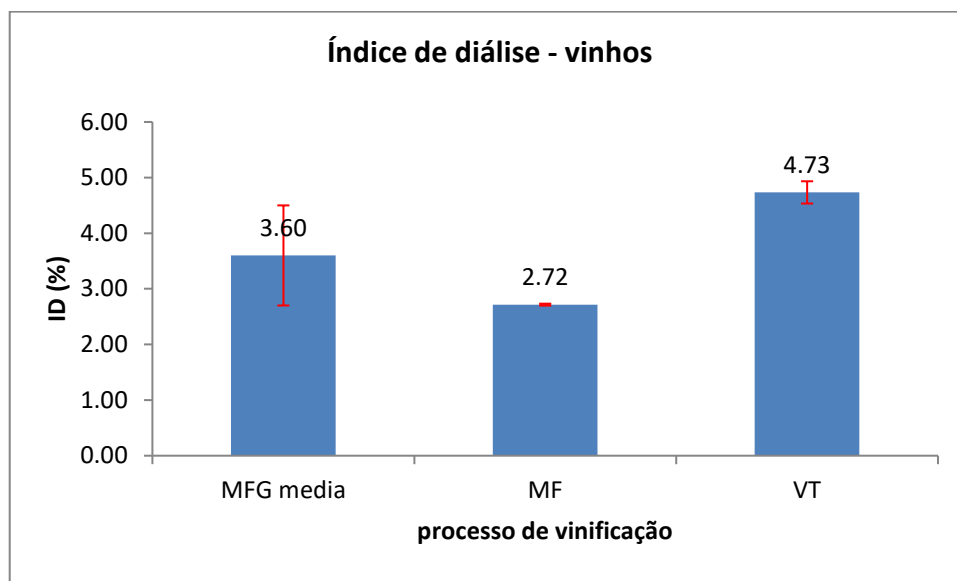


Figura 90 – Representação gráfica do índice de diálise dos vinhos / processo de vinificação

O vinho VT apresenta a maior percentagem de taninos condensados, Figura 90, relativamente aos existentes nos vinhos MF e MFG. Tal está de acordo com os resultados obtidos na análise para a determinação de taninos proantociânicos totais. No entanto a relação entre os índices de diálise não é a mesma que para os TPA (a relação entre os Índices de diálise é 1:1.7, para o vinho MF e 1:1.4 para o MFG média mostrando que existem muitos taninos proantociânicos no vinho VT mas de baixa complexidade, ao contrário dos presentes nos vinhos de MF que são em menor concentração mas mais estruturados.

Outro facto curioso, é que o vinho MFG (fermentado a temperatura ambiente) tem um teor de taninos estruturados superior ao da vinificação a uma temperatura mais baixa, mostrando o papel da temperatura nas reações de associação/ pigmentação.

3. Poder tanante

Este índice é baseado na capacidade dos taninos para formar agregados insolúveis com as proteínas, nomeadamente com a albumina sérica bovina (BSA) que tem sido utilizada como modelo para estudar a capacidade tanante dos taninos em matrizes alimentares. Realizou-se este ensaio para os vinhos e os resultados encontram-se representados na figura 91.

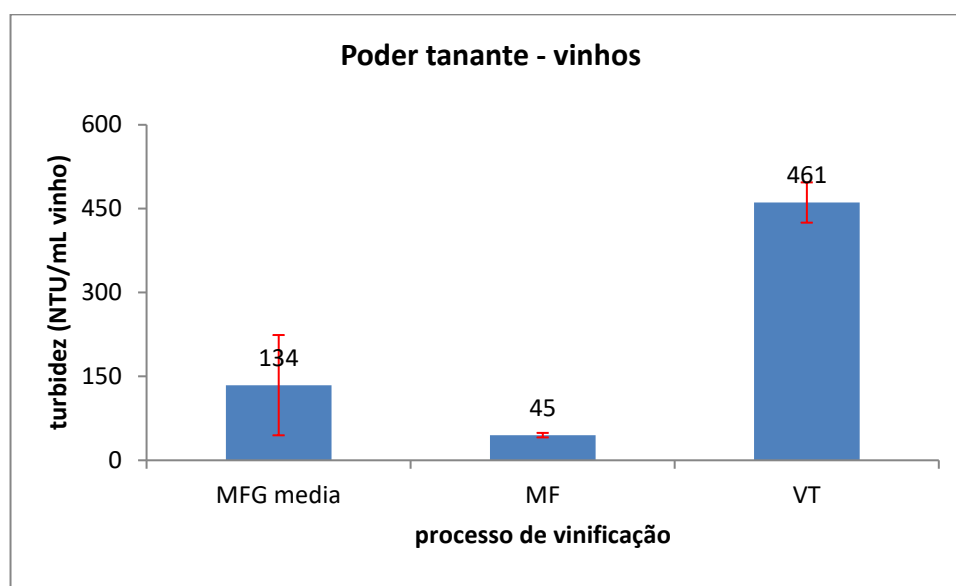


Figura 91 – Gráfico comparativo do poder tanante dos vinhos / processo de vinificação

O poder tanante dos vinhos MF é significativamente inferior ao poder tanante do vinho VT conforme se pode ver na Figura 91. O do vinho VT tem um valor semelhante ao resultado obtido por Fernandes em 2009 para vinho de Touriga Nacional $PT_{TN} = 493$ NTU/mL [69].

O poder tanante do vinho MF vinificado à temperatura ambiente é superior ao poder tanante do vinho MF vinificado a temperatura inferior, provando o papel determinante da temperatura na realização das reações de co-pigmentação e e/ou associações covalentes entre os compostos fenólicos com a formação de estruturas maiores e mais complexas [77].

O poder tanante é função da quantidade de taninos, logo se o poder tanante do vinho VT é muito superior ao do vinho MF, prova a existência de cerca de 10 vezes mais taninos que os existentes no vinho MF e 3 vezes mais do vinho MF em garrafão. Este resultado está de acordo com os outros parâmetros anteriormente analisados, nomeadamente:

- o vinho VT tem cerca de 10 vezes mais taninos que o vinho MF
- os taninos proantociânicos no vinho VT são o triplo dos presentes nos vinhos MF
- os taninos mais polimerizados no vinho VT são 1.4-1.8 superiores aos presentes nos vinhos MF

Logo, a grande maioria dos taninos presentes no vinho VT são de baixa complexidade.

Trata-se de vinhos jovens e por isso não houve reações significativas de co-pigmentação e/ou associações covalentes entre os compostos fenólicos com a formação de estruturas maiores e mais complexas.

