

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
Departamento de Ciências Químicas
Laboratório de Bromatologia e Hidrologia

Evolução das antocianinas, atividade antioxidante e parâmetros de cor no Vinho do Porto ao longo do seu envelhecimento

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo da Qualidade – Ramo de Especialização Água e Alimento

Orientador: Doutora Olga Maria da Silva Viegas

Coorientador: Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Mafalda Jacob Galante de Queiroz

Porto Setembro 2015

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Muitas pessoas devem a grandeza das suas vidas a problemas e obstáculos que tiveram que vencer.

Impele a tua própria Canoa.

Lord Robert Stephenson Smyth Baden-Powell (Escoteiro Chefe Mundial)

Agradecimentos

Existem ocasiões em que de facto devemos reconhecer e agradecer o apoio e carinho que outros nos dão. Por esta razão nesta dissertação, embora se trate de um documento de índole académica, não poderia já mais esquecer algumas pessoas sem as quais nunca o conseguiria ter terminado.

À minha família, mãe, Pai e irmão, que se fartaram de ouvir falar em mestrado e me empurraram na direção certa para o acabar.

Aos meus amigos e colegas de curso, pela opinião sincera e ajuda.

À Professora Doutora Isabel Ferreira, que tão prontamente me acolheu e me propôs este belíssimo tema que tanto gosto me tem dado a escrever.

À minha orientadora Doutora Olga Viegas sem ela não conseguiria passar da teoria para a prática.

A todos os colegas do departamento de Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, em especial ao Doutor Armindo Melo pelo conhecimento e ajuda na determinação das antocianinas.

A todos com quem trabalhei durante as duas vindimas na Quinta da Roeda, e em especial à D. Fátima e ao Sr. Machado, por aturarem os meus telefonemas, todos os meus devaneios durante as vindimas que fizemos juntos (espero que a essas se juntem muitas mais) e desvios ao seu trabalho para recolherem as minhas preciosas amostras, sem as quais não poderia realizar a parte prática deste mestrado.

Ao Sr. David Guimaraens, pois se ele não desse a sua aprovação esta tese de mestrado nunca sairiam do papel.

O meu mais profundo e sincero obrigada por tudo o que fizeram por mim. Espero um dia ser capaz de retribuir em igual ou superior dimensão e generosidade.

Resumo

O vinho do Porto é um dos produtos da gastronomia Portuguesa mais emblemático e a cor é um parâmetro relevante para a sua caracterização. Associado a esta estão os compostos fenólicos, nomeadamente, os flavonoides, com destaque para as antocianinas, como responsáveis não só pela cor, mas também pela atividade antioxidante.

Neste trabalho foram estudadas amostras recolhidas em sete etapas da vinificação, fazendo parte de um lote de uvas que foram divididas por dois métodos, o tradicional em lagares de granito e a cuba mecânica. No presente estudo efetuou-se a avaliação do perfil de antocianinas, bem como a sua quantificação por HPLC-DAD, procedeu-se também à quantificação dos polifenóis totais e capacidade antioxidante recorrendo às técnicas em microplaca de DPPH e ABTS. Relativamente à avaliação colorimétrica as técnicas escolhidas foram, as coordenadas CIELab e as medições espectrofotométricas dos índices de Glories.

A análise do perfil de antocianinas revelou que a Malvidina-3-glucósido foi a mais prevalente em todas as amostras, não obstante foram encontradas diferenças quantitativas em relação aos diferentes tipos de vinificação e as três primeiras etapas, já durante a maturação os valores foram similares. Este tipo de perfil foi também observado em relação às metodologias de quantificação de fenólicos totais e capacidade antioxidante. Na cor o que se observou foi que o parâmetro L^* se manteve constante ao longo de toda a amostragem e que os parâmetros a^* e b^* estão interligados, no entanto os índices de Glories permitiram acompanhar mais adequadamente as modificações de cor que ocorreram. Observou-se que a %V foi a mais relevante e que influenciou grandemente a intensidade de cor.

Palavras-chave: Antocianinas; Atividade antioxidante; Cor; Vinho do Porto
Vinificação.

Abstract

Port wine is one of the Portuguese gastronomy flagship products, its color being one of the traits that characterizes it. Associated with this are phenolic compounds, particularly flavonoids with special emphasis on anthocyanins, as responsible not only for color but also for antioxidant activity.

In this work the samples studied were selected from seven stages of the winemaking as part of a batch of grapes divided by two kinds of methods, the traditional lagares in granite and mechanical vat. In the present study was performed the evaluation of anthocyanin profile as well as its quantification by HPLC-DAD, also held up the quantification of total phenolic and antioxidant capacity by microplate techniques of DPPH and ABTS. For the colorimetric part the chosen techniques were CIELab coordinates and spectrophotometric measurement of Glories indexes.

For the analysis of anthocyanins profile, it was found that malvidin-3-glucoside was the most prevalent in all samples, although quantitative differences were found in relation to the different type of winemaking process and the first three steps, as for the maturation values were up holding steady. This type of profile was also observed regarding the methods of quantification of total phenolic and antioxidant capacity. As for the color methodologies the observed was that the parameter L^* was constant throughout the sampling and the parameters a^* and b^* are interconnected. The Glories indexes were an appropriate procedure to follow the colour changes. It was observed that the % V was the most important and greatly influenced color intensity.

Keywords: Anthocyanins; Antioxidant activity; Color; Port Wine; Winemaking.

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de abreviaturas.....	xvii
Objetivos.....	19
Parte I - Introdução.....	21
1.1 – A Produção de Vinho em Portugal.....	23
1.1.1 - O Consumo de Vinho em Portugal.....	24
1.2 - A Região do Douro.....	25
1.2.1 - Localização Geográfica.....	25
1.2.2 - Clima e Solos.....	26
1.3 - O Vinho do Porto.....	28
1.3.1 - Produção do Vinho do Porto.....	29
1.3.2 - Tipologias do Vinho do Porto.....	31
1.4 - Cor.....	34
1.4.1- Cor nos Vinhos.....	35
1.4.2 - Metodologias Utilizadas para Avaliar a Cor do Vinho.....	35
1.5 - Compostos Fenólicos no Vinho.....	38
1.5.1- Compostos Não Flavonóides.....	39
1.5.1.1 - Ácidos Fenólicos.....	39
1.5.1.2 – Estilbenos.....	40
1.5.2 - Os Compostos Flavonóides.....	41
1.5.2.1 - Flavonas e Isoflavonas.....	42
1.5.2.2 – Flavonóis.....	43
1.5.2.3 - Flavanonóis.....	44
1.5.2.4 - Antocianinas.....	45
1.5.2.5 - Flavan-3-óis.....	47
1.5.3 - Metodologias de Análise dos Compostos Fenólicos no Vinho.....	51
1.6 – Antioxidantes.....	53

1.6.1 - Antioxidantes no Vinho.....	54
1.6.2 - Metodologias Analíticas para Análise de Antioxidantes.....	55
Parte II – Materiais e Métodos.....	57
2.1 – Material.....	59
2.1.1 - Equipamentos.....	59
2.1.2 - Reagentes.....	60
2.1.3 - Padrões.....	60
2.2 – Amostragem.....	61
2.3 - Procedimentos Experimentais.....	62
2.3.1 - Colorimetria.....	62
2.3.1.1 - Índices de Glories.....	62
2.3.1.2 – Coordenadas CIEL*a*b*	63
2.3.2 – Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante.....	64
2.3.2.1 – Pré-tratamento da Amostra.....	64
2.3.2.2 – Fenólicos Totais (Folin-Ciocalteu).....	64
2.3.2.3 – DPPH (atividade antioxidante).....	66
2.3.2.4 – ABTS (atividade antioxidante).....	68
2.3.3 – Composição em Antocianinas.....	70
2.4 – Análise Estatística dos Resultados Obtidos.....	72
Parte III – Resultados e Discussão.....	73
3.1 – Colorimetria.....	75
3.1.1 – Índices de Glories.....	75
3.1.2 – Coordenadas CIELab.....	79
3.2 – Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante.....	82
3.3 – Composição em Antocianinas.....	85
Parte IV – Conclusões.....	91
Parte V - Referências Bibliográficas.....	97

Lista de Figuras

Figura 1: Localização geográfica da Região do Douro.....	25
Figura 2: Representação gráfica da divisão em sub-regiões da região do Douro.....	26
Figura 3: Esquema resumo de como é produzido o vinho do Porto, desde a vindima até ao seu engarrafamento.....	29
Figura 4: Exemplo de um macaco de madeira utilizado na remontagem do vinho do Porto.....	30
Figura 5: Fluxograma representativo dos vários tipos de Vinho do Porto segundo as características respeitantes ao tipo.....	31
Figura 6: Imagem representativa das várias tonalidades que o vinho do Porto pode adquirir, passando pelas castas brancas, rosés e tintas.....	33
Figura 7: Esquema representativo do método de coordenadas geométricas CIEL*a*b*, cores e luminosidade correspondentes.....	37
Figura 8: Classificação química dos Compostos Fenólicos.....	38
Figura 9: Estrutura química geral de um flavonóide.....	41
Figura 10: Estrutura geral dos Flavonóis.....	43
Figura 11: Estrutura química geral das antocianinas.....	45
Figura 12: Estrutura química geral de um Flavan-3-ol.....	47
Figura 13: Estrutura química das catequinas e epicatequinas.....	48
Figura 14: Estrutura química das galhocatequinas e epigalhocatequinas.....	48
Figura 15: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a preparação das amostras para a realização dos índices de Glories.....	62
Figura 16: Fluxograma explicativo do procedimento realizado para a medição das coordenadas CIEL*a*b*.....	63
Figura 17: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a realização da metodologia de Folin – Ciocalteu.....	65
Figura 18: Esquema da configuração da placa utilizada na metodologia de Folin-Ciocalteu.....	65
Figura 19: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a realização da metodologia de DPPH.....	67
Figura 20: Esquema da configuração da placa utilizada na metodologia de DPPH.....	67
Figura 21: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a preparação da solução de trabalho de ABTS* ⁺	68
Figura 22: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a realização da metodologia de ABTS* ⁺	69
Figura 23: Esquema da configuração da placa utilizada na metodologia de ABTS.....	69

Figura 24: Fluxograma resumo explicativo da preparação das amostras para a metodologia de antocianinas.....	70
Figura 25: Gráfico de colunas representativo da comparação de comprimentos de onda analisados individualmente e intensidade de cor para etapas de vinificação.....	76
Figura 26: Gráfico de colunas representativo da comparação de comprimentos de onda analisados individualmente e intensidade de cor para etapas de maturação.....	77
Figura 27: Gráfico de colunas representativo da comparação entre índices calculados e amostras das etapas de vinificação.....	78
Figura 28: Gráfico de colunas representativo da comparação entre índices calculados e amostras das etapas de maturação.....	78
Figura 29: Gráfico de dispersão que compara as medições das coordenadas a* e b* para as amostras das etapas de vinificação.....	80
Figura 30: Gráfico de dispersão, que compara as medições das coordenadas a* e b* para as amostras das etapas de maturação.....	81
Figura 31: Cromatogramas representativos de 3 etapas da amostragem para identificação e quantificação de antocianinas.....	85
Figura 32: Gráfico representativo da variação da quantidade de Malvidina-3-glucósido relativamente às etapas de processamento 1, 2 e 3 para cuba e lagar respetivamente.....	87
Figura 33: Gráfico representativo da variação da quantidade de Cianidina-3-glucósido relativamente às etapas de processamento 1, 2 e 3 para cuba e lagar respetivamente.....	87
Figura 34: Gráfico representativo da variação da quantidade de Delphinidina-3-glucósido relativamente às etapas de processamento 1, 2 e 3 para cuba e lagar respetivamente.....	88

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resumo referente ao consumo e exportações portuguesas relativas respetivamente ao período de 2005 a 2015 e ano de 2014.....	24
Tabela 2: Caracterização dos vinhos Branco quanto á sua doçura.....	32
Tabela 3: Tabela de correspondência entre o comprimento de onda e as cores absorvidas e transmitidas do espectro do visível, adaptado de Juster, 1962.....	34
Tabela 4: Estrutura química de alguns exemplos de compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos Ácidos Fenólicos.....	40
Tabela 5: Estrutura química dos Estilbenos mais comuns nas uvas.....	41
Tabela 6: Estrutura geral das flavonas e isoflavonas, nomes e radicais substituintes nas flavonas.....	42
Tabela 7: Estrutura química geral os principais flavonóis presentes nas uvas.....	43
Tabela 8: Estrutura química geral e substituintes dos principais flavanonóis.....	44
Tabela 9: Estrutura química das principais antocianinas presentes nas uvas.....	46
Tabela 10: Estrutura química da malvidina e locais de substituição dos radicais que constituem os monoglucosídeos e os diglucosídeos.....	46
Tabela 11: Estrutura estereoquímica referente às formas monoméricas dos flavan-3-óis.....	49
Tabela 12: Estrutura química de antocianidinas e os seus radicais.....	50
Tabela 13: Resumo dos compostos fenólicos que podem ser encontrados no vinho do Porto com recurso a diferentes metodologias analíticas.....	52
Tabela 14: Resumo das metodologias espectrofotométricas utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante em amostras de sumos de fruta e bebidas.....	56
Tabela 15: Descrição das várias etapas nas quais foram recolhidas amostras para a realização das metodologias escolhidas para esta tese.....	61
Tabela 16: Programa utilizado para o gradiente da corrida de HPLC-DAD da quantificação e identificação de antocianinas.....	71
Tabela 17: Resultados obtidos para os índices de Glories para as diferentes etapas de vinificação.....	75
Tabela 18: Resultados obtidos para os índices de Glories para as amostras das etapas de maturação.....	76
Tabela 19: Resultados obtidos para as coordenadas $L^*a^*b^*$, para as diferentes etapas de vinificação.....	79
Tabela 20: Resultados obtidos para as coordenadas $L^*a^*b^*$, as diferentes etapas de maturação.....	79
Tabela 21: Resultados obtidos para as diferentes técnicas de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e de atividade antioxidante (DPPH e ABTS), em relação às diferentes etapas da vinificação.....	82

Tabela 22: Resultados obtidos para as diferentes técnicas de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e de atividade antioxidante (DPPH e ABTS), em relação às diferentes etapas da maturação.....83

Tabela 23: Resultados obtidos correspondentes a cada uma das antocianinas identificadas para as diferentes etapas da vinificação.....86

Tabela 24: Resultados obtidos correspondentes a cada uma das antocianinas identificadas, para as diferentes etapas da maturação.....88

Lista de Abreviaturas

%A – Percentagem de Amarelo
%B – Percentagem de Azul
%Vol. – Grau Alcoólico Volumétrico
%V – Percentagem de Vermelho
 $^1\text{O}_2$ – Radical Oxigénio Singlete
AAPH – Dicloro de 2,2'- azobis(2-amidinopropano)
ABTS – Ácido 6-hidro-2-5-7-8-tetrametilcromo 2- carboxílico
ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variâncias)
 C_{18} – Octadecilsilano
C.I.E. – Comission International d'Eclairage
Cy-3-gluc – Cianidina – 3- glucósido
DAD – *Diode Array Detector* (Detetor de Díodos)
DMPD – N,N – dimetil – p – fenilenodiamina
DOC – Denominação de Origem Controlada
Dp-3-gluc – Delfinidina-3-glucósido
DOP – Denominação de Origem Protegida
DPPH – 2,2- difenil – 1- picril – hidrazina
ELISA – *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)
EI – *Electron Impact* (Impacto de Electrões)
ESI – *Electrospray Ionization Source* (Ionização Eletrospray)
ET – Equivalentes de Trolox
 Fe^{3+} -TPZ – Complexo Férrico – Tripiridiltriazina
 Fe^{2+} -TPZ – Complexo Ferroso – Tripiridiltriazina
 FeCl_3 – Cloreto Férrico
FRAP – Capacidade de Redução Férrica
GAE – *Galic Acid Equivalents* (Equivalentes de Ácido Gálhico)
GC – Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)
HCl – Ácido Clorídrico
 $\text{HO}_2^\cdot$ - Radical Hidroperóxido
 $\text{HO}^\cdot$ - Radical Hidroxilo
 H_2O_2 – Peroxido de Hidrogénio
HPLC – *High Performance Liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IC – Intensidade de Cor
IG – Indicação Geográfica
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
LBV - Late Bottle Vintage
MS- Mass Spectrometry
 $\text{NO}^\cdot$ - Óxido Nítrico ou Monóxido de Azoto
 $\text{NO}_2^\cdot$ - Dióxido de Azoto
 NO_2Cl – Cloreto de Nitrilo
 $\text{O}_2^\cdot$ - Radical Superóxido
O.I.V. – Office International de La Vigne et du Vin
 $\text{ONOO}^\cdot$ - Radical Peroxinitrito
ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigénio)
Pn-3-galac - Peonidina-3-glucósido
Pt-3-gluc – Petunidina-3-glucósido
RNS – *Reactive Nitrogen Species* (Espécies Reativas de Azoto)
ROS – *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigénio)
 SO_2 – Dióxido de Enxofre
SPE – *Solid Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida)
SPSS- *Statistical Package for the Social Sciences*
UV/VIS – Ultra Violeta/Visível

Objetivos

Os objetivos desta dissertação de mestrado foram:

- Conhecer a composição em polifenóis, atividade antioxidante e parâmetros de cor ao longo do processamento do vinho do Porto;
- Comparar a composição do Vinho do Porto feito em lagar (procedimento tradicional) e outro feito em cuba mecânica (procedimento industrial moderno), a partir de um mesmo lote de uvas.

Publicações desenvolvidas no decurso da preparação desta dissertação

M. Queiroz, O. Viegas, A. Melo, I.M.P.L.V.O. Ferreira “Evolution of phenolic and anthocyanins in Port Wine” no IJUP’15 – 8º Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto – 12, 13 e 14 de Maio de 2015, na Reitoria da Universidade do Porto

Parte I

Introdução

1.1 – O vinho em Portugal

1.2 - Região do Douro

1.3 – O Vinho do Porto

1.4 - Cor

1.5 - Compostos fenólicos no vinho

1.6 - Antioxidantes

1.1 – A Produção de Vinho em Portugal

Crê-se que foram os Tartéssios o povo que cultivou a vinha pela primeira vez na Península Ibérica por volta de 2000 a.C.. Desde então os vários povos que por aqui passaram utilizaram o vinho não só para consumo próprio, mas também como moeda de troca no comércio e em cerimónias religiosas. Ao longo de milénios foram sendo adquiridos novos conhecimentos, práticas e técnicas na área. ^[1,2]

Avançando até à época dos descobrimentos, tanto as caravelas, como as naus que partiam à descoberta transportavam nos seus porões vinho que lhes servia de lastro e moeda nas trocas comerciais com os povos do Oriente e do Brasil. O vinho que não era vendido, retornava aos produtores e por sofrer alterações vantajosas à sua qualidade durante a viagem, era vendido a preços mais elevados, razão pela qual em meados do século XVI, Lisboa se tronara o maior centro de consumo e distribuição de vinho de todo o Império. Mais tarde já no século XVIII, o Marquês de Pombal, instituiu uma série de medidas que incentivaram o desenvolvimento da vitivinicultura na região do Douro, na altura dominado pelos ingleses, fazendo desta a primeira região demarcada do país e do mundo e convertendo as exportações de Porto e Moscatel no ex-líbris português. ^[1,2]

A segunda metade do século XIX, foi a mais nefasta para a vinha, pois esta foi atacada por pragas e doenças responsáveis pela diminuição da produção de vinho. A bem conhecida filoxera foi a mais devastadora de todas. Entre 1900 e 1986, Portugal sofreu várias alterações tanto ao nível da reorganização das regiões vitivinícolas, como também na criação de organismos reguladores e cooperativistas e ainda na modernização das técnicas de produção vinícola. Com a entrada para a União Europeia, foram introduzidas novas regras e metodologias a fim de se cumprir a regulamentação das políticas agrícolas Europeias e também favorecer a qualidade do vinho. ^[1,2]

1.1.1 - O Consumo e Exportação de Vinho em Portugal

O sector vitivinícola português transpõe um elevado interesse tanto pelo valor económico que gera como pelo papel que desempenha a nível social e de empregabilidade. De acordo com um estudo realizado pelo “Wine Institute”, Portugal apresenta-se bem qualificado quer a nível de exportações, que a nível de consumo de vinho *per capita*.^[1,3]

O vinho português tem conseguido afirmar-se a nível internacional por ser uma proposta única e diferenciadora, baseada na diversidade e singularidade das suas castas e dos seus terroirs, a que se associa uma qualidade muito consistente e uma excelente relação qualidade-preço.^[1,3]

Hoje a reputação internacional dos vinhos Portugueses é inquestionável. As exportações de vinho português demonstram também este dinamismo do sector, visto que registaram um desempenho bastante favorável nos últimos anos (Tabela 1).^[1,3]

Tabela 1: Resumo referente ao consumo e exportações portuguesas relativas respetivamente ao período de 2005 a 2015 e ano de 2014. (adaptado de <http://www.viniportugal.pt/>)^[1]

Milhares de hl	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12	12/13	13/14	14/15
Produção	7266	7543	6073	5689	5894	7148	5622	63327	6231	6195
Consumo	5889	5666	5114	5392	5518	5450	5455	4523	4376	4234
Exportações 2014	Vinho 283	Vinho Licoroso 154	Vinho DOP 112	Vinho IG 82	Vinho espumante e espumosos 4			Mostos/outros vinhos 3		

1.2 - A região do Douro

A região do Douro é a mais antiga (1756) e emblemática, das regiões vitivinícolas demarcadas do nosso país, tendo adquirido por direito próprio a Denominação de Origem Controlada (DOC) para os Vinhos Comuns (mesa) e Especiais “Generosos” (Vinho do Porto). [2, 4]

1.2.1 - Localização Geográfica

A região do Douro localiza-se no Nordeste de Portugal, na bacia hidrográfica do Douro, entre as serras do Marão a norte e Montemuro a sul, e desde Barqueiros a oeste até Mazouco a este (Figura 1). Fazem ainda parte desta região os afluentes do Douro, sendo os mais importantes o Tua e o Corgo. Possui uma área cerca de 250 000 hectares apesar de apenas cerca de 40 000 hectares serem de área vitivinícola. [4, 5]



Figura 1 - Localização geográfica da Região Douro [5]

Sendo a região do Douro muito vasta, esta encontra-se dividida em três sub-regiões, são elas: o Baixo Corgo, o Cima Corgo, sendo a junção destes também chamada de Alto Douro e o Douro Superior (Figura 2) que faz fronteira com Espanha. [2, 4, 5]

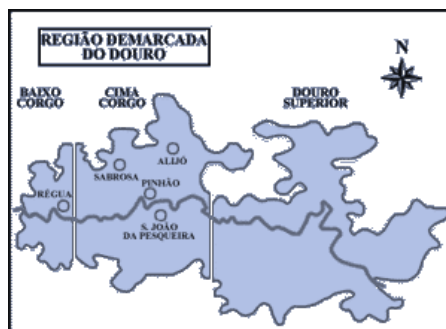


Figura 2: Representação gráfica da divisão em sub-regiões da região do Douro ^[3]

