

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Alvarina Rafaela Fonseca Teixeira**

**Polímeros molecularmente impressos para remoção de fenóis voláteis em vinhos  
tintos: influência no perfil metabólico**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de  
Qualidade – Área de Especialização em Água e Alimentos

Trabalho realizado sob orientação do  
Doutor Luís Manuel Lopes Rodrigues da Silva  
e coorientação da  
Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade

**Outubro de 2013**

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

## **Agradecimentos**

Ao finalizar esta dissertação sinto o dever e a necessidade de expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com o seu apoio e incentivo para que conseguisse alcançar o final desta etapa na minha formação. Deste modo agradeço reconhecidamente:

Ao Doutor Luís Manuel Lopes Rodrigues da Silva, dirijo o mais especial agradecimento pela orientação desta dissertação e pela simpatia e disponibilidade com que me recebeu desde o início. Porque me fez acreditar que conseguia chegar até aqui, pelas palavras e atitudes de encorajamento quando as coisas correram menos bem. E, por muito além de meu orientador, se ter revelado um amigo. Não esquecerei toda a ajuda que me deu. Muito obrigado.

À Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade devo um especial agradecimento. Antes de tudo pela coorientação desta dissertação. Pelo crescimento científico que me proporcionou e enriqueceu este trabalho. Por ter acreditado em mim e pela disponibilidade em todas as ocasiões. A si devo um muito obrigado por tudo.

À Professora Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão, expressei o meu agradecimento e admiração pela sua enorme capacidade científica e pelos conhecimentos científicos que me transmitiu. Pela sua pronta colaboração em todas as minhas dificuldades. Muito obrigado.

Ao Doutor António Graça e à Doutora Natacha Fontes da Sogrape pela cedência das amostras para a realização deste trabalho.

À Sónia Dopico e a todos os colaboradores do Grupo de Polímeros no Centro de Investigação Tecnológica da Universidade da Corunha, pela ajuda no desenvolvimento dos polímeros utilizados neste trabalho e por todo o companheirismo demonstrado.

Ao Doutor Félix Carvalho, diretor do Mestrado em Controlo de Qualidade, agradeço pela excelente orientação deste mestrado e pelo excelente professor que foi.

À Mafalda Queiróz e à Sílvia Chañi minhas colegas e amigas do laboratório de Farmacognosia, a quem devo muito pelos bons momentos partilhados e pela ajuda que sempre me deram para enfrentar momentos mais difíceis nesta etapa da minha vida.

Um muito obrigado pela amizade que sei que será para sempre. Jamais esquecerei cada momento passado.

Aos restantes elementos do laboratório de Farmacognosia, Doutora Fátima Fernandes, Doutora Andreia Oliveira, Marcos Taveira, Doutora Carla Sousa, Cristina Almeida, Doutora Clara Grosso, Rui Gonçalves, Graciliana Lopes e Brígida Pinho pela simpatia e carinho que demonstraram, e pela boa disposição com que sempre se disponibilizaram para me ajudar. Vocês fizeram-me sentir como membro integrante da equipa. Um muito obrigado a todos.

À Tânia Meireles, Mónica Torres, Carlos Vieira, Maria Freitas, Joana Botelho, Liliana Moreira, Carla Ferreira, Catarina Diogo, Fernando Marinho e Jorge Borges agradeço pela amizade de longa data. Por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis. Por me terem sempre ajudado e recebido carinhosamente quando mais precisei de vós. Muito obrigado.

À Joana Pinto, Ricardo Moreira e José Marinho, agradeço porque apesar da distância que nos separa estiveram sempre prontos a ouvir-me e souberam dizer as palavras certas nos momentos mais difíceis. Porque são a prova de que a amizade verdadeira perdura e ultrapassa tudo. Muito obrigado.

À Maria de Jesus, Melissa Ribeiro, Carlos Ribeiro, porque apesar de não serem família se sangue são família de coração. Apesar de estarem longe, fizeram-se sentir perto e sempre fizeram tudo para me ajudar pelas lindas palavras ditas nos momentos mais difíceis.

À minha família, porque fizeram sempre parte ativa da minha vida. Muito obrigado por todos os excelentes momentos partilhados que serviam para descontrair quando a pressão era maior. A todos, muito obrigada.

Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado a quem dedico esta dissertação. Aos meus pais, a quem devo muito e são tudo para mim. Por me terem sempre ensinado a nunca desistir a lutar pelo que mais quero. Ao meu querido pai que sempre fez tudo por mim. Soube dizer as palavras duras quando eram precisas mas também as palavras de conforto e encorajamento que me deram sempre ânimo para continuar. À minha mãe, por me ouvir sempre e por todos os momentos que passamos juntas. Obrigado por serem

uns pais maravilhosos. Ao meu irmão que esteve sempre lá para me ouvir e dar uma palavra amiga e de confiança.

A ti Miguel, meu namorado, por teres tolerado todas as minhas faltas de paciência. Porque foste a pessoa que mais me fez acreditar que conseguia chegar até aqui. Apesar de todas as minhas frustrações estives-te sempre lá ao meu lado e alegras-te os meus dias quando entrava em profunda angústia.

Vocês são a minha vida, aquilo que mais amo, são a minha força, a minha motivação. Muito obrigado.

## Resumo

Vinho é o produto que se obtém exclusivamente da fermentação alcoólica da uva e mosto, sendo um dos produtos agrícolas mais influentes na economia nacional. A deterioração por leveduras *Dekkera bruxellensis* representa um dos principais problemas económicos do setor. Estas leveduras produzem fenóis voláteis que conduzem a uma alteração das propriedades organolépticas, levando à formação de odores a madeira, fumo, medicina, suor de cavalo, entre outros, impossibilitando a sua comercialização.

Assim sendo, revela-se de extrema importância a investigação/desenvolvimento de técnicas que permitam a recuperação de vinhos afetados por fenóis voláteis.

Neste trabalho desenvolveram-se dois polímeros molecularmente impressos (MIPs) para duas moléculas-alvo, o 4-etilfenol e o 4-etilguaiaacol, e um polímero não molecularmente impresso (NIP) para servir como padrão de comparação. Estes polímeros foram aplicados em vinho tinto deteriorado por *D. bruxellensis*, com o intuito de avaliar a sua capacidade de retenção dos fenóis voláteis e qual o efeito a nível de várias outras classes de compostos voláteis, compostos fenólicos corados e não corados.

Nas amostras de vinho analisadas foram caracterizados 3 fenóis voláteis, 37 compostos voláteis pertencentes a diferentes classes, 17 compostos fenólicos não corados e 9 compostos fenólicos corados. Dos compostos identificados, destacam-se o 4-etilfenol nos fenóis voláteis, o acetato de isoamilol, o 2-feniletanol e o ácido decanoico nos compostos voláteis, a catequina e o ácido gálico nos compostos fenólicos não corados, e a malvidina-3-O-glucósido nos compostos fenólicos corados.

Verificou-se que o tratamento com os MIPs e NIP afetou, não só o perfil de fenóis voláteis, como o de todas as classes de compostos analisados. Os MIPs exibiram uma capacidade de retenção entre os 41–56%, sendo o MIP-4EF aquele que apresentou maior afinidade com os fenóis voláteis.

Entre as outras classes de compostos voláteis, os mais afetados pelo tratamento com os polímeros foram os sesquiterpenos e os norisoprenoides, tendo sido retidos na ordem dos 90%. Por outro lado, as classes de compostos fenólicos não corados mais afetadas foram os flavonóis, observando-se retenções que oscilaram entre os 86-90%, seguindo-se os ácidos hidroxicinâmicos (41-56%), os flavan-3-óis (24-43%) e os ácidos hidroxibenzoicos (22-33%). Por outro lado, os fenóis corados (antocianinas) apresentaram as retenções que oscilaram entre 13-24% nas amostras tratadas com os polímeros.

Estes resultados demonstram uma certa falta de especificidade e seletividade para as moléculas-alvo utilizadas na sua síntese, retendo um conjunto de compostos químicos fundamentais à estrutura do vinho. Estes polímeros necessitam de mais investigação com o intuito de melhorar a sua performance.

Palavras-chave: vinho, fenóis voláteis, compostos voláteis, compostos fenólicos, *Dekkera bruxellensis*, MIPs.

## Abstract

Wine is the product obtained exclusively by alcoholic fermentation from grape and must, being one of the most influential agricultural products in national economy.

Wine spoilage by yeasts of the species *Dekkera bruxellensis* is a serious problem in wine industry. These yeasts are the mains responsible for the production of volatile phenols (ethylphenols and vinylphenols), which lead to a change in the organoleptic properties, leading to sensory changes characterized as wood, tobacco, medicine, horse sweat and others, precluding its commercialization and consequently economical losses. Thus, it appears extremely important the development of efficient techniques that allow the recovery of wines affected by volatile phenols.

In this work we have synthesized two molecularly imprinted polymers (MIPs) with different templates, namely 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol. As a control, non-imprinted polymers (NIPs) were prepared for each assay. These polymers were applied in red wine spoiled by *Dekkera bruxellensis*, in order to assess the recovery of volatile phenols and its effects on several other classes of volatile compounds, colored and non-colored phenolic compounds.

Three volatile phenols, 37 volatile compounds of other classes, 17 non-colored phenolic compounds and 9 colored phenolic compounds. Among all of the identified compounds 4-ethylphenol, isoamyl acetate, phenylethyl alcohol, decanoic acid, catechin, gallic acid and malvidin-3-O-glucoside are highlighted as the major ones of each type.

Results show that MIPs treatment affected not only the profile of volatile phenols, but also all the other classes of compounds analyzed. The recovery of volatile phenols ranged between 41-56%, MIP-4EF revealed the highest retention capacity.

In a general way, in the wine sample treated with polymers was observed a decrease of the amounts of other volatile compounds, mainly sesquiterpen alcohols and norisoprenoids which showed retention of almost 90%. Regarding phenolic composition, non-colored compounds were the most affected, being the flavonols the more retained (86-90%), followed by hydroxycinnamic acids (41-56%), flavan-3-óis (24-43%) and hydroxybenzoic acids (22-33%). On the other hand, colored phenolic compounds were less affected by the treatments and showed retentions between 13-24%.

These results demonstrate a lack of specificity and selectivity for the templates used in their synthesis, retaining a set of chemicals essential to the structure of the wine. Although, it's necessary future research on MIPs with more selective matrixes for volatile phenols, to improve their performance.

Key-words: wine, volatile phenols, volatile compounds, phenolic compounds, *Dekkera bruxellensis*, MIPs.

## ÍNDICE

Agradecimentos .....	iii
Resumo.....	vi
Abstract .....	viii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas .....	xiii
Abreviaturas e Símbolos .....	xiv

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Perfil metabólico.....	2
1.1.1. Compostos fenólicos .....	2
1.1.1.1. Não flavonoides.....	2
1.1.1.1.1. Ácidos fenólicos .....	3
1.1.1.1.2. Estilbenos .....	5
1.1.1.2. Flavonoides .....	7
1.1.1.2.1. Flavonóis .....	8
1.1.1.2.2. Flavanóis (flavan-3-óis) .....	9
1.1.1.2.3. Antocianinas .....	13
1.1.2. Compostos voláteis .....	17
1.1.2.1. Álcoois superiores .....	18
1.1.2.2. Ésteres .....	19
1.1.2.3. Terpenos .....	21
1.1.2.4. Norisoprenoides .....	23
1.1.2.5. Ácidos voláteis.....	24
1.1.2.6. Fenóis voláteis.....	25
1.1.2.6.1. Origem .....	26
1.1.2.6.2. Deterioração por leveduras <i>Brettanomyces/Dekkera</i> .....	28
1.1.2.6.3. Controlo de fenóis voláteis nos vinhos .....	32
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. Substâncias de referência e reagentes.....	43
3.2. Síntese dos MIPs .....	43
3.3. Estudos de seletividade e especificidade .....	44
3.4. Amostragem .....	45
3.5. Análise dos compostos voláteis .....	47
3.5.1. Análise dos fenóis Voláteis .....	47
3.5.2. Análise de outros compostos voláteis.....	48
3.6. Análise dos compostos fenólicos .....	49

3.6.1.	Análise dos compostos fenólicos não-corados .....	49
3.6.2.	Análise das antocianinas.....	50
3.7.	Análise estatística .....	50
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
4.1.	Estudos da seletividade e especificidade .....	53
4.2.	Efeito na composição química .....	56
4.2.1.	Compostos voláteis .....	56
4.2.2.	Compostos fenólicos .....	67
4.2.2.1.	Compostos fenólicos não corados .....	67
4.2.2.2.	Antocianinas .....	73
4.3.	Análise de componentes principais.....	75
<b>V.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos principais ácidos hidroxibenzoicos.....	3
<b>Figura 2.</b> Estruturas dos principais ácidos hidroxicinâmicos. ....	4
<b>Figura 3.</b> Derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e do ácido tartárico. ....	4
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do resveratrol.....	6
<b>Figura 5.</b> Estrutura geral dos flavonoides .....	7
<b>Figura 6.</b> Estruturas dos principais flavonóis presentes no vinho.....	8
<b>Figura 7.</b> Estrutura química de um flavanol .....	10
<b>Figura 8.</b> Estruturas dos flavanóis monoméricos presentes em uvas de <i>Vitis vinifera</i> .....	11
<b>Figura 9.</b> Estrutura química de uma procianidina B1. ....	12
<b>Figura 10.</b> Estruturas químicas das antocianidinas.....	13
<b>Figura 11.</b> Estrutura química das antocianinas.....	14
<b>Figura 12.</b> Equilíbrio dinâmico entre as várias formas de antocianinas (5). ....	15
<b>Figura 13.</b> Equilíbrio de esterificação de um álcool.....	19
<b>Figura 14.</b> Estrutura química do 2-metil-1,3-butadieno. ....	21
<b>Figura 15.</b> Estrutura química do (A) linalol e do (B) citronelol. ....	22
<b>Figura 16.</b> Principais norisoprenoides em uvas tintas. ....	23
<b>Figura 17.</b> Os principais FV dos vinhos. ....	25
<b>Figura 18.</b> Formação dos fenóis voláteis por descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos.....	26
<b>Figura 19.</b> Micrografia de varrimento de elétrons de <i>D. bruxellensis</i> cultivadas num meio de enriquecimento (150) .....	29
<b>Figura 20.</b> Impressão molecular. ....	37
<b>Figura 21.</b> Esquema geral do trabalho.....	46
<b>Figura 22.</b> Perfil cromatográfico de compostos voláteis das amostras de vinho tinto obtidos por HS-SPME/GC-MS .....	57
<b>Figura 23.</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos não corados identificados no vinho controle obtido por HPLC/DAD .....	68
<b>Figura 24.</b> Perfil cromatográfico das antocianinas da amostra de vinho controle obtido por HPLC/DAD.....	73
<b>Figura 25.</b> Diagrama dos componentes principais do perfil metabólico das amostras analisadas.....	75

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Metodologias para o controlo de <i>D. bruxellensis</i> nos vinhos (113).....	34
<b>Tabela 2.</b> Caracterização química da amostra de vinho testada.....	45
<b>Tabela 3.</b> Influência do volume na capacidade de retenção dos MIPs e NIP. ....	53
<b>Tabela 4.</b> Influência do método de extração na capacidade de retenção dos MIPs e NIP. .....	54
<b>Tabela 5.</b> Influência do tempo de contacto na capacidade de retenção dos dos MIPs e NIP.....	55
<b>Tabela 6.</b> Fenóis voláteis e taxas de retenção obtidos nas amostras de vinho Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP.....	59
<b>Tabela 7.</b> Compostos voláteis e taxas de retenção obtidos nas amostras de vinho Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP. ....	61
<b>Tabela 8.</b> Compostos fenólicos não corados e taxas de retenção das amostras de vinho Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP.....	70
<b>Tabela 9.</b> Antocianinas e taxas de retenção das amostras de vinho Controlo, MIP-4-EF, MIP-4EG e NIP. ....	74

## Abreviaturas e Símbolos

<b>4-EF</b>	4-Etilfenol
<b>4-EG</b>	4-Etilguaiaicol
<b>4-VF</b>	4-Vinilfenol
<b>4-VG</b>	4-Vinilguaiaicol
<b><i>B.bruxellensis</i></b>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
<b><i>D.bruxellensis</i></b>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
<b>FV</b>	Fenóis voláteis
<b>GC-FID</b>	Cromatografia gasosa acoplada a detetor de ionização em chama
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
<b>HPLC/DAD</b>	Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detetor de díodos
<b>MIPs</b>	Polímeros molecularmente impressos
<b>NIPs</b>	Polímeros não molecularmente impressos
<b>nd</b>	Não detetado
<b>nq</b>	Não quantificável
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida
<b>MIT</b>	Técnica de impressão molecular
<b>UA</b>	Unidades arbitrárias
<b>VF</b>	Vinilfenóis
<b>EF</b>	Etilfenóis



## I. INTRODUÇÃO

O vinho é constituído basicamente por água e etanol, porém, as suas características como a cor, aroma e sabor estão associadas a uma série de compostos bioativos que fazem parte da mistura complexa do vinho. Entre estes podem considerar-se: hidratos de carbono, álcoois, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, lactonas, terpenos, ésteres, norisoprenoides, compostos fenólicos, entre outros (1-5).

Desde há muitos anos que tem vindo a aumentar o interesse na composição química dos vinhos, uma vez que os estudos epidemiológicos demonstraram que as doenças cardiovasculares são menos prevalentes em indivíduos que consomem quantidades regulares e moderadas desta bebida (6-9), produtos alimentares derivados das uvas e outros alimentos contendo importantes teores em compostos fenólicos (6). Porém, foi um relato intitulado “Paradoxo Francês”, que despertou o interesse para estes efeitos protetores, uma vez que evidenciou que indivíduos franceses apresentavam um risco mais baixo de mortalidade cardiovascular, apesar do elevado consumo de gorduras saturadas, comparativamente a outros indivíduos, por exemplo dos Estados Unidos, o que podia ser associado com um consumo moderado de vinho (6).

Primeiramente, associava-se tal efeito benéfico ao etanol, um dos constituintes do vinho (10, 11), mas outros estudos indicaram que os benefícios provenientes do consumo de vinho, eram muito mais notórios do que os evidenciados por outras bebidas alcoólicas, sugerindo que outros fatores não alcoólicos poderiam desempenhar também um papel protetor (12, 13).