Existe um aumento de pigmentos poliméricos com a temperatura de fermentação (índice de diálise ligeiramente superior na MFG relativamente ao vinho MF), assim como é maior o teor de taninos, pequenos e grandes pigmentos poliméricos (poder tanante superior para o vinho MFG relativamente ao vinho MF) [23]. O aumento de pigmentos poliméricos parece ser devido mais ao aumento de extração de taninos do que às antocianinas, pois o teor de antocianinas do vinho MF é muito superior ($ALT_{MFG}=76$ vs $ALT_{MF}=176$) ao do vinho MFG mas o seu poder tanante é cerca de um terço ($PT_{MF}=45$ vs $PT_{MFG}=134$). Se os taninos adequados não estão presentes no princípio da FA para reagir com as antocianinas, haverá menos pigmentos poliméricos no vinho [23].

Se considerarmos esta observação poderemos explicar porque o vinho de garrafão tem menos antocianinas: porque já tem compostos polimerizados, que se confirmam no poder tanante, no índice de diálise, e no TPA mais elevados, que o vinho MF, assim como pelo facto de não se ter detectado antocianinas monoméricas no HPLC.

Como sabemos, o poder tanante é proporcional à quantidade de taninos.

Se se considerar o valor do poder tanante como sendo a quantidade de taninos, para determinar, ainda que, aproximadamente a relação entre os taninos e as antocianinas nos vinhos em estudo, obtivemos os seguintes valores:

$$\text{Taninos/antocianinas}_{MF} = 45/176 = 0.26$$

$$\text{Taninos/antocianinas}_{VT} = 426/464 = 0.91$$

A relação taninos/antocianinas do vinho MF é cerca de 30% da relação para o vinho VT.

Segundo Blouin em 2000 existe uma relação forte entre o poder tanante e o IFT em vinhos. Essa correlação é forte $R^2=0,93$ e está representada na Figura 92 mas sem significância $p>0,05$ provavelmente devido ao pequeno número de amostras [81].

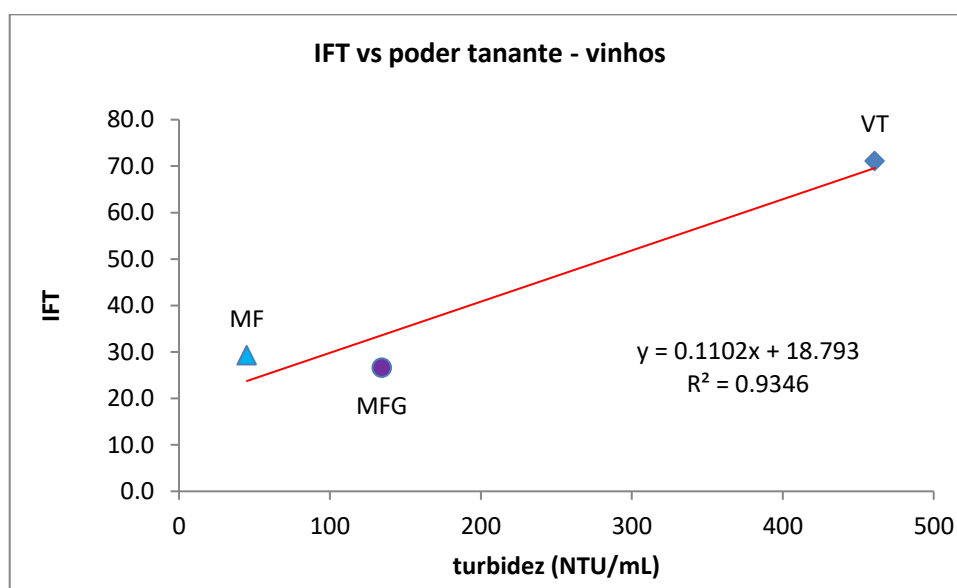


Figura 92 – Representação gráfica da relação entre poder tanante vs IFT

3.3. Análise sensorial

Para complementar as análises já realizadas e porque se trata de um dos objetivos deste trabalho, criar um vinho diferente a partir da casta Vinhão, para o consumidor comum, realizamos a análise sensorial ao vinho MF e VT. A análise foi realizada na Sala de Provas da CVRVV por um painel composto por 9 provadores qualificados. As amostras foram analisadas cerca de 1 mês após terem sido recolhidas, (ver anexo I), tendo os vinhos estado conservados à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$), ao abrigo da luz, em garrafas de vidro fechadas.

A análise sensorial foi composta por 3 provas: visual, olfativo e gustativo às 2 amostras de vinho e o registo das apreciações na Ficha de Prova, (anexo III), com uma escala de 0-10 (0 para o menos intenso e 10 para o mais intenso) para cada atributo.

3.3.1. Avaliação Visual

Os parâmetros de análise foram a cor (qualidade e intensidade) e a limpidez. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 93.

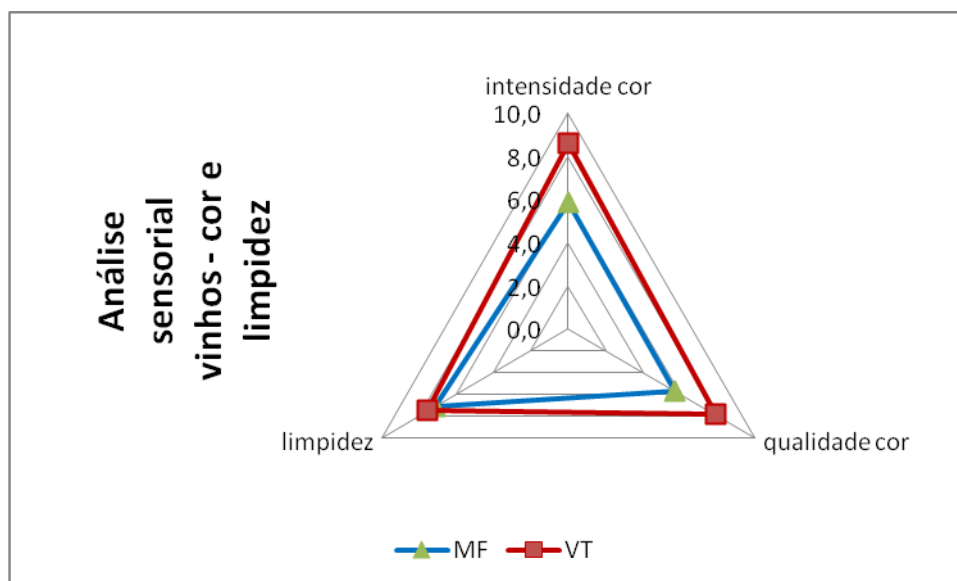


Figura 93 – Resultados obtidos para os parâmetros cor e limpidez na análise sensorial

Pela análise da Figura 93 concluímos que ambos os vinhos têm intensidade e qualidade de cor boa, acima de 5 valores. Destaca-se, no entanto, que a intensidade da cor do vinho VT é superior à do vinho MF em cerca de 50% e a sua qualidade de cor é de cerca de 40% superior à do vinho de MF. A limpidez das duas amostras é igual.

3.3.2. Avaliação olfativa

Os resultados da avaliação olfativa dos 2 vinhos estão representados na Figura 94 e 95.