Cada uma destas sub-regiões vai pertencer a um de 4 distritos (Vila Real, Bragança, Viseu e Guarda), 22 conselhos ou 172 freguesias que compõem toda a região. Em termos representativos, a região possui mais de 200 milhões de cepas que são trabalhadas por cerca de 34000 viticultores, sendo que os pequenos viticultores com áreas de terra inferiores a 0,5 Ha representam 2/3 da área total e encontram-se presentes um pouco por toda a região. Ainda assim, as grandes explorações estão concentradas na sub-região do Douro Superior. ^[4, 5, 7]

Em termos de área geográfica ocupada, o Baixo Corgo possui a maior percentagem de vinha plantada, 14831 Ha, comparando com a sua área total 45000 Ha, o que equivale a mais ou menos 33%. Já o Cima Corgo, tem uma área total de 95.000 Ha mas apenas 17937 Ha de vinha plantada o que equivale aproximadamente a 19%. O Douro Superior, tem uma área total de 110000 Ha, mas apenas 7723 Ha estão plantados com vinha, equivalendo a 7%, devido a ser uma região de muito difícil acesso. ^[4, 5, 8]

1.2.2 - Clima e Solos

Os solos durienses (são assim denominados os solos da região do Douro), são essencialmente compostos por xisto, embora, a rodear toda essa zona, existam solos graníticos, este fator faz com que os solos tenham uma textura ligeira, sejam ácidos e tenham pouca capacidade de retenção de água e nutrientes. A forte inclinação do terreno torna os solos particularmente difíceis de trabalhar. Tendo sido por isso necessário criar um sistema de socalcos, patamares e vinha ao alto. Os socalcos assemelham-se a varandas separadas por muros de xisto, os patamares são constituídos por terraços construídos mecanicamente sem muros de suporte às terras e a vinha ao alto é tipo de plantação que tem em conta a drenagem dos terrenos e o espaço necessário para a mecanização e movimentação das máquinas na vinha. Por outro lado, estes solos são

benéficos para a longevidade das vinhas e permitem mostos mais concentrados de açúcar e cor. [2, 5, 9]

Relativamente ao clima cada sub-região sofre alterações climáticas variadas, devido diferenças na cota, com o rio que variam entre os 100 e os 150 metros bem como as encostas com altitudes entre os 400 e os 700 metros, e a exposição solar nos vales profundos. [2, 5, 10]

De um modo geral, o clima é bastante seco e os conjuntos montanhosos oferecem às vinhas proteção contra os ventos, mesmo assim as variações de temperatura e precipitação variam durante o ano sendo que no inverno os termómetros podem chegar aos 0°C e a precipitação é alta e no verão as temperaturas chegam a atingir os 45° C. [2, 5, 10]

No Baixo Corgo o ar é mais húmido e fresco, pois recebe ainda alguma influência atlântica e a pluviosidade é mais elevada, ajudando a fertilizar os solos e a aumentar a produção. No Cima Corgo, o clima é mediterrâneo e no Douro Superior chega mesmo a ser desértico. O melhor vinho do Porto é feito nas encostas mais áridas e próximas do rio, enquanto os vinhos de mesa são produzidos nas encostas mais frescas. A região do Baixo Corgo, outrora considerada a melhor região para a produção do vinho do Porto, revela melhores condições para a produção de vinho de mesa. Na zona do Pinhão (Cima Corgo) os bagos de uva atingem maior concentração de açúcar, sendo uma área considerada perfeita para a produção de vintages. Os vinhos brancos, espumantes e o generoso Moscatel provêm das regiões mais altas de Cima Corgo e Douro Superior. [2, 5, 10]

1.3 – O Vinho do Porto

O Vinho do Porto é um vinho generoso, produzido na Região Demarcada do Douro. Entende-se por vinho generoso ou também denominado de licoroso como sendo um vinho ao qual foi adicionada aguardente durante a fermentação, evitando a transformação total dos açúcares em álcool. O vinho torna-se assim mais doce e alcoólico do que os vinhos de mesa. ^[4,5,11]

Após o período da Filoxera que afetou gravemente a região do Douro as castas recomendadas que são usadas na região para a denominação de Origem Porto são 29, sendo 15 tintas e 14 brancas. Dentro das tintas encontramos: Bastardo, Donzelinho Tinto, Mourisco, Touriga Franca, Tinta Roriz, Tinta Francisca, Tinto Cão, Touriga Nacional, Cornifesto, Malvasia Preta, Piriqueta, Rufete, Tinta Amarela, Tinta Barca e Tinta Barroca. Nas brancas encontramos: Donzelinho Branco, Esgana Cão, Folgazão, Gouveio ou Verdelho, Malvasia Fina, Rabigato, Viozinho, Arinto, Boal, Cercial, Códega, Malvasia Corada, Moscatel Galego e Fernão Pires. ^[4,5]

A denominação de "Vinho do Porto" é explicada pelo facto do vinho ser armazenado e comercializado a partir do porto situado entre a cidade do Porto e Vila Nova de Gaia. O vinho descia o rio Douro nos barcos rabelo e envelhecia nos armazéns de Vila Nova de Gaia, já que esta zona apresenta poucas variações de temperatura durante o ano. ^[10, 12]

O processo de vinificação do vinho do Porto é baseado na tradição e inclui genericamente as fases de, esmagamento/desengace, fermentação/maceração, prensagem das massas, envasilhamento em cuba, aguardentação (77%), lotação e o armazenamento. Sendo que conforme o tipo específico de vinho estas fases podem ser alteradas. ^[4, 5]

1.3.1 – Produção do Vinho do Porto

O Vinho do Porto, inicia o seu processo de vinificação através de métodos tradicionalmente utilizados na produção da maioria dos vinhos. Ou seja, começa por ser vindimado (figura 3, n.º 1) em meados de setembro, tradicionalmente à mão, sendo que as uvas serão depois transportadas para a adega onde são avaliadas pelo enólogo e inspecionadas num tapete de escolha (figura 3, n.º 2) antes de serem desengaçadas (remoção das uvas dos seus cachos) (figura 3, n.º 2).^[13]

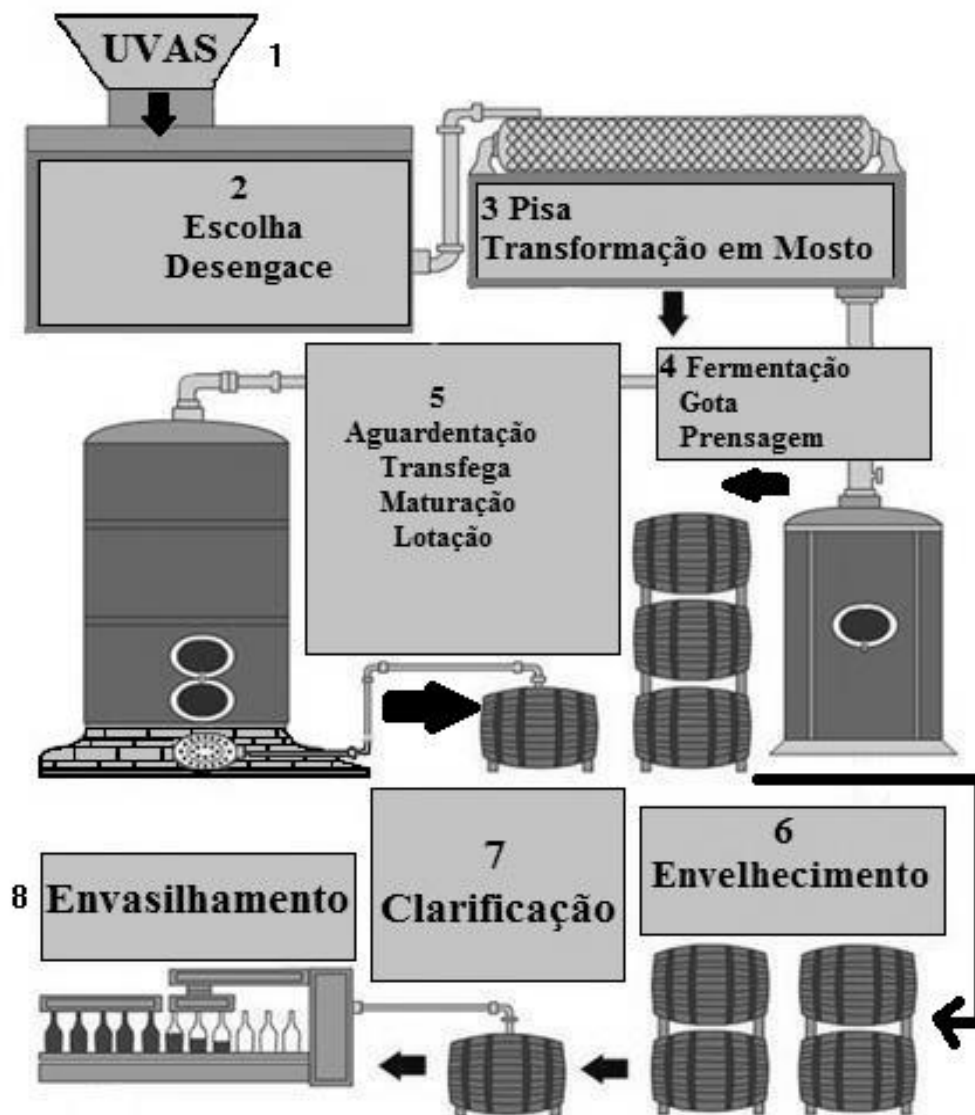


Figura 3: Esquema resumo de como é produzido o vinho do Porto, desde a vindima até ao seu engarrafamento.

Adaptado

de

<https://www.softchalk.com/lessonchallenge09/lesson/wineTutorial/wineTutorial4.html>^[14]

Após o desengace, as uvas são esmagadas (Figura 3, n.º 3) em lagares (tanques de pedra abertos, com uma altura máxima de 60 cm). Esta operação, conhecida por pisa, é tradicionalmente feita por homens, podendo também ser executada por modelos mecânicos que simulam a pisa a pé. O esmagamento é composto por duas etapas, a primeira o corte, é executada pisando metodicamente e em unísono, para assegurar que todas as uvas são completamente esmagadas. A segunda etapa, chamada liberdade, os pisadores trabalham individualmente, movendo-se livremente por todo o lagar, assegurando que as peles das uvas são mantidas submersas sob a superfície do mosto.^[13]

O mosto em fermentação fica então em repouso durante algumas horas e é novamente esmagado (remontagem), com a ajuda de êmbolos compridos de madeira, chamados "macacos" (Figura 4), os quais são usados para empurrar as peles das uvas para baixo da superfície do vinho, até à altura em que é separado das partes sólidas (prensagem) (Figura 3, n.º 4) a fim de ser adicionada a aguardente (Figura 3, n.º 5).^[13]



Figura 4: Exemplo de um macaco de madeira utilizado na remontagem do vinho do Porto (adaptado de www.ivdp.pt)^[5]

Quando cerca de metade do açúcar inicial natural do sumo da uva foi transformado em álcool pela fermentação, o enólogo dá o sinal para dar início ao processo de fortificação, o vinho é então, retirado do lagar e transferido (Figura 3, n.º 5) para uma cuba. À medida que o vinho em fermentação é transferido para a cuba, vai-lhe sendo adicionado aguardente vínica (bebida espirituosa neutra, incolor, com um teor alcoólico de 77%, é geralmente adicionada na proporção de aproximadamente 115 litros de aguardente por cada 435 litros de vinho em fermentação, embora esta proporção possa variar).^[13]

Após as vindimas, o vinho permanece na adega no Douro, onde repousa (Figura 3, n.º 5) até à primavera do ano seguinte, altura em que é transportado para as caves da empresa em Vila Nova de Gaia para envelhecer, ser loteado (Figura 3, nº 5, 6, 7 e 8) e engarrafado. Antes de ser levado para as caves, cada vinho é avaliado, decidindo-se a qual estilo de vinho do Porto será destinado. O vinho será então colocado em cascos ou cubas, conforme o caso, para começar o seu processo de envelhecimento.^[13]

1.3.2 -Tipologia do Vinho do Porto

O Vinho do Porto distingue-se dos vinhos de mesa pelas suas características particulares: uma enorme diversidade de tipos, um teor alcoólico elevado (geralmente compreendido entre os 19 e os 22% vol.), uma vasta gama de doçuras e uma grande diversidade de cores. Para que consigam ser distinguidos existem um conjunto de designações que possibilitam a sua identificação (Figura 5). [4, 5, 14]

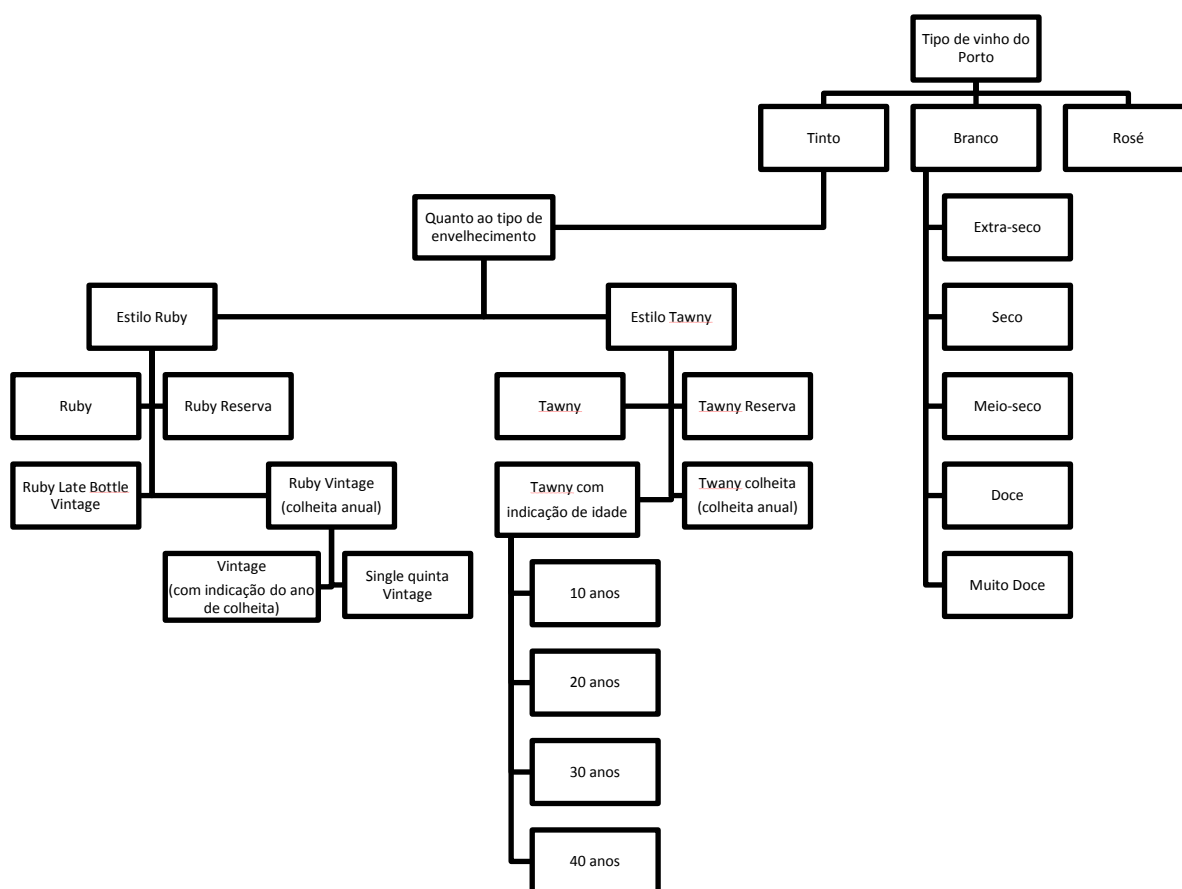


Figura 5: Fluxograma representativo dos vários tipos de Vinho do Porto segundo as características respeitantes não só à cor, mas também ao tipo de colheita, envelhecimento, idade e doçura no caso dos vinhos brancos. [4, 5, 14]

No que toca ao tipo podemos encontrar as seguintes designações gerais, tinto, branco e rosé. Sendo que dentro dos vinhos tintos existem os estilos Ruby (envelhecimento em garrafa) e o estilo Tawny (envelhecimento em madeira). [4, 5, 14]

Dentro do estilo Ruby pode encontrar-se os seguintes vinhos: Ruby - vinho jovem que é elaborado a partir de uma seleção dos melhores vinhos do Porto de cada ano, possui tons vermelho escuro com um envelhecimento inicial de 2 a 3 anos em cuba inox e posteriormente envelhecido em garrafa; Vintage - é o único Porto que amadurece em

garrafa, é produzido a partir de uvas de um único ano e engarrafado dois a três anos após a vindima, evolui gradualmente durante 10 a 50 anos em garrafa; Late Bottled Vintage (LBV) - é um Porto Ruby produzido a partir de uvas de um único ano, selecionado pela sua elevada qualidade engarrafado depois de um período de envelhecimento de entre quatro a seis anos; Porto (Vintage) Single Quinta Vintage - são vinhos de alta qualidade provenientes não só de um só ano mas também de uma só quinta. [4, 5, 14]

No caso do Porto Tawny podem encontrar-se os seguintes tipos: Tawny Reserva - é um vinho envelhecido em madeira de carvalho, pode ser um vinho jovem ou com alguma idade (média de 6 anos), revelada também cores âmbar médio; Tawny 10 anos - é um vinho um pouco mais de evoluído do que o Porto Tawny Reserva, possuem semelhanças, embora com a garantia de que o vinho possui as características de um vinho com dez anos de idade; Tawny 20 anos - possui uma gama de cores que vão do âmbar avermelhado ao âmbar dourado, são vinhos raros, envelhecidos em pequenas pipas de carvalho; Tawny 30 anos - são vinhos selecionados para um envelhecimento mais longo em pipas de madeira; Tawny 40 anos -classificado com a idade mais elevada dos Portos Tawny apresenta-nos vinhos maravilhosamente concentrados e complexos; Porto Colheita - são Tawnies de uma só colheita, envelhecidos em cascos por um período mínimo de sete anos, originando vinhos com amplitudes de cor que vão do tinto alourado ao alourado, dependendo da sua idade. [4, 5, 14]

No que toca aos brancos, este tipo de vinhos é normalmente identificado pela sua doçura, ou seja pela quantidade de açúcares nele contido podendo assim ser identificados os seguintes tipos: muito doce, doce, meio-seco, seco ou extra seco (Tabela 2). [4, 5, 14]

Tabela 2: Caracterização dos vinhos brancos quanto à sua doçura, correspondência entre o tipo e o valor em g/L de açúcares presentes no mesmo. [4,5]

Classe de doçura	Valores extremos de massa volúmica a 20 °C (g/l)	°Baumé	Açúcares (g/l)
Extra-seco	< 998	0,0	<40
Seco	de 998 a 1008	0,0 - 1,3	40 - 65
Meio-seco	de 1008 a 1018	1,4 - 2,7	65 - 90
Doce	de 1018 a 1034	2,8 - 5,0	90 - 130
Muito doce	> 1034	>5,0	>130

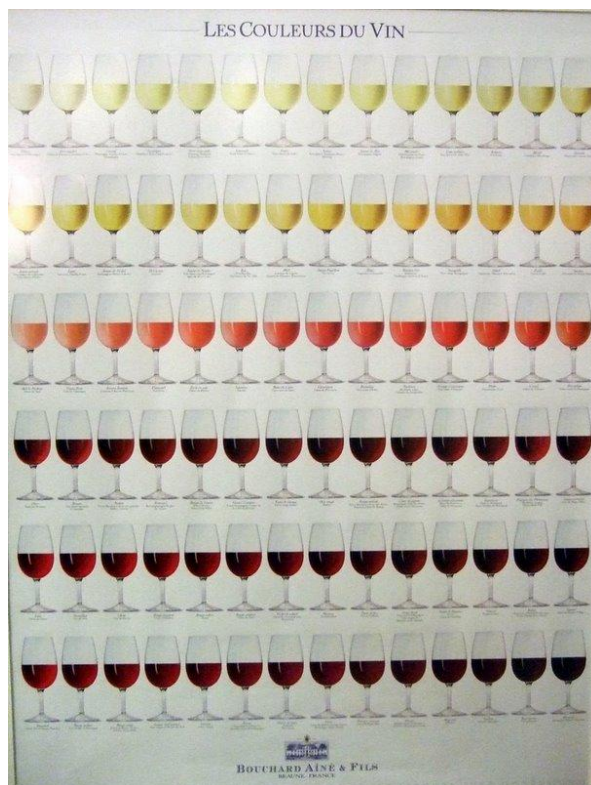


Figura 6: Imagem representativa das várias tonalidades que o vinho do Porto pode adquirir, passando pelas castas brancas e tintas.^[15]

Quanto ao Porto Rosé este é um vinho que foi conseguido devido a uma nova técnica de vinificação capaz de tratar as uvas de castas tintas de uma forma semelhante à vinificação de um vinho branco, proporcionando um cor-de-rosa subtil e delicado ao vinho. Este método de vinificação extrai uma quantidade razoável de cor da película das uvas sem, no entanto, extrair os taninos adstringentes. A decantação a frio que antecede a fermentação a frio que são fundamentais para assegurar a frescura dos aromas a fruta e sua elegância. É um vinho do ano por isso não permanece durante longos períodos de tempo em estágio, e deve ser consumido no ano de aquisição.^[11, 16]

Quanto à sua classificação, no que respeita à cor, os vinhos do Porto podem ser identificados da seguinte forma (Figura 6): os Vinhos do Porto Tintos podem variar entre o retinto e o alourado-claro, sendo possíveis todas as tonalidades intermédias (tinto, tinto-alourado, alourado e alourado-claro); os Vinhos do Porto Branco apresentam tonalidades diversas (branco pálido, branco palha e branco dourado), intimamente relacionadas com a tecnologia de produção. Quando envelhecidos em casco, durante muitos anos, os vinhos brancos adquirem, por oxidação natural, uma tonalidade alourada claro semelhante à dos vinhos tintos muito velhos.^[4,5, 11]

1.4 - Cor

A luz visível é uma radiação eletromagnética, que se encontra numa faixa bastante estreita de comprimentos de onda (400-800 nm). Inclui o vermelho (~ 625 – 740 nm), laranja (~ 590 – 625 nm), amarelo (~ 565 – 590 nm), verde (~ 500 – 565 nm), ciano (~ 485 – 500 nm), azul (~ 440 – 485 nm) e termina no violeta (~ 380 – 440 nm) (Tabela 3).^[17, 18]

Tabela 3: Tabela de correspondência entre o comprimento de onda e as cores absorvidas e transmitidas do espectro do visível, adaptado de Juster.^[18]

λ Comprimento de onda (nm)	Cor Absorvida	Cor Observada (transmitida)
400	Violeta	Amarelo-esverdeado
425	Azul-escuro	Amarelo
450	Azul	Laranja
490	Azul-esverdeado	Vermelho
510	Verde	Roxo
530	Amarelo-esverdeado	Violeta
550	Amarelo	Azul-escuro
590	Laranja	Azul
640	Vermelho	Azul-esverdeado
730	Roxo	Verde