Atribuem-se estes efeitos benéficos às substâncias fenólicas do vinho, pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (14, 15).

Recentemente estudos epidemiológicos demonstraram que estes compostos apresentavam atividade antioxidante contra espécies reativas envolvidas no envelhecimento e em doenças crónicas, autoimunes, inflamatórias, coronárias e degenerativas (16-19).

A atividade antioxidante pode também explicar as propriedades anticarcinogénicas destes compostos (10, 11), não sendo porém suficiente para explicar todas as suas propriedades biológicas (12, 13).

Desta forma, os compostos fenólicos constituem os principais parâmetros de qualidade (20-22), uma vez que além de serem responsáveis por funções estruturais e protetoras das plantas (23), influenciam a cor (um dos atributos mais importantes dos vinhos tintos), a adstringência e o amargor dos vinhos (23-27). Esta influência pode ser exercida diretamente ou por interação com proteínas, polissacarídeos ou outros compostos fenólicos (28, 29).

Por outro lado, alguns compostos voláteis como álcoois superiores, ésteres, terpenos, norisoprenoides, têm influência no aroma, considerado como umas das características mais importantes de um vinho: o aroma (30, 31).

## **1.1 Perfil metabólico**

### **1.1.1. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários presentes nas uvas e/ou extraídos para os vinhos durante o processo de vinificação (32). Estes desempenham um papel importante na Enologia e são responsáveis pelas diferenças entre os vinhos brancos e tintos (4), apresentando-se em concentrações mais elevadas nos vinhos tintos (5).

Esta classe de compostos é frequentemente associada a diversas funções estruturais e protetoras das plantas (23) por apresentarem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (14, 15) e influenciam as propriedades organolépticas como a cor, a adstringência e o amargor dos vinhos (23-26).

Os compostos fenólicos caracterizam-se do ponto de vista químico, por possuírem pelo menos um anel benzênico, que contém no mínimo, um grupo hidroxilo (-OH) livre ou envolvido noutra função: éter, éster ou heterósido (5). Apesar de possuírem grupos álcool, não possuem propriedades de um álcool (5). A reatividade que exibem está associada com o caráter ácido da função fenólica e nucleofílico do anel benzênico (22).

A diversidade estrutural destes compostos deve-se à extensa variedade de combinações presentes na natureza, estando frequentemente associados aos monossacáridos como a glucose, arabinose, galactose, ramnose, ácidos glucorónico e galacturónico, podendo também apresentar formas di-, tri- ou tetrassacarídeos (33).

De acordo com o seu esqueleto em carbono, os compostos polifenólicos podem ser divididos em duas categorias: os flavonoides e os não-flavonoides.

#### **1.1.1.1. Não flavonoides**

Os constituintes não flavonoides dos vinhos podem ser divididos essencialmente em ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos) e estilbenos (5, 21, 22).

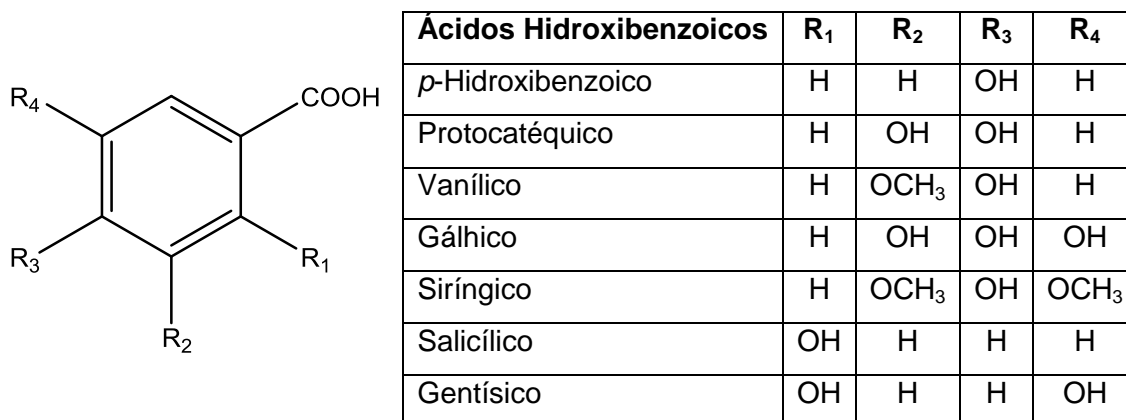
### 1.1.1.1.1. Ácidos fenólicos

Esta denominação pode ser utilizada para todos os compostos orgânicos que possuam pelo menos uma função carboxílica e um hidroxilo fenólico (34). Podem ser incluídos nesta denominação ácidos hidroxibenzoicos com sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e os ácidos hidroxicinâmicos com nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>).

Os **ácidos hidroxibenzoicos** são componentes minoritários nos vinhos (21), encontrando-se em menores proporções relativamente aos ácidos hidroxicinâmicos.

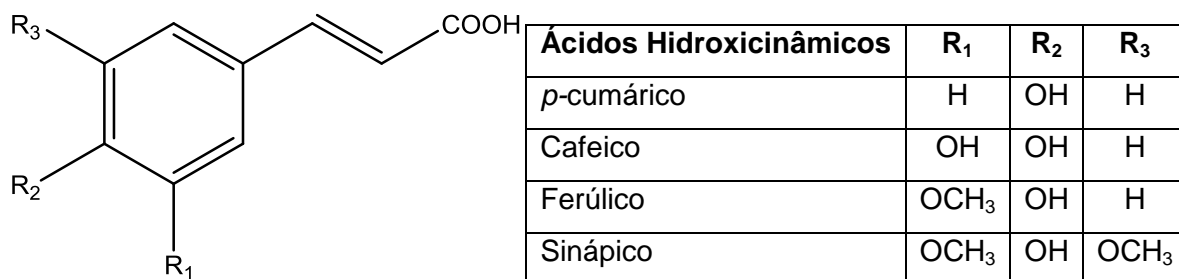
Estes ácidos podem ser detetados inicialmente nas uvas, ou nos vinhos, sendo provenientes da hidrólise de taninos hidrolisáveis (ésteres de ácido gálgico ou elágico).

O ácido gálgico é sem dúvida o principal ácido benzoico, este destaca-se pela sua função antioxidante (35), sendo o único que foi formalmente identificado no seu estado nativo em uvas, mais precisamente na parte sólida do bago, quer sob a forma de éster de flavanol ou na forma livre (36). Destacam-se também outros ácidos benzoicos nos vinhos, incluindo o *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílico, siríngico, salicílico e gentísico (Figura 1) (22, 37, 38).



**Figura 1.** Estrutura dos principais ácidos hidroxibenzoicos.

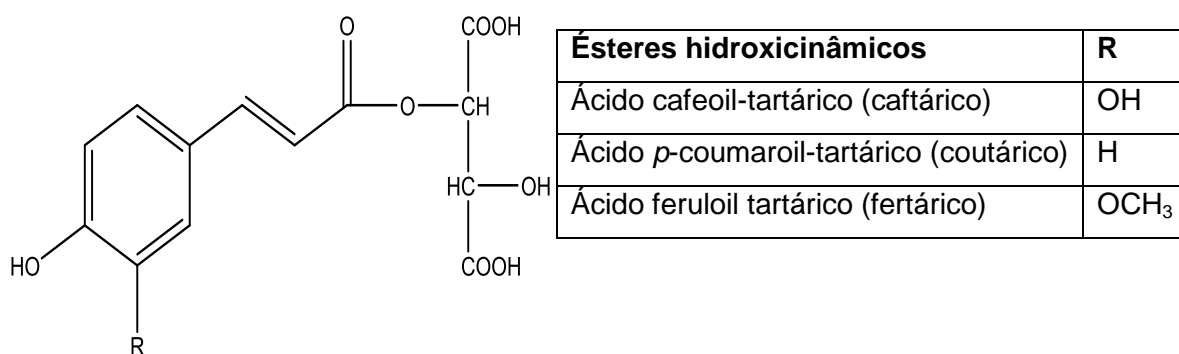
Os **ácidos hidroxicinâmicos** constituem o maior grupo de compostos fenólicos nos vinhos brancos, porém, também são detetados na mesma proporção nos vinhos tintos. Estes ácidos são derivados do ácido cinâmico e os compostos mais comumente encontrados nas uvas e no vinho são os ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico (21, 39) (Figura 2).



**Figura 2.** Estruturas dos principais ácidos hidroxicinâmicos.

Na natureza, estes ácidos apresentam-se em baixa quantidade na forma livre, apresentando-se normalmente esterificados com açúcares, álcoois ou ácidos orgânicos, destacando-se entre eles o ácido tartárico (5).

Os enologistas adotaram nomes triviais para os ésteres do ácido tartárico, sendo estes o ácido cafeoil-tartárico (caftárico), *p*-coumaroil-tartárico (coutárico) e o feruloil tartárico (fertárico) (Figura 3) (5, 21, 22). Devendo referir-se que o mais abundante nas uvas e no vinho é o ácido caftárico (35).



**Figura 3.** Derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e do ácido tartárico.

Estes ésteres com ácido tartárico são encontrados na polpa da fruta e por conseguinte em todos os sumos de frutas e em todos os vinhos (21, 22). Os níveis em que se encontram nas uvas são variáveis, apresentando teores médios de 170 mg/kg, 20 mg/kg e 5 mg/kg nas uvas de *Vitis vinifera* em caftárico, coutárico e ferúlico, respetivamente, mantendo-se a mesma proporção nos vinhos (40, 41).

Estes compostos são suscetíveis a determinadas reações, devido ao seu pH ácido, normalmente entre 3,0 e 3,9. Usualmente, ocorrem reações de hidrólise que levam à libertação dos ácidos hidroxicinâmicos que são facilmente detetados no vinho com poucas semanas. Por sua vez, estes ácidos livres podem reagir com o etanol do vinho, formando novamente ésteres.

Estes ácidos desempenham um papel importante na produção de vinhos, principalmente brancos, que se caracterizam por serem facilmente oxidáveis levando ao escurecimento dos vinhos (21, 35, 42). O escurecimento provém da ação da enzima polifenoloxidase que é libertada durante o esmagamento da uva. Esta enzima rapidamente oxida os ácidos hidroxicinâmicos (principais substratos) em quinonas. Este efeito é rapidamente contrabalançado pela presença da glutatona na uva, através da sua adição nucleofílica às quinonas, formando um produto incolor, o ácido 2-S-glutationil cafeoiltartárico, usualmente denominado por “produto de reação de uva” (43, 44), que compete com as reações que levam à degradação do mosto, mantendo elevados os níveis de compostos fenólicos inalterados (45, 46).

Desta forma, o potencial de um mosto para o escurecimento pode ser caracterizado por estes apresentarem ou não elevadas quantidades de glutatona presente.

De salientar que pequenas quantidades destes derivados oxidados dos ácidos caftarico e coutárico, são responsáveis pela coloração amarelo ouro de alguns vinhos brancos (5).

Apesar de mais notórios nos vinhos brancos, os efeitos desta enzima não deixam também de ser consideráveis na produção e descoloração dos vinhos tintos.

#### **1.1.1.1.2. Estilbenos**

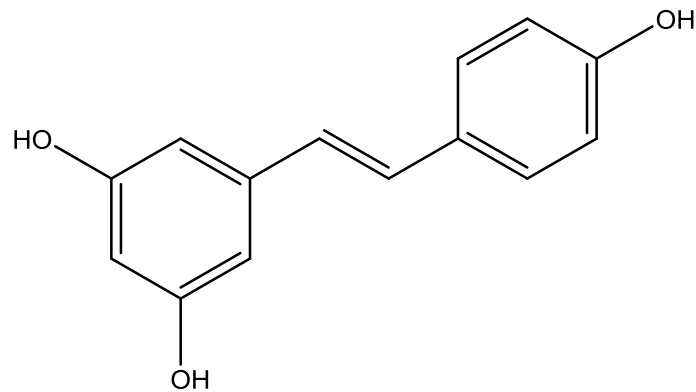
Os estilbenos constituem outra das classes minoritárias dos vinhos, são fitoalexinas naturalmente produzidas nas plantas, especialmente nas películas, folhas e raízes, como forma de resposta a agressões externas, nomeadamente infeções fúngicas (ex: infeção por *Botrytis*) e radiações UV (47, 48).

Estes possuem uma estrutura composta por dois anéis benzénicos unidos por uma cadeia de etano ou etileno.

As uvas e os seus produtos derivados constituem a principal fonte de estilbenos (49), sendo estes compostos transferidos para o mosto e vinho durante o processo de vinificação.

O estilbeno de maior relevância é o *trans*-3,5,4'-trihidroxi-estilbeno, comumente conhecido como resveratrol (Figura 4) (4, 39), é produzido na película das uvas, sendo transferido para o vinho durante a fermentação, os seus derivados são encontrados em muito

maiores quantidades nos vinhos tintos, devido ao maior tempo de contacto com as películas.



**Figura 4.** Estrutura química do resveratrol.

Podem considerar-se várias formas de resveratrol, existindo sob a forma de dois isómeros (conformações *cis* e *trans*), na sua forma livre, ou como derivado glucósido de ambos os isómeros (*trans*-resveratrol 3-*O*-glucósido) (21).

A reação de isomerização da conformação *cis* à conformação *trans* é desencadeada pela presença de luz (39, 50).

Os níveis totais de todas as formas variam entre os 7 mg/L para os vinhos tintos (51), 2 mg/L para os rosés e 0,5 mg/L para os vinhos brancos (52).

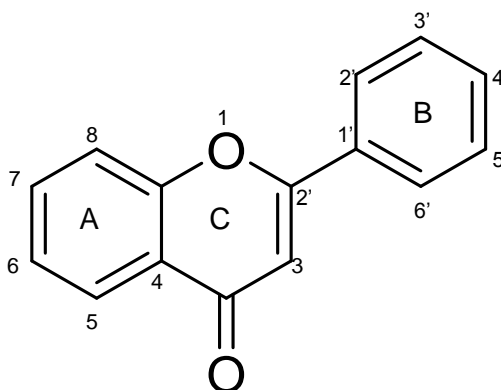
Apesar de estarem presentes em quantidades vestigiais, os estilbenos têm sido associados a determinadas propriedades antioxidantes, anticarcinogénicas e antimutagénicas, tendo um particular destaque no que se refere às propriedades nutracêuticas do vinho (4, 35, 39).

De todos os derivados, o *trans*-resveratrol é o mais estudado, tem demonstrado habilidade para formar complexos com iões cobre e para capturar radicais superóxido e peróxido, de forma a impedirem a peroxidação lipídica. Os seus efeitos protetores têm sido devidamente estudados tanto *in vitro* como *in vivo*, inibe e previne a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), protege o material genético de oxidações, estando associado à prevenção de alguns tipos de cancro e doenças cardiovasculares (48). Recentemente foi reportada a sua eficiência contra a disfunção neuronal e a morte celular, podendo contribuir para a prevenção de doenças como Huntington e Alzheimer (35).

### 1.1.1.2. Flavonoides

Podem considerar-se também dentro do grupo dos compostos fenólicos, os flavonoides, pigmentos de coloração amarela mais ou menos intensa. Estes compreendem uma classe maioritária de compostos fenólicos no vinho tinto, constituindo mais de 85% do conteúdo fenólico ( $\geq 1000$  mg/L), sendo encontrados principalmente nas películas e sementes das uvas e extraídos para o vinho durante o processo de fermentação (5, 21).

Estes compostos polifenólicos caracterizam-se por uma estrutura geral com quinze átomos de carbono,  $C_6-C_3-C_6$  e dois ciclos benzénicos ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo formar um terceiro heterociclo. Os anéis são designados como A, B e C começando o sistema de numeração a partir do átomo de oxigénio do heterociclo, prosseguindo até aos carbonos envolvidos na função dos anéis (Figura 5) (21). Desta forma, apresentam um heterociclo oxigenado (anel C), que está interligado com outro anel aromático (anel A) ao longo de uma ligação, e ligado a outro anel aromático (anel B) por uma ligação simples.



**Figura 5.** Estrutura geral dos flavonoides.

Com base no grau de oxidação e substituição apresentado pelo heterociclo oxigenado, podem classificar-se os vários grupos de compostos flavonoides (5, 42, 53). Os principais grupos encontrados nas uvas e no vinho são os **flavonóis**, os **flavanóis** (flavan-3-óis) e as **antocianinas**, e em menor percentagem os flavanonóis e as flavonas (21, 22).

O padrão de substituição no anel B, é responsável pelas diferenças encontradas dentro de cada grupo, sendo que estes diferem no número e na localização do grupo hidroxilo e metoxilo localizados neste anel (21, 22). Normalmente, os padrões de substituição são um grupo hidroxilo na posição 4 com uma substituição adicional de um oxigénio na posição 3 e/ou 5, que pode ser um hidroxilo ou metoxilo (21).

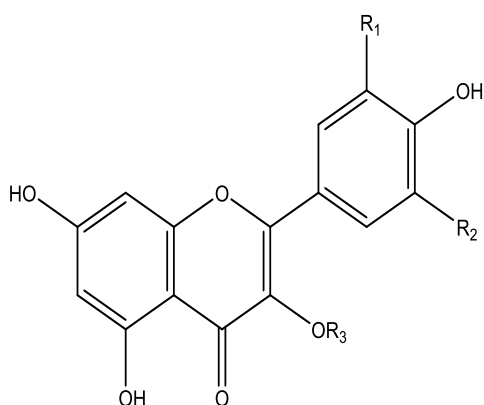
Os flavonoides podem encontrar-se em várias formas: livres, polimerizados com outros flavonoides, açúcares ou não-flavonoides, ou então, como uma combinação destes.

No caso de se encontrarem esterificados com açúcares ou compostos não-flavonoides são designados glicósidos ou derivados acilo, respetivamente (5).

### 1.1.1.2.1. Flavonóis

Estando presentes numa vasta seleção de fontes alimentares vegetais, os flavonóis encontram-se principalmente localizados nos vacúolos da epiderme das uvas. Esta classe de compostos é normalmente encontrada na forma de 3-O-glicósidos de quatro agliconas principais: a quercetina, a miricetina, o campferol e a isoramnetina (Figura 6) (22), sendo o flavonol mais reconhecido a quercetina-3-O-glicósido (35).

Além de estarem presentes na forma de 3-O-glicósidos, podem também estar presentes na forma de 3-O-glucurónidos e di-glicósidos (46).