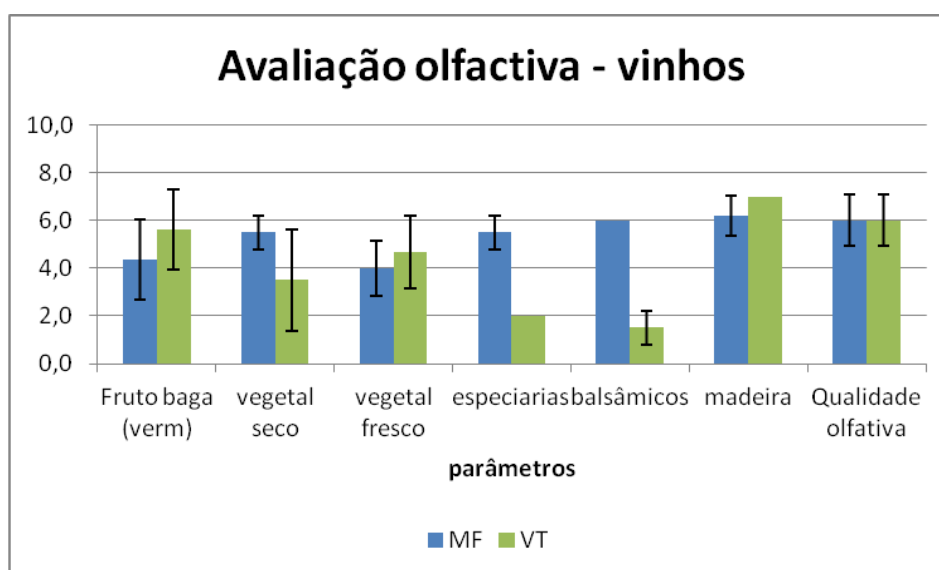


Figura 94 – Resultados obtidos na avaliação olfativa aos vinhos por processo de vinificação

Os vinhos têm a mesma qualidade olfativa, mas em termos de parâmetros aromáticos são muito diferentes, como se pode ver na Figura 94.

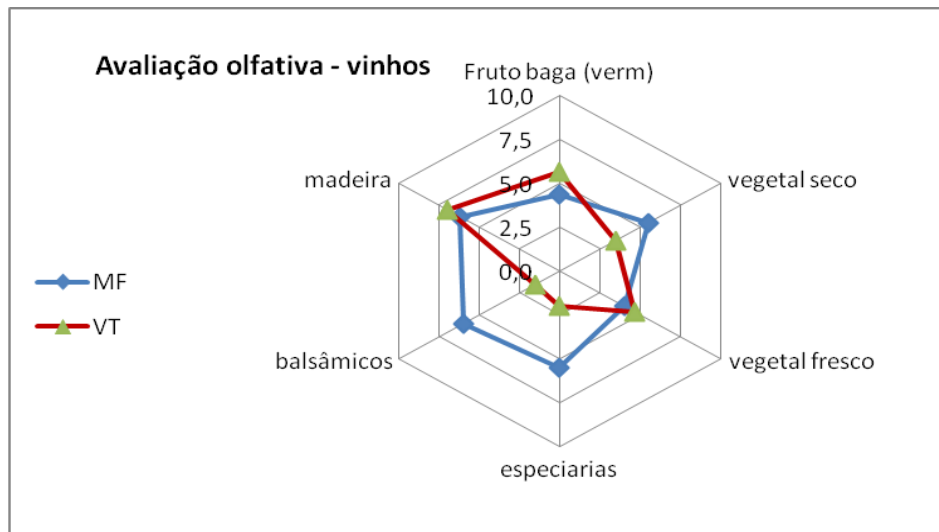


Figura 95 – Resultados obtidos na avaliação olfativa- aromática aos vinhos por processo de vinificação

O vinho de MF apresenta aromas – balsâmicos, especiarias e vegetal seco – mais pronunciados do que o vinho VT. Este por sua vez, apresenta maior aroma a fruto vermelho, vegetal fresco e madeira relativamente ao vinho MF. O aroma do vinho MF é mais harmonioso, mais equilibrado que o do vinho VT, conforme Figura 95.

3.3.3. Avaliação gustativa

Os resultados da avaliação gustativa dos 2 vinhos estão representados na 96 e 97.

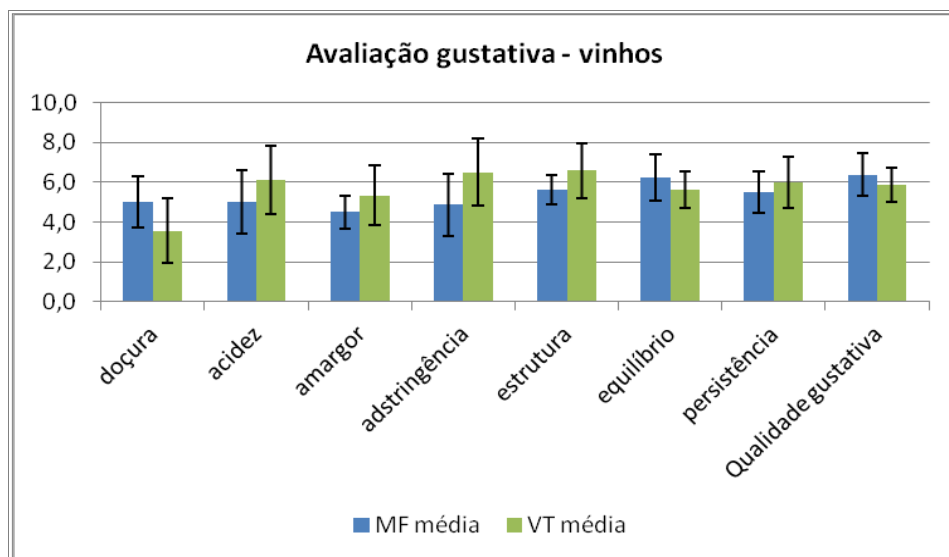


Figura 96 – Resultados obtidos na avaliação gustativa aos vinhos por processo de vinificação

Pela análise da Figura 96 concluímos que existe uma pequena diferença na qualidade gustativa dos 2 vinhos, com uma ligeira vantagem para o vinho MF relativamente ao vinho VT. Analisando os parâmetros gustativos, a diferença é mais visível na Figura 97.