À absorção seletiva da luz visível por uma substância chama-se cor, não sendo porém a da luz absorvida, mas sim, da luz que a substância transmite ou reflete que conseguimos ver. Por esta razão, uma substância preta absorve todos os comprimentos de onda de luz visível. É importante reconhecer ainda que a cor não irá necessariamente depender em ter o comprimento de onda para a absorção máxima na região do visível, pois muitas substâncias com bandas de absorção largas têm uma absorvância abaixo de 400 nm e ainda aparecem fortemente coloridas devido às suas bandas de absorção se estenderem para o espectro visível (Tabela 3).^[17, 18]

1.4.1 - Cor nos Vinhos

A cor dos vinhos é o parâmetro principal para a avaliação da sua qualidade, pois não só está dependente de muitos fatores, relativos à origem e produção, como é também um critério de aceitação do produto por parte do consumidor. Através dela podemos obter informações como a idade ou até a presença/ausência de alguns defeitos. [4,5,6]

Para além de fatores como a casta e o seu porta-excerto, fatores ambientais como o clima e o solo e mesmo a tecnologia vitivinícola, a cor é também influenciada pelos compostos químicos provenientes da uva que lhe conferem pigmentação nomeadamente os compostos fenólicos como as antocianinas e outros. Estes pigmentos constituem uma família muito heterogénea de moléculas com vários mecanismos de formação que vão ser abordados com maior detalhe mais à frente. [4,5,18]

1.4.2 – Metodologias utilizadas para Avaliação da Cor do Vinho

A fim de se realizar a caracterização da cor foram desenvolvidas várias metodologias que permitem uma melhor normalização dos parâmetros, estas metodologias incluem os índices de Sudraud, de Glories e o de Roubert, os parâmetros colorimétricos dos sistemas CIE e CIELAB e os métodos de Somers e Evans. Todas estas metodologias são baseadas em medidas espectrofotométricas com variações nas fórmulas e comprimentos de onda utilizados. [19, 20]

O índice de Sudraud que é usado para calcular o tom do vinho, este compreende os comprimentos de onda de 420 e 520nm, pois dá maior importância aos tons vermelhos e amarelos. Para que se identifique então o tom de um vinho utiliza-se a fórmula $T = (A_{420}/A_{520}) \times 100$. [19 -21]

O índice de Glories efetua-se para calcular a intensidade de cor do vinho, é o método mais usado nas adegas e empresas vitivinícolas. Este compreende para além dos comprimentos de onda já referidos inclui o de 620 nm para que se incorpore o tom azul. A fórmula utilizada para tal é $IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$. Glories determinou ainda as seguintes fórmulas para calcular o tom do vinho $Tom = A_{420}/A_{520}$, a percentagem de amarelo através da fórmula $A\% = [100 \times A_{420}/IC]$, já para a percentagem de vermelho a fórmula que é utilizada é $V\% = [100 \times A_{520}/IC]$, por outro lado a fórmula utilizada para a percentagem de azul é $B\% = [100 \times A_{620}/IC]$. Estas medições são realizadas através de medidas espectrofotométricas com percursos óticos de 2mm. [19, 23, 24]

O índice de Roubert, faz referência ao número de cores e para esse efeito efetuam-se medidas nos comprimentos de onda de 625, 650 e 675nm. ^[21]

Com os avanços da técnica e instrumentação de medição, é agora possível utilizar para a determinação da cor das amostras num curto espaço de tempo metodologias que aplicam aparelhos denominados colorímetros que para além de serem portáteis e de fácil utilização, os valores medidos podem ser facilmente traduzido em mudanças físicas. Neste contexto, as técnicas utilizam os sistemas CIE e CIELAB para a expressão de resultados, que de um modo geral compreendem as seguintes características básicas ^[21, 24, 26, 27].

Tonalidade – intervalo de comprimento de onda da cor apresentada;

Brilho – corresponde à luminosidade, fazendo a cor parecer mais clara;

Saturação – caracteriza o grau de pureza da amostra em análise.

A metodologia de CIE, foi estabelecida pelo Office International de la Vigne et du Vin (O.I.V.) e determina-se através da transmitância por medições espectrofotométricas de *tristimulus* as coordenadas X, Y, e Z, as quais se vão depois transformar matematicamente em coordenadas de cor. Assim sendo, para o efeito são então determinados os comprimentos de onda de 445, 495, 550 e 625nm. ^[21, 24, 26, 27]

Relativamente à metodologia de CIELAB ($L^*a^*b^*$), esta é muito semelhante à anterior usando no entanto coordenadas geométricas para a identificação dos parâmetros colorimétricos. Podemos então com isto fazer corresponder à coordenada L^* a luminosidade que vai variar do valor de zero, como o tom menos luminoso, preto, ao valor cem (100) como sendo mais luminoso, incolor ($L^*= 0$ preto e $L^*= 100$ incolor). A coordenada a^* , vai variar do sentido negativo ($-a$) para o positivo ($+a$) dos tons verdes para os tons vermelhos ($a^*> 0$ vermelho e $a^*< 0$ verde), e a coordenada b^* , vai variar do sentido negativo ($-b$) para o positivo ($+b$) entre os tons azul e amarelo ($b^*>0$ amarelo e $b^*<0$ azul) (figura 7). ^[24, 25]

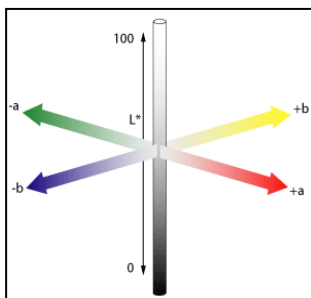


Figura 7: Esquema representativo do método de coordenadas geométricas CIELAB coordenadas $L^*a^*b^*$, cores e luminosidade correspondentes. ^[28]

Para além das coordenadas $L^*a^*b^*$, este método permite ainda calcular a saturação métrica C^* através da fórmula $[(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0.5}$ e também o ângulo da matriz h através da fórmula $h = \arctan b^*/a^*$, sendo que para um ângulo de $0^\circ/360^\circ$ denota-se o tom vermelho, para um ângulo de 90° denota-se um tom amarelo. Já para um ângulo de 270° é a aproximação ao tom azul e entre este e o 360° existe um aumento da intensidade da cor azul. Nos vinhos jovens, o ângulo de 350° é indicativo de uma matriz de tom violeta característico dos mesmos. ^[29-32]

O método de Somers e Evans, também denominado de índice de ionização, permite conhecer os elementos contribuintes para a cor como as antocianinas e os compostos fenólicos. Para tal procede-se ao tratamento do vinho com um excesso de dióxido de enxofre (SO_2), para que se conheçam os pigmentos SO_2 – resistentes, e com um excesso de ácido clorídrico (HCl), para que obtenha uma indicação da concentração total de pigmentos vermelhos (520nm) e compostos fenólicos totais (280nm) e efetuam-se ainda medidas nos comprimentos de onda de 520nm (pigmentos vermelhos) e 420nm (pigmentos amarelos/laranjas) antes da adição destes compostos. ^[20, 23]

1.5 - Compostos Fenólicos no Vinho

Os compostos fenólicos são constituintes importantes do vinho, em especial do vinho tinto. Quimicamente os fenóis são compostos que possuem um anel benzênico com um ou mais grupos hidroxilo. [33]

Em termos de classificação os compostos fenólicos dividem-se em dois grandes grupos, os não flavonoides e os flavonoides. Dentro do primeiro grupo, encontramos os ácidos fenólicos que por sua vez se dividem em ácidos hidroxibenzóicos (ex.: ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (ex.: ácido paracumárico), e também os estilbenos (ex.: resveratrol) (Figura 9). No segundo grupo podemos encontrar, as flavonas, os flavonóis, os flavanonóis, as antocianinas e os flavan-3-óis. Estes flavan-3-óis podem por sua vez tomar a forma monomérica, oligomérica ou a forma polimérica, sendo as duas ultima também chamadas de proantocianidinas ou também de taninos condensados (Figura 8) [33].

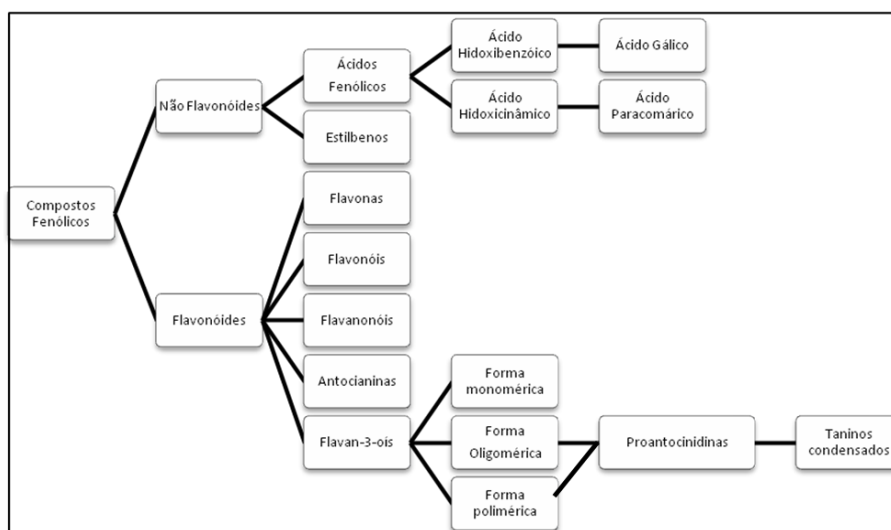


Figura 8: Classificação química dos compostos fenólicos a sua divisão nos grandes grupos segundo os radicais e grupos funcionais que os constituem.

Os compostos fenólicos são conhecidos por darem cor e sabor ao vinho, e também por possuírem propriedades antioxidantes, bactericidas, vitamínicas (vitamina E) e anti-inflamatórias. O seu consumo moderado está aparentemente associado a benefícios que protegem os consumidores de doenças cardiovasculares. Esses benefícios incluem a indução do relaxamento endotelial dos vasos dependente óxido nítrico; inibição dos efeitos da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (que estão associadas a uma baixa incidência de doenças cardiovasculares); e a atividade anticancerígena. [34]

A sua proveniência é variada e começa na planta (desde a videira, porta-excerto, casta até à película da uva) e podem ser obtidos em várias fases da vinificação, bem como ser alterados por fatores como o pH, tipo de tecnologia vitícola e fatores ambientais (clima e solo).^[35, 36]

A composição do vinho em fenólicos refletirá o efeito conjunto de todos os fatores mencionados anteriormente que permitem ter alguma percepção da idade, e evolução temporal assim como de possíveis defeitos que nele existam.^[36]

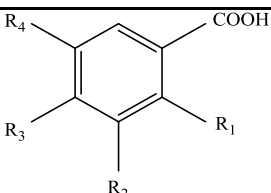
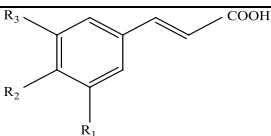
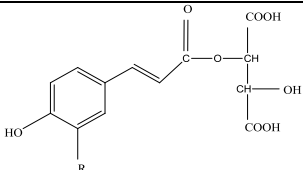
1. 5.1 - Os Compostos não Flavonóides

1.5.1.1 - Ácidos Fenólicos

São ácidos fenólicos de estrutura simples (Tabela 4) que derivam normalmente do ácido benzoico e do ácido cinâmico. Entre outros compostos que derivam do primeiro aquele que possui maior relevância é o ácido gálico, que se encontra nas partes sólidas da uva sob a forma livre ou sob a forma de éster flavanol (*p*-epicatequina-3-O-galato). Os mais numerosos e mais diversificados entre as espécies são os que derivam do ácido cinâmico, os ácidos cafeoil tartárico; *p*-cumaroil tartárico e feruloil tartárico, estando sob a forma de ésteres tartáricos *trans*. A forma isomérica *cis* também pode ser encontrada mas em muito menores quantidades. Podemos ainda encontrar ésteres de glicose como o ácido - *p*-cumárico e ferúlico.^[33, 37]

Estes compostos armazenam-se nos vacúolos das células da película e da polpa e são extraídos facilmente por esmagamento.^[33,37]

Tabela 4: Estrutura química de alguns exemplos de compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos Ácidos Fenólicos. [33,37]

Deivados de*					
	*Ácido Benzoico	R1	R2	R3	R4
	p – Hidroxibenzoico	H	H	OH	H
	Protocatecuico	H	OH	OH	H
	Vanílico	H	OCH ₃	OH	H
	Gálico	H	OH	OH	OH
	Sirínico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Salicílico	OH	H	H	H
Gentísico	OH	H	H	OH	
	*Ácido Cinâmico	R1	R2		
	p-cumárico	H	OH		
	Cafeico	OH	OH		
	Ferúlico	OCH ₃	OH		
	Sinápico	OCH ₃	OH		
	*Ester Hidroxicinâmico	R			
	Ácido <i>Trans</i> – cafeiol tartárico	OH			
	Ácido <i>Trans</i> - p-cumaroil tartárico	H			
	Ácido <i>Trans</i> - feruliltartárico	OCH ₃			

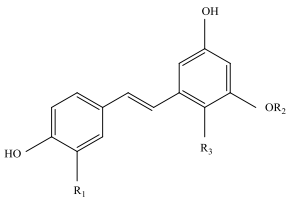
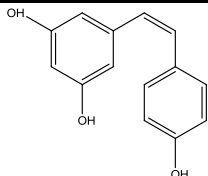
1.5.1.2- Estilbenos

Os estilbenos são um pequeno grupo de fenilpropanóides de pequenas dimensões que derivam do ácido cinâmico e são caracterizados por possuírem uma estrutura 1,2 difenil-etileno (tabela 5). [33, 37,38]

No caso da videira são produzidos na película das uvas, nas folhas e nas raízes em resposta a infecções por diversos agentes patogénicos, danos causados por radiação ultravioleta (UV) ou outras condições de stress. [33, 37,38]

Os estilbenos provenientes das uvas são considerados os mais importantes em termos dietéticos. O mais comum é o *trans*- resveratol, encontrando-se também presente o seu isómero *cis*, ambos na forma glicosilada. [33, 37,38]

Tabela 5: Estrutura química dos estilbenos mais comuns nas uvas. [33,37,38]

	Estilbeno			
	R1	R2	R3	
				
<i>Trans</i> – resveratrol	H	H	H	
<i>Trans</i> – resveratrol – 3 – O – glucósido	H	glc	H	
<i>Trans</i> – resveratrol – 2 – C – glucósido	H	H	glc	
<i>Trans</i> – astringina	OH	glc	H	
				
<i>Cis</i> - resveratrol				

1.5.2 - Os compostos Flavonoides

Os flavonoides são um grupo de compostos de baixo peso molecular, caracterizados por serem difenilpropanóides, C6-C3-C6, constituídos por dois anéis benzênicos que se encontram ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não formar-se um terceiro anel, este irá ser chamado de anel heterocíclico (Figura 10). [33, 37, 39]

Estes compostos são importantes antioxidantes pois possuem um elevado potencial redox que lhes permite atuar como agentes redutores e possuem ainda um potencial para quelatar metais. [33, 37, 39]

No caso das uvas e dentro do grupo dos flavonóides podemos encontrar as seguintes subclasses de compostos, flavonas, flavonóis, flavan-3-óis, flavanonóis e antocianinas, a diferença entre cada um destes grupos será o número e posição dos radicais hidroxilo, metilo do anel benzênico B (figura 9). [33, 37, 39]

Estes compostos encontram-se primeiramente na película e nas sementes das uvas e menos frequentemente na haste, no caso dos flavonóis e das antocianinas estes compostos armazenam-se nos vacúolos celulares da película das uvas. [33, 37, 39]

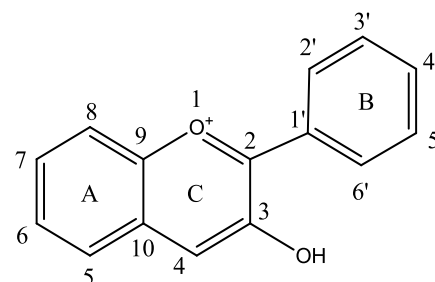


Figura 9: Estrutura química geral de um flavonóide.

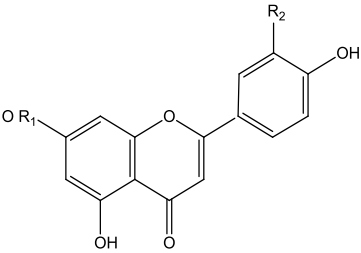
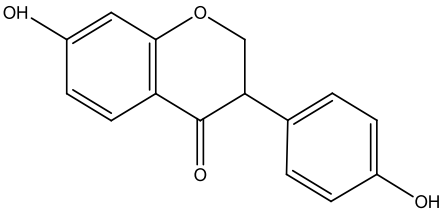
1.5.2.1 - Flavonas ou Isoflavonas

Incluem-se neste grupo mais de 100 compostos diferentes, no entanto não são os mais comuns no que respeita às frutas. Particularizando para o caso da videira, estes podem ser encontrados nas folhas. As flavonas (Tabela 6) ou isoflavonas são uma subclasse que é normalmente descrita como um fito-estrogénio pois exibem uma atividade estrogénica, mas contudo não são os únicos compostos a exibirem essa mesma atividade. [33, 37, 39]

As características de uma flavona estão diretamente ligadas com os radicais que pode apresentar na posição 7 do anel benzénico A e na posição 3' do anel benzénico B. [33, 37, 39]

As principais flavonas encontradas nas uvas são, a luteolina e a as formas 7-O-glucosido da apigenina e também da luteolina. [33, 37, 39]

Tabela 6: Estrutura geral das flavonas e isoflavonas, nomes e radicais substituintes nas flavonas.
Gluc: Glucose [33, 37, 39]

Flavonas	Nome do composto	R1	R2
	Apigenina	H	H
	Apigenina – 7-O – glucósido	Gluc	H
	Luteolina	H	OH
	Luteolina – 7- O- glucósido	Gluc	OH
Isoflavonas			
			

1.5.2.2 - Flavonóis

Os flavonóis (Figura 10) são a subclasse mais numerosa de compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides. [33, 37, 39]

Encontram-se maioritariamente na película das uvas e também em alguns casos no pedicelo. São normalmente associados à absorção da radiação UV, o que permite que providenciem uma proteção nos tecidos das plantas dos efeitos adversos da mesma e níveis elevados destes compostos indicam uma elevada exposição solar. A sua síntese é ativada pela exposição direta aos raios UV e à radiação azul. [33, 37, 39]

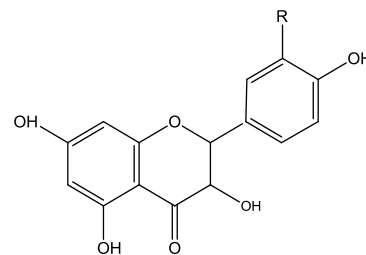


Figura 10: Estrutura geral dos flavonóis

Uma concentração elevada destes compostos no vinho pode dever-se às variedades de uvas nele presentes, pois algumas castas possuem uma película mais espessa do que outras e /ou um rácio película/volume maior. [33, 37, 39]

Quimicamente observam-se alterações no anel benzénico A, onde em quase 90% dos casos existe um radical hidroxilo fenólico em C-5 e C-7. [33, 37, 39]

Nas uvas podemos encontrar as seguintes formas químicas: 3-O-glucósido de quercetina, miricetina, caempferol e isoharmetina (tabela 7). Encontramos ainda as formas monoglicosiladas dos anteriores: quercetina – 3-O- glucurósido, kaempferol -3 – O- glucurósido e -3-O-galactosido e a miricetina-3-O-glucurosidio. Além destas formas ainda encontramos as formas diglicosiladas- 3-O-glucoarabinoide da quercetina e do kaempferol e a forma -3-O-glucosilxilosoide da quercetina. [33, 37, 39]

Tabela 7: Estrutura química geral os principais flavonóis presentes nas uvas. [33, 37, 39]

Quercetina	Caempferol	Miricetina

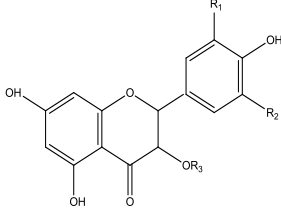
1.5.2.3 - Flavanonóis

Estes compostos, não são muito comuns nas plantas para alimentação, mas sim na madeira, sob a forma de agliconas livres. De qualquer modo aquelas que se podem encontrar nas uvas são a astilbina e a engeletina. Estes compostos são também conhecidos como dihidroquercetina-3-O-ramnosido e dihidrokaempferol-3-O-ramnosido. Estas duas agliconas estão presentes na película das uvas, em uvas brancas e mais concretamente a astilbina pode ser encontrada no bagaço e nas uvas tintas. [33, 37, 39]

Além das duas gliconas anteriormente referidas podem ainda ser encontradas em uvas tintas as seguintes: dihidromiricetina-3-O-ramnosido, dihidrokaempferol, dihidroquercetina (também denominada de taxifolina), as formas -3-O-glicosido do dihidrokaempferol e dihidroquercetina e também a dihidroquercetina-3-O-xilosido (tabela 8). [33, 37, 39]

A dihidromiricetina também denominada ampelopsina é um derivado do flavonol miricetina que apresenta atividade anticancerígena. [33, 37, 39]

Tabela 8: Estrutura química geral e substituintes dos principais flavanonóis. [33, 37, 39]

Estrutura Geral	Flavanonol	R1	R2	R3
	2,3-Dihidrokaempferol	H	H	H
	2,3-Dihidrokaempferol-3-O-ramnosido	H	H	Rha
	2,3-Dihidrokaempferol-3-O-glucosido	H	H	Gluc
	2,3-Dihidroquercetina	OH	H	H
	2,3-Dihidroquercetina-3-O-ramnosido	OH	H	Rha
	2,3-Dihidroquercetina-3-O-glucosido	OH	H	Gluc
	2,3-Dihidroquercetina-3'-O-glucosido	O gluc	H	H
	2,3-Dihidroquercetina-3-O-xilosido	OH	H	Xyl
	2,3-Dihidromiricetina-3-O-ramnosido	OH	OH	Rha

1.5.2.4 - Antocianinas

As antocianinas (Figura 11) já foram estudadas por diversos autores como forma de caracterização de castas e/ou como forma de estabelecer a sua origem. A palavra antocianina deriva do grego *anthos* que significa flor e *cyan* que significa azul. [33,34,36,38]

Estes compostos são solúveis em água e estão presentes em todas as partes das plantas desde folhas, a flores e frutos. No caso das uvas encontram-se mais concretamente nos vacúolos celulares da película das mesmas e são os principais flavonoides responsáveis pela cor das uvas e do vinho e também pela estabilidade do mesmo. [33,34,36]

As antocianinas possuem uma gama de cores que varia entre o vermelho, o roxo e o azul consoante o pH a que se encontram, sendo este sempre ácido. Entre pH 1-2 encontramos os tons vermelhos, para pH 3-6 os tons roxos e para pH > 6 os tons azúis, na zona do visível (700-400 nm) e com o aumento do pH estes tendem compostos a tornam-se incolores. [33,34,36,40]

Hoje em dia as antocianinas são largamente usadas como corantes alimentares e já se começa a ponderar a possibilidade de serem usadas como suplementos alimentares, medicamentos, entre outros devido aos seus efeitos benéficos para a saúde. Estes efeitos estão relacionados com atividade antioxidante, anticancerígena, alívio da inflamação crónica, diminuição da hipertensão arterial e regulação da síndrome metabólico. [33,34,36]

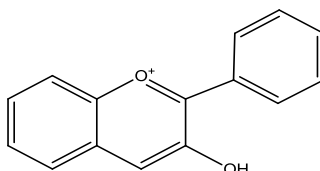


Figura 11: Estrutura química geral das antocianinas.