Flavonol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Campferol	H	H	H
Campferol-3-O-glicósido	H	H	Glc
Campferol-3-O-galactósido	H	H	Gal
Campferol-3-O-glucurónido	H	H	Gluc
Quercetina	OH	H	H
Quercetina-3-O-glicósido	OH	H	Glc
Quercetina-3-O-glucurónido	OH	H	Gluc
Miricetina	OH	OH	H
Miricetina-3-O-glicósido	OH	OH	Glc
Miricetina-3-O-glucurónido	OH	OH	Gluc
Isoramnetina	OCH <sub>3</sub>	H	H
Isoramnetina-3-O-glicósido	OCH <sub>3</sub>	H	Glc
gal=galactose; glc=glucose; gluc=ácido glucurónico			

**Figura 6.** Estruturas dos principais flavonóis presentes no vinho.

O perfil flavonol no vinho é diferenciável do apresentado nas uvas pela presença de formas agliconas, originadas principalmente por hidrólises das formas glicosiladas durante a vinificação, maturação e ou envelhecimento do vinho (35, 37, 54).

A quercetina, constitui o flavonol mais frequentemente encontrado na natureza, principalmente nas uvas (55), enquanto que no vinho o principal flavonol é a dihidroquercetina (4).

Atribuem-se a estes compostos influências em determinadas propriedades do vinho, nomeadamente coloração por copigmentação (56), amargor (57), atividade antioxidante (58) e ainda conferem ao vinho propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogénicas (35). A contribuição que estes compostos têm na copigmentação, deve-se essencialmente à sua localização no bago, uma vez que se localizam maioritariamente na camada externa das células da epiderme, e ao facto destes absorverem fortemente radiação UV a 360 nm, levando a que as plantas os produzam como protetores solares naturais, protegendo-os contra a exposição à radiação UV (5, 21, 59).

Quando presentes, os glicósidos de antocianinas também se acumulam nas células exteriores da hipoderme. Desta forma, a síntese quer dos flavonóis quer das antocianinas parece ser diretamente ativada pela exposição à radiação UV e radiação azul (5).

Os flavonóis atuam como copigmentos das antocianinas, em diversas flores, frutos e produtos derivados de frutos (60), pensa-se que uvas que tenham sofrido elevada exposição solar dão origem a vinhos com conteúdo flavonol mais elevado, o que poderá estar associado com uma maior extensão na copigmentação flavonol-antocianina, e consequentemente a uma maior estabilização da coloração do produto final (61, 62).

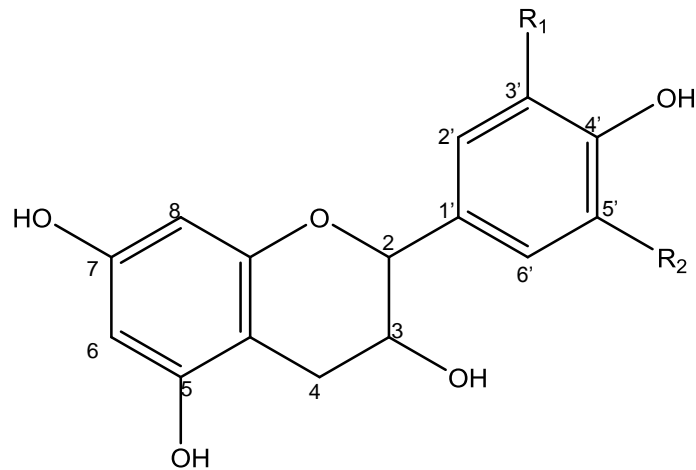
Assim, os níveis destes compostos encontrados nas uvas podem constituir um útil indicador da exposição solar e da qualidade do vinho (21).

Porém, um nível elevado destes compostos pode também estar relacionado com a variedade da uva, podendo apresentar películas espessas e/ou uma elevada razão película/volume, assim como com a qualidade das técnicas de extração utilizadas durante a vinificação (63).

#### **1.1.1.2.2. Flavanóis (flavan-3-óis)**

Os flavanóis constituem o grupo de flavonoides mais abundante dentro dos compostos fenólicos presentes nas uvas, sendo encontradas nas partes sólidas dos bagos (semente, película e tronco), no vinho e em outros alimentos, tais como maçãs, infusões e chocolate (64). Estes compostos são de relevante importância no que se refere à estrutura dos vinhos tintos, nomeadamente adstringência e amargor (29).

A sua designação mais comum é flavan-3-óis, de forma a identificar a localização do grupo álcool no anel C (Figura 7) (21, 39).



**Figura 7.** Estrutura química de um flavanol.

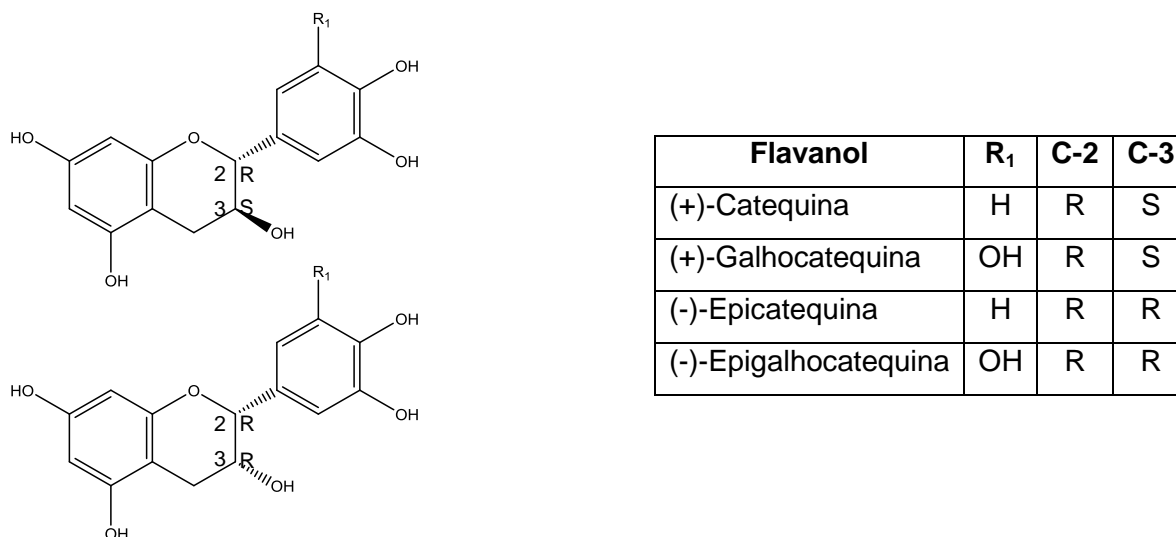
Estes podem ser encontrados em diversas formas, nomeadamente **monoméricas**, **oligoméricas** e **poliméricas**, podendo as duas últimas ser também designadas por **proantocianidinas** ou **taninos condensados**(22).

### **Unidades monoméricas**

As unidades monoméricas de flavanóis encontradas nas uvas de *Vitis vinifera* são a (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galhocatequina e (-)-epigalhocatequina (36, 65).

Os padrões de substituição no anel B variam entre as unidades monoméricas, sendo a (+)-catequina e a (-)-epicatequina orto-hidroxiladas nas posições C-3' e C-4', enquanto que as outras duas possuem um terceiro grupo hidroxilo na posição C-5'.

Além disso, uma vez que as posições C-2 e C-3 são dois centros assimétricos, os quatro flavanóis monoméricos podem ser agrupados em dois pares de diastereoisómeros, cujas configurações são *2R:3S* para a (+)-catequina e (+)-galhocatequina, e *2R:3R* para a (-)-epicatequina e (-)-epigalhocatequina (Figura 8) (21, 22, 66).



**Figura 8.** Estruturas dos flavanóis monoméricos presentes em uvas de *Vitis vinifera*.

Contrariamente ao que se verificava para os outros grupos, no vinho, os flavanóis não são normalmente encontrados na forma glicósido, por sua vez, são encontrados como ésteres de ácido gálico, que é esterificado na posição 3 das séries –epi originando: (-)-epicatequina-3-O-galato e epigalhocatequina-3-O-galato (21). No vinho, encontram-se ambas as formas monoméricas livres (di-hidroxiladas e tri-hidroxiladas) (21, 67, 68).

O principal flavanol é a catequina, variando os níveis totais de flavanóis monoméricos nos vinhos tintos entre os 40-120 mg/L (69).

### Proantocianidinas ou taninos condensados

A maioria dos compostos fenólicos presentes nos vinhos tintos são derivados da condensação de unidades de flavanóis, originando proantocianidinas (oligómeros) e taninos condensados (polímeros) que representam os maiores constituintes dos vinhos.

Na família dos taninos podem considerar-se duas classes, consoante sejam baseados em compostos flavonoides ou não flavonoides: taninos condensados ou catéquicos e taninos hidrolisáveis ou gálicos, respetivamente (4, 5). No entanto, apenas a primeira classe é representativa nos vinhos, devido à natureza das ligações que unem os compostos fenólicos envolvidos, isto é, nos taninos condensados são unidos por ligações covalentes que não são suscetíveis ao meio ácido usualmente exibido pelo vinho. Porém, os taninos hidrolisáveis são sensíveis traduzindo-se através do enfraquecimento das ligações entre os átomos de hidrogénio e oxigénio dos compostos envolvidos, com consequente dissociação (4, 5, 21).

As proantocianidinas têm a capacidade de libertarem antocianidinas quando sujeitas a condições de temperatura e acidez, como resultado da quebra de ligações interflavânicas

(70), podem distinguir-se dois grupos de proantocianidinas com base na natureza das antocianidinas libertadas: procianidinas e prodelfinidinas.

Como o próprio nome sugere, as procianidinas libertam cianidinas, e são constituídas por (+)-catequina e (-)-epicatequina. Enquanto que as prodelfinidinas libertam delfinidinas e são constituídas por (+)-galthocatequina e (-)-epigalthocatequina.

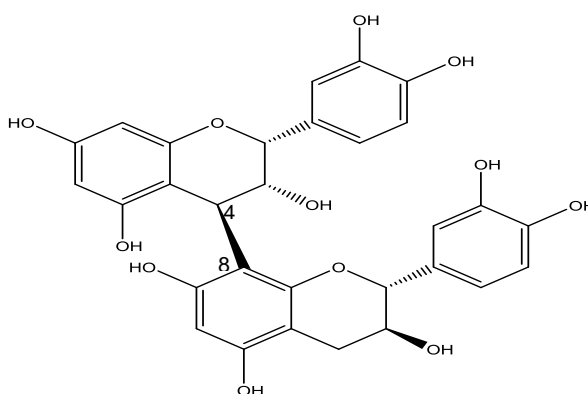
Além de serem distinguidas pelo tipo de antocianidinas que libertam, as proantocianidinas podem também ser distinguidas pelo comprimento da cadeia e pela natureza da ligação interflavânica.

Pelo comprimento da cadeia, podem distinguir-se oligómeros e polímeros. Os oligómeros apresentam um grau de polimerização de 2 a 5 unidades. Por sua vez, polímeros dizem respeito às moléculas com grau de polimerização superior a 5 e que não podem ser separadas devido ao elevado número de isómeros que podem originar.

Esta classificação, não pode ser adotada como totalmente restrita, uma vez que pode variar em função do substrato e técnica utilizada (71).

No que se refere à natureza da ligação interflavânica, podem distinguir-se dois tipos de proantocianidinas, tipo B e A.

As proantocianidinas do tipo B, possuem os seus monómeros ligados através de uma ligação C-4 na unidade do topo e as posições C-6 ou C-8 da unidade terminal, sendo de referir que os isómeros C4-C8 são mais comuns (Figura 9) (21).



**Figura 9.** Estrutura química de uma procianidina B1.

Por outro lado, as proantocianidinas do tipo A contêm uma ligação éter entre a posição C-2 da unidade superior e o grupo hidroxilo da posição C-5 ou C-7 da unidade inferior (21, 22).

A quantidade de polímeros mais oligómeros tem particular relevância no conteúdo total de compostos fenólicos, variando entre 25 a 50% nos vinhos novos, apresentando uma maior proporção nos vinhos mais velhos. Os níveis variam entre 0,5 g/L e 1,5 g/L apresentando-se em menores quantidades nos vinhos brancos (21).

As proantocianidinas são largamente responsáveis pela adstringência e amargor no vinho (39, 72, 73), estão presentes nas reações químicas de escurecimento oxidativo na formação de turvação e em interações com proteínas (74), e também em inúmeras reações de condensação durante a maturação do vinho e envelhecimento (75).

### 1.1.1.2.3. Antocianinas

As antocianinas representam uma vasta classe de polifenóis responsáveis pela cor de muitos frutos, flores e outras partes das plantas. Devido à tendência atual para um maior consumo de frutas e vegetais estão amplamente incluídas na dieta humana (76).

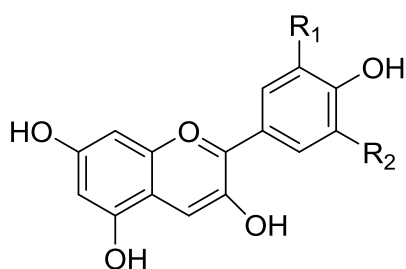
As antocianinas são os pigmentos vermelhos das uvas, localizados nas películas e nas polpas e são particularmente responsáveis pela cor dos vinhos tintos (21, 22).

O nome que comumente se atribui ao sistema flavonoide anelar é antocianidina, fazendo-se a classificação das classes com base no padrão de substituição apresentado pelo anel B, nomeadamente o número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo presentes.

No entanto, devido à sua instabilidade, esta forma de flavonoide não é comum, encontrando-se normalmente em quantidades vestigiais.

Normalmente apresentam-se conjugadas com glucose, uma vez que este componente melhora a sua estabilidade química e também a sua solubilidade em água, passando a designar-se antocianinas (5).

As antocianinas identificadas nas uvas de *Vitis vinifera* são descritas como sendo 3-O-monoglucósidos ou 3-O-acetilados monoglucósidos de cinco antocianidinas principais: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina (Figura 10) (21, 22).



Antocianidina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

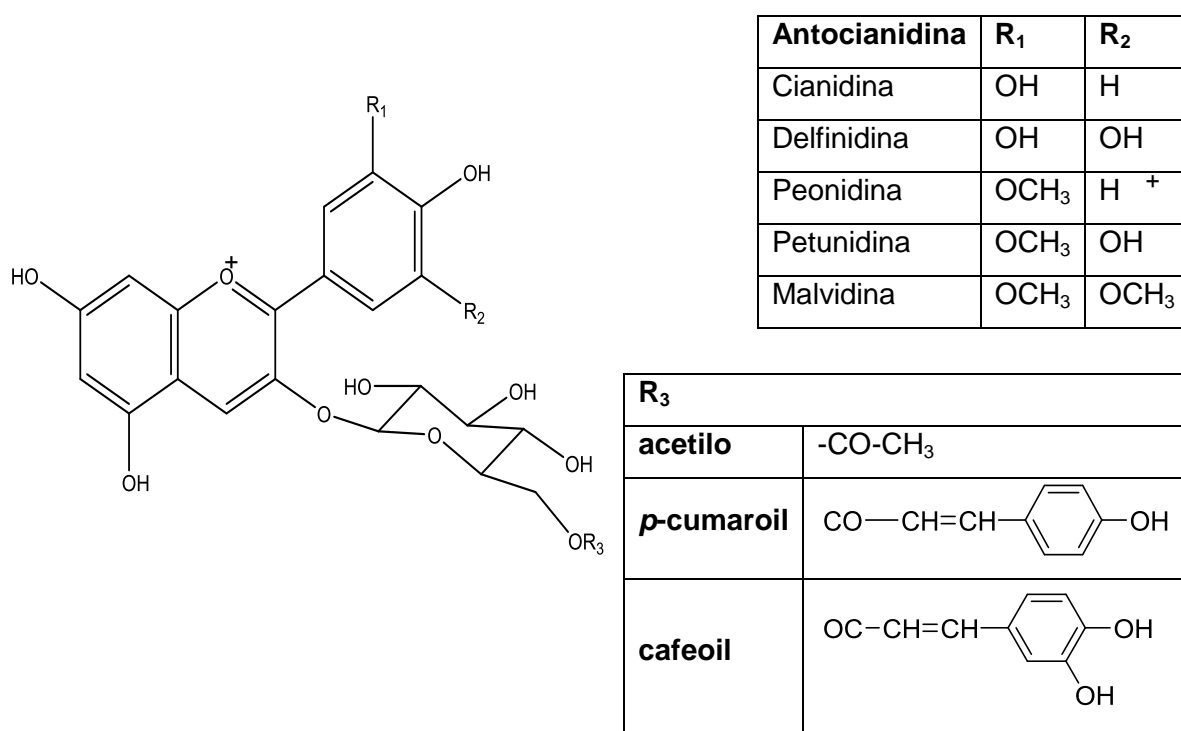
**Figura 10.** Estruturas químicas das antocianidinas.

De referir, que a *Vitis vinifera* constitui uma exceção no que se refere ao número de componentes glucósidos, sendo que normalmente só se apresentam na forma monoglicosilada. Factoeste que se deve à carência do alelo dominante que regula a produção

de antocianinas di-glicosiladas. No entanto, no caso de haver cruzamentos interespécies com *Vitis vinifera*, podem ser produzidas antocianinas mono- e di-glicosiladas.

A presença de formas diglucósidos pode ser vantajosa na perspectiva da estabilidade, mas é desvantajosa no que toca à suscetibilidade ao escurecimento (77). A proporção de cada classe de antocianinas é variável mediante os cultivares e as condições de crescimento a que estão sujeitas (78).

Na maioria das variedades de uvas tintas, as antocianinas apesar de glucosiladas podem também ser aciladas, ao estabelecerem ligações éster com os ácidos acético, cafeico ou *p*-cumárico, através da posição C-6 do componente açúcar (Figura 11) (21, 79).