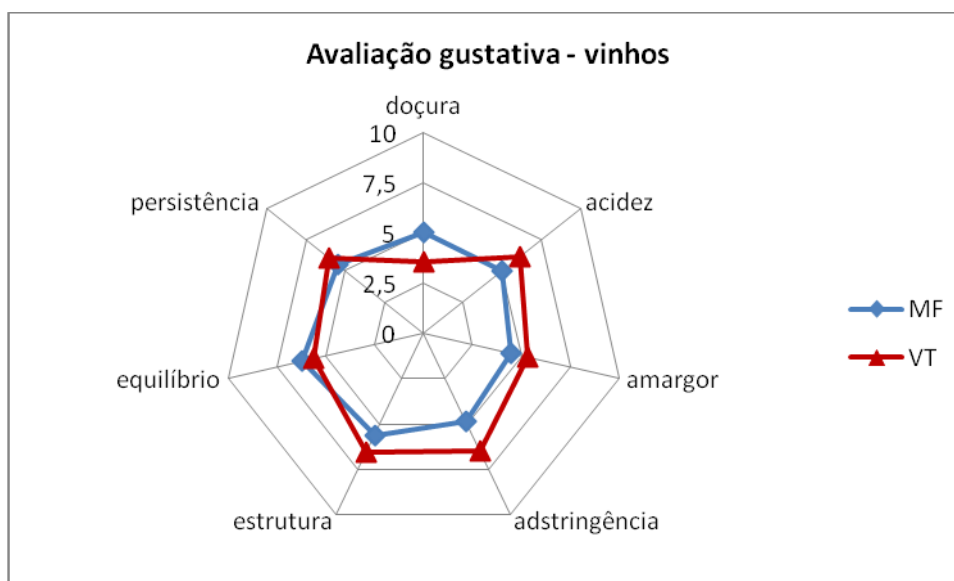


Figura 97 – Resultados obtidos na avaliação gustativa aos vinhos por processo de vinificação

Na Figura 97 nota-se que a doçura e o equilíbrio são superiores no vinho MF relativamente ao vinho VT e que a acidez, a adstringência, o amargor e a estrutura são inferiores. Mais uma vez, o vinho MF é mais equilibrado, harmonioso ao paladar que o vinho VT e provavelmente por isso, é o preferido pelos provadores.

IV. Conclusões

O estudo apresentado é referente a uma só vindima e todas as conclusões que a seguir se expõem devem ter tal facto em consideração.

A cor dos vinhos tintos é um dos atributos mais importantes na avaliação das suas características organoléticas, constituindo um parâmetro de qualidade. O vinho tinto proveniente da casta Vinhão pelo processo tradicional é um vinho de cor intensa, na gama do vermelho vivo segundo Glories em 1974, fortemente acídulo, adstringente, adaptado à gastronomia da região, e com pouco capacidade de envelhecimento [73,87].

Verificou-se que a amostragem de uvas é difícil de ser representativa, mas apesar disso foi possível confirmar o elevado teor de polifenóis, IC, e ICV na casta Vinhão, o que mostrou a necessidade de escolha de um método de vinificação que não extraia todo o potencial de antocianinas e taninos existente, tendo em conta o objetivo do trabalho.

O objetivo do trabalho foi conseguir um vinho tinto de cor intensa, do agrado do consumidor, menos acídulo, menos adstringente, mais aromático e com capacidade de envelhecimento que permita alargar o mercado além-fronteiras. Para tal, selecionamos a maceração pré-fermentativa a frio para, desta forma, conseguirmos extrair um maior conteúdo de compostos fenólicos das uvas, favorecendo a extração de taninos da película (taninos nobres), relativamente aos taninos rústicos das grânhas das uvas, melhorar a relação taninos/antocianinas, obtendo cor, sem acidez o que poderá originar vinhos com marcado aroma varietal, cor intensa, boa estrutura tânica e “maciez” em boca, além de estabilidade de cor [88].

Os resultados indicam que a maceração pré-fermentativa a frio, proporcionou aos vinhos da casta Vinhão:

- igual teor alcoólico (11,5-12.0% vs 11.7%),
- menor conteúdo de extrato seco (22,2-24.1 vs 30.2 g/L),
- menor acidez fixa (5.2-5.5 vs 6.8 g/L (ácido tartárico))
- menor a igual acidez volátil (0.24-0.4 vs 0.39 g/L (ácido acético)),
- menor teor de ácido tartárico (2.3-3.0 vs 4.2 g/L),
- menor a igual pH (3.44-3.54 vs 3.55)
- menor índice de fenóis totais (29 vs 71)
- menor teor de antocianinas (75-176 vs 464 mg/L equiv. malvidina-3-O-glucósido)

- menor teor de taninos proantociânicos (0.90-1.1 vs 3.18 g/L)
- menor teor de taninos polimerizados (índice de diálise 2.72-3.39 vs 4.73)
- menor adstringência (poder tanante 45-134 vs 426)
- menor intensidade de cor (Intensidade de cor 6.6-7.3 vs 31.0) mas com a mesma % de cor vermelha (55%)
- maior tonalidade (0.63-.61 vs 0.54)

quando comparado com o vinho de vinificação tradicional.

Estes resultados estão de acordo com a análise sensorial, nomeadamente nos parâmetros cor, acidez e adstringência:

- A intensidade de cor dos vinhos MF é inferior ao do vinho VT (6.6 vs 31), assim como a diferença de IFT e do teor de antocianinas, corroborado com o resultado de 5.9 vs 8.6 no parâmetro intensidade de cor e de 5.7 vs 7.9 no parâmetro qualidade de cor na prova de avaliação visual.

- A menor acidez, fixa e volátil do vinho MF é corroborada na avaliação dos parâmetros acidez (5.0 vs 6.1) e doçura (5.0 vs 3.6) na prova de avaliação gustativa.

- O menor teor em taninos do vinho MF é corroborado na avaliação dos parâmetros amargor (4.5 vs 5.3) e adstringência (4.9 vs 6.5) na prova de avaliação gustativa.

A maceração pré-fermentativa a frio com uvas da casta Vinhão permite, sem dúvida, a produção de um vinho diferente de avaliação global positiva, mais equilibrado e mais aromático. No entanto, considero que se deveria:

- ensaiar a maceração pré-fermentativa a frio por maior período de tempo, 3-4 dias a 10°C, para melhor avaliar as características resultantes deste método, para minimizar as variações inter e intra cubas, para maior extração de antocianinas e taninos das películas, de modo a encontrar a relação ideal taninos/antocianinas, que promova a estabilidade da cor;
- aumentar o número de remontagens durante a maceração a frio
- adicionar o mosto resultante da prensagem das massas vínicas no fim da maceração a frio, ao mosto de lágrima, antes da fermentação alcoólica, com o objetivo de melhorar a estrutura (corpo e aroma).