Quimicamente as antocianinas possuem o mesmo tipo de estrutura que outros flavonoides, um esqueleto base de 15 átomos de carbono na forma C₆-C₃-C₆. Estruturalmente as antocianinas são heterósidos de uma unidade aglicona (também denominada antocianidina), que é um derivado do ião *flavilium*. As principais diferenças entre as várias antocianinas encontram-se no número de grupos hidroxilo da antocianidina, a sua natureza, o número de açúcares ligados à estrutura, a presença ou ausência de um radical carboxilo alifático ou aromático ligado ao açúcar na molécula, e a posição destas ligações. [33,34,36]

As mais comumente encontradas em frutas como é o caso da uva derivam de seis antocianidinas que são: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Tabela 9).^[33,34,36]

Tabela 9: Estrutura química das principais antocianinas presentes nas uvas.

Pelargonidina	Cianidina	Delfinidina

São também encontradas algumas formas derivadas da malvidina nomeadamente as formas conjugadas de mono e diglucósidos, mais concretamente a malvidina 3-glucósido, a malvidina 3-acetilglucósido e a malvidina 3-coumaroilglucósido (Tabela 10). Estes derivados estão diretamente relacionados com a alteração de cor durante o envelhecimento dos vinhos.^[33,34,36]

Tabela 10: Estrutura química da malvidina e locais de substituição dos radicais que constituem os monoglucósidos e os diglucósidos.

Malvidina
Monoglucósido R₁ Diglucósido R₁ e R₂

Os seus produtos da adição com ácido pirúvico, ácido 3-glucósido-pirúvico, foram aqueles que mais se destacaram durante o período de envelhecimento, devido a sua maior estabilidade em relação às antocianinas originais. Até ao período de 100 dias verificou-se um aumento destes compostos e após este período uma diminuição dos mesmos. Estes factos deveram-se a uma boa proteção do vinho a quando do seu

envelhecimento em inox contra a exposição ao ar. No entanto para o envelhecimento em garrafa, o que se verificou foi que as reações de oxidação-redução, são atenuadas ao longo do tempo permitindo a manutenção dos pigmentos antociânicos muito mais intensos. Por conseguinte os vinhos que envelhecem somente em casco, são aqueles que possuem uma menor quantidade de compostos antociânicos na sua forma original e por isso não apresentam cores tão intensas como os que são envelhecidos em inox e em garrafa. [33,34,36,40]

Por esta razão, o conteúdo em antocianinas num vinho de estilo Ruby é muito maior e mais estável do que num estilo Tawny, sendo que entre estes dois estilos se encontra o LBV devido às suas características específicas de envelhecimento. [33,34,36,40]

1.5.2.5 - Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis (Figura 12) ou também denominados flavanóis, são uma das mais importantes e alargadas classes de compostos fenólicos, presentes nas uvas. São eles que promovem a estabilidade da cor vermelha do vinho tinto bem como, a sua adstringência (sensação de aspereza na língua provocada pelo excesso de taninos), estrutura e paladar. [33, 34,37]

Estes podem ser encontrados nas partes sólidas das uvas, grainha (sendo aquela que apresenta menor quantidade), película e pedicelo. A quantidade presente nas uvas varia segundo o tipo de casta e pode ser afetado pelo tipo de viticultura praticado, assim como por fatores ambientais, nomeadamente o estado de maturação das uvas, as condições climáticas da estação em que são colhidas, área de produção e também a quantidade de frutos recolhidos. [33, 34,37]

São compostos que possuem capacidade antioxidante. O método mais utilizado na sua deteção é a fluorescência, mas a absorvância a 280 nm também é utilizada. Além de antioxidantes os flavan-3-óis são potenciais quelantes de iões, agentes precipitantes de proteínas e também agentes anti-inflamatórios, muitos destes compostos são já usados como suplementos e extratos para chás ao nível dos produtos ditos naturais. [33, 34,37]

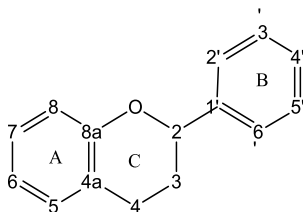


Figura 12: Estrutura química geral de um Flavan-3-ol.

As formas mais comumente encontradas destes compostos são distinguidas em dois grandes grupos as (+) catequinas e as (-) epicatequinas (figura 13).^[33, 34,37]

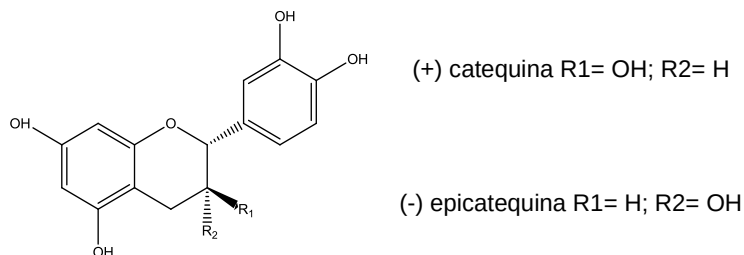


Figura 13: Estrutura química das catequinas e epicatequinas.

Estas podem ainda distinguir-se em formas monoméricas, oligomérica e poliméricas, sendo que estas duas últimas também podem ser denominadas de taninos condensados ou proantocianidinas.^[33, 34,37]

As diferenças entre as (+) catequinas e as (-) epicatequinas encontram-se na natureza estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel C (C2 e C3) bem como no grau de hidrolisação dos anéis A e B. Assim sendo as formas monoméricas dos flavan-3-óis que podem ser encontradas nas *vitis vinífera*, (+) catequinas, (-) epicatequinas, são ortohidrolizadas em C'3 e C'4 do anel B, enquanto as (+) galhocatequinas e (-) epigalhocatequinas possuem um terceiro grupo hidroxilo na posição C'5 (Figura 14 e Tabela 11).^[33, 34,37]

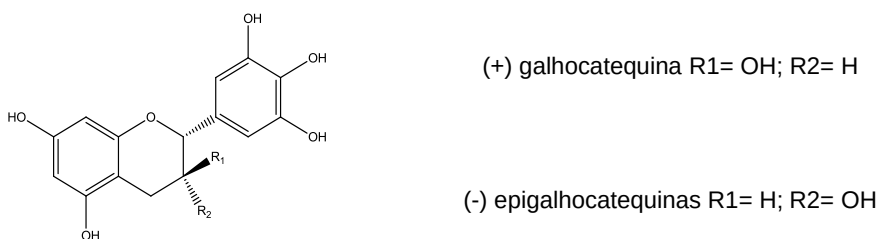
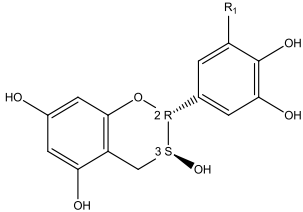
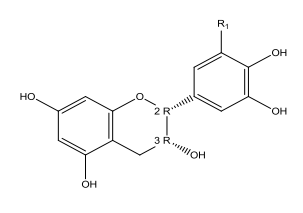
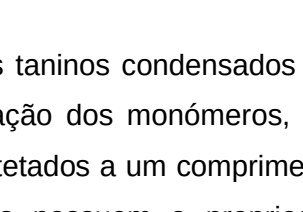
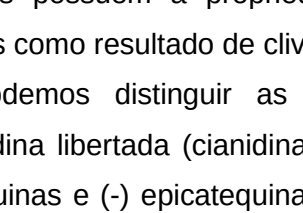


Figura 14: Estrutura química das galhocatequinas e epigalhocatequinas.

Devido a estas variações os quatro monómeros podem ser grupados em dois grupos distintos denominados de pares diastereoisómeros, que são devidos aos dois centros moleculares assimétricos C2 e C3. As configurações desses grupos são então: 2R:3S para as (+) catequinas e (+) galhocatequinas, e 2R: 3R para as (-) epicatequinas e (-) epigalhocatequinas (Tabela 11). Podemos ainda dizer que a forma di-hidroxiladas as (-) epicatequinas podem ser esterificadas a partir do ácido gálico na posição C3, o que resulta na (-) epicatequina-3-O-galhato. Podem ainda ser encontradas algumas formas

livres trihidroxiladas de (+) galhocatequinas, (-) epicatequinas e (+) galhocatequina -3-O-galhato distribuídas um pouco por toda a uva exceto nas grainhas. [33, 34,37]

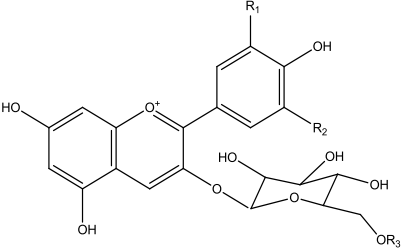
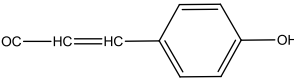
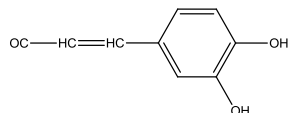
Tabela 11: Estrutura estereoquímica referente às formas monoméricas dos flavan-3-óis.

Flavan-3-ol	R1	C-2	C-3
	H	R	S
	OH	R	S
	H	R	R
	OH	R	R

Os taninos condensados (proantocianidinas) são oligómeros que surgem após a polimerização dos monómeros, por isso possuem alto peso molecular e são incolores sendo detetados a um comprimento de onda de 280 nm (na gama do ultravioleta). Estes compostos possuem a propriedade de libertar antocianidinas em condições ácidas aquecidas como resultado de clivagem nas ligações interflavílicas. [34,37, 38]

Podemos distinguir as proantocianidinas em dois grupos dependendo da antocianidina libertada (cianidina ou delphinidina) são eles: procianidinas compostas por, (+) catequinas e (-) epicatequinas que derivam de catequinas e epicatequinas e do seu estér gálhico, e prodelfinidinas compostas por, (+) galhocatequinas e (-) epigalhocatequinas, estes últimos estão presentes nas grainhas mas ambos podem ser encontrados na película da uva (Tabela 12). [34,37, 38]

Tabela 12: Estrutura química de antocianidinas e os seus radicais.

Antocianidinas	R1	R2
	Cianidina	H
	Delfinidina	OH
	Peonidina	OCH ₃
	Petonidina	OH
	Malvidina	OCH ₃
-CO-CH₃ (acetilo)  R₃ 		

Além desta distinção podemos ainda caracterizar as proantocianidinas pelo seu comprimento de cadeia e pela sua ligação interflavílica. Em relação ao primeiro, o termo “oligómero” é aplicado à maior cadeia de uma mistura e que pode corresponder a uma proantocianidina que possua um grau de polimerização médio de 2 a 5 unidades, que lhe permite ser bem separada e identificada. Já o termo “polímero”, é aplicado a proantocianidinas com um grau de polimerização superior a 5 unidades e que, por isso, não permite nem uma boa separação, nem uma boa identificação devido ao grande número de isómeros possível de ser formado. [34,37, 38]

Em relação a ligação interflavílica, para caracterizar as proantocianidinas, podemos classificar as antocianidinas como sendo do tipo B, onde a ligação dos monómeros é feita através da posição C-4 da unidade de topo e o carbono C-6 ou C-8 da unidade terminal. Predominam os isómeros C-4 e C-8, em relação os isómeros C-4 e C-6. As do tipo A podem conter dois tipos de ligações entre o carbono C-2 da unidade de topo e o grupo hidroxilo no carbono C-5 ou C-7 da unidade inferior. [34,37, 38]

1.5.3 - Metodologias de Análise dos Compostos Fenólicos no Vinho

O teor de polifenóis totais ou índice de compostos polifenólicos é normalmente determinado em vinhos fortificados, utilizando o método de Folin-Ciocalteu, que é o reconhecido pela O.I.V. (L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), utilizando o ácido gálico como padrão. Este método baseia-se na redução do complexo fosfotungstato-fosfomolibdato pelos fenóis com a formação de produtos de reação de cor azul, a partir dos quais se vai medir a absorvância aos comprimentos de onda de 700 ou 750nm. Os resultados desta medição são depois expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro. [34,37, 38, 42]

Geralmente, o ácido gálico é um dos compostos fenólicos que apresenta valores mais elevados para os vinhos fortificados. No caso específico do vinho do Porto, ácido sirínico, ácido *cis*-cafeoil tartárico, rutina, tirosol, epicatequina e catequina também são importantes quantitativamente. [34,37, 38,42]

Quanto às metodologias, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas tanto para a quantificação como para identificação. No entanto nem todas são empregadas, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *high-performance liquid chromatography*) a que se destaca. No que respeita ao detetor, o mais usado é o detetor de díodos (DAD), e a espectrofotometria de massa incluindo ESI-MS (*electrospray ionization source*) (Tabela 13). [34,37, 38, 43]

No que respeita a técnicas separativas, observou-se que a cromatografia gasosa é também uma das escolhidas tanto para a quantificação como identificação destes compostos, estando na maioria dos casos acoplada com um detetor de massa, e para um estudo mais aprofundado em termos estruturais destes composto surge a cromatografia gasosa por impacto eletrónico equipado com espectrómetro de massas (GC/EI-MS - *gas chromatography- electron impact mass spectrometry*). No entanto, em ambas as metodologias, é necessário proceder a uma purificação dos compostos devido ao facto de existirem interferentes, tais como açúcares nas amostras originais, para tal é usada a extracção em fase sólida (SPE - *solid phase extraction*), recorrendo normalmente a colunas extrativas de octadecilsilano (C₁₈). [34,37, 38, 43]

Tabela 13 – Resumo dos compostos fenólicos que podem ser encontrados no Vinho do Porto com recurso a diferentes metodologias analíticas. ^[34,37, 38, 42,43]

	Metodologia				
	HPLC-DAD	RP-HPLC	UPLC-DAD	Electroforese capilar	HPLC/MS
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	✓			✓	
Ácido cafeíco		✓		✓	✓
Catequina				✓	✓
Ácido <i>cis</i> -cafeoil tartárico	✓				
Ácido <i>cis</i> -cumaroil tartárico	✓			✓	
<i>Cis</i> - resveratrol - 3 - s - beta – glucósido	✓				✓
<i>Cis</i> -resveratrol	✓				✓
Epicatequina	✓	✓		✓	✓
Ácido gálgico	✓	✓		✓	✓
Miricetina	✓	✓			✓
Ácido cumárico	✓	✓	✓	✓	✓
Rutina	✓				✓
Ácido siríngico	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Trans</i> -astringíco	✓				
Ácido <i>trans</i> -cumaroil tartárico	✓			✓	
<i>Trans</i> - resveratrol - 3 - s - beta – glucósido	✓				✓
<i>Trans</i> -resveratrol	✓	✓			✓
Tirosol	✓		✓	✓	✓
Ácido valínico	✓	✓	✓		✓

No entanto há ainda outras metodologias, que ainda se enquadram nas técnicas separativas mas que são menos comuns, são o caso das eletroforeses. Nesta classe de metodologias podemos também encontrar vários tipos de procedimentos, são exemplo disso, a eletroforese capilar, a eletroforese capilar de zona e a eletroforese capilar em gel. ^[34,37, 38, 43]

Podemos ainda falar de outras metodologias que podem ainda ser utilizadas como a técnica de ELISA (ensaio imunoenzimático), as medidas de fluorescência e as medidas espectrofotométricas simples para quantificação de fenóis e/ou antocianinas totais. ^[34,37, 38, 43]

1.6 - Antioxidantes

Os radicais livres podem ser definidos como pequenas moléculas altamente reativas, orgânicas e inorgânicas que contêm um ou mais eletrões desemparelhados na orbital eletrónica mais externa. Estas moléculas para além do facto de serem altamente reativas, são quimicamente instáveis, possuem também um tempo de semivida muito curto e são considerados importantes para em algumas funções fisiológicas, nomeadamente no envelhecimento, cancro, arteriosclerose, inflamação, entre outros. [44, 45]

Os radicais livres podem ser formados endogenamente, mais concretamente no citoplasma, na mitocôndria ou na membrana celular por diversas vias, podem também surgir ainda pela respiração aeróbia e inflamações ou podem também ser geradas por fatores exógenos, tais como radiação UV (ultra violeta), radiação gama, medicamentos, ozono, dieta e tabaco entre outros. [44, 45]

Entre os mais importantes encontramos as espécies reativas do oxigénio (ROS) e as espécies reativas do azoto (RNS). Sendo que nos primeiros encontramos as partículas, radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); radical hidroperoxilo ($HO_2^{\cdot}$); radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$); peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e por último o radical oxigénio singleto (1O_2). Por outro lado nas espécies reativas de azoto podemos encontrar: o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$); o dióxido de azoto ($NO_2^{\cdot}$); o cloreto de nitrilo (NO_2Cl) e o radical peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). [45, 46, 47]

Quando existe um excesso destas espécies no organismo este encontra-se sob *stress* oxidativo, ou seja existe um predomínio de espécies oxidativas que consequentemente vão provocar danos nas células. Se este *stress* for moderado um organismo saudável vai conseguir reestabelecer rapidamente o equilíbrio através das defesas antioxidantes, nomeadamente: os mecanismos de prevenção; os mecanismos de reparação; as defesas físicas e defesas antioxidantes. [45, 46, 47]

Estas partículas antioxidantes, podem ser definidas como substâncias que presentes em baixas concentrações quando comparadas com a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse mesmo substrato de maneira eficaz. [45, 46, 47]

Existem duas classes de antioxidantes, os antioxidantes naturais e os antioxidantes sintéticos. Os primeiros podem ser definidos como moléculas com diferentes pesos moleculares, diferente composição e estado químico, diferente mecanismo e local de ação e que se subdividem nas seguintes categorias: antioxidantes enzimáticos, antioxidantes de baixo peso molecular, antioxidantes solúveis em lípidos e antioxidantes solúveis em água. [45, 46, 47]

Dentro desta categoria, podemos encontrar como exemplo os precursores algumas vitaminas como a A, a E e ainda alguns pigmentos como os carotenoides que vão ser

essenciais para a proteção da nossa pele contra os efeitos nefastos da radiação UV e efeitos da idade. [45, 46, 47]

Já os antioxidantes sintéticos são definidos como, substâncias químicas sintetizadas artificialmente e aprovadas por organismos institucionais, como por exemplo a *Food and Drug Administration* e que podem ser usados em alimentos. [45, 46, 47]

1.6.1 - Antioxidantes no Vinho

As uvas bem como outros produtos derivados, o vinho, o sumo de uva entre outros, são considerados como uma das maiores fontes de compostos fenólicos existentes na natureza. Estes compostos, na forma de ácidos fenólicos, como o p-cumárico, cinâmico, cafeíco, ferúlico e vanílico (Tabela 4); flavonoides, mais concretamente catequina, epicatequina (Figura 13); procianidinas (Tabela 12); antocianinas (Figura 11, Tabela 9), e resveratrol, são de acordo com a literatura científica aqueles que possuem maior atividade antioxidante. Os antioxidantes estão associados nomeadamente à capacidade de melhorar a qualidade dos alimentos, proporcionar-lhe melhor estabilidade bem como baixar os valores de LDL (lipoproteína humana de baixa densidade) e colesterol. [48, 49]

1.6.2 - Metodologias Analíticas para Análise de Antioxidantes no Vinho

No que toca a metodologias, a literatura ilustra várias técnicas, nomeadamente técnicas espectrofotométricas e técnicas de HPLC com extratos alcoólicos para determinação tanto qualitativa, como quantitativa de compostos fenólicos totais e flavonoides, conteúdo em antocianinas totais e monoméricas. Em ambas as metodologias os comprimentos de onda selecionados são os seguintes: 280, 320, 360 nm para os compostos fenólicos e 520 e 700 nm para as antocianinas. [50-53]

No entanto existem outras metodologias que incluem também medições espectrofotométricas mas que se baseiam em reações químicas. Nesta categoria pode ser inserido o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) que tem por base a redução deste mesmo radical pelos antioxidantes com mudança de coloração do violeta para o amarelo, assim sendo quanto maior for o efeito antioxidante, mais rapidamente se dá a alteração na cor. [50-53]

O método de ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), que se baseia na formação deste mesmo radical a partir do ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin)-6-sulfónico, seu precursor, através de reações químicas ou enzimáticas colorimétricas que são lidas a 414 nm, podendo também proceder-se a medições secundárias aos comprimentos de onda de 645, 734, 754 e 815 nm. [50-53]

Uma outra metodologia de deteção de capacidade antioxidante utilizada em vinho é o método de ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigénio), que se baseia na leitura da diminuição da fluorescência de proteínas (B- ficoeritrina e R-ficoeritrina). Nesta metodologia o radical peroxil ($\bullet\text{OH}$) vai ser formado através da reação do AAPH [dicloro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com o oxigénio atmosférico que irá formar um composto não fluorescente contrariamente ao indicador utilizado. A medição dessa mesma fluorescência pode ser feita a 575 nm quando é utilizada a proteína B-ficoeritrina como indicador e 578 nm quando é utilizada a R-ficoeritrina. [50-53]

A técnica de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), baseia-se na medição direta da coloração que é obtida através da reação de redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPZ) a complexo ferroso (Fe^{2+} - TPZ) em condições ácidas (pH= 3,6). A leitura da cor azul intensa do complexo é feita a na absorção máxima a 593 nm. [50-53]

Uma outra metodologia é DMPD (N,N-dimetil-p-fenilenodiamina). Esta é menos usada devido a críticas que indicam interações com os metais constituintes integrais de frutos e vegetais. Esta metodologia baseia-se na produção do catião radical do DMPD o

qual vai formar um composto de cor violeta quando reage com FeCl_3 (cloreto férrico) a pH ácido. ^[50-53]

Para além das metodologias descritas, existem ainda muitas outras que se baseiam em princípios semelhantes, quer no que toca ao tipo de reação, como ao tipo de deteção usado, quer até no sistema usado (micro placa ou cuvete) (Tabela 14). ^[50-53]

Tabela 14- Resumo das metodologias espectrofotométricas utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante em amostras de sumos de fruta e bebidas adaptado de Pisoschi & Negulescu 2011. ^[50]

Nome da metodologia	Descrição	Tipo de determinação
DPPH	Reação antioxidante com um radical orgânico.	Colorimétrica
ABTS	Reação antioxidante com um radical catiónico orgânico.	Colorimétrica
FRAP	Reação antioxidante com um complexo de Fe(III) .	Colorimétrica
PFRAP	Redução do Ferrocianeto de Potássio pelos antioxidantes e reação subsequente do Ferrocianeto de Potássio com Fe^{3+} .	Colorimétrica
CUPRAC	Redução Cu(II) a Cu(I) pelos antioxidantes.	Colorimétrica
ORAC	Reação antioxidante com radicais peróxido, induzidos pelo APPH (2,2'-azobis-2-amidino-propano).	Perda de fluorescência da fluoresceína
HORAC	Capacidade antioxidante dos radicais OH para eliminar radicais gerados pelo Co(II) num sistema Fenton.	Perda de fluorescência da fluoresceína
TRAP	Capacidade antioxidante para eliminar radicais derivados de luminol, gerados pela decomposição do AAPH.	Perda de quimiluminescência
Fluorimetria	Emissão de luz por uma substância que absorveu luz ou outra radiação eletromagnética de comprimento de onda diferente.	Gravação dos espectros de excitação de fluorescência / emissão

Parte II

Materiais e Métodos

2.1 – Material

2.2 – Amostragem e preparação das amostras

2.3 – Procedimentos experimentais

2.4 – Análise estatística dos resultados obtidos

Neste capítulo, serão descritos todos os reagentes, solventes, materiais e equipamentos utilizados para a realização de todo o trabalho experimental. Serão descritos ainda os procedimentos analíticos realizados no manuseamento e preparação das amostras bem como as condições experimentais de cada uma das técnicas aplicadas.