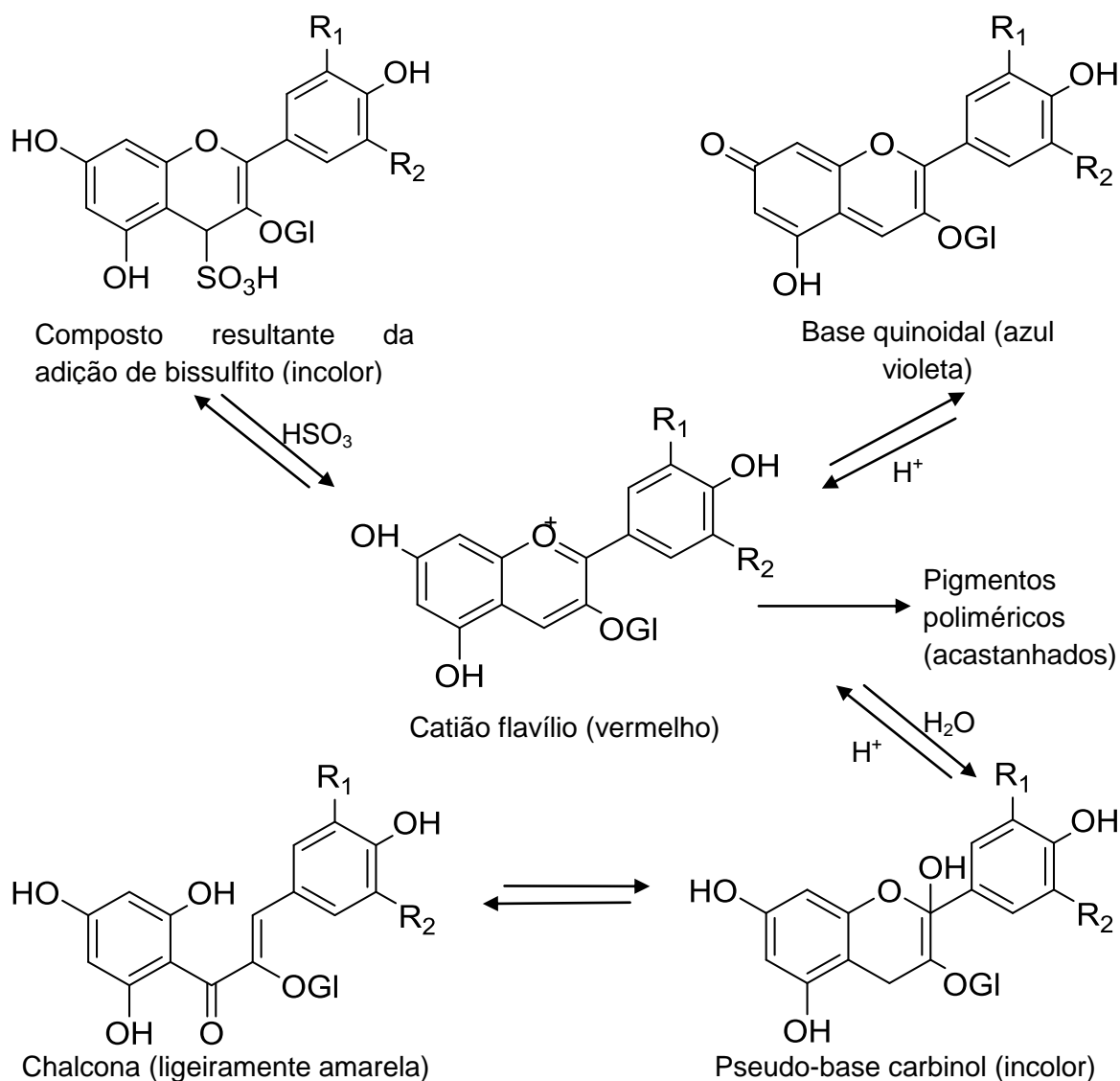


**Figura 11.** Estrutura química das antocianinas.

A intensidade de coloração dos vinhos tintos depende de todas as antocianinas, destacando-se a malvina, uma vez que possui maior intensidade de coloração vermelha, doando a maior parte da coloração aos vinhos tintos.

A base para a explicação do facto de algumas antocianinas poderem contribuir de forma mais significativa para a coloração do vinho do que outras, está no padrão de substituição apresentado pelo anel B, sendo que uma coloração mais azulada está associada com um maior número de grupos hidroxilo, enquanto que uma coloração mais avermelhada associa-se com um maior número de grupos metilo (5).

Em meio normalmente ácido (ex. vinho), as antocianinas ocorrem num equilíbrio dinâmico entre cinco estados moleculares, quatro destes numa forma livre e um deles associado com o dióxido de enxofre (Figura 12) (5, 21, 80).



Gl, glucose

**Figura 12.** Equilíbrio dinâmico entre as várias formas de antocianinas (5).

Considerando este equilíbrio, a coloração das soluções constituídas por antocianinas varia em função da proporção em que as designadas formas se encontram.

Desta forma, há que ter em consideração quais os fatores que têm influência no mesmo, podendo considerar-se o efeito do pH, a estrutura e concentração dos pigmentos, os copigmentos, a temperatura, os iões metálicos, o oxigénio disponível, enzimas, ácido ascórbico, açúcares e os seus produtos de oxidação, o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), entre outros (5, 21, 79).

A todos estes fatores, associam-se reações de oxidação, hidrólise e condensação, que têm interferência na coloração do vinho (21).

O pH tem efetivamente efeito na coloração do vinho, valores mais elevados de pH deslocam o equilíbrio no sentido das formas incolores, favorecendo a diminuição da coloração e valores inferiores de pH exercem o efeito contrário, favorecendo o catião flavílio e a coloração vermelha mais intensa.

Por exemplo, o pH do vinho situa-se normalmente entre os 3,4 e 3,6, cerca de 20 a 25 % das antocianinas encontram-se na forma de catião flavílio, enquanto que para valores de 4, apenas 10 % se encontram nesta forma (5, 21, 81).

O dióxido de enxofre é ainda mais influente no equilíbrio, funcionando como um agente eficaz mas reversível de branqueamento das antocianinas.

As antocianinas são de fato as principais responsáveis pela coloração dos vinhos, porém a sua contribuição pode também depender de outros compostos fenólicos, podendo estar associadas a diferentes efeitos: polimerização e copigmentação, que condicionam a sua estabilidade e suscetibilidade à degradação (4, 5, 24, 56, 82).

A polimerização ocorre essencialmente entre as antocianinas e os compostos fenólicos incolores, nomeadamente os flavanóis monoméricos e poliméricos (catequinas e procianidinas), flavonóis ou ácidos fenólicos durante o envelhecimento dos vinhos.

Esta reação não é dependente do oxigénio, podendo ocorrer quer em condições aeróbias ou anaeróbias, sendo que durante o envelhecimento em garrafas é mais condicionada pela temperatura do que pelo oxigénio disponível (83).

As moléculas de antocianinas polimerizadas usufruem de proteção contra a descoloração pelo SO<sub>2</sub>, a oxidação, os efeitos de um pH elevado, assim como a outras modificações químicas, e também a precipitação dos taninos, beneficiando de uma maior estabilidade e portanto contribuição para a coloração dos vinhos (5).

O fato de proteger contra o efeito do SO<sub>2</sub> explica-se por ser necessária a ocorrência da auto-oxidação dos fenólicos na presença de oxigénio, levando à produção de peróxido de hidrogénio, que por sua vez oxida o etanol a acetaldeído, ligando-se às antocianinas reverte o efeito branqueador do SO<sub>2</sub>.

No que diz respeito à proteção ao pH, uma vez que a polimerização contribui para uma maior proporção dos estados flavílio e quinoidal, é facilmente perceptível o seu efeito estabilizador na coloração, tome-se como exemplo o fato de a um pH de 3,4 cerca de 60% das antocianinas polimerizadas estarem na sua forma colorida, enquanto que apenas 20% das antocianinas livres se encontram nessa mesma forma.

Apesar de favorecer os estados acima referidos, é de salientar que a polimerização tem, também um efeito sobre o tom das antocianinas, passando este a ser amarelo-acastanhado (81).

Porém, no caso da polimerização não ocorrer no momento adequado, isto é, quando as procianidinas não estão em estado para se polimerizarem com as antocianinas, e de o

pH ser adequado, surge como alternativa ao efeito protetor da polimerização, a copigmentação.

Os copigmentos normalmente associados a estes complexos são compostos não flavonoides e flavonoides, destacando-se a quercetina (21, 84).

Contrariamente à polimerização, a copigmentação não requer a presença de oxigénio, sendo favorecida quando as antocianinas se encontram na forma de catião flavílio (85), o que constitui uma vantagem porque desloca o equilíbrio no sentido desta forma.

Usualmente, estão associadas a estes copigmentos mudanças na coloração no decorrer do envelhecimento dos vinhos, explicadas pela instabilidade destes devido ao facto destes estarem unidos por atrações hidrofílicas entre os seus componentes de glucose e repulsão hidrofóbica pela água, ao invés de ligações covalentes estáveis.

Por fim, deve referir-se que a concentração em que as cinco formas principais de antocianinas se encontram é muito variável, quer em função da maturação e da natureza das uvas, variando entre os 100 mg/L e 1500 mg/L, diminuindo drasticamente depois da vinificação até um valor limite de 50 mg/L (4).

### 1.1.2. Compostos voláteis

Os compostos voláteis são responsáveis por uma das características mais importantes dos vinhos: o **aroma**, que constitui o atributo-chave para a aceitabilidade dos consumidores (30, 31).

De forma geral, o aroma varietal de um vinho advém de uma combinação entre vários compostos aromáticos, sendo muito dificilmente atribuído a um ou a poucos compostos voláteis (5).

Atualmente já foram identificados mais de 1000 compostos voláteis nos vinhos, diferenciando-se na sua polaridade e volatilidade, as suas concentrações variam entre os mg/L e os ng/L, muitos encontram-se abaixo do limiar de perceção sensorial humana. Estes compostos pertencem a várias classes químicas, porém apenas algumas podem ter impacto significativo no aroma dos vinhos (31, 86, 87), entre as quais se encontram os **álcoois superiores**, **ésteres**, **ácidos voláteis**(5, 88), **monoterpenos** e **norisoprenoides**(89, 90). Além destas classes podem também considerar-se aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis voláteis (FV), compostos sulfurados e azotados, entre outros (38, 91, 92).

A importância de cada composto volátil para o aroma é dependente do limiar de perceção do odor, que se refere à concentração mais baixa que pode ser detetada pelo olfato humano. Usualmente, utiliza-se um parâmetro designado de valor da atividade odorante,

que se refere à razão entre a concentração e o valor limiar de percepção, apenas os compostos com valor superior a 1 podem ser classificados como contribuintes para o aroma (93, 94).

De acordo com a sua importância para o aroma, os compostos podem ser divididos em(5):

- i. **Compostos de impacto**, são compostos que têm um efeito significativo e distinto na fragância do vinho, conferindo-lhe uma singularidade varietal.
  
- ii. **Compostos de contribuição**, são aqueles compostos que contribuem para a complexa fragância naturalmente exibida pelos vinhos, e que participam no desenvolvimento do bouquet que se forma ao passo que o vinho envelhece, e pelo bouquet básico gerado por ação de leveduras durante a fermentação.

#### **1.1.2.1. Álcoois superiores**

Os álcoois superiores representam 50% dos componentes aromáticos presentes num vinho além do etanol, denominam-se álcoois superiores, aqueles álcoois que possuam mais de dois átomos de carbono.

A sua presença nas uvas é praticamente insignificante, sendo que a maior parte dos álcoois presentes nos vinhos surgem como produtos do metabolismo de leveduras durante a fermentação alcoólica, diretamente a partir dos açúcares ou dos aminoácidos das uvas (4, 5).

A sua formação durante a fermentação é fortemente influenciada pelas práticas enológicas utilizadas durante a produção de um vinho, sendo determinantes as condições que se fazem sentir, podendo estas ter um efeito fomentador ou repressor na produção destes compostos (95).

Entre as condições que favorecem a sua produção, destacam-se (5):

- i. Presença de oxigénio;
- ii. Temperaturas elevadas na fermentação;
- iii. Material em suspensão no mosto.

Como condições repressoras, temos:

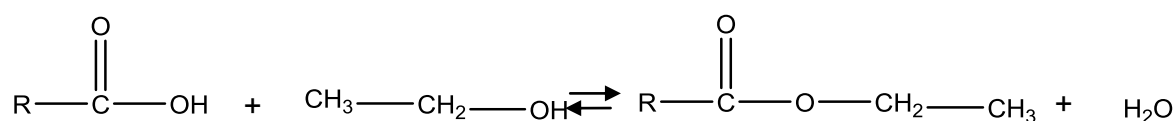
- i. Clarificação pré-fermentativa;
- ii. Temperaturas baixas na fermentação;

Estes constituintes são determinantes no aroma dos vinhos, os mais importantes são os álcoois de cadeia linear, como por exemplo: o 1-propanol; o álcool isobutílico (2-metil-1-propanol); o álcool isoamílico (3-metil-1-butanol); o 2-metil-1-butanol. Destaca-se também o 2-feniletanol (álcool fenético), como o derivado fenólico mais importante. A sua influência no aroma é dependente das concentrações em que se encontram, se presentes em baixas concentrações ( $\approx 0,3$  g/L) tornam ainda mais complexo o bouquet de um vinho, por outro lado se presentes em elevadas concentrações definitivamente dominam o aroma de um vinho.

No entanto, podem também estar associados com um efeito indesejável. O seu conteúdo é variável ao longo da vida de um vinho, podendo aumentar devido à ação de microrganismos deteriorantes, como leveduras e bactérias, conduzindo à formação de maus odores. Deve também salientar-se o facto de poderem levar ao incremento de outros componentes aromáticos dos vinhos, por exemplo podem formar-se ésteres por reação com ácidos orgânicos (4, 5).

### 1.1.2.2. Ésteres

Os ésteres constituem o grupo funcional mais comum nos vinhos, são produtos de uma reação de condensação reversível entre o grupo carboxilo de um ácido orgânico e o grupo hidroxilo de um álcool ou fenol, com a eliminação de uma molécula de água (Figura 13). A reação inversa corresponde à hidrólise de um éster, favorecida por elevadas temperaturas e baixo pH (4, 5).



**Figura 13.** Equilíbrio de esterificação de um álcool.

Estes são oriundos das uvas em baixas quantidades, podem também formar-se durante a fermentação alcoólica. Caracterizam-se por uma baixa volatilidade, não são normalmente identificados como intervenientes na fragância de um vinho. Estes compostos são dotados de aromas frutados e são encontrados em concentrações acima do seu limiar de perceção, intervêm no bouquet dos vinhos brancos, porém para os vinhos tintos ainda não está bem definida a sua intervenção (4, 5).

As reações de esterificação que levam à sua presença nos vinhos, podem ser de duas naturezas distintas, consoante a fase do vinho. Nomeadamente, são de natureza

enzimática nos processos fermentativos, e de natureza química no decorrer do envelhecimento de um vinho. Devendo referir-se que um mesmo éster no produto final, pode ser consequência das duas vias (4, 88).

A sua produção durante a fermentação é condicionada por uma série de fatores:

- i. O grau de amadurecimento da uva, condiciona a ocorrência de esterificação no mosto, sendo esta tanto menor quanto maior for o amadurecimento.
- ii. A atividade da esterase em determinadas leveduras.
- iii. A temperatura de fermentação, sendo que baixas temperaturas favorecem ésteres com características frutadas (ex. acetato de isoamiló e acetato de isobutilo), e elevadas temperaturas, promovem a produção de ésteres de elevado peso molecular (ex. acetato de etilo e octanoato de etilo).
- iv. Níveis baixos de  $\text{SO}_2$ , clarificação do mosto, ausência de  $\text{O}_2$ , favorecem a sua síntese.

Os ésteres podem dividir-se em duas categorias: alifáticos (cadeia linear) e fenólicos (cíclicos), sendo a primeira categoria a mais comumente encontrada nos vinhos.

Os ésteres alifáticos podem dividir-se em três sub categorias: ésteres de ácidos monocarboxílicos, ésteres de ácidos di- e tricarboxílicos e ésteres de ácidos hidróxi ou oxo (4, 5).

**i. Ésteres de ácidos monocarboxílicos:**

Podem ser baseados em etanol e ácidos gordos saturados, como por exemplo: ácido hexanóico, octanóico e decanóico, ou baseados em ácido acético e álcoois superiores, tais como o álcool isoamilico e isobutilico. São os únicos ésteres aos quais se atribui relevância na intervenção no aroma dos vinhos, contribuindo, particularmente no aroma dos vinhos jovens, a nível dos aromas frutados. Porém, o tipo de contribuição aromática que têm varia com o comprimento da cadeia de carbonos, nomeadamente, o aroma varia de frutado, a uma espécie de aroma de sabão e posteriormente torna-se um aroma muito forte.

**ii. Ésteres de ácidos di- e tricarboxílicos:**

Usualmente presentes em concentrações superiores a 1 mg/L, não são normalmente considerados como influentes no aroma dos vinhos, salvo determinadas exceções dependendo do ácido com o qual estão associados (ex. lactato de etilo).

**iii. Ésteres de ácidos hidróxi ou oxo:**

Os ésteres são denominados hidróxi se possuidores de um grupo hidróxilo, ou oxo se possuidores de um grupo cetona. Associados a uma baixa volatilidade não são considerados como intervenientes no perfil aromático dos vinhos (ex. ácido caftárico).

Entre todos os ésteres, o mais estudado foi o acetato de etilo. Encontrado nos vinhos em concentrações que rondam os 50 a 100 mg/L, tem influência efetiva no aroma dos vinhos, sendo esta dependente da concentração.

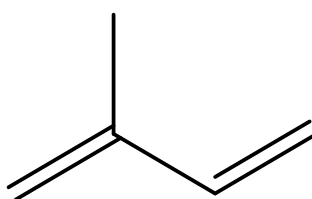
Deste modo, quando presente em concentrações mais baixas, inferiores a 50 mg/L, pode contribuir para a complexidade dos vinhos, quando presente em concentrações superiores a 150 mg/L, confere-lhe um aroma a vinagre (96).

De uma forma geral, níveis elevados deste composto podem ser inerentes do mosto ou advir de uma contaminação com bactérias acéticas aeróbias (4, 5). No entanto, as bactérias não têm a capacidade de sintetizar diretamente, sendo resultantes da reação não enzimática do ácido acético proveniente da bactéria com o etanol do meio.

### 1.1.2.3. Terpenos

Os terpenos constituem um importante grupo de compostos aromáticos, contribuindo para o aroma de diversas flores e frutos, são oriundos das uvas (97), muito úteis para a caracterização de inúmeras variedades (ex. Moscatel) (88).