V. Referências Bibliográficas

- [1] Comissão Vitivinícola da Região dos Vinhos Verdes. <http://www.vinhoverde.pt> [acedido em 20 Julho 2017].
- [2] Mota T. Preservação de castas autóctones no noroeste português Variedades Tintas (Parte II / II). Agrotec. Agosto **2014**;11: 54-57.
- [3] Amaral A, Pereira OM. e Seabra L. Vinho Verde Tinto – contributo para a sua valorização. DRAEDM ;**2000**.
- [4] Magalhães N. Sistemática e Taxionomia em: Chaves Ferreira Publicações. Tratado de Viticultura: a videia, a vinha e o terroir. Lisboa; **2008**. 10-59.
- [5] Silva JA. Catálogo das Castas – Região Demarcada dos Vinhos Verdes. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação;**1986**.
- [6] Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche D, Lonvaud A.. Handbook of Enology- The Microbiology of Wine and Vinifications, Volume1. 2nd Edition. England.John Wiley & Sons. **2006**.
- [7] Cravero MC, Di Stefano R, I composti fenolici e l'origine varietale delle uve. Rivista de Viticulture y Enologia. **1990**; 1: 33-44.
- [8] Calò A, Tomasi D, Cravero MC, Di Stefano R. Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (Vitis sp), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoil tartarici della buccia di varietà a bacca rossa. *Annali dell'Istituto Sperimentale per L'Enologia Asti*. **1994**; Vol XXV (1054): 47-61.
- [9] Cabrita MJ, Ricardo-da-Silva J, Laureano O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos.I Seminário Internacional de Vitivinicultura. INIFAP: México: **2003**.
- [10] Mateus N. A Química dos Sabores do Vinho—os polifenóis. Revista Real Academia Galega de Ciencias. **2009**;28:5-22.
- [11] Costa, IMG. Influência dos processos de vinificação e da conservação sobre a composição fenólica do mosto e do vinho jovem da casta Vinhão (*Vitis vinífera L.*) [relatório

final] Ponte de Lima: Escola Superior Agrária de Ponte de Lima do Instituto Politécnico de Viana do Castelo. **1999**.

[12] Pereira GE, SANTOS JdO, Sepulveda C, Alves LA, editors. Influência do tipo de levedura e do uso de enzima pectolítica sobre a qualidade de vinhos tintos tropicais cv. Petit verdot. Embrapa Semiárido'-Resumo em anais de congresso (ALICE): In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE VITICULTURA Y ENOLOGIA, 11., 2007, Mendoza. Seduciendo al consumidor de hoy. Mendoza: IVV: CLEIFRA: SECYT, **2007**.

[13] Brouillard R, Dubois JE. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99(5), 1359-1364

[14] Brouillard R, Lang J. The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canadian journal of chemistry*. **1990**;68(5):755-61.

[15] Ribéreau-Gayon P. *C.R. Acad. Sciences*. **1965**; 260,341.

[16] Langcake P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene *Physiol. Plant Pathol.* **1981**; 18(2), 213-226.

[17] Araújo, PAC. Estudo da influência do grau de tostagem da madeira, na composição fenólica de um vinho de mesa tinto da casta Touriga Nacional, da Região Demarcada do Douro. [Dissertação] Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; **2015**.

[18] Cai J, Zhu BQ, Wang Y, Lu L, Lan Y, Reeves MJ, Duan C. Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chemistry*. **2014**;154: 217–229.

[19] Dal'Osto M. Emprego da maceração a frio na extração e estabilização de compostos fenólicos em vinhos de Syrah cultivada em ciclo de Outono-Inverno. [dissertação]. Piracicaba:Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz da Universidade de S.Paulo; **2012**.

- [20] Lukić I, Budić-Leto I, Bubola M, Damijanić K, Staver M. Pre-fermentative cold maceration, saignée, and various thermal treatments as options for modulating volatile aroma and phenol profiles of red wine. *Food Chemistry*. **2017**; 224: 251–261
- [21] Piccardo D, González-Neves G. Extracción de polifenoles y composición de vinos tintos Tannat elaborados por técnicas de maceración prefermentativa. *Agrociencia Uruguay*. **2013**; 17(1):36-44
- [22] Bayram M, Ozturk B, Anl E. The effect of cold maceration on the phenolic composition of red wines. *Proceedings of the 40th World Congress of Vine and Wine*. BIO Web of Conferences; **2017**.
- [23] Sacchi KL, Bisson LF, Adams DO. A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *American Journal for Enology and Viticulture*. **2005** ;5(3): 197-206.
- [24] Gomes-Miguéz M, González-Miret ML, Herédia F. Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*. **2007**;79: 271–278
- [25] Corte-Real D. Efeitos da maceração pré-fermentativa a frio e da aplicação de taninos enológicos na vinificação de tintos. [dissertação]. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa e Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; **2009**.
- [26] Aleixandre JL, Sanchez L, Aleixandre-Tudó JL, Lizama V, Garcia MJ, Alvarez I. Phenolic composition of Bobal red wines elaborated with prefermentative cold maceration. *Ciência Tecnologia. Vitivinícola*. **2012**. 27 (2) 61-72
- [27] Budić-Leto I, Lovrić T, Vrhovsek U. Influence of Different Maceration Techniques and Ageing on Proanthocyanidins and Anthocyanins of Red Wine cv. Babić (*Vitis vinifera*, L.). *Food Technology Biotechnology*. **2003**; 41 (4): 299–303
- [28] Ortega-Heras M, Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML. Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT - Food Science and Technology*. **2012**; 48:1-8

- [29] Mihnea M, Gonzalez-SanJose ML, Ortega-Heras M, Perez-Magarino S. A comparative study of the volatile content of Mencía wines obtained using different pre-fermentative maceration techniques. *LWT - Food Science and Technology*. **2015**;64: 32-41
- [30] Panprivech S, Lerno LA, Brenneman CA, Block DA, Oberholste A. Investigating the Effect of Cold Soak Duration on Phenolic Extraction during Cabernet Sauvignon Fermentation. *Molecules*. **2015**; 20: 7974-7989
- [31] Cejudo-Bastante MJ, Gordillo B, Hernanz D, Escudero-Gilete ML, González-Miret ML, Heredia FJ. Effect of the time of cold maceration on the evolution of phenolic compounds and colour of Syrah wines elaborated in warm climate. *International Journal Food Science Technology*. **2014**; 49:1886–1892.
- [32] Heatherbell D. *et al.* Effect of Prefermentation cold maceration on the composition, color and flavour of Pinot Noir wine. *Proceeding of the 4th Int. Symposium on Cool Climate Enology and Viticulture*. **1997**
https://www.researchgate.net/publication/284618092_Effect_of_prefermentation_cold_maceration_on_the_composition_color_and_flavor_of_Pinot_Noir_wine [acedido em 27 de Janeiro de 2018]
- [33] Marais J. Effect of Different Wine-Making Techniques on the Composition and Quality of Pinotage Wine. I. Low-Temperature Skin Contact Prior to Fermentation. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. **2003**;25(2):70-75
- [34] Cardoso, AD. O vinho da uva à garrafa. Âncora Editora. **2007**.
- [35] Heredia FJ, Escudero-Gilete ML, Hernanz D, Gordillo B, Meléndez-Martínez MJ, Vicario IM *et al.* Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of Syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chemistry*. **2010**;118: 377–383
- [36] Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector vitivinícola M. Ramirez y col. (eds.); Badajoz. **2007**.
<https://dialnet.unirioja.es> [acedido em 27 de Janeiro de 2018]