2.1– Material

2.1.1 – Equipamentos

Para a realização de todas as técnicas deste trabalho foi utilizada a centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5810R*, o aparelho Serapur Pro 90CN para a obtenção de água ultrapura, a balança Mettler Toledo AG 204 e o ultrassons Fungilab Ultrasonic Cleaner. Para a determinação/identificação e quantificação de antocianinas foi utilizado uma unidade de HPLC da Gibson, constituída por, um módulo manométrico 805, um misturador (Dynamic Mixer 811C), duas bombas (Pump 305 e 306), um injetor manual com um *loop* de 20 µl, e um detetor de díodos (Varian Prostar 335). Também foi utilizado um forno (column heater 7981 da Jones Chromatography) e a coluna utilizada foi a ACE 5C₁₈ (5µm; 250mm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro interno). O *software* utilizado foi o LC Workstation Multi Instrument 6.41.

Para os ensaios espectrofotométricos em microplaca (Folin-Ciocalteu, DPPH e ABTS) foi utilizado o leitor de placas Spectro Star Nano da BMG Labtech bem com a versão de software 2.10 e o programa de Spectrostar Nano – Data Analysis com a versão de software 2.30 R3.

Na realização dos testes colorimétricos CIELAB foi utilizado o colorímetro CR 400 da Konica Minolta (Osaka, Japão), já para os restantes índices colorimétricos foi utilizado o espectrofotómetro UV-1800 da Shimadzu.

2.1.2 - Reagentes

Todos os solventes, reagentes e padrões utilizados neste trabalho, foram de grau analítico, ou grau de HPLC sempre que necessário e água ultrapura.

Para a separação/identificação e quantificação de antocianinas foram utilizados os seguintes reagentes: na extração foram usados, metanol para análise (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido clorídrico 37% PA-ISO (Panreac, Barcelona, Espanha). Na quantificação, foram utilizados como eluentes os seguintes reagentes: ácido fórmico (Merck 98-100%, Darmstadt, Alemanha) e metanol, (CHROMASOLV® GRADIENT GRADE, ≥ 99,9% Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Para as técnicas de Folin-Ciocalteu, DPPH e ABTS, foi utilizado, etanol absoluto (EtOH, absoluto PA, Panreac Applichem, Darmstadt, Alemanha) (50% v/v).

Para as técnicas em microplaca foram utilizados os seguintes reagentes e padrões: Folin Ciocalteu Merck, Darmstadt, Alemanha, 2N (4:10 v/v), carbonato de sódio decahidratado (PA – ISO Panreac Applichem, Darmstadt, Alemanha), (6% w/v) e ácido gálico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil radical, 2,2-Difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil, PA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); Trolox 97%, PA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Ainda na metodologia de ABTS, foram utilizados a solução de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ≥98%, HPLC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (7mM, 96mg/25mL) em água ultrapura, Persulfato de Potássio ≥99,0% ACS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (2,45mM, 33,11mg/50mL) em água ultrapura, Ácido Acético Glacial 99,8%, ACS (Chem-Lab Zedelgem Belgium) e ainda Acetato de Sódio Anidro PA (Merck Darmstadt, Germany) (50mM, 410mg/100mL).

2.1.3 – Padrões

Os padrões utilizados neste trabalho, destinaram-se à identificação das antocianinas, foram adquiridos à Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha), tendo sido utilizados os seguintes: Delfinidina -3-galactósido ≥95.0%, HPLC; Delfinidina-3- glucósido ≥95.0%, HPLC; Cianidina-3-galactósido ≥90%, HPLC; Cianidina-3-glucósido ≥95% HPLC; Malvidina-3-galactósido ≥95%, HPLC; Peonidina-3-galactósido (500 µg/mL in methanol with 2% HCl,) e Pelargonidina- 3-glucósido, ≥97.0% HPLC).

2.2 – Amostragem

As amostras para este trabalho foram recolhidas na Quinta da Roeda (produtora de vinho Croft grupo Fladgate Partnership), durante a vindima do ano de 2013. Pertencem ao mesmo lote de uvas, e foram repartidas por um lagar de pisa tradicional (L) e uma cuba de pisa mecânica (C). Foram também recolhidas as amostras em período de maturação (M) correspondentes a 0 meses (M1); 2 meses (M2); 4 meses (M3) e 6 meses (M4).

As amostras foram recolhidas em várias etapas da produção do vinho em cada uma das modalidades, (Tabela 15).

Tabela 15: Descrição das várias etapas nas quais foram recolhidas amostras para a realização das metodologias escolhidas para esta tese. ¹- Após tratamentos, significa já foram corrigidos os valores de ph, grau alcoólico e acidez do vinho para os níveis legislados. L- Lagar; C-Cuba e M- Maturação.

Número da etapa	Nome da etapa	Amostra do Lagar	Amostra da Cuba
1	Após o Corte	L1	C1
2	Início da fermentação – Levantamento da Manta	L2	C2
3	24 Horas após a adição da aguardente	L3	C3
4	Após tratamentos ¹		M1
5	2 Meses após entrada em Maturação		M2
6	4 Meses após entrada em Maturação		M3
7	6 Meses após entrada em Maturação		M4

A recolha das amostras, foi feita para frascos esterilizados de 50 ml, sempre em duplicado e protegidas da luz para todas as etapas selecionadas. Após a recolha estas foram colocadas a -20°C até à realização dos procedimentos experimentais.

2.3 – Procedimentos experimentais

2.3.1 – Colorimetria

2.3.1.1 – Índices de Glories

Para esta metodologia as amostras após terem sido descongeladas, foram medidos cerca de 5 ml e colocados em tubo para centrifuga, com as seguintes condições (4000 rpm; 15min), o sobrenadante foi então retirado e realizadas as medições a 420; 520 e 620 nm diretamente em cuvets de plástico com 10mm de percurso ótico (Figura 15), adaptado de Method OIV-MA-AS2-07B ^[54].

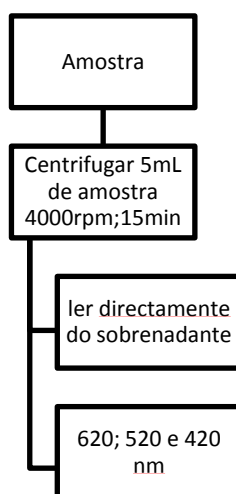


Figura 15: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a preparação das amostras para a realização dos índices de Glories.

Após realizar as medições dos comprimentos de onda separadamente os índices segundo Glories foram calculados da seguinte forma:

$$\text{Intensidade de cor} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$\text{Tonalidade do Vinho} = A_{420}/A_{520}$$

$$\text{Cor vermelha do vinho} = A_{520}$$

$$\text{Cor amarelo do vinho} = A_{420}$$

$$\text{Cor azul do vinho} = A_{620}$$

$$\text{Percentagem de amarelo} = [100 \times A_{420} / IC]$$

$$\text{Percentagem de vermelho} = [100 \times A_{520} / IC]$$

$$\text{Percentagem de azul} = [100 \times A_{620} / IC]$$

Sendo que uma percentagem entre 60 e 80% implicará uma cor vermelho vivo, já uma percentagem inferior a 40% indica uma cor vermelho acastanhado. ^[30, 54]

2.3.1.2 – Coordenadas CIEL *a*b*

De acordo com a literatura foram realizadas as medições L* (luminosidade), a* (verde-vermelho), b* (azul-amarelo), e ainda determinados os parâmetros C* (cromaticidade) e h* (matriz/tonalidade).^[30, 54]

As medições foram realizadas com amostras centrifugadas (segundo a O.I.V.)^[54] (Figura 16), recolhendo-se o sobrenadante e enchendo-se uma caixa de cultura de células (50 cm³), retangular e opticamente límpido.^[54]

O colorímetro foi calibrado com recurso a uma placa branca, segundo as instruções do fabricante. As determinações efetuaram-se numa sala escura, de forma a evitar qualquer interferência de cor e de luz exterior ao sistema. As medições foram efetuadas sempre nas mesmas condições experimentais para todas as amostras de vinho, tendo sido registadas sempre 3 medições para cada amostra.

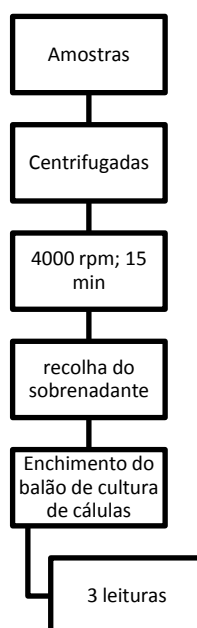


Figura 16: Fluxograma explicativo do procedimento realizado para a medição das coordenadas CIELAB.

As coordenadas L*, a* e b* foram medidas diretamente através da leitura direta com o colorímetro, já para o cálculo das coordenadas C* e h* as fórmulas aplicadas foram as seguintes: $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ e $h^* = \tan^{-1}(a^*/b^*)$ ^[30, 54]

2.3.2 – Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante

2.3.2.1 – Pré-tratamento da Amostra

Tendo em conta que as amostras recolhidas apresentavam muitas partículas sólidas foi necessário realizar a extração dos compostos fenólicos e com atividade antioxidante das mesmas.

Para tal mediram-se 3 ml de amostra e a esta foram adicionados 3 ml de etanol 50% (v/v). Esta solução foi então colocada a centrifugar a 5000 rpm durante 20 minutos.

Após esta primeira extração, foi recolhido o sobrenadante e ao resíduo sólido foram adicionados novamente 3 ml de etanol 50% e centrifugado com as condições descritas anteriormente. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi retirado e adicionado ao anterior e o volume foi ajustado até aos 9 ml. No final da extração consideramos então que a amostra se encontra diluída na proporção 1:3.

2.3.2.2 – Fenólicos Totais (Folin-Ciocalteu)

Para a determinação dos fenólicos totais a reação e leitura foram realizados em microplaca de 96 poços, baseado na técnica de Magalhães *et al.* ^[55] com modificações. Resumidamente, na placa de 96 poços colocaram-se 75 µl de amostra pré-tratada e foram feitas diluições sucessivas entre 1:48 e 1:3072. Nos poços destinados à curva de calibração do padrão, colocou-se padrão de ácido gálico na concentração de 31,25 mM e 500 mM (solução mãe a 1mM, 170,12mg/L em água), adicionaram-se em todos mais 25 µl de reagente de Folin (2 N 4:10, v/v) e a placa foi colocada no espectrofotómetro durante 10 minutos para agitação e incubação.

Após a incubação foram adicionados 100 µl de carbonato de sódio (6% w/v) em todos os poços da placa. A ação dos compostos foi monitorizada a 765 nm a cada minuto durante 120 min (Figura 17 e Figura 18).

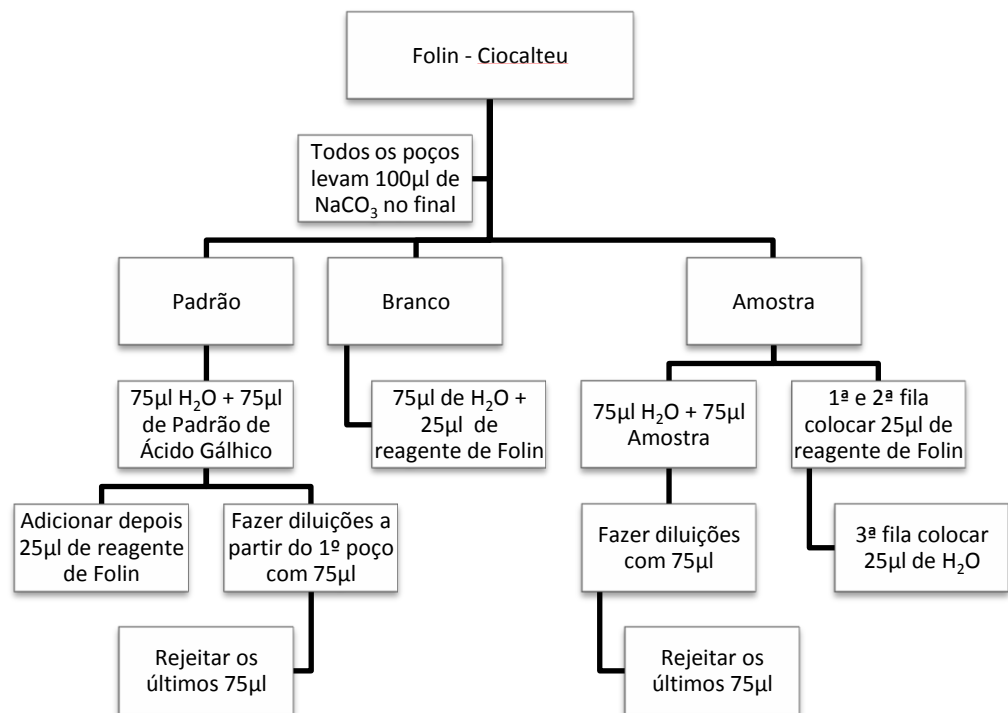


Figura 17: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a realização da metodologia de Folin – Ciocalteu realizada em microplaca de 96 poços.

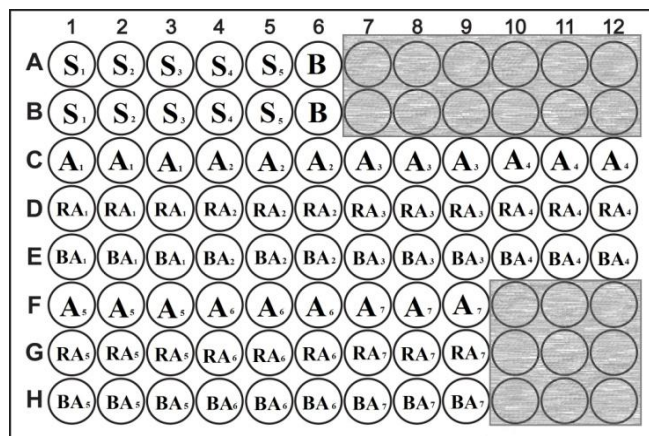


Figura 18: Esquema da configuração da placa utilizada para a detecção de fenólicos totais. Em que, S₁- Padrão a 500mM; S₂- Padrão a 250mM; S₃- Padrão a 125mM; S₄- Padrão a 62,5mM; S₅ - Padrão a 31,25mM; B- Branco; A₁ – Amostra 1; RA₁- Réplica da Amostra 1; BA₁- Branco da Amostra 1; A₂- Amostra 2; RA₂- Réplica da Amostra 2; BA₂- Branco da Amostra 2; A₃ – Amostra 3; RA₃- Réplica da Amostra 3; BA₃- Branco da Amostra 3; A₄ – Amostra 4; RA₄- Réplica da Amostra 4; BA₄- Branco da Amostra 4; A₅ – Amostra 5; RA₅- Réplica da Amostra 5; BA₅- Branco da Amostra 5; A₆ – Amostra 6; RA₆- Réplica da Amostra 6; BA₆- Branco da Amostra 6; A₇ – Amostra 7; RA₇- Réplica da Amostra 7; BA₇- Branco da Amostra 7; Os poços que se encontram sombreados a cinzento não são utilizados.

2.3.2.3 - DPPH (Atividade Antioxidante)

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, foi baseado em Magalhães *et al.* ^[55] Viegas *et al.* ^[56], realizado em microplaca de 96 poços (Figura 19 e Figura 20);

Para a construção da curva de calibração foi utilizado o padrão Trolox (solução mãe a 1mM, 250,3mg/L em etanol 50%) foram carregados com 100 µl de etanol absoluto e 100 µl de solução padrão de diluídos entre 15,62 mM e 250 mM. Nos poços de amostra foram colocados no primeiro poço 200 µl de amostra e nos restantes 100 µl de etanol 50% e as diluições foram feitas a partir do primeiro poço com 100 µl (1:24 e 1:768), após esta etapa foram adicionados às primeira e segunda filas 100 µl de DPPH (1mM, 5,9mg/50ml em etanol absoluto) e na terceira 100 µl de etanol absoluto. O branco foi efetuado com 100µl de etanol 50% e 100µl de etanol absoluto, já os poços de DPPH controlo foram efetuados com 100 µl de etanol 50% e 100 µl de DPPH. A adição do DPPH foi efetuada no final a quando da introdução na placa no leitor, esta ficou então a ler a cada minuto durante 120 minutos, a um comprimento de onda de 517nm.

Posteriormente foi avaliado maior tempo de cinéticas (até 240 min) de acordo com, Carmona-Jiménez *et al.* ^[57].

Também foram efetuadas diluições e cinética de reação em *eppendorf* (em vez de placa), mantendo as proporções dos reagentes fazendo leituras em placa ao fim, 120, 240 e 300 min. O volume final transposto na placa manteve-se igual ao descrito no protocolo a cima referido.

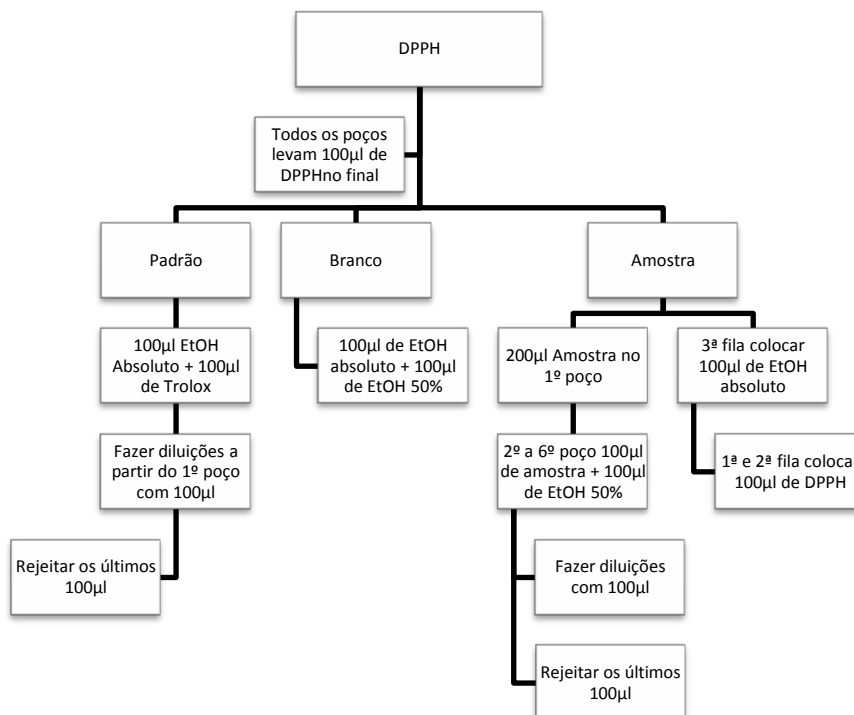


Figura 19: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a realização da metodologia de DPPH.

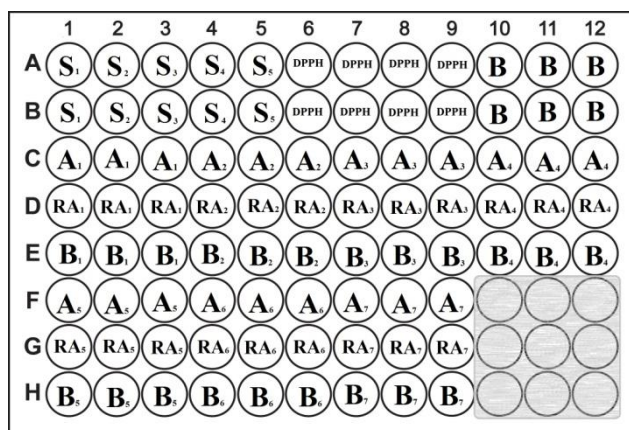


Figura 20: Esquema da configuração da placa utilizada na metodologia de DPPH. Em que, S₁- Padrão a 250mM; S₂ - Padrão a 125mM; S₃- Padrão a 62,5mM; S₄- Padrão a 31,25mM; S₅ - Padrão a 15,62mM; B- Branco; DPPH- DPPH controlo; A₁ – Amostra 1; RA₁- Replica da Amostra 1; BA₁- Branco da Amostra 1; A₂- Amostra 2; RA₂- Replica da Amostra 2; BA₂- Branco da Amostra 2; A₃- Amostra 3; RA₃- Replica da Amostra 3; BA₃- Branco da Amostra 3; A₄- Amostra 4; RA₄- Replica da Amostra 4; BA₄- Branco da Amostra 4; A₅- Amostra 5; RA₅- Replica da Amostra 5; BA₅- Branco da Amostra 5; A₆- Amostra 6; RA₆- Replica da Amostra 6; BA₆- Branco da Amostra 6 e A₇- Amostra 7; RA₇- Replica da Amostra 7; BA₇- Branco da Amostra 7. Os poços que se encontram sombreados a cinzento não são utilizados.

2.3.2.4 – ABTS (Atividade Antioxidante)

No que toca ao procedimento experimental, este foi realizado em microplaca (Adaptado de Magalhães *et al.* [55, 58]), sobe as seguintes condições (Figura 21, 22 e 23).

Relativamente à solução de trabalho de $ABTS^{*+}$ (3,5 mM), foi feita 12-16h antes da análise juntando ABTS (96mg/25mL 7mM em água) com persulfato de potássio (2,45 mM) 1:1. Antes da análise foi preparada a solução de $ABTS^{*+}$ mediante resultado da leitura das absorvâncias a 734 nm ($0,8 \pm 0,02$).