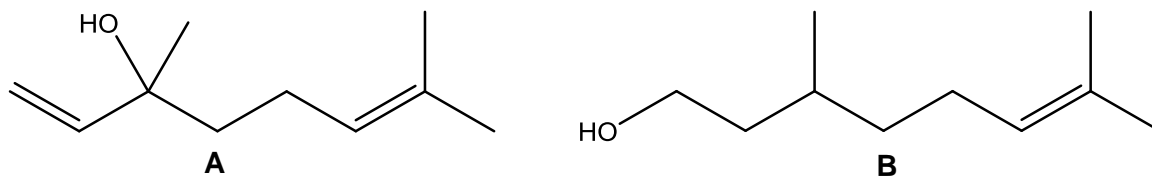
Caracterizam-se pelo particular esqueleto em carbono que apresentam, que consiste numa estrutura básica de cinco átomos de carbono, usualmente designada por unidade isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 14). Assim, os diferentes terpenos são diferenciados pelo número de unidades isopreno que apresentam, sendo estes agrupados em monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades) e triterpenos (seis unidades) (5)(4).



**Figura 14.** Estrutura química do 2-metil-1,3-butadieno.

Podem coexistir diferentes formas de terpenos, consoante os grupos funcionais que apresentam. No caso de possuírem grupos hidroxilo, existem sob a forma de álcoois, dos quais servem de exemplo o linalol e o geraniol. Estes compostos podem, também existir sob a forma de aldeídos, entre outros (4, 5).

Dentro dos terpenos, destacam-se os monoterpênicos, como sendo os compostos com maior influência no aroma, os mais perfumados são encontrados na forma de álcoois, como por exemplo o linalol e o citrônolol (Figura 15) (4).



**Figura 15.** Estrutura química do (A) linalol e do (B) citrônolol.

Especialmente derivados das uvas, os terpenos podem existir em três formas diferentes (5, 98):

- i. Álcoois monoterpênicos livres;
- ii. Complexados com glicósidos;
- iii. Di- ou trióis;

A forma na qual existe condiciona a sua possível contribuição para o aroma, sendo que as formas livres são as que têm maior impacto e estão relacionadas com a qualidade do vinho. As outras formas possíveis não têm contribuição para o aroma, no entanto, do ponto de vista quantitativo, a forma glicosilada é a mais importante (5, 98).

Durante o envelhecimento dos vinhos, sucedem-se mudanças no seu conteúdo, podendo ocorrer um aumento das formas livres devido a quebras nas ligações glicosídicas, que pode ser favorecida pela adição de preparações enzimáticas (99), ou uma diminuição no seu conteúdo derivada da ocorrência de oxidações ou outras transformações (88). Estas mudanças não são de grande relevância no aroma dos vinhos tintos onde a sua ocorrência é mínima (5).

Os terpenos podem estar relacionados com efeitos indesejáveis nos vinhos tintos, uma vez que a libertação das formas livres ocorre na forma de derivados de ácidos hidroxicinâmicos, levando à formação de fenóis voláteis responsáveis pelos maus odores (100).

#### 1.1.2.4. Norisoprenoides

Os norisoprenoides podem ter duas origens distintas, podendo ter a mesma origem dos terpenos resultando da degradação química ou enzimática de carotenoides, ou podem ter uma origem distinta, resultando da degradação de moléculas de glucose (101-103).

Os carotenoides estão presentes nas uvas em concentrações na ordem dos 15 a 2500  $\mu\text{g/Kg}$ , sendo os mais importantes por ordem decrescente: luteína,  $\beta$ -caroteno, neoxantina e luteína-5,6-epóxido (104).

Durante o processo de vinificação, especialmente durante a maturação, há uma tendência natural para uma diminuição do conteúdo em carotenoides e por conseguinte, um aumento dos seus derivados, tais como os norisoprenoides.

A sua degradação leva à formação de derivados com 9, 10, 11 ou 13 átomos de carbono, sendo os derivados C13 aqueles que se apresentam como interessantes do ponto de vista olfativo para os vinhos, devido aos seus baixos limiares de percepção (4, 101). De referir, que estes se apresentam nos vinhos sobretudo na forma glicosilada (104).

Os principais norisoprenoides descritos como componentes da composição aromática nas uvas tintas são a  $\beta$ -damascenona e a  $\beta$ -ionona (Figura 16) (105, 106), ambos presentes em maiores quantidades nos vinhos tintos (4).



**Figura 16.** Principais norisoprenoides em uvas tintas.

A  $\beta$ -damascenona é um composto aromático ativo encontrado nas uvas e nos vinhos (104), conferindo-lhes odores a flores, frutos exóticos, doce e maçã, apresentando um limiar de percepção muito baixo na ordem dos 0,05  $\mu\text{g/L}$  (4, 104, 107).

Por sua vez, a  $\beta$ -ionona, pode também contribuir para o aroma dos vinhos, proporcionando-lhes aromas a violeta, podendo ser gerado diretamente da degradação de  $\beta$ -caroteno ou pela hidrólise do seu açúcar precursor (104).

Outro derivado norisoprenoide considerado como influente no aroma dos vinhos é o **1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN)**. A sua presença nos vinhos é mais comum nos estados mais avançados das suas vidas, aparecem durante o envelhecimento em garrafas, estando ausentes nos vinhos jovens e nas uvas, nestas últimas são encontrados como precursores não voláteis, sendo libertados posteriormente por hidrólise ácida (4, 104).

Este composto possui um limiar de percepção na ordem das 20 µg/L, pode afetar negativamente a qualidade de um vinho quando presente em elevadas concentrações, estando descrita a formação de odores desagradáveis, como por exemplo o odor a querosene (4, 108).

#### **1.1.2.5. Ácidos voláteis**

A variedade de ácidos que fazem parte do perfil metabólico dos vinhos pode ter origens distintas, nomeadamente podem ser oriundos das uvas, da atividade de diferentes microrganismos (leveduras, bactérias acéticas ou bactérias lácticas), de processos químicos naturais verificados durante a evolução dos mostos e vinhos, ou da ação tecnológica (como o recurso à adição de corretivos ácidos) (109, 110).

A acidez total dos vinhos é comumente dividida em duas categorias: fixa e volátil. Apesar de minoritária quantitativamente, a acidez volátil distingue-se claramente em relação à fixa.

Desta forma, os ácidos voláteis influenciam o aroma conferindo novos odores aos vinhos, sendo considerados como desejáveis ou indesejáveis mediante a concentração em que se encontrem.

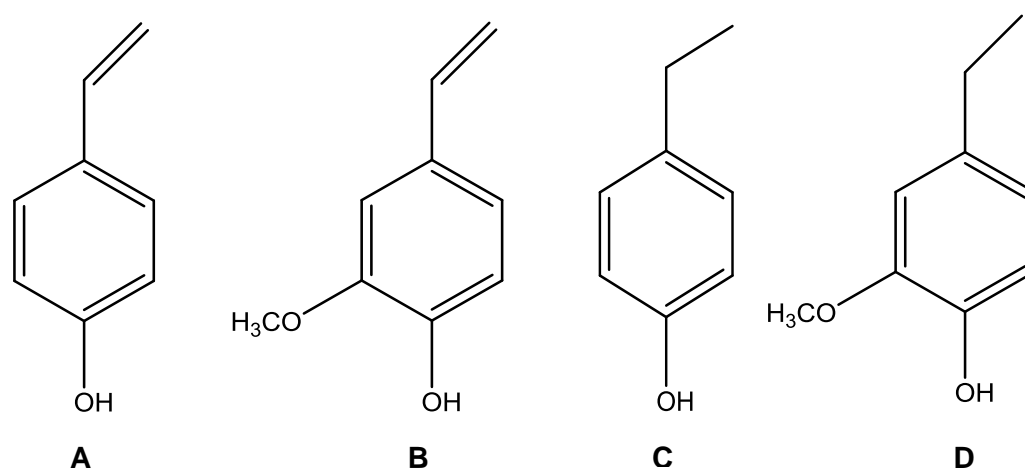
O ácido acético é o principal ácido volátil, se presente em concentrações inferiores a 300 mg/L, é favorável para o vinho, conferindo-lhe maior complexidade no sabor e odor. Porém, se presente no vinho em concentrações superiores às referidas, torna-se prejudicial, conferindo-lhe um odor desagradável a vinagre e um gosto amargo (4, 5).

Por sua vez, os restantes ácidos carboxílicos homólogos têm também influências no aroma, isto é, os ácidos com pequenas cadeias carbonatadas ( $C_2$  a  $C_5$ ), como o ácido propiónico, odor a gordo e o ácido butírico, associado a um odor a ranço e a manteiga. Por sua vez os carboxílicos de  $C_6$  a  $C_{10}$  conferem odores a bode (4, 5).

### 1.1.2.6. Fenóis voláteis

Os FV constituem uma família de compostos químicos que contribuem para a complexidade aromática de inúmeras bebidas fermentadas, principalmente no vinho. Estes compostos estão presentes em quantidades residuais nos mostos, enquanto que nos vinhos oscilam entre algumas dezenas e muitas centenas de  $\mu\text{g/L}$ , sendo descritos como componentes normais do aroma do vinho (111, 112).

Nos vinhos, os mais amplamente descritos são os (i) vinilfenóis (VF), destacando-se o 4-vinilfenol (4-VF) e o 4-vinilguaiacol (4-VG); e os (ii) etilfenóis (EF), principalmente o 4-etilfenol (4-EF) e o 4-etilguaiacol (4-EG) (Figura 17) (112, 113).



**Figura 17.** Os principais FV dos vinhos: (A) 4-vinilfenol, (B) 4-vinilguaiacol, (C) 4-etilfenol, (D) 4-etilguaiacol.

Os VF estão presentes em maiores quantidades nos vinhos brancos, em contrapartida os vinhos tintos possuem maiores quantidades de EF, onde usualmente se apresentam numa proporção 4-EF:4-EG de 8:1. O limite de perceção olfativa para o 4-EF é de 600  $\mu\text{g/L}$  e para o 4-EG é de 110  $\mu\text{g/L}$ . Nestas condições há um efeito sinérgico entre as duas moléculas e o limite de perceção olfativa baixa até aos 370  $\mu\text{g/L}$  (114). Os vinhos rosés apresentam valores intermédios aos apresentados pelos vinhos brancos e tintos (4, 114). Nesta classe de compostos, os EF são os que exercem maior impacto na qualidade dos vinhos, sendo esta influenciada pelos teores em que se apresentam.

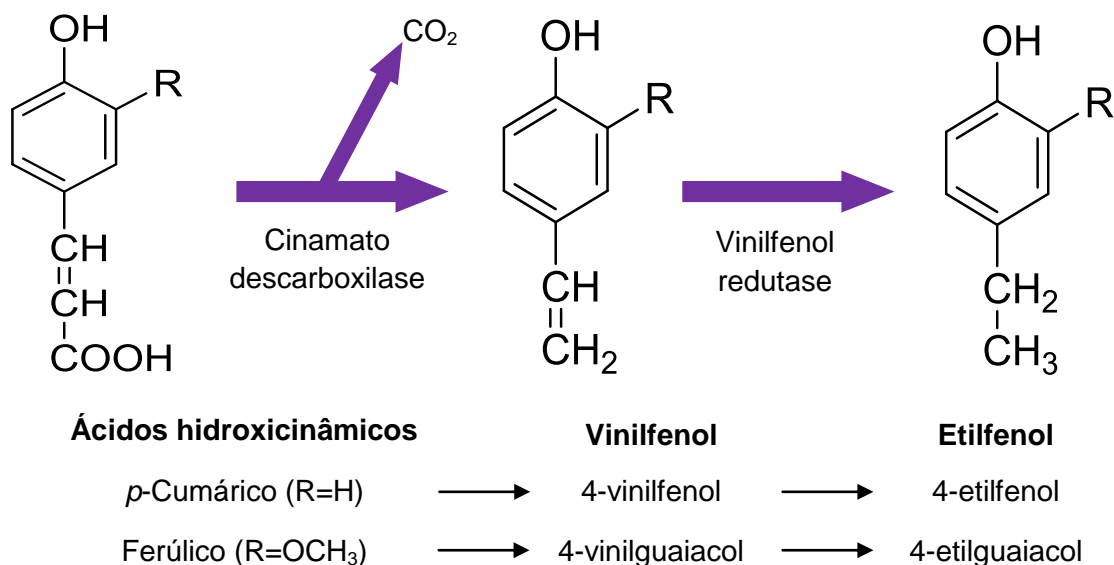
Quando presentes em concentrações superiores a 620  $\mu\text{g/L}$ , exercem um efeito adulterante levando à perda dos aromas frutados e substituindo-os por odores desagradáveis, usualmente descritos como fenólicos, medicinais e animais (couro, suor de cavalo, estábulo), entre outros, além disso, conduzem a alterações na cor e na estrutura (114, 115).

No entanto, para teores inferiores a 400 µg/L, estes compostos poderão contribuir para a complexidade aromática dos vinhos, conferindo-lhe aromas a especiarias, fumo e pele, sendo reportado na bibliografia a existência de vinhos com FV que foram premiados em concursos internacionais (116-118).

#### 1.1.2.6.1. Origem

A origem dos FV tem sido extensamente investigada. Estes compostos têm como precursores os ácidos hidroxicinâmicos (*p*-cumárico e ferúlico), que são encontrados naturalmente nas uvas (113, 116, 119).

A transformação bioquímica que leva à produção destes compostos envolve duas etapas e a ação sequencial de duas enzimas (Figura 18). A primeira etapa envolve a descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos levando à formação dos VF correspondentes, sendo esta reação catalisada pela hidroxicinamato descarboxilase; seguindo-se a sua redução aos EF correspondentes pela vinilfenol redutase (113, 114, 120).



**Figura 18.** Formação dos fenóis voláteis por descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos.

A produção de FV pode estar associada a bactérias e fungos, consoante a atividade que estes microrganismos possuem a nível das enzimas hidroxicinamato descarboxilase e vinilfenol redutase. A enzima que fomenta a descarboxilação está presente em várias bactérias, fungos filamentosos e leveduras, mas a fase de redução é apenas levada a

cabo pelas leveduras *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Candida versatilis*, *Candida halófila*, *Candida mannitofaciens*; e pelas bactérias *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* (121-123).

**i. Bactérias:**

Inicialmente a presença de etilfenóis no vinho foi associada às bactérias lácticas. Determinadas bactérias como *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* possuem a atividade de ambas as enzimas, sendo capazes de produzir EF. Porém, a sua atividade é limitada e a quantidade de EF produzida é baixa quando comparada com certas leveduras (121, 124).

**ii. Leveduras:**

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* spp., *Torulaspota* spp. e a *Zygosaccharomyces* spp. podem produzir 4-VF, mas não o reduzem a 4-EF, uma vez que apenas possuem atividade da enzima hidroxicinamato descarboxilase (113, 122). Algumas leveduras como *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Candida helophila*, *Candida fermentari*, *Candida mannitofaciens* e *Candida versatilis* possuem quer atividade da hidroxicinamato descarboxilase como da vinilfenol redutase (122, 125).

Por outro lado, algumas espécies como *Candida Cantarellii*, *C. wickerhamii*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaromyces hansenii* e *P. Guilliermondii* são capazes de produzir 4-EF em quantidades consideráveis quando testadas em meio sintético, mas a sua ação sob condições enológicas ainda não foi ainda estudada (123, 126, 127).

Entre todas as leveduras produtoras de FV destacam-se as do género ***Brettanomyces/Dekkera*** especialmente a espécie ***Dekkera bruxellensis*** (*D.bruxellensis*), que possui atividade de ambas as enzimas vinho, sendo capazes de produzir EF em quantidades suficientes para afetar negativamente a sua qualidade.

Diversos estudos demonstraram a capacidade de *D.bruxellensis* em sintetizar 4-EF, 4-EG e 4-etil-seringol a partir dos ácidos fenólicos presentes nas uvas ou da madeira de carvalho (117, 122, 125, 128, 129). Além disso, estas leveduras destacam-se dos outros microrganismos pela sua capacidade de utilizar o 4-VF diretamente como substrato (130). Por estas razões, estas leveduras são consideradas como um forte agente de deterioração, especialmente indesejáveis nos vinhos tintos de alta qualidade (113, 118, 131).

A produção de **FV** por estas leveduras é influenciada por diversos fatores:

**i.** Presença dos seus precursores e proporção relativa à população de *Brettanomyces/Dekkera*(132).

ii. Teor em álcool, temperatura: concentrações da ordem dos 12% v/v e temperaturas de 18°C favorecem a sua produção (132, 133).

iii. Variedade das uvas, práticas de vinificação e maturação, afetam a fração fenólica e indiretamente a fração volátil. Uvas muito maduras, macerações longas e o uso de enzimas pectolíticas podem favorecer a produção de FV (134, 135).

#### 1.1.2.6.2. Deterioração por leveduras *Brettanomyces/Dekkera*

As leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* estão largamente distribuídas pela natureza, sendo que diversas publicações reportam a sua existência em vários produtos fermentados, tais como: queijos, leite e bebidas alcoólicas, tais como vinho, cerveja e cidra (136-138).