- [37] Reynolds A, Cliff M, Girard B, Kopp TG. Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **2001**;52: 235–240.
- [38] Schuller DE, Alves H, Dequin S, Casal, M. Estudo Ecológico das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* numa vinha da Região dos Vinhos Verdes em Portugal. **2005**.
- [39] Capozzi V, Garofalo C, Chiriatti MA, Grieco F, Spano G,. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research* **2015**;181: 75–83
- [40] Liu P, Lu L, Duan C, Yan G. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*. **2016**;71: 356-363
- [41] Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chemistry*. **2007**;104: 814–823
- .
- [42] ŠUČUR S, MARAŠ V, KODŽULOVIĆ V, RAIČEVIĆ J, MUGOŠA M, JUG T, et al. The impact of different commercial yeasts on quality parameters of Montenegrin red wine–Vranac and Kratošija. *Biol*. **2016**;1(1):1-4.
- [43] Taniasuri F, Lee P, Liu S. Induction of simultaneous and sequential malolactic fermentation in durian wine. *International Journal of Food Microbiology*. **2016**;230: 1–9
- [44] Holt H, Cozzolino D, McCarthy J, Abrahamse C, Holt S, Solomon M et al. Influence of yeast strain on Shiraz wine quality indicators. *International Journal of Food Microbiology*. **2013**;165: 302–311
- [45] Chen K, Escott C, Loira I, del Fresno JM, Morata A, Tesfaye et al. Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*. **2018**;69: 51-63

- [46] Favre G, Charamelo D, González-Neves G,. Empleo de taninos enológicos y maceración prefermentativa en frío en una experiencia de elaboración de vinos tintos Tannat. *Agrociencia Uruguay*. **2013**; 17 1:65-73
- [47] Kritzinger EC, Bauer FF, du Toit WJ. Role of Glutathione in Winemaking: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**; 61: 269–277
- [48] Smit AY, du Toit WJ, Stander M, du Toit,M. Evaluating the influence of maceration practices on biogenic amine formation in wine. *LWT - Food Science and Technology*. **2013**;53: 297-307
- [49] Cabrita MJ, Torres M, Palma V, Alves E, Patão R, Freitas AC. Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta*. **2008**;74(5):1281-1286.
- [50] Šučur S, Maraš, V, Kozulović V, Raićević J, Gazivoda A, Mogoša M, et al.. Effect of microbiological and technological parameters on Montenegrin red wines quality. *Proceedings of Sixth International Scientific Agricultural Symposium. Agrosym*. **2015**.
- [51] Cappello MS, Zapparoli G, Logrieco A, Bartowsky EJ. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International Journal of Food Microbiology*. **2017**;243: 16–27.
- [52] Dubourdieu D, Moine-Ledoux V. Propriedades e características das manoproteínas extraídas das paredes de levedura. www.infowine.com. *Revista Internet de Viticultura e Enologia*. **2007**;9: 1-9.
- [53] Gómez-Plaza E, Cano-López M. A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chemistry*. **2011**;125: 1131–1140
- [54] Trigo MSAS. Avaliação do efeito da micro-oxigenação na estabilidade da cor e perfil volátil dos vinhos. [dissertação]. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro;**2012**.

- [55] Aleixandre-Tudo JL, Nieuwoudt H, Olivieri A, Aleixandre JL, du Toit W. Phenolic profiling of grapes, fermenting samples and wines using UV-Visible spectroscopy with chemometrics. *Food Control*. **2018**;85:11-22.
- [56] Darné G.Madero-Tamargo J. Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides soluble totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques soluble totaux des organes de la vigne. *Vitis*. **1979**, 18(3),221-228.
- [57] Ensaíos OIV –<http://www.oiv.int> - acedido em 2018
- [58] Adega Cooperativa de Ponte da Barca -Procedimentos de Ensaio
- [59] CVRVV. Manual de Procedimentos de Ensaíos
- [60] Rizzon LA, Ambrosi Sganzerla VM. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. *Ciência Rural*, 37(3). **2007**.
- [61] Sommers TC, Evans ME. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "Chemical Age". *J. Sci. Food Agric.*, **1977**, 28, 279-287.
- [62] Oliveira J.; Santos-Buelga C.; Silva, AMS; de Freitas V.; Mateus N. Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine. *Anal. Clin. Chim. Acta*, **2006**, 563, 2-9;
- [63] Ribéreau-Gayon P, Stonestreet E. Dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **1966**, 2, 627-631
- [64] Darné G. Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne. PhD Thesis. *University of Bordeaux I*, France.**1991**;
- [65] Glories, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. PhD Thesis. Université de Bordeaux II, France, **1978**.
- [66] Mateus N, Proença S, Ribeiro P, Machado JM, De Freitas VAP. Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinífera* varieties concerning vineyard altitude. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, **2001c**, 3(2), 102-110;

- [67] De Freitas VAP, Mateus N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49(2), 940-945.
- [68] Jordão AM, Simões S, Gonçalves FJ, Correia AC. Estudo do potencial antioxidante de algumas castas tintas da Região do Dão e sua relação com a composição fenólica. Livro de Actas do 8º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora. ATEVA; **2010**.
- [69] Fernandes PADC. *Comportamento agronómico e enológico das castas Touriga Nacional e Syrah em seis regiões portuguesas* [Dissertação]. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Universidade Técnica de Lisboa; **2009**.
- [70] Castillo-Sanchez JX, Garcia-Falcon MS, Garrido J, Martinez-Barcallo E, Martins-Dias LR, Mejuto XC. Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*. **2008**; 106:18–26.
- [71] FERNANDES P, CRUZ A, Vieira C, Castro J, Lopes D, Lucas C, Ribeiro F, Ricardo-da-Silva J, Castro R, Comportamento agronómico e enológico das castas Syrah e Touriga Nacional em seis “Terroirs” de Portugal. Livro de Actas do 8º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora. ATEVA; **2010**
- [72] Dopico-Garcia MS, Figue A, Guerra L, Afonso JM, Pereira O, Valentão P, Andrade PB *et al.* Principal components of phenolics to characterize red *Vinho Verde* grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds?. *Talanta*. **2008**;75: 1190–1202
- [73] Araújo IMM. Características aromáticas e cromáticas das castas Amaral e Vinhão [dissertação]. Porto: Universidade do Porto e Universidade Técnica de Lisboa; **2004**
- [74] Roggero JP, Coen S, & Ragonnet B. High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to, anthocyanin metabolism. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1986**; 37(1), 77-83.
- [75] Di Stefano R, Moriondo G, Borsa D, Gentilini N, Foti S. Influenza di fattori climatici e culturali sul profilo antocianico varietale. *L' Enotecnico*. **1994**; 4: 73-77