Na microplaca de 96 poços, colocaram-se em todos os poços de padrão foram carregados com 150 µl de água e 150 µl de solução padrão de Trolox (solução mãe a 1mM, 250,3mg/L em etanol 50%) diluídos entre 3,91mM e 500mM. Nos poços de amostra foram colocados no primeiro poço 300 µl de amostra e nos restantes 150 µl de água e as diluições foram feitas a partir do primeiro poço com 150 µl (1:48 e 1:3072), após esta etapa foram adicionados às primeira e segunda filas 150 µl de $ABTS^{*+}$ e na terceira 150 µl de água. O branco foi efetuado com 150 µl de água e 150 µl de tampão acetato, já os poços de ABTS controlo foram efetuados com 150 µl de tampão acetato e 150 µl de $ABTS^{*+}$. A adição do $ABTS^{*+}$ foi efetuada no final a quando da introdução da placa no leitor, tendo sido efetuadas leituras a T0 e T5h (300min), ao comprimento de onda de 734nm.

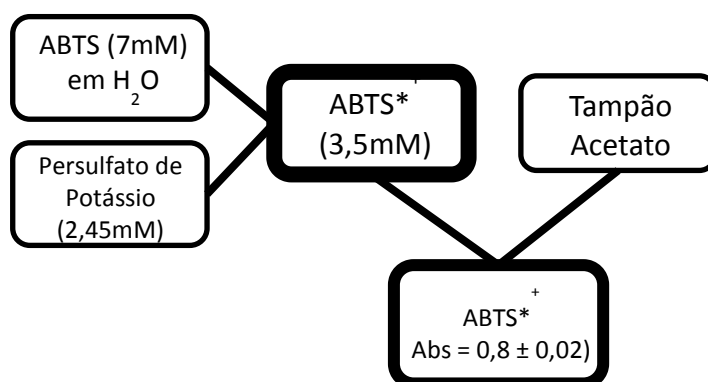


Figura 21: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a preparação da solução de trabalho de $ABTS^{*+}$.

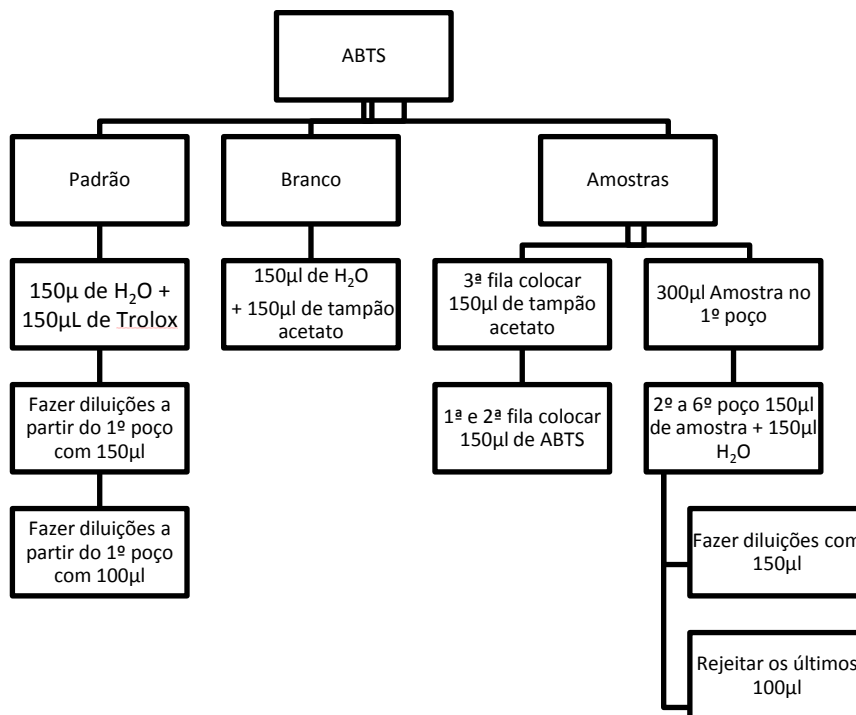


Figura 22: Fluxograma explicativo do procedimento executado para a realização da metodologia de ABTS*+.

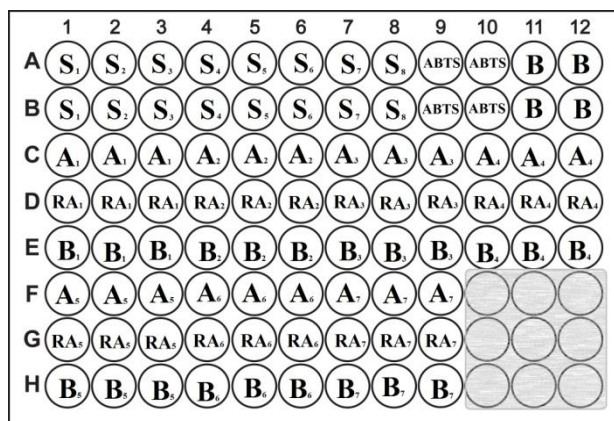


Figura 23: Esquema da configuração da placa utilizada na metodologia de ABTS. Em que, S- Padrão; B- Branco; ABTS- ABTS controlo; A₁ – Amostra 1; RA₁- Replica da Amostra 1; BA₁- Branco da Amostra 1; A₂- Amostra 2; RA₂- Replica da Amostra 2; BA₂- Branco da Amostra 2; A₃ – Amostra 3; RA₃- Replica da Amostra 3; BA₃- Branco da Amostra 3; A₄ – Amostra 4; RA₄- Replica da Amostra 4; BA₄- Branco da Amostra 4; A₅ – Amostra 5; RA₅- Replica da Amostra 5; BA₅- Branco da Amostra 5; A₆ – Amostra 6; RA₆- Replica da Amostra 6; BA₆- Branco da Amostra 6; A₇ – Amostra 7; RA₇- Replica da Amostra 7; BA₇- Branco da Amostra 7. Os poços que se encontram sombreados a cinzento não são utilizados.

2.3.3 – Composição em Antocianinas

Na Identificação e quantificação das antocianina, mediu-se rigorosamente 10 ml de amostra para um balão volumétrico de 20 ml e adicionaram-se até à marca ácido clorídrico em metanol 0,1% (v/v), esta mistura foi colocada em agitação magnética durante 10 minutos sempre ao abrigo da luz. Após este período de tempo o magneto foi retirado e o conteúdo do balão foi transferido para o tubo de centrifuga, sendo colocado a 8000 rpm durante 20 minutos (Figura 24). (Adaptado de Pinho *et al.*)^[59]

Após esta etapa, o sobrenadante foi recolhido e novamente colocado num balão de 20 ml acertando-se o volume até à marca com metanol HPLC. Estas alíquotas foram depois colocadas a -20°C até à altura da sua análise por HPLC.

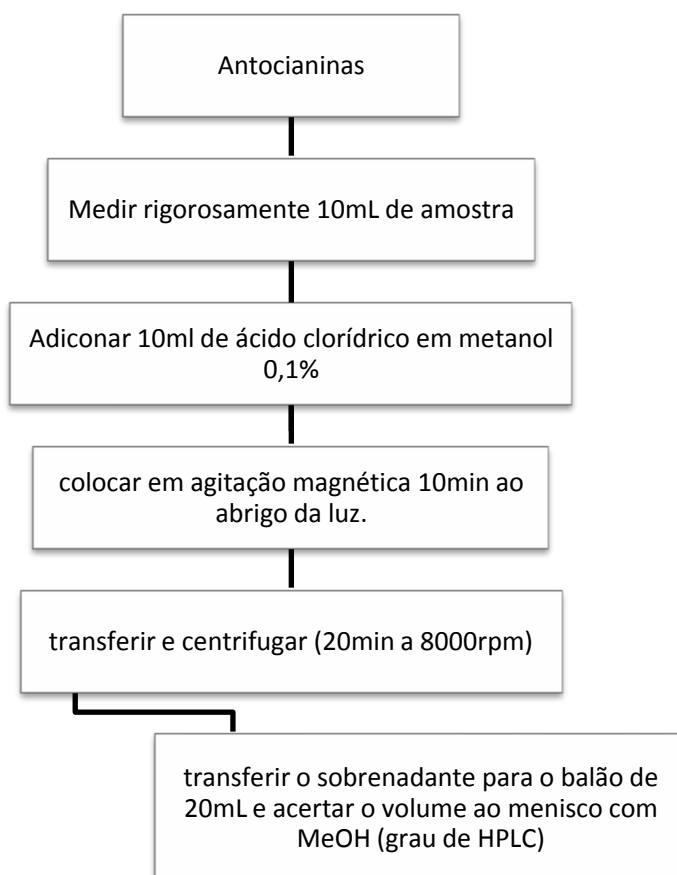


Figura 24: Fluxograma resumo explicativo da preparação das amostras para a metodologia de antocianinas.

As condições da separação cromatográfico foram também adaptadas de Pinho *et al.* ^[59] e de Gouvêa *et al.*, 2015 ^[60], sendo que o volume foi de 20µl na coluna aquecida a 40°C, utilizando como eluentes, A 10% ácido fórmico aquoso (90:10; v/v) e B uma mistura de ácido fórmico/água/metanol (10:40:50 v/v/v). Relativamente ao gradiente usado foi o seguinte, 20% durante 3 minutos solvente B, 30% em 15 min e por 2 min de solvente B, 60% em 15 min e por 2 min de solvente B e finalmente 20 % em 5 min e por 8 min de solvente B, assim sendo a corrida fica com uma duração total de 50 minutos mas que foi entretanto alterada para 48 min, as amostras foram sempre executadas em triplicado (Tabela 16).

Tabela 16: Programa utilizado para o gradiente da corrida de HPLC-DAD da quantificação e identificação de antocianinas.

Gradiente	
Tempo /min	B (%) /A
0-3	20
15	30
15-17	30
30	60
30-32	60
40	20

2.4 – Análise Estatística dos Resultados Obtidos

Os valores obtidos a partir dos resultados experimentais de todas as técnicas analisadas foram estatisticamente analisados através do programa SPSS 22.0 para o Windows e pelo Microsoft Excel 2010.

A ANOVA TWO-WAY, foi aplicada neste trabalho para discriminar as amostras em função do tipo e tempo de processamento.

A ANOVA ONE-WAY, foi utilizada para avaliar diferenças significativas de evolução/alteração para as amostras da maturação em cada uma das diferentes técnicas utilizadas neste trabalho.

O teste de Tukey foi aplicado para verificar o nível de significância das amostras em função do tipo e tempo de processamento e técnicas usadas nas diferentes determinações.

O teste de correlação de Pearson foi aplicado para verificar a eficiência das diferentes técnicas utilizadas para a determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante.

O estudo das médias marginais estimadas relativas, foi realizado para visualizar a evolução ao longo das etapas do processamento.

Parte III

Resultados e Discussão

3.1– Colorimetria

3.2 – Fenólicos Totais e atividade antioxidante

3.3 – Composição em antocianinas

3.1- Colorimetria

3.1.1 - Índices de Glories

Os índices de Glories foram medidos espectrofotometricamente, com um percurso ótico de 10mm, em cuvetes de plástico e repetidos em triplicado. Os resultados obtidos mostram que o vinho quer na etapa C1, quer na etapa L1 se apresentou pouco vermelho (%V) com os respetivos valores de 37,19 e 45,51. No caso da intensidade de cor a amostra C1 apresentou-se menos intensa (0,89) do que para etapa L1 (2,00). (Tabela 17).

Tabela 17: resultados obtidos para os índices de Glories são referentes a valores médio $\pm$ desvio padrão em valores absolutos de absorvância, para amostras repetidas em triplicado. C – cuba; L- lagar

	620	520	420	IC	%V	%A	%B
C1	0,15 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,002	0,41 $\pm$ 0,001	0,89 $\pm$ 0,01	37,19 $\pm$ 0,19	45,98 $\pm$ 0,35	16,83 $\pm$ 0,54
C2	0,10 $\pm$ 0,003	0,46 $\pm$ 0,013	0,26 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,02	55,64 $\pm$ 0,03	31,43 $\pm$ 0,03	12,93 $\pm$ 0,01
C3	0,67 $\pm$ 0,01	1,57 $\pm$ 0,004	0,84 $\pm$ 0,001	3,08 $\pm$ 0,006	50,92 $\pm$ 0,10	27,38 $\pm$ 0,06	21,69 $\pm$ 0,15
L1	0,43 $\pm$ 0,002	0,91 $\pm$ 0,002	0,66 $\pm$ 0,001	2,00 $\pm$ 0,002	45,51 $\pm$ 0,11	33,09 $\pm$ 0,03	21,35 $\pm$ 0,08
L2	0,35 $\pm$ 0,001	1,27 $\pm$ 0,001	0,77 $\pm$ 0,001	2,38 $\pm$ 0,001	53,26 $\pm$ 0,04	32,21 $\pm$ 0,04	14,53 $\pm$ 0,02
L3	0,26 $\pm$ 0,002	1,19 $\pm$ 0,001	0,70 $\pm$ 0,001	2,15 $\pm$ 0,003	55,33 $\pm$ 0,01	32,73 $\pm$ 0,01	11,93 $\pm$ 0,08

Realizou-se uma ANOVA TWO – WAY, para comparação entre os dois tipos de processamento (Cuba e Lagar) e diferentes etapas da vinificação. O que se verificou foi uma clara diferença no que respeita ao tipo de processamento. Já as diferenças em relação às etapas de vinificação não são significativas. Realizando uma pesquisa na literatura, não foi possível encontrar dados que possam corroborar os resultados obtidos relativamente á comparação entre a cuba mecânica e lagar tradicional. (Figura 25)

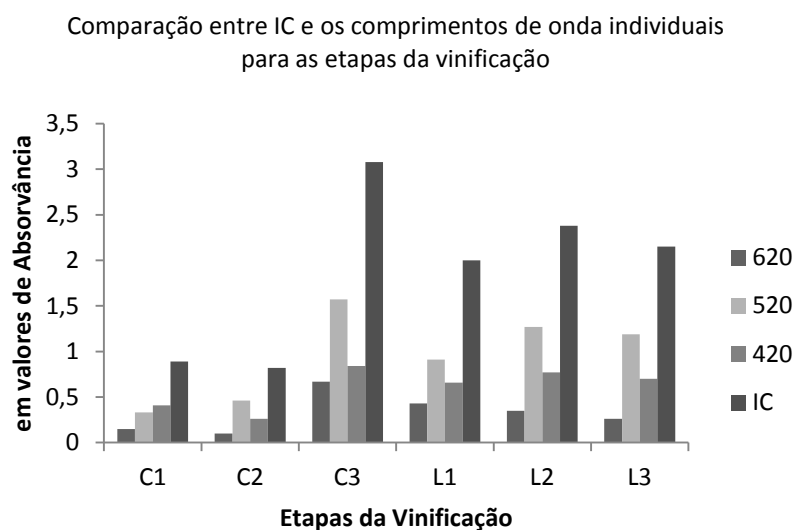


Figura 25: Gráfico de colunas, representativo da comparação entre comprimentos de onda analisados individualmente e a intensidade de cor para amostras referentes às etapas de vinificação, valores são referentes a médias de amostras repetidas em triplicado. C- Cuba; L-Lagar.

Recorrendo à ANOVA ONE WAY, para as etapas da maturação (Tabela 18), o que se verifica é uma manutenção e estabilização dos valores obtidos para todos os comprimentos de onda individuais e para os índices calculados. Este facto segundo os autores Almela *et al.* ^[61]; Figueiredo-González *et al.* ^[62]; Rivas *et al.* ^[63] e Ho *et al.* ^[28], se deve ao facto de este ser um vinho jovem e que está em maturação em cuba de inox contrariamente ao tradicional casco de madeira.

Tabela 18: resultados obtidos para os índices de Glories são referentes a valores médio $\pm$ desvio padrão em valores absolutos de absorvância, para amostras repetidas em triplicado. Os índices a a c - indicam diferenças significativas $p < 0.05$ no teste ANOVA ONE-WAY. M - maturação

	620	520	420	IC	%V	%A	%B
M1	0,34 $\pm$ 0,005 ^a	1,61 $\pm$ 0,02 ^a	0,89 $\pm$ 0,01 ^a	2,84 $\pm$ 0,03 ^a	56,80 $\pm$ 0,12 ^a	31,16 $\pm$ 0,17 ^a	12,03 $\pm$ 0,01 ^{ab}
M2	0,35 $\pm$ 0,008 ^a	1,69 $\pm$ 0,003 ^b	0,95 $\pm$ 0,02 ^b	2,99 $\pm$ 0,04 ^b	56,54 $\pm$ 0,22 ^a	31,91 $\pm$ 0,21 ^b	11,56 $\pm$ 0,4 ^a
M3	0,39 $\pm$ 0,01 ^b	1,73 $\pm$ 0,01 ^{bc}	0,97 $\pm$ 0,01 ^b	3,09 $\pm$ 0,03 ^c	56,06 $\pm$ 0,18 ^b	31,52 $\pm$ 0,04 ^{ac}	12,47 $\pm$ 0,2 ^c
M4	0,42 $\pm$ 0,01 ^c	1,77 $\pm$ 0,02 ^c	1,01 $\pm$ 0,01 ^c	3,21 $\pm$ 0,03 ^d	55,19 $\pm$ 0,03 ^c	31,61 $\pm$ 0,03 ^{bc}	13,20 $\pm$ 0,01 ^d

Ao fazer-se uma observação atenta dos resultados obtidos para as medições dos índices de Glories, podemos concluir que o comprimento de onda que mais influencia a cor é o de 420 nm que corresponde segundo Juster ^[18], à cor absorvida azul-escuro e transmitida de amarelo ainda assim os dois restantes comprimentos de onda, 520 e 620, analisados individualmente estão interligados devido ao facto de ser a sua combinação que produz a cor que o vinho realmente apresenta um vermelho escuro intenso (Figuras 25 e 26).

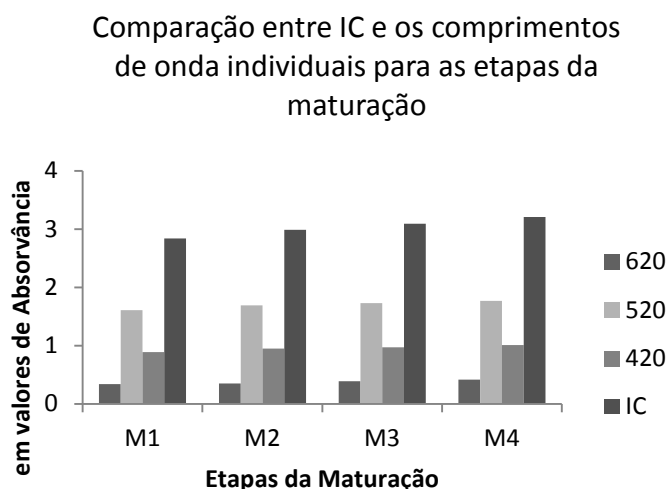


Figura 26: Gráfico de colunas, representativo da comparação entre comprimentos de onda analisados individualmente e a intensidade de cor para etapas da maturação, valores são referentes a médias de amostras repetidas em triplicado. M -Maturação

Comparando-se agora a intensidade de cor (IC) com os três comprimentos de onda individuais, 620, 520 e 420 nm (Figuras 24 e 25), podemos verificar que esta é diretamente influenciada por todos os eles, sendo que como já foi visto para todos os outros parâmetros analisados nas etapas de maturação há uma tendência para a estabilização o que não é exceção neste caso, o que segundo Ho *et al.* ^[28], se deve ao facto de este vinho ser maturado em cuba de inox.

Observando por outro lado os índices calculados de Glories (Figuras 27 e 28), o que se pode verificar é que a cor vermelha é a predominante para todas as amostras o que segundo os autores, Rustioni *et al.* ^[64], se deve ao facto de as antocianinas serem compostos que possuem a capacidade de absorver luz nos comprimentos de onda próximos aos 520 nm, com a exceção da amostra C1, onde se verifica uma inversão com percentagem de amarelo, passando esta a ser a cor predominante, facto que segundo os autores Rustioni *et al.* ^[64], pode significar que existe copigmentação, levando a cor do vinho a ter uma tonalidade diferente das restantes amostras.

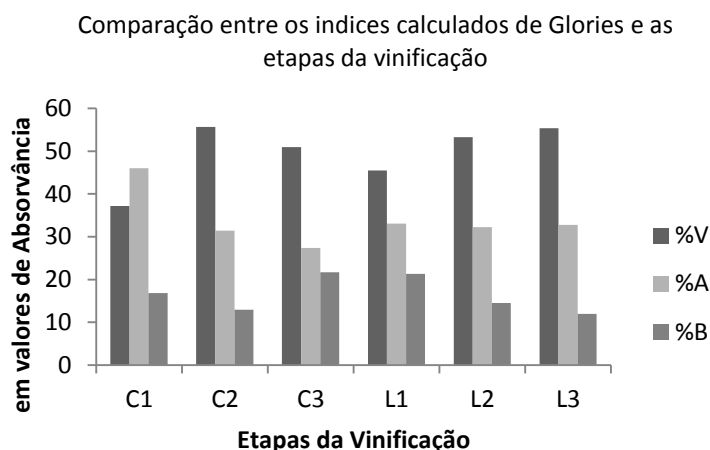


Figura 27: Gráfico de colunas, representativo da comparação entre índices calculados e amostras das etapas de vinificação, valores são referentes a médias de amostras repetidas em triplicado. C-Cuba e L- Lagar.

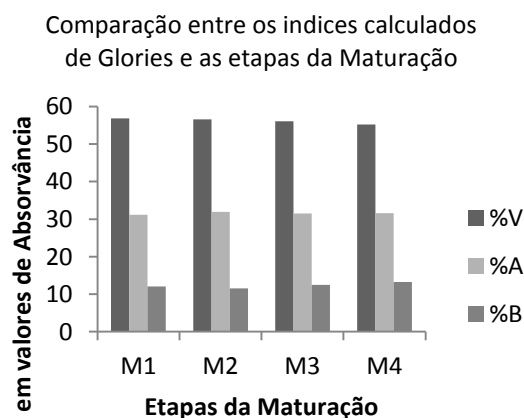


Figura 28: Gráfico de colunas, representativo da comparação entre índices calculados e amostras das etapas de maturação, valores são referentes a médias de amostras repetidas em triplicado. Maturação.

De um modo geral para todos os índices determinados verificou-se uma tendência nos valores em todas as etapas de maturação, verificando-se que estes se mantêm estáveis muito embora tenha havido uma diminuição em alguns deles, relativamente às etapas iniciais do processamento, não obstante Figueiredo-González *et al.* ^[62] os valores apurados estão de acordo com o que se encontra na literatura para amostras semelhantes às analisadas.

3.1.2 - Coordenadas L*a*b*

Analísaram-se as amostras relativamente às coordenadas de cor L*a*b*, que revelaram que para L* (luminosidade) os valores oscilaram entre 20,76 e 23,13, semelhante aos encontrados por Figueiredo-González ^[62], valor médio 28±0,49 para vinhos fortificados. A coordenada a* variou entre 0,16 e 2,89, a coordenada b* variou entre -0,51 e 0,02, tendo sido estes valores lidos diretamente do colorímetro (Tabela 19 e 20).