Estas leveduras foram referenciadas pela primeira vez em 1904, no momento em que foram isoladas por Claussen em cervejas britânicas (139). Estas cervejas adquiriam odores característicos que estavam associados a esta levedura, classificada como levedura da cerveja britânica, derivando daí o nome *Brettanomyces*. A sua primeira referência em vinhos data de 1940 e surgiu quando Custers realizou um estudo sistemático destas leveduras e as identificou em mostos Franceses (140, 141). Desde aí, muitas referências foram feitas à presença deste género de leveduras predominantemente em vinhos tintos de diversos países, entre os quais se incluem França (114), Itália (142), Espanha (143), Austrália (144), Nova Zelândia (145) e Estados Unidos (146), entre outros. A taxonomia destas leveduras nos vinhos foi vastamente reclassificada ao longo dos anos, atualmente consideram-se que elas existem em duas formas (120, 147):

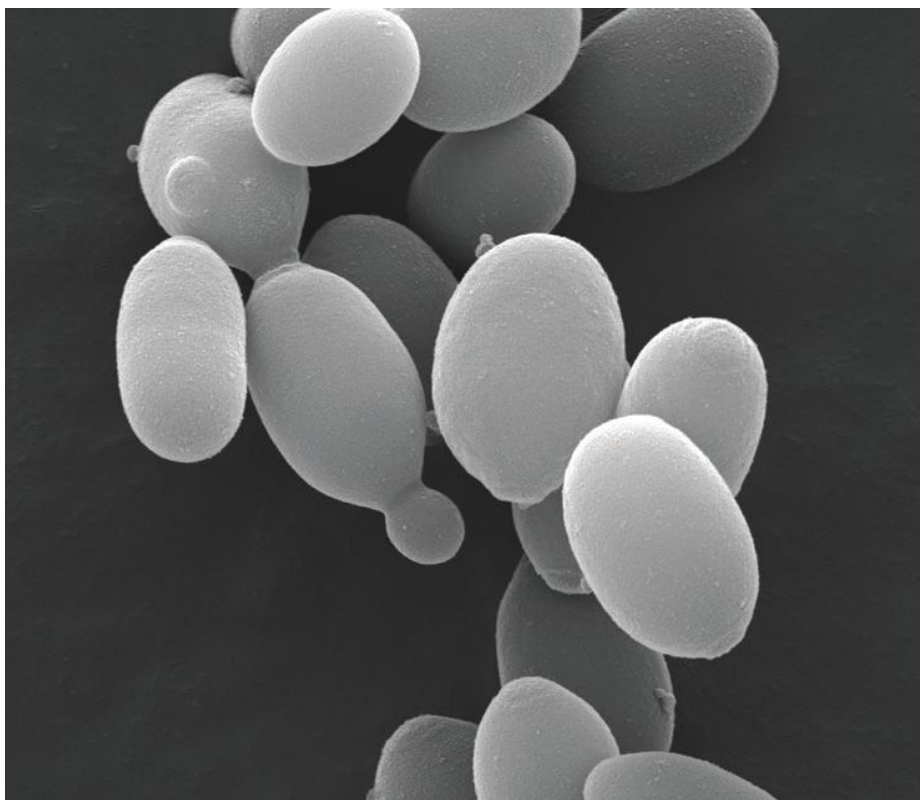
i. **Forma anamórfica:** corresponde a um estado imperfeito, com reprodução assexuada e não esporulada, sendo classificadas como *Brettanomyces*;

ii. **Forma teleomórfica:** corresponde a um estado perfeito, com reprodução sexuada e esporulada, sendo classificados como *Dekkera*.

Reconhecem-se cinco espécies individuais de *Brettanomyces/Dekkera*: *Brettanomyces bruxellensis* (*B. bruxellensis*), *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis* e *Brettanomyces nanus*(148). Deve referir-se que as duas primeiras espécies apresentam formas teleomórficas, *Dekkera bruxellensis* (*D. bruxellensis*) e *Dekkera anomalus*(149).

Das cinco espécies acima referidas, as mais associadas com o setor vitivinícola são as ***B. bruxellensis*** (***B. bruxellensis***) (Figura 19) (142, 150). Neste contexto usualmente

considera-se irrelevante a separação entre *Dekkera* e *Brettanomyces*, uma vez que determinadas técnicas de DNA não fazem distinção entre as formas anamórfica e teleomórfica (138). Por isso vamos adota-se a forma *D. bruxellensis* para a sua descrição.



**Figura 19.** Micrografia de varrimento de elétrões de *D. bruxellensis* cultivadas num meio de enriquecimento (150).

A sua presença nos vinhos está relacionada com as suas propriedades únicas, tais como a capacidade de sobreviver em meio abiótico extremo onde estão presentes condições de anerobiose, baixo pH, pouca quantidade de açúcares fermentáveis, a presença de teores superiores a 10% de etanol (130, 151, 152) e ainda às concentrações de SO<sub>2</sub> normalmente encontradas nos vinhos (131).

De uma forma geral, as leveduras deste género são consideradas como uma das principais causas de deterioração e consequente diminuição da qualidade do vinho, podendo impossibilitar a sua comercialização e conduzir a elevadas perdas económicas em todo o mundo (113, 118, 131). A contaminação dos vinhos por *D. bruxellensis* leva à produção de vários metabolitos, que produzem um impacto sensorial único, conferindo-lhes um carácter usualmente designado por “carácter Brett”, sendo descrito como odores a rato, medicinais, estábulo e suor de cavalo (148).

Entre os metabólitos secundários produzidos por esta levedura, destacam-se os (i) **FV** (4EF, 4EG) como sendo os principais responsáveis pelo caráter Brett (153); (153); (ii) as **tetrahidropirinas**, responsáveis pelo “odor a rato”; (iii) **ácidos** (succínico, pirúvico, isobutírico, isovalérico, 2-metilbutírico) (estas leveduras caracterizam-se por serem bastante acidogénicas); (iv) **ésteres** (acetato de etilo e decanoato de etilo); (v) **aldeídos** (acetaldeído); (vi) **ácidos gordos** (octanoico e dodecanoico); (vii) **álcoois** (2-feniletanol, isoamílico); (viii) **lactonas** ( $\beta$ -damascenona); (ix) **produtos de degradação dos lípidos** (*cis*-2-nonenal, *trans*-2-nonenal) e (x) **aminas biogénicas** que podem, também contribuir para o perfil dos vinhos contaminados (154).

Estas alterações foram reconhecidas como características deste género, sendo muitas vezes denominadas como “caráter Brett” e, por isso podem ser usadas como critério na sua deteção (141). Apesar de serem usualmente conotados negativamente, deve referir-se que vinhos com caráter Brett foram premiados em concursos internacionais (114, 131, 155).

As **tetrahidropirinas** (2-acetiltetrahidropirina e 2-etiltetrahidropirina) sintetizadas por estas leveduras a partir do aminoácido lisina e do etanol, conferem um odor a rato, de grande persistência e desagradável na boca, devido à ação neutralizadora da saliva. A 2-acetil-tetrahidropirina parece ser mais influente neste efeito uma vez que é usualmente encontrada nos vinhos em teores que oscilam entre 4,8-106  $\mu\text{g/L}$ , sendo superiores ao seu limiar de perceção (1,6  $\mu\text{g/L}$ ), enquanto que a segunda tetrahidropirina possui um limiar de perceção muito mais elevado (150  $\mu\text{g/L}$ ), encontrando-se em concentrações mais baixas que a anterior (144, 156). Deve referir-se que estes compostos não são muito influentes no “caráter Brett” dos vinhos (128).

Estas leveduras também influenciam a acidez dos vinhos pela produção de grandes quantidades de **ácido acético** que é favorecida pela presença de oxigénio.

Este composto constitui mais de 90% da acidez volátil e quando presente em concentrações elevadas conduz ao picado acético (157-159).

Geralmente, os vinhos contaminados por estas leveduras possuem uma coloração indesejável. As leveduras deste género vêm sendo associadas com uma atividade glicosídica ( $\beta$ -glicosidase) que pode levar a vinhos com qualidades aprimoradas no que diz respeito ao aroma e à complexidade. Porém, a atividade glicosídica também podem conduzir à hidrólise das antocianinas, libertando glucose e destabilizando a forma aglicona (antocianidina), afetando negativamente esta propriedade (82, 160, 161).

A perda de cor pode, também estar relacionada com a perda de pigmentos de antocianinas derivados das uvas, nomeadamente vitisinas, aductos de VF, entre outros, que podem contribuir para a estabilização da cor, particularmente durante o envelhecimento (162). A formação destes aductos resulta da condensação entre os VF e

as antocianinas das uvas, e assim estas leveduras podem levar à perda de cor porque têm tendência em reduzir os VF a EF, impedindo portanto a formação destes aductos (121, 124).

As **aminas biogénicas** são produzidas através da descarboxilação dos aminoácidos (ex. histidina a histamina). São especialmente indesejáveis nos vinhos por serem associados a diversos efeitos fisiológicos indesejáveis em pessoas com intolerância a estes compostos. No meio enológico, as leveduras do género *D. bruxellensis* foram classificadas como as maiores produtoras destes compostos. Entre as aminas biogénicas produzidas podem considerar-se: etanolamina, metilamina e putrescina. Este efeito é especialmente preocupante, uma vez que a capacidade do corpo humano para degradar estas aminas é fortemente afetada pelo etanol que inibe a enzima diamina oxidase responsável pela sua transformação em compostos inofensivos (154, 163).

O processo de vinificação engloba uma série de pontos críticos através dos quais pode ocorrer uma contaminação por leveduras do género *D. bruxellensis*. Estas leveduras são habitantes naturais das adegas e do equipamento utilizado na vinificação, sendo detetada a sua presença em amostras do ar e nas paredes húmidas das adegas, em bombas, prensas, drenos, linhas de transferência, válvulas dos tanques, linhas de engarrafamento e outros equipamentos difíceis de esterilizar (164, 165).

As referências a estas leveduras na constituição microbiológica das uvas são raras, facto que pode ser resultante do baixo número de células usualmente presentes e do ecossistema microbiológico, onde prevalecem outras leveduras e bactérias dominantes. No entanto já foram feitas menções a este género de leveduras nos mostos (119, 166). Desta forma, não é surpreendente que as adegas sejam consideradas como a fonte primária de contaminação.

*D. bruxellensis* são leveduras de crescimento lento, a sua proliferação é favorecida quando estão presentes condições nutricionalmente favoráveis, assim é provável que a contaminação ocorra durante as operações pré-fermentativas, após estas operações e mais tardiamente na maturação/engarrafamento (151, 167).

A contaminação é favorecida especialmente se a maturação decorrer em barricas de madeira, porque a sua estrutura impossibilita uma perfeita limpeza e esterilização, sendo que muitas leveduras indesejáveis permanecem nos poros da madeira mesmo após estas ações. Este facto é benéfico para as leveduras, que prevalecem de um meio com disponibilidade em nutrientes e proteção contra os agentes que possam limitar o seu crescimento (113, 116, 168).

Além disso, estas barricas são o habitat de eleição para *D. bruxellensis*, isto porque têm a capacidade de produzir a enzima  $\beta$ -glucosidase, que degrada a celobiose em glucose (116, 169). Factoeste que juntamente com a tendência de reutilização dos cascos e a

utilização da micro-oxigenação para acelerar a maturação, contribui para uma alteração do perfil volátil, favorecendo a proliferação destas leveduras (153, 157)(170).

### 1.1.2.6.3. Controlo de fenóis voláteis nos vinhos

Os vinhos com elevados teores em FV não podem ser comercializados, pelo que a degradação organolética dos vinhos resultante da presença desses compostos é, provavelmente a principal problemática do setor vitivinícola, sendo responsável por graves perdas económicas em todo o mundo, especialmente em vinhos de elevada qualidade que requerem longos períodos de maturação (148).

Deste modo, e devido ao impacto que estes compostos têm na qualidade dos vinhos, revela-se de extrema necessidade a implementação de metodologias que visem a prevenção e controlo dos vinhos relativamente à formação de FV, outra possibilidade seria o recurso a processos curativos com o intuito de os remover do vinho.

Atualmente, no setor vitivinícola, os métodos mais utilizados para controlar esta problemática assentam em duas metodologias: (i) controlo da população de *D. bruxellensis* através de meios de cultura seletivos e diferenciais (148, 171); e (ii) quantificação do teor em FV por GC/FID ou GC/MS (129, 148).

As leveduras *D. bruxellensis* apresentam um crescimento lento, particularmente quando são isolados de vinhos. Ao contrário da maioria das leveduras dos vinhos que formam colónias visíveis num meio de cultura adequado ao fim de 2-3 dias, estas formam colónias após 7-10 dias (148, 171).

A elucidação recente do papel das *D. bruxellensis* na formação de “odor fenólico”, devido à presença de quantidades significativas de 4-EF e 4-EG (121, 172), renovaram o interesse em estudos de populações e concretamente na utilização de meios de cultura seletivos e diferenciais para *D. bruxellensis*.

O controlo destas leveduras permite ao enólogo controlar a evolução da população, adicionalmente com a avaliação do teor em FV, permite-lhe ter informação em tempo útil para atuar de forma a impedir a adulteração dos vinhos.

A contaminação por estas leveduras tornou-se ainda mais relevante durante a última década, devido às recentes tendências enológicas, tais como vinhos com elevado pH e altos teores em açúcares residuais, o desuso da filtração e de SO<sub>2</sub>, pouca higiene das adegas e métodos ineficazes de limpeza e esterilização das barricas; a utilização de barricas contaminadas que propiciam a dispersão destas leveduras pelas adegas e a importação de vinhos contaminados (173, 174), levaram ao aparecimento indesejável do “caráter Brett” em vinhos produzidos em diversos países, causando perdas económicas avultadas.

Ultimamente surgiram uma enorme variedade de técnicas para a deteção e controlo das leveduras *D. bruxellensis* (Tabela 1) (113).

**Tabela 1.** Metodologias para o controlo de *D. bruxellensis* nos vinhos (113).

Tratamento	Resultado	Desvantagem
<b>Clarificação de proteínas</b> (175, 176)		
Gelatina	Reduz as populações por floculação	Perda de cor e aroma
Clara de ovo		
Caseinato de potássio		
Caseínas		
<b>Filtração</b> (177, 178)		
Membranas (0.45 µm)	Reduz as populações por separação física	Perda de cor e aroma
Ultrafiltração		
<b>Variáveis físico-químicas</b> (132)		
Baixa temperatura de maturação	Estabelece as condições físico-químicas para reduzir a viabilidade	Variáveis podem ser difíceis de modificar em vinhos e incompatíveis com o envelhecimento
Baixo Ph		
Diminuição do teor em O <sub>2</sub>		
Eliminação da micro-oxigenação		
Níveis de álcool elevados		
<b>Redução da concentração dos precursores</b> (134)		
Baixa temperatura de maceração	Previne a solubilização dos ácidos hidroxicinâmicos	Possível perda de cor e aroma
Eliminação do uso de enzimas pectolíticas e		
Enzimas com atividade cinamoil esterase		
<b>Aditivos</b> (179-181)		
SO <sub>2</sub>	Inibe o crescimento e previne as condições que favorecem a produção de etilfenóis	Alguns destes produtos ainda não são autorizados no setor vitivinícola ou ainda estão em fase de experimentação
DMDC		
Quitosano		
Ácido sórbico		
Ácido benzoico		
Ácido fumárico		
Ácido ascórbico		
Ácido eritórbico		
<b>Processamento de alta pressão</b> (182)		
400-500 Mpa	Destroi os microrganismos no vinho sem provocar alterações nas propriedades sensoriais	Elevados custos de equipamento
<b>Técnicas biológicas</b> (183)		
Bacteriocinas	Inibe o crescimento das leveduras	A aplicação destas técnicas no setor vitivinícola é usualmente experimental
Enzimas bacteriológicas		
Zimocinas		
<b>Engenharia Genética</b> (183)		
Leveduras transgênicas	Leveduras geneticamente desenhadas que previnem o crescimento	Não são correntemente permitidos em enologia

As soluções “paliativas” apresentadas na Tabela 1 consistem no tratamento do vinho tinto antes de os introduzir nas barricas de madeira. Estudos demonstraram que as populações de *D. bruxellensis* podem ser reduzidas entre 40-2000 vezes com tratamento à base de proteínas. Estes tratamentos não são muito bem aceites pelos enólogos, uma vez que reduzem o aroma e a cor (175).

A filtração pode, também ser usada para reduzir a população de leveduras contaminantes. Este tratamento pode causar a destruição da estrutura coloidal do vinho, reduzindo a intensidade e a cor (178).

A população de *D. bruxellensis* pode ser controlada através das variáveis que favorecem o seu crescimento, tais como a manutenção do pH e dos níveis de oxigénio tão baixos quanto possível, assegurar que a temperatura de armazenamento do vinho é suficientemente baixa para impedir o desenvolvimento destas leveduras (13°C em vez de 18 °C), a prevenção de macerações longas e intensas, evitando a extração dos precursores dos etilfenóis das películas, ajudando a prevenir a produção de aromas indesejáveis por estas leveduras (113).

O uso de aditivos pode inibir o crescimento de *D. bruxellensis*. O mais comum é o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), sendo fundamental manter a sua concentração estável durante os longos períodos de envelhecimento em barricas de carvalho, uma vez que os seus teores tendem a diminuir através de fenómenos oxidativos e absorção por parte da madeira. O bicarbonato dimetilico (DMDC), quitosano, ácidos sórbico e benzoico possuem atividade antifúngica e podem ser utilizados contra *D. bruxellensis*, mas o seu uso não é seletivo, não sendo autorizada a sua aplicação em enologia (113, 179, 180). A incorporação de agentes antioxidantes, tais como os ácidos ascórbico e isoascórbico permitem reduzir a presença de oxigénio durante a maturação/envelhecimento, prevenindo a formação de etilfenóis.

O tratamento de amostras de vinho a altas pressões 400-500 MPa durante 5-15 min e com temperaturas de 5-20 °C pode reduzir a população de leveduras, incluindo as *D. bruxellensis*, bactérias lácticas e acéticas na ordem dos 99,99% (182), sem causar efeitos a nível das propriedades físico/químicas dos vinhos, atividade enzimática ou propriedades sensoriais.

O controlo biológico de leveduras e bactérias contaminantes envolve o uso de vários agentes antimicrobianos, por exemplo bacteriocinas, zimocinas e estirpes de leveduras com atividade antimicrobiana construídas por engenharia genética (183).

Uma outra forma de controlar a ação destas leveduras e conseqüentemente prevenir a deterioração que causam nos vinhos, poderá passar pela implementação de técnicas eficientes de sanitização.

Entre estas incluem-se a utilização de ozono (184), barricas devidamente aparadas, tratadas e queimadas (185) e a utilização de ultrassons de alta eficiência (173), estas metodologias demonstraram ser promissoras no que diz respeito à prevenção da contaminação e destruição da flora leveduriforme.

Várias metodologias podem ser utilizadas como processos curativos para reduzir o conteúdo em etilfenóis no vinho: (i) filtração por osmose inversa e adsorção (186); (ii) adsorção com recurso a outros agentes químicos (polivinilpolipirrolidona, carvão vegetal, caseína, caseinato de potássio, leveduras secas ativas e celulose esterificada) (113, 176, 184, 187-190).

Uma das técnicas utilizadas para remoção dos fenóis voláteis dos vinhos passa pela utilização de um sistema contínuo de filtração por osmose inversa e adsorção. Esta técnica permitiu a obtenção de níveis de redução na ordem dos 76% a 87%, no entanto levou à perda de alguns compostos aromáticos (ex. ésteres) (186).

A remoção dos FV dos vinhos pode, também efetuar-se através da utilização de adsorventes como polivinilpolipirrolidona (PVPP) e carvão vegetal, usualmente utilizados na vinificação para redução do escurecimento, amargor e maus odores (113). Agentes de clarificação como a caseína, caseinato de potássio e a parede celular das leveduras possuem propriedades de adsorção dos FV (176, 184, 187-189).