- [76] Rivas-Gonzalo JC, Gutierrez Y, Hebrero E, & Santos-Buelga C. Comparisons of methods for the determination of anthocyanins in red wines. *American journal of enology and viticulture*. **1992**; 43(2), 210-214.
- [77] Mateus N, Proença S, Ribeiro P, Machado JM, & De Freitas V. Grape and wine polyphenolic composition of Red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude. *CYTA-Journal of Food*. **2001**; 3(2), 102-110.
- [78] Freitas VD. *Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin* (Doctoral dissertation, Bordeaux 2); **1995**.
- [79] Harbertson JF, Kilmister RL, Kelm MA, & Downey MO. Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation. *Food chemistry*. **2014**;160, 16-21.
- [80] Adams DO, & Harbertson JF. Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wines. *American journal of enology and viticulture*. **1999**; 50(3), 247-252.
- [81] Blouin J, Stonestreet E, & Papet N. Étude de la structure polyphénolique des vins rouges par analyses physico-chimiques et sensorielles. *OENO ONE: Journal internationale des sciences de la vigne et du vin= International journal of vine and wine sciences*. **2000**;34(1), 33-40.
- [82] Amerine MA. Further studies with controlled fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1955**; 6(2), 1-16.
- [83] Almela L, Javaloy S, Fernández-López J, López-Roca J. Comparison between the tristimulus measurements Yxy and L* a* b* to evaluate the colour of young red wines. *Food Chemistry*. **1995**;53(3):321-7.
- [84] Castillo-Sanchez JJ, Mejuto JC, Garrido J, Garcia-Falcon S. Influence of wine-making protocol and fining agents on the evolution of the anthocyanin content, colour and general organoleptic quality of Vinhão wines. *Food Chemistry*. **2006**; 97: 130–136
- [85] Revilla E, García-Beneytez E, Cabello F, Martín-Ortega G, & Ryan JM. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red

grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*. **2001**; 915(1-2), 53-60.

[86] Pina F, Oliveira J, de Freitas V. Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations. *Tetrahedron*. **2015**; 71(20), 3107-3114.

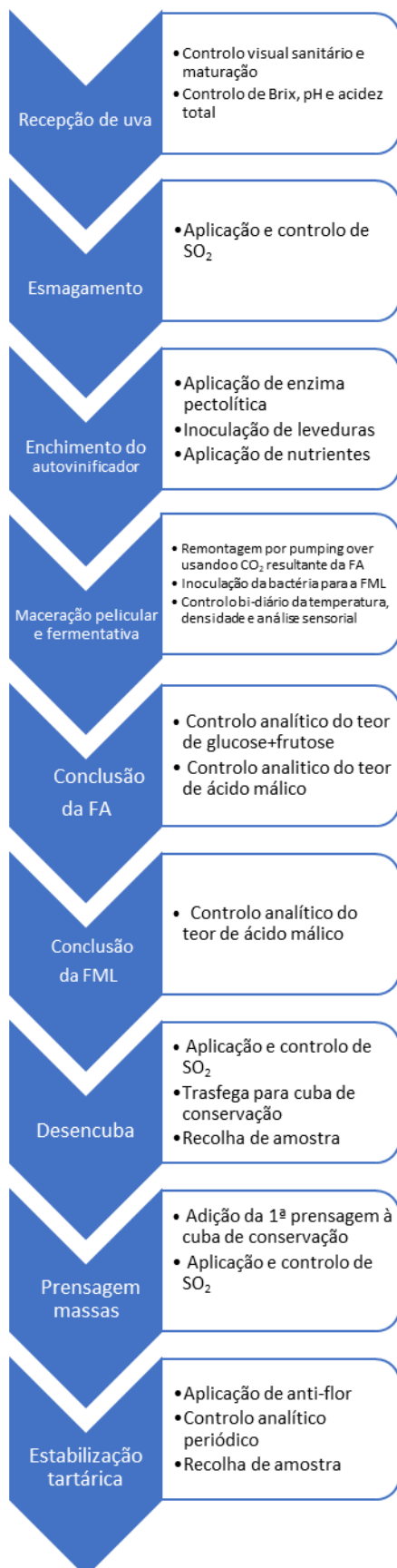
[87] Glories Y. Structure and properties of the polymerized phenolic compounds of red wines. *11. Precipitation and extraction in the presence of mineral salts. Action of proteins. Connaiss. Vigne Vin*. **1974**; 8, 375-93.

[88] SOUZA DDS, SILVA INEDS, CARVALHO ESS, SANTOS FN, SANTOS RDS, & BARROS A. Influência de métodos de vinificação não convencionais na composição físico-química e fenólica do vinho tinto Touriga Nacional do Vale do Submédio São Francisco. *In Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: ENCONTRO NACIONAL, 20.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 6., 2017. Belém, PA. Segurança e qualidade de alimentos. Belém, PA: LACEN: UFPA, **2017**.

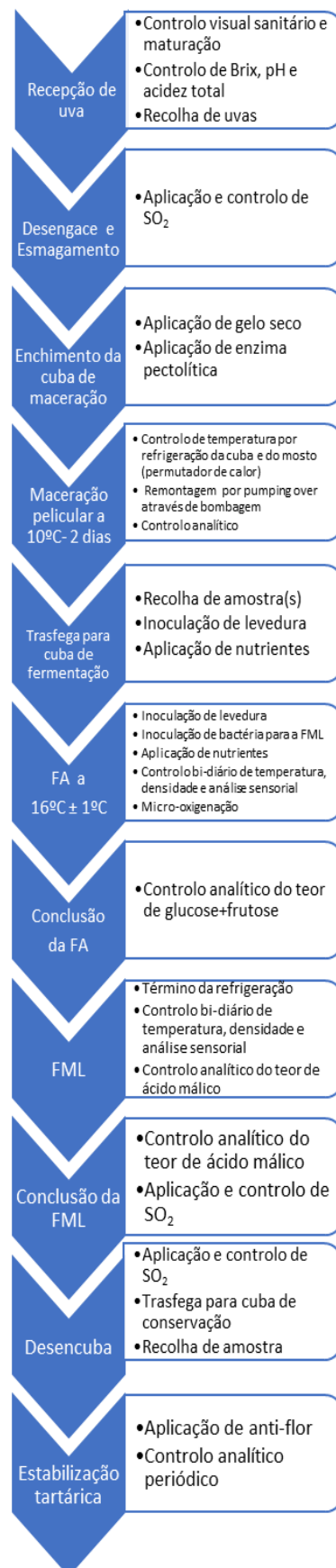
VI. Anexos

Anexo I

Esquema de Vinificação Tradicional



Esquema de Vinificação ensaiado



Anexo II

Análises físico-químicas ao longo do processo de vinificação

Tabela A.1 – Análises físico-químicas durante a maceração

Cuba	Análise Físico - Químicas		
68		1 dia	2 dias
	pH	3,01	3.15
	Acidez Total	13,3	7,2
	SO2 Total	24	26
69		1 dia	2 dias
	pH	3,11	3.17
	Acidez. Total	8,9	6,5
	SO2 Total	24	27
70		1 dia	2 dias
	pH	3,28	3,12
	Acidez. Total	9,6	7,3
	SO2 Total	30	25