Tabela 19: resultados obtidos para as coordenadas L*a*b*, são referentes a valores médios ±desvio padrão, para amostras repetidas em triplicado. C – cuba; L - lagar

	L*	a*	b*
C1	23,13±0,005	2,89±0,02	-0,51±0,005
C2	20,81±0,05	0,78±0,03	-0,12±0,05
C3	21,48±0,07	0,22±0,02	-0,11±0,01
L1	21,86±0,47	0,67±0,08	-0,10±0,02
L2	20,76±0,05	0,53±0,01	0,02±0,02
L3	20,72±0,06	0,66±0,01	-0,05±0,01

Tabela 20: resultados obtidos para as coordenadas L*a*b*, são referentes a valores médios ±desvio padrão, para amostras repetidas em triplicado. M - maturação

	L*	a*	b*
M1	20,85±0,06	0,31±0,05 ^a	-0,06±0,03 ^a
M2	20,82±0,08	0,25±0,02 ^{ab}	0,03±0,02 ^{ab}
M3	21,10±0,03	0,22±0,04 ^{ab}	0,03±0,02 ^b
M4	21,19±0,10	0,16±0,03 ^b	0,04±0,01 ^b
Sig.	0,251		

Para as etapas C1 a C3 e L1 a L3, o teste de Tukey mostrou que para todos os parâmetros referentes à cor existem diferenças significativas entre etapas, C1 ≠ C2 ≠ C3 e L1 ≠ L2 ≠ L3, (Tabela 19), mas entre o tipo de processamento, cuba e lagar, não existem diferenças significativas. Para as etapas da maturação também não são observadas diferenças significativas em relação a todas as coordenadas L*a*b*, (Tabela 20).

Verificou-se para o parâmetro L* que este se mantém praticamente constante ao longo do tempo independentemente do tipo de processamento (Tabela 19 e 20), o que de acordo com Almela *et al.* ^[61], pode dever-se ao facto de existirem sólidos em suspensão no caso das etapas C1 e L1, já para as etapas de maturação este facto pode dever-se de acordo com os autores Lago-Vanzela *et al.* ^[65] e Santos-Buelga & de Freitas ^[66], a

sinergismos entre as cores que compõem o vinho, fazendo com que este perca alguma luminosidade devido à sua cor, apesar de límpida, apresentar uma tonalidade mais escura que a inicial.

Segundo os autores, Figueiredo-González *et al.* [62] e Alañón *et al.* [67] a diminuição que é observada para o parâmetro a^* ao longo de todo o processo de vinificação independentemente do tipo, pode ser explicada pela diminuição da quantidade de antocianinas presentes no vinho e pela interação destas com condições oxidativas às quais o vinho é exposto. No entanto ao observar-se atentamente o parâmetro a^* e o parâmetro b^* (Figura 29 e 30) pode verificar-se que a evolução de ambos está interligada e que segundo Lago-Vanzela *et al.* [65] e Santos-Buelga & de Freitas [66], pode indicar que a cor do vinho está a transformar-se de um vermelho rosado claro para um vermelho escuro e mais acastanhado, devido à perda de copigmentação azul que com o tempo se vai transformando em nuances amarelas.

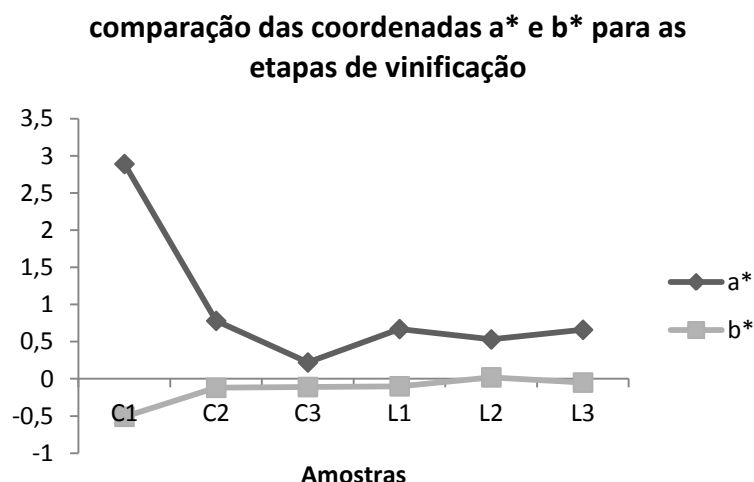


Figura 29: Gráfico de linhas que compara as medições das coordenadas a^* e b^* para as amostras das etapas de vinificação. Os valores apresentados são referentes às médias de amostras repetidas em triplicado. C – Cuba e L – Lagar.

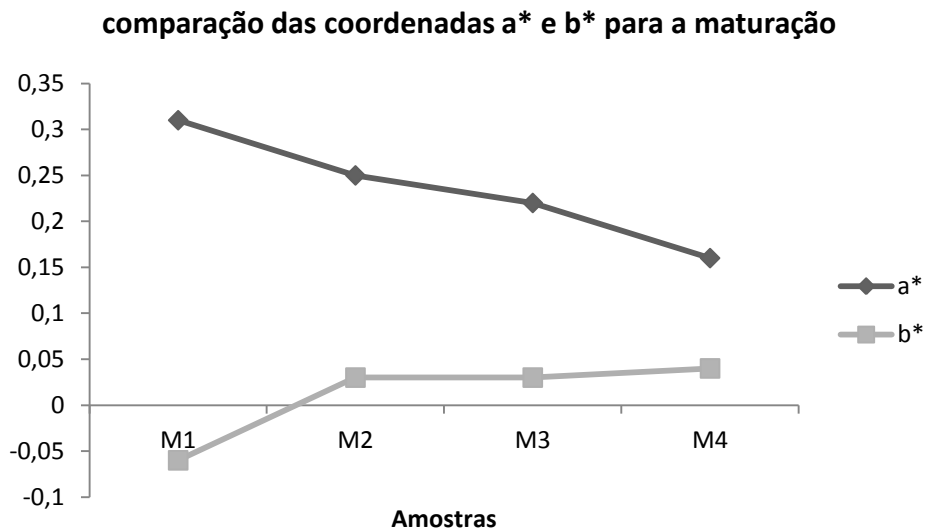


Figura 30: Gráfico de linhas que compara as medições das coordenadas a* e b* para as amostras das etapas de maturação. Os valores apresentados são referentes às médias de amostras repetidas em triplicado. M-Maturação

Uma análise geral de todos os parâmetros de cor medidos indica que estes sofreram poucas variações, (Tabelas 19 e 20) o que segundo Ho *et al.* ^[28], se deve ao facto de vinhos maturados em cubas de inox por oposição a cascos de carvalho ou garrafa estão menos expostos a reações de oxidação redução e oxigénio dissolvido e assim o vinho conseguir manter a sua cor mais vermelha durante mais tempo do que a castanha, encontrada nos vinhos que maturam e envelhecem em cascos de carvalho.

3.2 - Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante

Relativamente ao teor em fenólicos totais foi determinado através da metodologia de Folin-Ciocalteu e para a atividade antioxidante, foram realizadas as metodologias de DPPH, ABTS.

Considerando a análise das três técnicas em simultâneo pôde-se verificar que os valores obtidos revelaram um perfil relativamente idêntico ao longo do tempo (Tabela 21) sendo que para o DPPH os valores oscilaram entre 7,78 e 17,17 mM de equivalentes de Trolox (ET), já para o ABTS estes variaram entre 10,31 e 40,37 mM ET, no que toca aos fenólicos totais os valores rondaram os 5,09 e 16,76 desta vez em mM de equivalentes de ácido gálico (EAG), para as etapas C1 a C3 (cuba) e L1 a L3 (lagar). Estes valores estão concordantes com a literatura encontrada tanto para ensaios como para amostras semelhantes. ^[55, 68]

Tabela 21: Os resultados apresentados na tabela são referentes a valores médios $\pm$ desvio padrão para amostras repetidas em triplicado e para as diferentes técnicas de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e de atividade antioxidante (DPPH e ABTS). 1- mM de EAG; 2- mM de ET, em relação às diferentes etapas da vinificação. C- cuba; L- lagar.

	Folin-Ciocalteu ¹	DPPH ²	ABTS ²
C1	5,09 $\pm$ 0,28	7,78 $\pm$ 0,80	10,31 $\pm$ 0,54
C2	8,7 $\pm$ 0,32	9,25 $\pm$ 0,97	19,51 $\pm$ 0,82
C3	10,36 $\pm$ 0,34	15,04 $\pm$ 0,96	42,67 $\pm$ 2,55
L1	10,49 $\pm$ 0,58	16,87 $\pm$ 0,51	33,23 $\pm$ 0,43
L2	14,53 $\pm$ 0,69	17,17 $\pm$ 1,41	28,83 $\pm$ 0,17
L3	16,76 $\pm$ 0,86	16,72 $\pm$ 0,42	40,37 $\pm$ 0,33

Através da observação da tabela (Tabela 21) podemos visualizar, uma clara distinção entre o tipo de processamento nas três primeiras etapas (C1 e L1; C2 e L2; C3 e L3). Verifica-se ainda que existe um aumento da atividade antioxidante ao longo das etapas e que esta é sempre mais elevada para as amostras provenientes do lagar do que para as provenientes da cuba. Estes dados foram comprovados através do estudo das médias marginais estimadas relativas a cada uma das metodologias em relação às etapas, isto pode dever-se ao facto de a etapa C3 e L3 corresponder às 24h após a aguardentação. A justificação para estes resultados é segundo os autores Mateus & Freitas ^[41], e Oliveira *et al.* ^[68], um conteúdo elevado em etanol favorece a solubilidade dos compostos fenólicos e como estes estão diretamente interligados com a atividade antioxidante, podem favorecer um aumento da mesma nesta etapa da produção do vinho.

Outro facto é que a prensagem do vinho que ocorre imediatamente após a aguardentação, vai também ajudar na extração de compostos que estivessem ainda na

parte sólida da uva este processo pode então contrariar o efeito que pudesse ser causado pela diluição do mosto fermentado com a aguardente.

No que respeita à quantificação de compostos fenólicos a técnica de Folin-Ciocalteu revelou-se de fácil execução e talvez por isso seja muito referida na literatura para o tipo de amostra utilizada e através de uma análise de correlação de Pearson podemos ainda verificar que existe uma correlação muito forte entre esta técnicas e as duas técnicas escolhidas para a avaliação da atividade antioxidante, sendo respetivamente com a técnica de DPPH de 0,556 e com a técnica de ABTS de 0,471.

Através da análise estatística com a ANOVA TWO-WAY e o teste de Tukey, verificou-se que entre as três primeiras etapas existem diferenças significativas ($p < 0,05$), quanto ao processo de vinificação (Cuba mecânica-C e Lagar tradicional-L), (Tabela 21). Quanto ao tipo de vinificação não existe literatura disponível, no entanto quando comparados em termos absolutos, os valores obtidos são concordantes com a literatura, nomeadamente Magalhães *et al.* ^[55] descreve para vinhos tintos valores de 10,6 a 15,6 EAG.

Relativamente às diferentes etapas da maturação (Tabela 22), através da realização de uma ANOVA ONE-WAY pode observar-se que não houve diferenças significativas, mas observou-se um perfil decrescente estável o que é corroborado pelos trabalhos de Pinho *et al.* ^[59], Mateus & Freitas ^[41] e Oliveira *et al.* ^[69], que atribuem à transformação dos compostos originais do mosto noutros mais estáveis como anteriormente referido, e também às reações redox que ocorrem devido às trasfegas de local para local que o vinho realizou, figura 38. Na etapa M4, que corresponde a 6 meses de maturação, obteve-se um valor médio de 14,47 EAG, em que é possível observar a estabilização tendo em conta a semelhança com M3 e cujo valor é equiparável aos obtidos por Magalhães *et al.* ^[55] para vinhos tintos.

Tabela 22: Os resultados apresentados na tabela são referentes a valores médios $\pm$ desvio padrão para amostras repetidas em triplicado e para as diferentes técnicas de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e de atividade antioxidante (DPPH e ABTS). 1- mM de EAG; 2- mM de ET. M- maturação.

	Folin-Ciocalteu ¹	DPPH ²	ABTS ²
M1	16,48 $\pm$ 0,29	14,20 $\pm$ 1,02	46,80 $\pm$ 5,57
M2	14,99 $\pm$ 0,66	15,28 $\pm$ 0,19	41,85 $\pm$ 0,83
M3	14,54 $\pm$ 0,59	14,84 $\pm$ 0,99	37,84 $\pm$ 2,38
M4	14,47 $\pm$ 0,27	13,66 $\pm$ 0,18	35,91 $\pm$ 1,91
Sig.	0,304	0,774	0,140

Em relação às etapas da maturação (M1-M4) (Tabela 20), as diferenças não foram significativas entre cada etapa $p \geq 0,05$, este facto pode dever-se à exposição do vinho a reações de oxidação/redução irreversíveis que transformam os compostos iniciais presentes no mosto em outros derivados mais estáveis, havendo por isso uma perda. [41, 57] No caso concreto das amostras em análise essa diferença é notada mas não acentuada devido ao facto do vinho ainda ser muito jovem e não ter ainda entrado nas etapas de envelhecimento.

Especificamente em relação à técnica de DPPH, para a avaliação da atividade antioxidante, foram encontrados algumas dificuldades na aplicação da técnica às presentes amostras. Carmona-Jiménez *et al.* [57], indica que há dificuldades em encontrar linearidade entre a concentração de antioxidantes (diluição da amostra) e a percentagem de inibição em amostras de vinho e dos seus subprodutos, demonstrando que trabalhar com diluições elevadas minimiza o efeito da matriz. Dificuldades adicionais na aplicação desta metodologia foram por exemplo a mistura destas amostras com percentagens de etanol elevadas (solvente preferido nesta metodologia) em trabalhar com as amostras, no sentido em que ao procede-se à mistura destas com grandes percentagens de etanol, (solvente preterido nesta metodologia [55, 57]) observando-se precipitação.

Foi avaliado o tempo de reação, verificando-se que ao final de 120 min [55] a reação não estava completa e que ao final de 300 min [57] já não se observava alterações quando comparado com o tempo de 240 min o que significa o final da reação. De acordo com Carmona-Jiménez *et al.* [57] foi então selecionado o tempo de 240min como tempo de reação. No entanto com o aumento do tempo de reação, e para evitar evaporações da microplaca ou alterações na mesma devido ao elevado tempo de exposição do material da mesma ao solvente orgânico [55] optou-se por realizar a reação em *eppendorf* ao abrigo da luz e no final do tempo de reação proceder-se à leitura em placa. Tendo em conta as dificuldades encontradas com na aplicação da técnica de DPPH foi necessário a aplicação de uma outra metodologia para a avaliação da atividade antioxidante assim optou-se por testar a metodologia de ABTS que se revelou de fácil aplicação às amostras. Ambas as metodologias de avaliação da atividade antioxidante foram eficientes e verificou-se uma elevada correlação (0,759 na correlação de Pearson).

3.3 - Composição em antocianinas

Analizou-se a composição em antocianinas das amostras recolhidas das diferentes etapas de elaboração do Vinho do Porto por HPLC-DAD. Foram identificados e quantificados cinco picos cromatográficos (Figura 31), correspondentes às seguintes antocianinas: a delphinidina-3-glucosido (Dp-3-gluc) e a cianidina-3-glucosido (Cy-3-gluc), identificadas através da comparação por os espectros dos respetivos padrões, a malvidina - 3- glucosido (Mv-3-gluc), a peonidina-3-glucosido (Pn-3-gluc) e a petunidina-3-glucosido (Pt-3-gluc), que foram identificada por comparação com a literatura nos, Mateus & Freitas ^[41], Pinho *et al.* ^[55], Oliveira *et al.* ^[68], Oliveira *et al.* ^[69], Fraige *et al.* ^[70]. Para a quantificação foi usada a curva de calibração da cy-3-gluc, sendo as restantes antocianinas expressas em mg de equivalentes de cy-3-gluc/l.

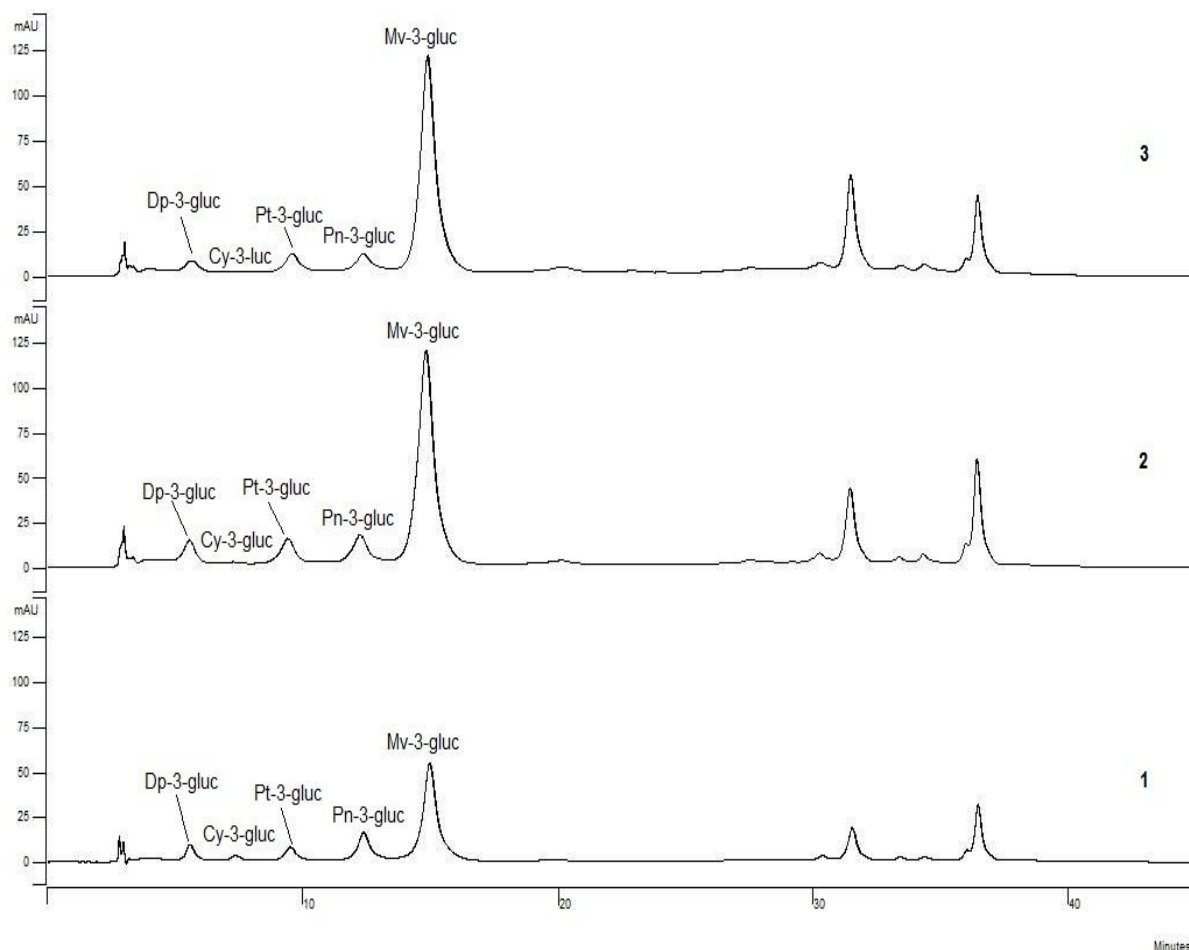


Figura 31: Cromatogramas representativos de 3 etapas da amostragem para identificação e quantificação de antocianinas 1 – C1; 2- C2 e 3 – M4.

Embora o perfil cromatográfico fosse o mesmo, verificaram-se alterações quantitativas ao longo da amostragem (Figuras 31), com variações na quantidade das antocianinas identificadas. No final do cromatograma verificou-se a existência de outros picos (tempo de retenção entre os 30 e os 40 minutos) que não foram quantificados. As variações verificadas no perfil de antocianinas, bem como os picos presentes no final do cromatograma, podem dever-se a reações das antocianinas com metabolitos das leveduras que aparecem durante a fermentação, nomeadamente o ácido pirúvico, Mateus & Freitas ^[41] e Fulcrand *et al.* ^[71].

Relativamente à amostragem ao longo do tempo a variação apesar de ser notória (Tabela 23) é ainda pequena devido ao facto de o intervalo de tempo em que as amostras foram recolhidas ser curto e ainda não terem sido transferidas para envelhecimento em cascos de carvalho, prática utilizada na vinificação do Vinho do Porto e que leva à formação de compostos mais estáveis que os originalmente produzidos. ^[69]

Tabela 23: Valores descritos na tabela representam as médias $\pm$ desvio padrão de amostras repetidas em triplicado e correspondentes a cada uma das antocianinas identificadas, para as diferentes etapas da vinificação 1- os valores foram expressos em mg de Cy-3-gluc/L. C- cuba; L- lagar.

	Dp-3- gluc ¹	Cy-3-gluc ¹	Pt-3-gluc ¹	Pn-3-gluc ¹	Mv-3-gluc ¹	Antocianinas Totais ¹
C1	12,31 $\pm$ 1,17	4,46 $\pm$ 0,59	14,36 $\pm$ 1,90	30,66 $\pm$ 2,83	139,80 $\pm$ 10,19	201,59
C2	32,52 $\pm$ 0,714	6,11 $\pm$ 0,30	33,05 $\pm$ 0,45	60,87 $\pm$ 1,80	291,85 $\pm$ 6,96	424,40
C3	20,21 $\pm$ 1,30	1,39 $\pm$ 0,08	29,32 $\pm$ 0,81	36,68 $\pm$ 1,73	314,59 $\pm$ 7,17	402,19
L1	24,04 $\pm$ 1,94	2,99 $\pm$ 0,15	29,19 $\pm$ 2,38	46,44 $\pm$ 1,33	394,81 $\pm$ 5,79	497,47
L2	26,42 $\pm$ 1,13	3,03 $\pm$ 0,12	28,91 $\pm$ 1,39	41,23 $\pm$ 2,17	420,28 $\pm$ 2,68	519,87
L3	13,29 $\pm$ 0,11	0,59 $\pm$ 0,01	21,22 $\pm$ 0,18	20,81 $\pm$ 0,49	308,46 $\pm$ 1,81	364,37

Através da Tabela 19, pode verificar-se que a antocianina mais prevalente é a mv-3-gluc independentemente de tipo e etapa da amostragem com valores entre 139,80 e 420,28 mg de equivalentes de cy-3-gluc/L, seguida da pn-3-gluc com valores que variaram entre 20,33 e as 46,44 mg de equivalentes de cy-3-gluc/L. ^[41, 59, 68]

A antocianina presente em menor quantidade foi a cy-3-glu que teve um máximo no mosto imediatamente antes da aguardentação atingindo na cuba os 6,11 mg de equivalentes de cy-3-gluc/L e 3,03 mg de equivalentes de cy-3-gluc/L no caso do lagar.

Verificaram-se diferenças significativas entre C1 e L1; C2 e L2 e C3 e L3, para os valores de mv-3-gluc, cy-3-gluc e dp-3-gluc, o que segundo Pinho *et al.* ^[59] a diminuição na etapa 3 (Figuras 32, 33 e 34) poderá dever-se à diluição feita com a adição da aguardente.