Outras possibilidades passam pela utilização de fibras de acetato de celulose (CA), acetato propionato de celulose (CAP), acetato butirato de celulose (CAB) e propionato de celulose (CP). Tratamentos com estes polímeros (4g/L de vinho) demonstraram capacidade para a redução destes compostos, o CAP e o CP foram os compostos que revelaram maior eficiência, obtendo-se valores médios na ordem dos 38 e 37%, respetivamente.

Os efeitos da dose e do tempo de contacto foram também estudados, os resultados obtidos demonstraram que o nível de redução dos FV aumentava com a dose de polímero utilizada, atingindo níveis na ordem das 20 g/L (190).

Todos os métodos descritos anteriormente apresentaram limitações, tais como preço, eficiência “curativa” e dificuldades de aplicação a nível industrial. Por estas razões, o desenvolvimento de novos métodos para uma fácil e barata recuperação dos vinhos afetados pelos maus odores produzidos por *D. bruxellensis* revela-se de extrema importância para o setor enológico.

### 1.1.2.6.3.1. Polímeros molecularmente impressos (MIPs)

Recentemente o desenho de materiais capazes de imitar os processos de reconhecimento observados na natureza tornou-se uma área de pesquisa relevante, na qual se deu particular ênfase à impressão molecular, identificando-a como uma das técnicas com habilidade para criar esses materiais.

Os MIPs são designados como sendo os materiais porosos funcionais produzidos por técnicas de impressão molecular (MIT). Estes são dotados de uma seletividade predefinida para um determinado analito ou compostos estruturalmente semelhantes, possuindo capacidades de reconhecimento semelhantes aos anticorpos e recetores biológicos (191-193).

#### 1.1.2.6.3.1.1. Síntese dos MIPs

O processo de impressão molecular consiste na associação de monómeros funcionais com uma determinada molécula-alvo (*template*) conduzindo a um complexo de polimerização, quer por interações covalentes ou não covalentes. De seguida, este complexo é submetido a uma copolimerização numa solução contendo um agente reticulante em excesso e um solvente apropriado, resultando numa rede de polímero tridimensional. Por fim, o *template* é removido do polímero ficando este com locais de reconhecimento específicos complementares em termos de forma, tamanho e funcionalidade química para o analito utilizado na sua síntese e moléculas análogas (Figura 20) (193-197).

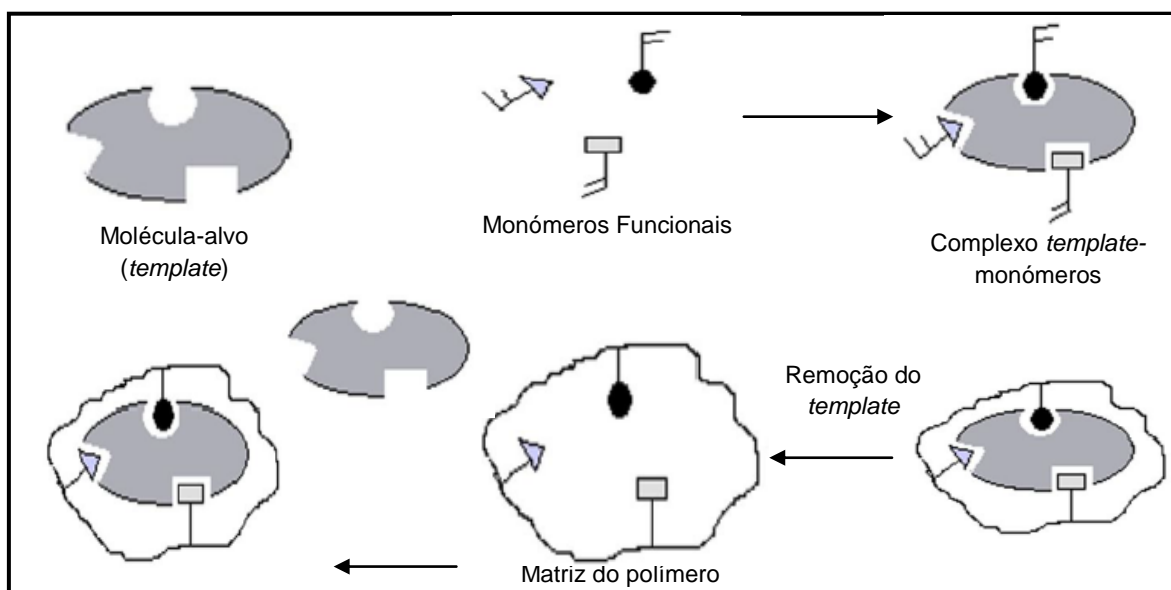


Figura 20. Impressão molecular [adaptado de (195)].

De referir que a forma pela qual o *template* é removido é variável consoante as interações entre o *template* e os monómeros funcionais sejam de natureza covalente ou não covalente. No primeiro caso, o *template* é removido por clivagem química das ligações covalentes. Por sua vez, no segundo, a remoção é conseguida simplesmente pela extração com solventes (198).

Para averiguar a sua especificidade e seletividade, os MIPs são comparados a polímeros não impresso (NIPs). Estes NIPs são sintetizados exatamente com as mesmas quantidades de agente reticulante e monómeros funcionais, mas sem *template*, não apresentando as propriedades específicas dos MIPs (199).

Durante o processo de impressão molecular há que ter em consideração diversos parâmetros que têm influência considerável na morfologia, propriedades e na performance dos polímeros. Entre estes fatores podem considerar-se: (i) a escolha dos reagentes químicos, (ii) a escolha do monómero, (iii) a escolha do agente reticulante e (iv) a natureza e volume do solvente (195, 200).

i. A escolha dos reagentes químicos utilizados na MIT é de relevante importância no que diz respeito à eficiência dos polímeros obtidos. Até então já foi utilizada uma enorme variedade de moléculas-alvo na síntese de MIPs, estas vão desde fármacos, aminoácidos, hidratos de carbono, proteínas, bases nucleotídicas, hormonas, pesticidas, e coenzimas (201-203).

ii. O tipo de **monómero funcional** escolhido para a complexação com a molécula-alvo é de extrema importância na formação de locais de ligação específicos. Desta forma, os monómeros devem ser escolhidos de acordo com a sua habilidade para interagir com os grupos funcionais da molécula-alvo. Além disso, a associação entre estes é regulada por um equilíbrio, pelo que os monómeros funcionais devem ser adicionados em excesso para favorecer a polimerização (195, 200).

iii. O **agente reticulante** também desempenha funções importantes na MIT. Este tem uma forte influência nas características físicas dos MIPs, controlando a sua morfologia, conferindo estabilidade dos locais de ligação e estabilidade mecânica à matriz do polímero mantendo as suas propriedades de reconhecimento molecular. Além disso, os agentes reticulantes são frequentemente adicionados em elevadas proporções para a obtenção de materiais suficientemente porosos e com as características pretendidas (204, 205).

iv. A **natureza e volume do solvente** desempenham também um papel relevante na MIT. O solvente é responsável por colocar todos os intervenientes na mesma fase permitindo o rearranjo do complexo monómero funcional-*template*, ao mesmo tempo que

favorece a criação dos poros de diferentes tamanhos e volumes nos MIPs resultantes. Devido a esta função que têm, são usualmente designados como “porogens” (195, 200).

#### 1.1.2.6.3.2. Aplicações dos MIPs

Até à presente data os MIPs demonstraram ser úteis nas mais diversas áreas:

**i. Técnicas de separação e purificação:**

Em cromatografia de impressão molecular (195), separações quirais (206), extração líquido-líquido (207, 208), extração em fase sólida (SPE) (195, 207, 208). Sendo que nesta última, podem funcionar tanto como adsoventes para pré-concentração e limpeza, como para extração de analitos de matrizes complexas (biológicas, ambientais e alimentares), combinando as vantagens do reconhecimento molecular e das técnicas de separação tradicionais, isto é, a elevada especificidade e seletividade do mecanismo de reconhecimento molecular com o elevado poder de resolução dos métodos de separação, conseqüentemente proporcionando uma eluição dos analitos quase livres dos compostos coextraídos (196, 209).

No entanto deve ter-se em consideração que os MIPs além de possuírem locais de ligação molecularmente impressos com afinidade para um determinado *template*, também possuem funcionalidade polar e lipofílica a nível superficial. Sendo que a retenção alcançada nas técnicas de separação, deve-se a um mecanismo misto entre as duas funcionalidades apresentadas pelos polímeros, isto é, uma retenção específica e uma não específica.

Deste modo, a otimização de uma técnica de separação utilizando MIPs deve ter em atenção estas duas variáveis, assim como a sua variação em função do tipo de solvente utilizado.

**ii. Sensores e biosensores(210, 211).**

Recentemente demonstrou-se a sua habilidade para simularem anticorpos naturais, pelo que podem ser usados em ensaios imunológicos. Além disso também se revelaram como potenciais transdutores.

**iii. Catálises(212).**

Os MIPs possuidores de propriedades catalíticas podem ser utilizados em diversos ensaios de catálise enzimática.

**iv. Administração de medicamentos(195).**

A seletividade e especificidade apresentada pelos MIPs que os habilita para se ligarem a moléculas bioativas, torna-os de relevante interesse nas áreas da terapia médica, sendo que a MIT se revela como uma técnica potencial para criar doses convenientes.

Na bibliografia consultada constatou-se a existência de vários trabalhos que reportam a utilização de MIPs em vinhos. Nomeadamente, a preparação de um MIP para o reconhecimento seletivo do resveratrol em vinhos (213), no qual se alcançaram taxas de retenção entre os 79,3 % e os 90,6 %, demonstrando que o MIP poderia ser utilizado para a pré-concentração seletiva e determinação do resveratrol em amostras de vinho.

Outros autores (214) reportaram a utilização de MIPs para a remoção da ocratoxina A de vinhos tintos, tendo alcançado retenções na ordem dos 90%, porém revelou-se alguma falta de especificidade tendo-se obtido resultados similares com o NIP.

Noutro trabalho foram utilizados MIPs para a remoção do 2,4,6-tricloroanisolo e dos etilfenóis em vinhos tintos envelhecidos (199) verificando-se em simultâneo a influência em outros compostos voláteis. Observou-se que para os EF a retenção era maior com os MIPs do que com os NIPs, rondando os 92,3 e 89,4 %. De igual modo se verificaram valores de retenção elevados para os restantes compostos voláteis.

Foi também reportado por outros autores a utilização de MIPs para a determinação da quercetina em vinhos tintos (197), tendo sido verificadas retenções na ordem dos 98,2 %. Todo o potencial demonstrado pelos MIPs deve-se às inúmeras vantagens que estes apresentam, destacando-se a elevada seletividade e afinidade para a molécula-alvo (195, 196), mas também a maior robustez física (195, 197, 199); força (195); resistência a elevadas temperaturas e pressões (195, 199); inércia a ácidos, bases, iões metálicos e solventes orgânicos (195); e sobretudo a sua síntese é menos dispendiosa e ainda podem ser armazenados por longos períodos de tempo à temperatura ambiente sem correrem o risco de perderem a sua capacidade de reconhecimento (195).

A MIT e consequentes produtos (MIPs) demonstram-se uma técnica promissora por serem capazes de identificar moléculas químicas e biológicas nas quais se incluem aminoácidos e proteínas (201), derivados de nucleótidos (215), contaminantes (215, 216), medicamentos e alimentos (196, 197, 217).

#### **1.1.2.6.3.3. Limitações**

Não obstante de todas as potencialidades dos MIPs, estes também são possuidores de alguns aspetos críticos que devem ser melhorados de forma a poder beneficiar-se da poderosa ferramenta que constituem.

Nomeadamente, a criação de um novo MIP é um processo moroso e no qual são necessários vários aperfeiçoamentos, pelo controlo das variáveis que afetam a sua performance até que sejam alcançadas as condições ideais (195). Desta forma, o

desenvolvimento de um MIP requer elevada dedicação e trabalho para síntese, lavagem e testes com os diferentes MIPs.

Estas dificuldades podem ser ultrapassadas pela utilização bibliotecas combinatórias, sistemas de síntese e rastreio de elevada eficiência (HTS), entre outros (218, 219).

Além disto, outro dos aspetos que deve ser aprimorado nos MIPs deve ser a criação de polímeros solúveis em água, isto porque quando presentes em soluções aquosas, as moléculas de água competem com a molécula alvo levando ao enfraquecimento das interações entre essa e os monómeros funcionais (195). Têm sido feitos alguns progressos na tentativa de resolução deste problema, que passam por exemplo (i) pela utilização de ciclodextrinas polimerizáveis como parte hidrofóbica e protegendo as interações entre os monómeros e a molécula-alvo (220), (ii) pela introdução de propriedades hidrofílicas nos MIPs através da utilização de solventes polares, monómeros hidrofílicos, agentes reticulantes e/ou monómeros capazes de reagir estequiometricamente com o *template*(221-223).

## **II. OBJETIVOS**

O trabalho desenvolvido nesta dissertação teve como principais objetivos:

1. A caracterização dos compostos fenólicos e voláteis presentes em vinho tinto da região do Alentejo produzido a partir das castas Alicante Bouschet (84%) e Aragonês (16%).
2. Desenvolvimento e otimização de MIPs para retenção de FV em vinhos tintos.
3. Estudo do efeito da aplicação dos MIPs e NIP no perfil metabólico de vinho afetado por FV, relativamente a compostos fenólicos e compostos voláteis.
4. Avaliação da taxa de retenção dos MIPs e NIP a nível dos compostos voláteis e compostos fenólicos em vinho tinto afetado com FV.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Substâncias de referência e reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho tinham grau analítico adequado. As substâncias de referência foram adquiridas a diversos fornecedores: os ácidos vanílico, cafeico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico, cinâmico, hexanoico, octanoico, decanoico e palmítico, o  $\beta$ -linalol, nerol, nerolidol, eugenol, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, 2-feniletanol, 4-EG, 4-EF, trans-cafeoil tartárico (*t*-CAFTA) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A malvidina-3,5-*O*-diglucósido, cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-rutinósido, peonidina-3-*O*-glucósido, malvidina-3-*O*-glucósido, delphinidina, petunidina, pelargonidina, malvidina, catequina, epicatequina, epigalocatequina-3-*O*-galhato, epicatequina-3-*O*-galhato, miricetina, isoramnetina-3-*O*-glucósido e a quercetina foram fornecidos pela Extrasynthèse (Genay, França). O butanoato de etilo, acetato de hexilo, succinato de dietilo e o clorofórmio foram obtidos da Merk (Darmstadt, Alemanha). Uma mistura de hidrocarbonetos C6-C20, foi adquirida à Fluka (Buchs, Suíça). O metanol e o acetonitrilo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A Prolabo (Fontenay-Sous Bois, França) forneceu o ácido acético. A água foi desionizada num sistema Mili-Q de purificação de água (Milipore, Bedford, MA). Os reagentes utilizados para a síntese dos MIPs foram o 2,20-azobis-(2-metilpropionitrilo) (AIBN) e o dimetacrilato de etilenoglicol (EDMA) foram obtidos da Fulka e Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e a 4-vinilpiridina da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

#### 3.2. Síntese dos MIPs

Neste trabalho, desenvolveram-se dois MIPs para duas moléculas alvo (*template*), o 4-EF e o 4-EG, respetivamente. O processo de síntese foi adaptado de trabalhos prévios (199, 224), ocorrendo de forma não covalente (Figura 20).

Deste modo, 1 mmol de *template* foi adicionado a uma mistura que continha o monómero (4-vinilpiridina, 4 mmol), agente reticulante (EDMA, 20 mmol) e o iniciador (AIBN, 0,5 mmol) em 40 mL de porogen. O porogen consistiu numa solução com 40 mL de acetonitrilo:clorofórmio (na proporção de 3:1), previamente desgaseificada em atmosfera de azoto durante pelo menos 15 minutos. A mistura foi levada a um ultrassons durante 10 minutos, colocada num banho de gelo (para que a temperatura do iniciador não se elevasse), desgaseificada durante 5 minutos em atmosfera de azoto e selada sob vácuo. A polimerização decorreu num banho quente a 60°C durante cerca de 24 horas.

Após polimerização, os MIPs foram secos em estufa. De seguida, procedeu-se à remoção do *template* através de lavagens com uma mistura metanol:ácido acético (4:1). Os NIPs foram preparados nas mesmas condições experimentais que os MIPs, com exceção do *template*, que não foi adicionado. Consequentemente, também o processo de lavagem é diferente, pois neste caso não há *template* a remover, sendo necessário menos lavagens.

### 3.3. Estudos de seletividade e especificidade

Os estudos de seletividade e especificidade efetuados neste trabalho foram baseados em dois trabalhos prévios (224, 225). Com a finalidade de aferir as capacidades dos MIPs no que diz respeito à sua seletividade e especificidade, foram levados a cabo alguns ensaios prévios, com o intuito de verificar quais seriam as condições ótimas para a sua aplicação. Para verificar a capacidade de reconhecimento molecular dos FV pelos MIPs, realizaram-se alguns ensaios nível do volume de amostra, tipo de extração e tempo de contacto. As condições testadas foram as seguintes:

**Ensaio 1 (volume):** 200 mg de MIP foram colocadas em cartuchos de polipropileno de 6 mL, usados para SPE (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), previamente empacotados com discos PTFE na parte inferior dos cartuchos. De seguida, as pontas de saída foram ligadas a uma bomba de vácuo (VISIPREP). A coluna foi pré-condicionada com 5 mL de vinho sintético [solução aquosa com 15% em etanol (v/v) e 3 g/L de ácido tartárico a um pH de 3]. Seguidamente passaram-se 25 mL e 100 mL de uma solução com os quatro fenóis voláteis a uma concentração de 10 mg/L, em vinho sintético. Esta operação foi realizada em triplicado para ambos MIPs e NIP.

**Ensaio 2 (método de extração):** 3 mL de uma solução de vinho sintético com os quatro fenóis voláteis a uma concentração de 10 mg/L foram colocados num goblé em contacto com 24 mg de MIP, durante 1 h em agitação (85 U/min), seguida de um período de repouso de 2 h. No final, os resultados obtidos foram comparados com os registados previamente no ensaio 1 em SPE. Este ensaio foi realizado em triplicado para ambos MIPs e NIP.