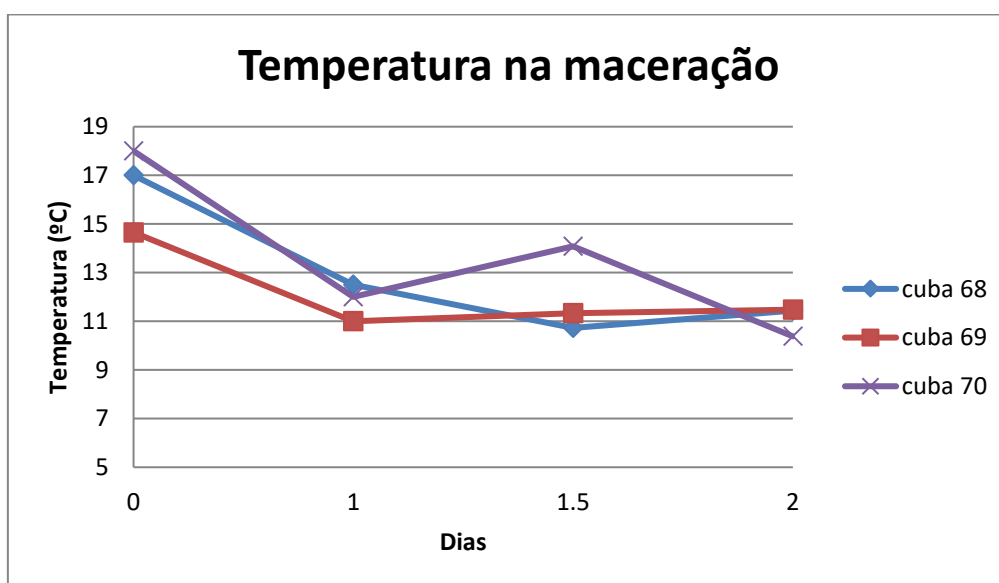


Figura A.1 – Evolução da temperatura ao longo da maceração a frio

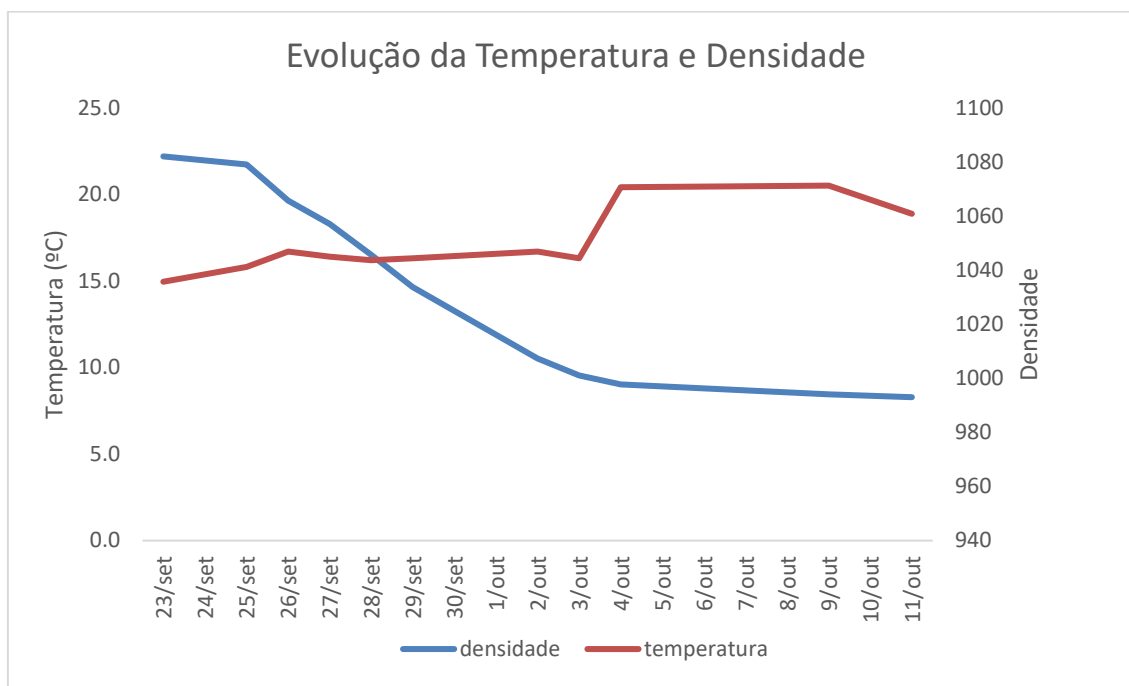


Figura A.2 – Evolução da temperatura e da densidade ao longo da FA e FML

Tabela A.2 – Análises físico-químicas ao longo da FA e FML

Parâmetros / unidades		início da FA	11 dias	12 dias	17 dias	19 dias	Desencuba
Acidez fixa	g/L (ácido tartárico)	9,3			7,70	6,2	6,2
Acidez total	g/L(ácido tartárico)	9,4	9,0	9,0	7,9	6,4	6,4
Acidez volátil	g/L (ácido acético)	0,09			0,14	0,18	0,17
Ácido L- málico	g/L	4,82	3,39	3,35	2,34	sem málico	sem málico
Ácido tartárico	g/L	1,8			0	1,7	1,6
Ácido láctico	g/L	0,02		0,39	1,58	2,94	2,56
Açucars totais	g/L			3,64	0,02	0,03	
Dióxido de enxofre livre	mg/L	7			9		29
Dióxido de enxofre total	mg/L	23			29		52
densidade		1082		998	994	993	
pH		3,25			3,30	3,43	3,48
Grau provável % vol		11,0					
Título alcoométrico volúmico total % vol							12,0

Anexo III



Ficha de Prova

Provedor

Data

Notação de 0 a 10											
Avaliação Visual											
	Amostra						Amostra				
Limpidez	1	2	3	4	5	Cor	1	2	3	4	5
Intensidade						intensidade da cor					
						qualidade da cor					
0 - turvo 10 - Cristalino						Branco					
						Rosado					
						Tinto					

Avaliação Olfativa						Avaliação Gustativa					
	Amostra						Amostra				
parâmetros	1	2	3	4	5	parâmetros	1	2	3	4	5
Frutos citrinos						doçura					
Fruto baga (vermelhos)						acidez					
fruto de árvores						amargor					
fruto tropical											
frutos secos						adstringência					
vegetal seco											
vegetal fresco						estrutura					
especiarias						equilíbrio					
floral											
balsâmicos						persistência					
empíreumáticos											
madeira											
Qualidade olfativa						Qualidade gustativa					
Obs:											