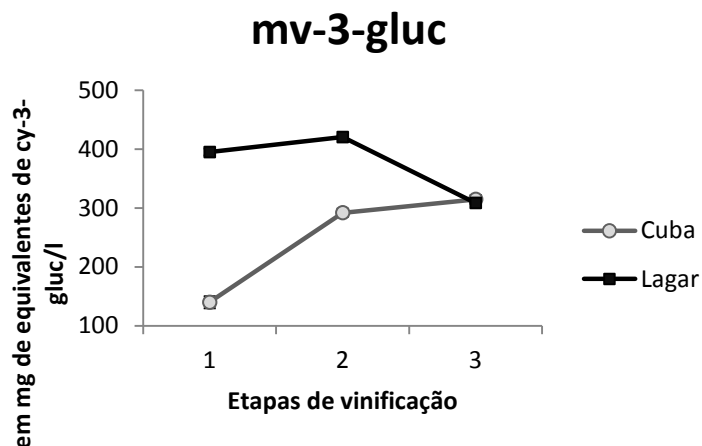


Figura 32: Gráfico representativo da variação da quantidade de Malvidina-3-glucósido relativamente às etapas de vinificação 1, 2 e 3 para cuba e lagar respetivamente. Valores de médias para amostras repetidas em triplicado em mg de equivalentes de cy-3-gluc/l.

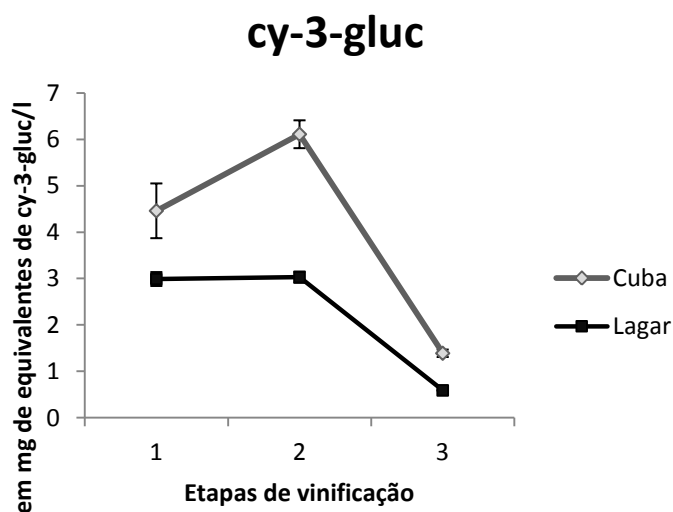


Figura 33: Gráfico representativo da variação da quantidade de Cianidina-3-glucósido relativamente às etapas de vinificação 1, 2 e 3 para cuba e lagar respetivamente. Valores de médias para amostras repetidas em triplicado em mg de equivalentes de cy-3-gluc/l.

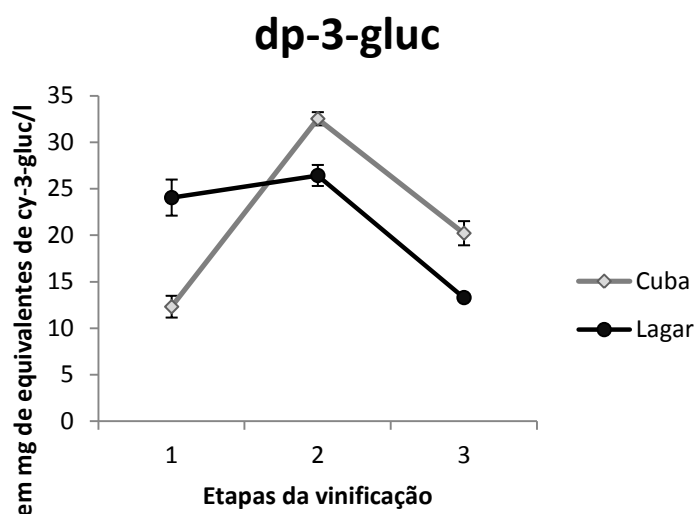


Figura 34: Gráfico representativo da variação da quantidade de Delfinidina-3-glucósido relativamente às etapas de processamento 1, 2 e 3 para cuba e lagar respetivamente. Valores de médias para amostras repetidas em triplicado em mg de equivalentes de cy-3-gluc/l.

Ao realizar-se a estatística, (ANOVA TWO-WAY com o teste de Tukey) foi possível separar as amostras em vários subconjuntos, mostrando que para as etapas iniciais há diferenças ($p < 0,05$) entre tipo de processamento (C- cuba e L - lagar), ao longo do tempo.

No que respeita à evolução durante as etapas da maturação (Tabela 24) verificou-se que não há diferenças ($p \geq 0,05$) entre elas.

Tabela 24: Valores descritos na tabela representam os médios $\pm$ desvio padrão de amostras repetidas em triplicado e correspondentes a cada uma das antocianinas identificadas, para as diferentes etapas da maturação1- os valores foram expressos em mg de Cy-3-gluc/L. M-maturação.

	Dp-3- gluc ¹	Cy-3-gluc ¹	Pt-3-gluc ¹	Pn-3-gluc ¹	Mv-3-gluc ¹	Antocianinas Totais ¹
M1	17,59 $\pm$ 0,43	0,91 $\pm$ 0,03	24,30 $\pm$ 0,19	22,15 $\pm$ 0,06	353,5 $\pm$ 3,01	419,45
M2	17,09 $\pm$ 0,57	0,72 $\pm$ 0,02	24,24 $\pm$ 0,67	19,94 $\pm$ 1,52	256,27 $\pm$ 3,21	318,26
M3	15,25 $\pm$ 0,51	0,66 $\pm$ 0,05	22,66 $\pm$ 0,44	20,40 $\pm$ 0,54	237,27 $\pm$ 8,03	296,24
M4	15,24 $\pm$ 1,57	0,67 $\pm$ 0,07	21,58 $\pm$ 3,44	16,02 $\pm$ 1,43	237,19 $\pm$ 8,93	290,70

Através da estatística com o teste de Tukey com um intervalo de confiança de 95%, em que $p < 0,05$ verificam-se diferenças significativas entre as etapas C1, L1, C2, L2, C3 e L3, verifica-se que não só os valores de Mv-3-gluc, como os de Dp-3-gluc e Cy-3-gluc sofrem variações diferentes, (Figura 33, 34 e 35) o que segundo Pinho *et al.* ^[59], à evolução na extração das antocianinas e posteriormente à diluição com aguardente feita

para parar a fermentação. Quanto às diferenças entre tipo de processamento podem dever-se ao facto do processo de vinificação por cuba mecânica ser mais eficiente na extração de compostos do que o processo de vinificação por lagar, processo tradicional.

Relativamente às etapas de maturação (Tabela 24), o que se pode visualizar é que existe um perfil relativamente estável, não entanto observa-se uma tendência para a diminuição dos valores de todas as antocianinas em geral que segundo Pinho *et al.* ^[59] e Mateus & Freitas ^[41], é indicativo da formação de compostos mais estáveis, que os originalmente formados.

Parte IV

Conclusões

4 - Conclusões

O trabalho apresentado é inovador na medida em que não existem na literatura estudos em relação ao impacto do tipo de vinificação, em cuba mecânica e lagar tradicional na composição do Vinho do Porto.

Os índices de Glories, revelaram ser uma técnica que permite uma boa distinção entre o tipo de processo de vinificação (cuba e lagar), e também permite seguir a evolução da cor ao longo das diferentes etapas, mostrando não só interação entre os diferentes comprimentos de onda analisados, como também uma evolução em termos de perfil.

Para a técnica de coordenadas CIELab, verifica-se que para a coordenada, L^* não há diferenças significativas ao longo de toda a amostragem. Os restantes parâmetros, coordenadas a^* e b^* , apesar de mostrarem diferenças estas não são significativas o que faz com que este método embora de fácil utilização e muito empregue na literatura, não ofereça nenhuma vantagem quando aplicado a esta amostra, pois não é capaz de fazer nenhuma distinção entre tipo de processamento ou etapa. Já em relação às etapas de maturação, conclui-se que o seu perfil é mais estável para todos os índices aplicados o que mostra que existe já um encaminhamento para a cor do produto final. É de notar ainda e tal como era esperado, que a percentagem de vermelho é a mais relevante, influenciando em grande parte a intensidade de cor (IC). O que se pode concluir também é que a cor final observada a olho nu vai depender de um conjunto de cores individuais (azul, amarelo, vermelho).

Relativamente ao teor de Fenólicos Totais é relevante referir que o perfil obtido para as três primeiras etapas é crescente evidenciando a importância da aguardentação na extração destes compostos. Em relação às etapas de maturação o perfil que se observou foi decrescente.

Em relação à atividade antioxidante, em ambas as metodologias o perfil encontrado foi idêntico. No entanto para a etapa 3 verificou-se que há uma aproximação dos valores obtidos, o que mostra que independentemente da tipologia de vinificação a aguardentação vai fazer com que todos os compostos acabem por ser extraídos e por isso se verificar um máximo nos resultados obtidos. Já na maturação o perfil revelou-se decrescente que pode dever-se à transformação dos compostos inicialmente presentes no mosto noutros mais estáveis.

Em relação à técnica de DPPH em específico, o que se pode concluir é que apesar de ser uma técnica amplamente utilizada na literatura, no que respeita às amostras analisadas foi de difícil emprego. Esse facto levou a que para comparação de resultados se tivesse de recorrer a uma outra técnica (ABTS). Nesta segunda técnica, as dificuldades não se aplicaram, podendo por isso dizer-se que para as amostras em questão se revelou uma alternativa bastante eficaz.

A correlação de Pearson indicou que os resultados da técnica de DPPH, da técnica de ABTS e de fenólicos totais apresentaram uma correlação forte entre elas o que leva a concluir que são adequadas para avaliar a atividade antioxidante das amostras em estudo.

Relativamente às antocianinas, verificou-se que efetivamente os perfis quantitativos apresentados para as amostras C1 e L1; C2 e L2; e C3 e L3, foram distintos o que revelou que a metodologia de vinificação tem um papel importante nesta fase da produção, onde se verificou que a cuba mecânica foi mais eficaz para quatro das antocianinas identificadas com a exceção da mv-3-gluc, que atingiu valores mais elevados no processo de vinificação por lagar tradicional (pisa manual). No que toca às etapas da maturação o que se observou foi uma diminuição na quantidade total de antocianinas o que leva à concluir que há transformação das antocianinas originais do mosto, noutros compostos mais estáveis. No entanto este decréscimo dos valores ao longo do tempo pode estar também relacionado com a exposição do vinho a fatores que causam reações redox.

Comparando agora os fenólicos totais com o perfil de antocianinas verifica-se também o mesmo tipo de perfil, isto leva a concluir que a perda das antocianinas está diretamente ligada com a perda de compostos fenólicos. Este facto pode também ser aplicado à atividade antioxidante.

É ainda relevante concluir que de um modo geral o processo de vinificação em Lagar tradicional (pisa manual), não trás vantagens sobre o método Cuba mecânica (pisa mecânica), visto que a quando da aguardentação praticamente todos os valores se aproximarem em ambos os processos, sendo que o emprego da tradição seja apenas para a manter viva.

Quanto às etapas de maturação (M1 – M4), é de referir que as amostras correspondem a um período de tempo de seis meses de maturação e não um período completo de envelhecimento como se encontram em muito artigos da literatura ^[x], no entanto os resultados obtidos encontraram-se de acordo com as referências encontradas.

Parte V

Referências Bibliográficas

5 - Referências Bibliográficas

1. Instituto da Vinha e do Vinho, I.P. [em linha]. Disponível em, <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/vinho>, Consultado em 15/04/2015
2. Infovini (2009). Regiões Vitivinícolas [em linha]. Disponível em, <http://www.infovini.com/pagina.php?codNode=3893>. Consultado em 5/12/2013
3. Wines of Portugal – Estatística [em linha]. Disponível em, <http://www.winesofportugal.info>, Consultado em 15/04/2015
4. Carrera C., Vinhos de Portugal Da vinha ao vinho – variedades e regiões. 2ª edição. Sintra – Portugal, Colares Editora, (1999)
5. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto. História [em linha]. Disponível em, <http://www.ivdp.pt/pagina.asp?codPag=9&codSeccao=1&idioma=0>. Consultado em 5/12/2013
6. Carrera C., Vinho do Porto e a Região do Douro – A arte de beber vinho do Porto, iniciação e harmonia gastronómica. Sintra – Portugal, Colares Editora, (1999)
7. Magalhães N., et alli, Enciclopédia dos Vinhos de Portugal – O Vinho do Porto Vinhos do Douro. Lisboa – Portugal, Chaves Ferreira- Publicações S.A. (1990)
8. Ministério da Agricultura e do Mar - ESTRUTURA LOCAL DE APOIO DO DOURO VINHATEIRO (ELA-DV). [em linha]. Disponível em, http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/ela_dv/eladv_index.html. Consultado em 23/01/2014
9. Brito, C. M., Estrutura e dinâmica do sector do Vinho do Porto, cadernos da revista Douro- Estudos & Documentos. Porto- Portugal, Instituto do Vinho do Porto (1997)
10. Guichard F., Pereira G. M., Guimaraens D., Peixoto F., Ribeiro de Almeida A., Lopes T. S., Sandman G., Carvalho M., O Vinho do Porto. Porto- Portugal, Instituto do Vinho do Porto (2003)
11. Decreto-lei n.º: 166/86 de 26 de Junho de 1986 (Vinho do Porto) [em linha]. Disponível em, http://www.wipo.int/wipolex/en/text.jsp?file_id=199522 Consultado em 15/04/2015
12. Em Defesa da Marca de Origem “Porto”, Instituto do Vinho do Porto, Editado em 1973 – 40º. Aniversário da Criação do Instituto do Vinho do Porto
13. The Fladgate Partnership. Disponível em, <http://www.fladgatepartnership.com>. Consultado em: 15/04/2014
14. Food and Wine Pairing, criado por Jessica Street [em linha]. Disponível em, <https://www.softchalk.com/lessonchallenge09/lesson/wineTutorial/wineTutorial4.html> Consultado em 15/04/2014
15. As Cores do Vinho. Disponível em: <http://lacrimavitis.blogspot.pt/>. Consultado em: 15/04/2014
16. O PRIMEIRO VINHO DO PORTO ROSÉ. Disponível em, <http://www.croftpink.com/pt/o-primeiro-vinho-do-porto-rose/>. Consultado em: 15/04/2014
17. Roberts J. D., Caserio M. C., Basic Principles of Organic Chemistry, 2nd Edition, W. A. Benjamin Inc, 1977, California USA.

18. Juster N. J., Color and Chemical Constitution, Journal of Chemical Education, 39, 596-601, 1962
19. Araújo I., Linhares J., Pereira O., Nascimento S., Oliveira J., Características cromáticas de vinhos verdes tintos, 7º Encontro de Química dos Alimentos, 13-16/04/2005, Viseu – Portugal
20. Pérez-Magariño S., González-Sanjós M. L., Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. Food Chemistry, 81, 301-306, 2003
21. Rivas E., Alcázar E., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C., Escribano-Bailón M. T., Behaviour and characterisation of the color during red wine making and maturation. Analytica Chimica Acta, 563, 215-222, 2006
22. Fogaça A. O., Daudt C. E., Perez F. S., Phenolic potencial of the Merlot grape grown in different areas of Rio Grande do Sul. Disc Scientia Série: Ciência da Saúde, Santa Maria, v.13, n.1, 121-129, 2012
23. Measuring red wine colour using the modified Somers assay, The Australian Wine Research Institute, 2012
24. Almela L., Javaloy S., Fernández-López J. A., López-Roca J., Comparison between the tristimulus measurements Yxy and L*a*b to evaluate the colour of young red wines. Food Chemistry, 53, 321-327, 1995
25. Bakker J., Bridle P., Timberlake C. F., Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine port. Vitis, 25, 67-78, 1986
26. Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments, 2nd edition, Wiley, 2006
27. Martín M. L. G.-M., Wei J., Luo R., Hutchings J., Heredia F. J., Measuring colour appearance of red wines, Food Quality and Preference, 18, 862-871, 2007
28. Ho P., Silva M. C. M., Hogg T. A., Changes in colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 1269-1280, 2001
29. Heredia F. J., Troncoso A. M., Guzmán-Chozas M., Multivariate characterization of aging status in red wines based on chromatic parameters. Food Chemistry, vol. 60, n.º: 1, 103-108, 1997
30. Suberviola A. I. N., Granado J.F. E., Zurbano F. A., Esteban A. M. L., Colorimetria en vinos. Zubría Monográfico, 7, 151-166, 1995
31. Birse M., Pollnitz A., Herderich M., CIELab colour values: Enhanced wine colour measurements for use by the wine industry and in research applications. The Australian Wine Research Institute
32. Color Handbook – CIELAB Method, [em linha]. Disponível em, <http://www.specialchem4coatings.com/tc/color-handbook/?id=cielab>, consultado em, 16/04/2014
33. Monagas M., Bartolomé B., Gómez – Cordovés C., Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. Critical Reviews in Food and Nutrition, no. 45, pp. 85 – 118, 2005

34. Valls J., Millán S., Pilar Martí M., Borràs E., Arola L., Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavonoids and flavonols, *Journal of Chromatography A*, 1216, pp.7143 – 7172, (2009)
35. Jackson, R.S., *Wine Science Principles, Practice, Perception*, 2nd ed. (2000), Academic Press, San Diego- USA.
36. Kennedy J. A., *Grape and wine phenolics: Observations and recent findings*, *Ciencia e Investigación AGRARIA*, 35 (2), 107 – 120, (2008)
37. Ignat I., Volf I., Popa V. I., A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry* 126, 1821 – 1835, (2011)
38. Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plants médicinales*. Paris: Editions Tec & Doc; 1999
39. Marçõ, P. H., Poppi, R. J., Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais, *Química Nova*, 31 (5), 1218-1223 (2008)
40. Heredia, F. J., et al, Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chemistry*, 63. 4, 491-498, (1998)
41. Mateus N., Freitas V., Evolution and Stability of Anthocyanin-Derived Pigments during Port Wine Aging, *Journal of Agriculture, Food Chemistry*, 49, 5217-5222, (2001)
42. Paixão N., Pereira V., Marques J. C., Câmara J.S., Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC, *Journal of Separation Science - Wiley Online Library*, 31, 2189-2198, (2008)
43. Ferreira, I. M.P.L.V.O. e Pérez-Palacios, M. T., Processing and Impact on Antioxidants in Beverages Chapter 1 – Anthocyanic Compounds and Antioxidant Capacity in Fortified Wines, 3–14 (2014)
44. Chorilli, M., Leonardi, G. R., Salgado, H. R. N., Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicações farmacêuticas e cosméticas *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 88 (3), 113-118, 2007
45. Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S., Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 41 (1), 61-68, 1997
46. Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. F., Manfredini V., Benfato M.S., Kubota, L. T., Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* 5 (30), 1323-1338, 2007
47. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin M. T. D., Mazur, M., Telser, J., Free Radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84, 2007
48. Abe, L. T., Da Mota, R. V., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L., *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 27 (2), 394 – 400, 2007
49. Pesco, D. C. S., Da Silva, D. A. R., Damazio, T. G., Cortez, D. A.G., Cortez, L. E. R., Avaliação da atividade antioxidante de mostras de uvas (*Vitis vinífera* L.), VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica, Maringá – Paraná, Brasil, 2012

50. Pisoschi A. M. & Negulescu G. P., Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review, *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1: 1 (2011) 1-10
51. Alves C. Q., David J.M., David J. P., Bahia M.V., Aguiar R. M., Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos, *Química Nova*, 10 (33), 2202 – 2210, 2010
52. Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese M. I., Gonçalves, A. E. S. S., Frett, R., Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis vinifera labrusca* L.) widely produced in Brazil, *Food Chemistry*, 127, 174 – 179, 2011
53. Kedage V. V., Tilak J. C., Dixit G. B., Devasagayam T. P. A., Mhatre, M., A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera* L.), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 175 – 185, 2007
54. L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin - Compendium Of International Methods of Analysis – OIV Chromatic Characteristics – Method OIV-MA-AS2-07B Type IV method, 2009
55. Magalhães L. M., *et al.*, Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach, *Talanta*, 91 (2012) 473-483
56. Viegas O., *et al.*, Inhibitory Effect of Antioxidant-Rich Marinades on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pan-Fried Beef, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 6235-6240
57. Carmona-Jiménez Y., García-Moreno M. V., Igartuburu J. M., Barroso C. G., Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine-products, *Food Chemistry*, 165 (2014) 198-204
58. Magalhães L. M., Ramos I. I., Reis S., Segundo M.A., Antioxidant profile of commercial oenological tannins determined by multiple chemical assays, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20 (2014) 72-79
59. Pinho C., Couto A.I., Valentão P., Andrade P.B., Ferreira I.M.P.L.V.O., Assessing the anthocyanic composition of Port wines and musts and their free radical scavenging capacity, *Food Chemistry*, 131, 885-892, (2012)
60. Gouvêa A. C. M.S., *et al.*, Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitrantes obscura* (DC.) N. Silveira and endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies, *Food Chemistry*, 185 (2015) 277-283
61. Almela, L., Javaloya, S., Fernández-López J. A., López-Roca J. M., Comparison between the tristimulus measurements Yxy and L*a*b* to evaluate the colour of young red wines, *Food Chemistry*, 53 (3), (1995), 321–327
62. Figueiredo-González M., *et al.*, The phenolic chemistry and spectrochemistry of red sweet wine-making and oak-aging, *Food Chemistry*, 152 (2014) 522-530
63. Rivas, E. G-P., Alcalde-Eon, C., Santos-Bulga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation, *Analytica Chimica Acta*, 563 (1–2), (2006), 215–222
64. Rustioni L., Di Meo F., Guillaume M., Failla O., Trouillas P., Tuning color variation in grape anthocyanins at the molecular scale, *Food Chemistry* 141 (2013) 4349-4357

65. Lago-Vanzela E. S., *et al.*, Aging of red wines made from hybrid grape cv BRS Violeta: Effects of accelerated aging conditions on phenolic composition, color and antioxidant activity, *Food Research International*, 56 (2014) 182-189
66. Santos-Buelga C., de Freitas V., Influence of phenolic on wine organoleptic properties, In M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds), *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 529-570). New York: Springer Science+ Business Media LLC.
67. Alañón M.E., *et al.*, Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines Part II: Phenolic compounds and chromatic characteristics, *Food Research International* 51 (2013) 536–543
68. Oliveira J., *et al.*, Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine, *Analytica Chimica Acta*, 563 (2006) 2-9
69. Oliveira H., Fernandes I., Freitas V., Mateus N., Aeging impacto n the antioxidante and antiproliferative properties of Port wines, *Food Resarch International*, 67 (2015) 199-205
70. Fraige K., Pereira-Filljo E. R., Carrilho E., Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis, *Food Chemistry*, 145 (2014) 395-403
71. Fulcrand, H., Benabdeljalil. C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins, *Phytochemistry*, 47 (7), (1998), 1401-1407