**Ensaio 3 (tempo de contacto):** colocaram-se 100 mL da amostra de vinho contendo FV, em contacto com 800 mg de MIP durante 12 h em agitação (250 rpm), seguindo-se um período de repouso de 2h à temperatura ambiente. Paralelamente, efetuou-se outro

ensaio nas mesmas condições, com exceção do tempo de agitação (2 h). Ambos foram realizados para os MIPs em estudo e para o NIP. Este ensaio foi realizado em triplicado. A quantificação dos FV foi efetuada por GC-FID.

Em função dos pré-ensaios, as condições selecionadas para a aplicação dos MIPs e NIP foram as seguintes: um volume total de 100 mL de amostra e 800 mg do respetivo polímero foram colocados em contacto durante 2 h com agitação magnética (250 rpm), seguidamente as amostras foram submetidas a um período de 2 h de repouso.

### 3.4. Amostragem

A amostra de vinho tinto comercial usada neste estudo era composta pelas castas Alicante Bouschet (84%) e Aragonês (16%), sendo proveniente da região do Alentejo, da colheita de 2011. Este vinho foi envelhecido em barricas de carvalho Francês, sendo alvo de alteração microbiológica por leveduras *D. bruxellensis* com consequente produção de FV. A caracterização da amostra utilizada neste trabalho está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização química da amostra de vinho testada.

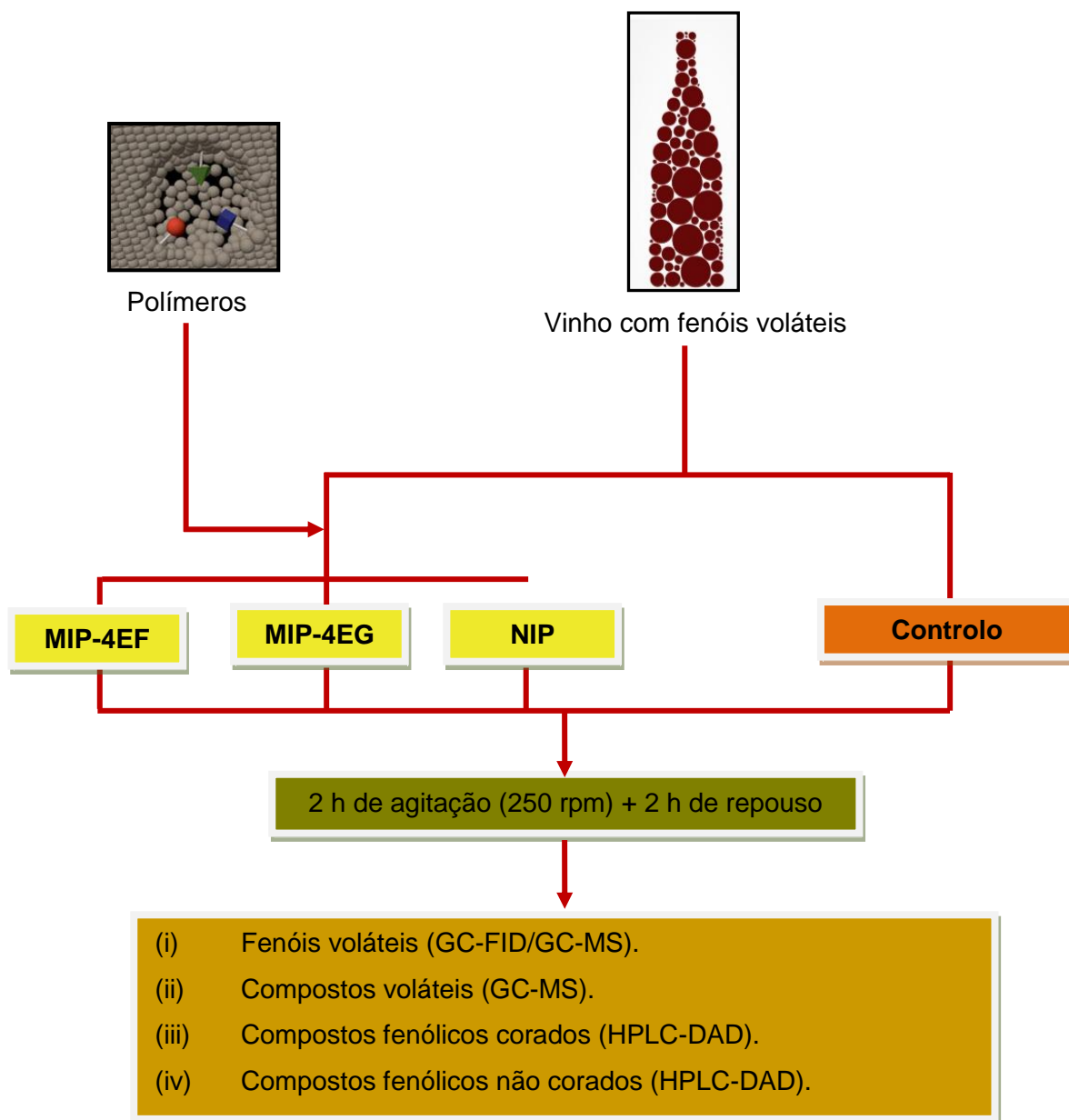
Parâmetros	Teores
SO <sub>2</sub> livre (mg/L)	22,0
Acidez total (g/L)	3,40
Ph	3,69
Acidez volátil (g/L)	0,68
Açúcares reduzidos (g/L)	2,80

Neste trabalho foram utilizados 10 L desta amostra de vinho, filtrados com filtro de 0,45 µm (Millipore, EUA) e distribuído por frascos individuais de 100 mL, repetindo-se este processo três vezes de forma independente.

O vinho foi submetido a um tratamento com os MIPs (MIP-4EF, MIP-4EG) e NIP nas condições selecionadas nos ensaios prévios. Paralelamente, uma amostra controlo, sem qualquer tratamento foi, também submetida às mesmas condições (Figura 21).

100 mL de vinho foram colocados num goblé em contacto com 800 mg de MIP, sob agitação a 250 rpm durante 2 h, seguindo-se um período de repouso de 2 h à temperatura ambiente.

Após tratamento, as amostras foram filtradas com filtros de 0,22 µm e analisadas ao nível dos compostos voláteis e compostos fenólicos.



**Figura 21.** Esquema geral do trabalho.

### 3.5. Análise dos compostos voláteis

#### 3.5.1. Análise dos fenóis Voláteis

**Extração dos FV:** a extração dos FV foi efetuada de acordo com o método previamente descrito por Silva et al. (226). Num balão de 100 mL foram colocados 50 mL da amostra de vinho e 50 µL de 4-decanol (1 g/L em 60% de etanol) (padrão interno) sob agitação em placa. Seguidamente, esta solução foi extraída com 4 mL de éter:*n*-hexano (1:1) durante 5 minutos. Transferiu-se a solução para a uma ampola de extração, permanecendo em repouso para ocorrer uma perfeita separação das fases, passando-se a fase orgânica para um vial e a fase aquosa novamente para o balão.

Seguiram-me mais duas extrações com 2 mL de éter etílico:*n*-hexano. As três fases orgânicas foram misturadas num vial, sendo analisados 2 µL de cada um dos extratos por GC/FID.

**Análise por GC-FID:** a quantificação dos FV foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita por Silva et al. (226). A análise foi efetuada num cromatógrafo Focus GC ThermoFinnigan Model, equipado com detetor de ionização de chama (FID). A coluna usada foi uma CP-Wax 57 (WCOT Fused Silica) (25 m x 0,25 mm x 0.20 µm) da varian (Palo Alto, CA). O injetor foi aquecido a uma temperatura de 200 °C e as injeções foram efetuadas em modo *split-splitless*, durante 0,5 minutos, a uma razão split 30:1. A fase móvel usada foi o hidrogénio com um fluxo de 2,8 mL/min. O gradiente de temperatura utilizado foi o seguinte: iniciou com 40°C durante 5 minutos, aumentando posteriormente 3°C/min até 200°C (20 min) e a temperatura do detetor foi programada para 250°C. Os sinais do detetor foram registrados e processados por um software Chrom-Card para Windows (Fisions, USA).

Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos com os dos padrões injetados nas mesmas condições. A quantificação dos FV foi efetuada recorrendo ao método do padrão externo.

**Calibração dos fenóis voláteis:** as retas de calibração para cada um dos FV (4-VF, 4-VG, 4-EF, 4-EG) foram obtidas a partir de uma solução stock com os quatro FV em etanol (60%) a uma concentração de 100 mg/L, estes foram diluídos com vinho sintético de modo a apresentarem concentrações entre 62,5 e 1000 µg/L. Estas soluções foram submetidas a extração de acordo com o método descrito anteriormente, e com adição prévia do padrão interno, tal como foi efetuado com as amostras.

### 3.5.2. Análise de outros compostos voláteis

A quantificação de todos os outros compostos voláteis foi realizada de acordo com o método descrito por Barros et al (91).

**Fibras de microextração em fase sólida (SPME):** A escolha da fibra para as extrações efetuadas neste estudo baseou-se nas recomendações do fornecedor (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e no conhecimento prévio da sua eficácia (91), sendo utilizada uma fibra revestida com divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), com 50/30  $\mu\text{m}$  de espessura.

Este procedimento foi realizado com o auxílio de um amostrador automático Combi-PAL (Varian Pal Autosampler, Suíça) e com o software Cycle Composer (CTC Analysis System Software, Suíça).

Assim, mediram-se 5 mL de vinho para um vial de vidro de 20 mL com cápsula PTFE e adicionaram-se 0,5 g de NaCl. Em seguida as amostras foram agitadas (250 rpm) a uma temperatura de 45 °C, durante 5 minutos. A fibra DVB/CAR/PDMS foi exposta ao headspace do vial, com agitação constante (250 rpm) a uma temperatura de 45 °C, durante 20 minutos. Posto isto, a fibra foi recolhida e o dispositivo de SPME foi removido do frasco e inserido no injetor do cromatógrafo para dessorção térmica dos compostos, durante 2 minutos.

**Análise por GC-MS:** a análise foi efetuada num cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 (EUA) acoplado a um detetor de massa Varian Saturn 4000 (EUA) e com um software Saturn GC-MS versão 6.8. A coluna usada foi a VF-5 ms (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Varian, Santa Clara, Califórnia, EUA). O injetor foi aquecido a uma temperatura de 220 °C e as injeções foram efetuadas em modo splitless. A fase móvel utilizada foi hélio C-60 (Gasin, Portugal), com um fluxo constante de 1 mL/min. O gradiente de temperatura utilizado foi o seguinte: 40 °C durante 1 minuto, aumentando posteriormente 5 °C/min até 250 °C, seguida por um aumento de 5°C/min até 300 °C.

Todos os espetros de massa foram adquiridos no modo de impacto eletrónico (EI). A ionização permaneceu inativa durante o primeiro minuto. O detetor *Ion Trap* foi programado do seguinte modo: as temperaturas de transfer line, manifold, e trap de 280, 50 e 180 °C, respetivamente. O método abrangeu valores de massa situados entre 35-600 m/z, com uma frequência de 6 scan/segundo. A emissão de corrente foi de 50  $\mu\text{A}$  e o multiplicador de iões foi programado em modos de autocalibração. O tempo máximo de ionização foi de 25 000  $\mu\text{s}$ , com um nível de armazenamento de 35 m/z.

Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e do espectro de massa dos picos cromatográficos com os de padrões injetados nas mesmas condições, por comparação com a base de dados NIST MS 05 (correspondência superior a 80 %) e por comparação dos índices de retenção (índices de Kovats) com dados da literatura. As áreas dos picos foram obtidas a partir da análise do cromatograma (modo full scan) e com o auxílio dos iões de quantificação específicos de cada composto. Desta forma, alguns picos que coeluíam em full scan (valor de resolução inferior a 1) foram integrados com um valor de resolução superior a 1. Os iões selecionados para análise qualitativa estão representados na tabela 6.

### **3.6. Análise dos compostos fenólicos**

#### **3.6.1. Análise dos compostos fenólicos não-corados**

**Extração dos compostos fenólicos não-corados:** os extratos foram preparados de acordo com um método previamente descrito por Silva et al. (129). 20 mL de cada amostra de vinho foram extraídos três vezes com 30 mL de éter dietílico durante 5 minutos. A fração éter foi separada e concentrada até à secura através de evaporador rotativo. O resíduo resultante foi redissolvido com 1 mL de etanol, sendo mantido no frigorífico até à sua utilização.

**Análise por HPLC/DAD:** para análise dos compostos fenólicos foi utilizado o método previamente descrito por Silva et al. (129). 20 µL de cada um dos extratos redissolvidos foram analisados num sistema de HPLC (Gilson), usando uma coluna de fase reversa ODS-Hypersil (20 m x 0.21 cm x 5 µm de tamanho de partícula).

O sistema eluente usado foi uma mistura de água:ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B). A eluição iniciou com 2% de metanol (B), atingindo os 62% aos 60 minutos. O fluxo utilizado foi de 0,3 mL/min. A deteção foi efetuada com um detetor de díodos (DAD) (Gilson).

Os dados espectrais dos picos foram recolhidos no intervalo de 200-400 nm. Os cromatogramas foram registados a 280, 320 e 350 nm e analisados com o software Unipoint (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França).

A identificação dos compostos fenólicos de cada extrato foi realizada por comparação do tempo de retenção e do espectro UV-Vis de cada composto com os de substâncias de referência. Os ácidos gálgico, vanílico, siríngico e cinâmico foram determinados a 280 nm, assim como a catequina, epicatequina, epigalocatequina-3-O-galhato e a epicatequina-3-O-galhato.

Por sua vez, os ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, cafeoil-tartárico (caftárico) e o *p*-coumaroil-tartárico (coutárico) foram determinados a 320 nm. Por fim a determinação do ácido elágico, e dos flavonóis quercetina, miricetina e isoramnetina-3-*O*-glucósido foi a 350 nm. A quantificação dos compostos foi obtida através da absorvância registrada nos cromatogramas em relação aos padrões externos. O *t*-COUTA foi identificado como ácido *p*-cumárico.

### 3.6.2. Análise das antocianinas

Para o estudo das antocianinas existentes nas amostras de vinho adotou-se o método previamente descrito por Valentão et al. (226).

**Preparação das amostras:** 5 mL de vinho com 20 µL de ácido clorídrico (HCl concentrado).

**Análise por HPLC/DAD:** 20 µL de cada um dos extratos foram analisados num sistema de HPLC (Gilson), usando uma coluna Spherisorb ODS2 (25.0 x 0.46 cm, 5 µm tamanho de partícula) (Waters, Milford, MA). O sistema de eluente usado foi uma mistura de água:ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B). A eluição iniciou com 5 % de metanol (B), instalando um gradiente para atingir os 15 % aos 3 min, 25 % aos 13 min, 30 % aos 25 min, 35 % aos 35 min, 45 % aos 39 min, 45 % aos 42 min, 50 % aos 44 min, 55 % aos 47 min, 70 % aos 50 min, 75 % aos 56 min e 100 % aos 60 min. O fluxo utilizado foi de 0,9 mL/min. A detecção foi efetuada com um detetor de díodos (DAD) (Gilson). A identificação das antocianinas de cada extrato foi realizada por comparação do tempo de retenção e do espectro UV-Vis no intervalo entre os 200-600 nm.

Os cromatogramas foram registados a 500 nm e analisados com o software Unipoint (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França). A quantificação foi obtida através da absorvância a 500 nm registrada nos cromatogramas em relação aos padrões externos.

### 3.7. Análise estatística

Todos os dados obtidos apresentam-se sob forma de média ± desvio-padrão de ensaios efetuados em triplicado. Os valores médios foram comparados pelo teste t (Wilcoxon testes pareados) (Graph Pad Prism versão 5.0 GraphPad Software, Inc, São Diego, CA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativamente diferentes.

Foi também feita uma análise de componentes principais (PCA) utilizando o software XLSTAT 2009.6.

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O vinho é um produto alimentar consumido em todo o mundo. Em Portugal é considerado como um dos principais produtos agrícolas, possuindo uma importância económica considerável.

A sua qualidade é fortemente influenciada pela flora microbiana presente. O desenvolvimento de determinados microrganismos durante o processo de vinificação poderá levar a alterações nas suas características organolépticas, tais como estrutura, aroma e odor. Um dos principais microrganismos adulterantes do vinho é a levedura *D. bruxellensis*. Atualmente é considerada como uma das principais preocupações para o setor vitivinícola, devido às adulterações organolépticas resultantes da produção de FV, ocorrendo especialmente em vinhos tintos de elevada qualidade e submetido a longos períodos de maturação em barricas de carvalho.

Uma vez que esta adulteração leva a perdas económicas consideráveis no setor vitivinícola, é de todo importante o desenvolvimento de métodos eficazes que permitam controlar esta problemática. Diversas metodologias têm sido propostas, recorrendo a vários processos preventivos e curativos, como por exemplo, através do controlo da população destas leveduras ou através da remoção dos FV. No entanto, nenhum deles revelou ser totalmente eficaz no combate a esta problemática, sendo fundamental a continuidade de investigação de novas metodologias para recuperar os vinhos atacados por FV.

Face ao exposto, e na tentativa de desenvolver um MIP para recuperar este tipo de vinho, procedeu-se à síntese de MIPs utilizando duas moléculas-alvo diferentes (4-EF e 4-EG) e um NIP. Com o intuito de estudar a performance dos MIPs e NIP a nível da remoção dos FV (4-VF, 4-VG, 4-EF, 4-EG), efetuaram-se alguns estudos preliminares a nível do volume de amostra, tipo de extração e tempo de contacto.

Posteriormente, as amostras de vinho foram tratadas com os MIPs e NIP para avaliar os efeitos a nível de compostos voláteis e compostos fenólicos (corados e não corados).

#### 4.1. Estudos da seletividade e especificidade

**Ensaio 1 (volume):** este ensaio teve como objetivo verificar qual a influência do aumento do volume da solução eluída, através dos MIPs ou NIP, mantendo a quantidade de FV e de polímero. Assim em colunas de SPE testaram-se dois volumes diferentes (25 e 100 mL) de uma solução de vinho sintético, contendo os quatro FV a uma concentração de 10 mg/L. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Influência do volume na capacidade de retenção dos MIPs e NIP.

Fenóis voláteis	Retenção (%) <sup>a</sup>					
	MIP-4EG		MIP-4EF		NIP	
	V=25 mL	V=100 mL	V=25 mL	V=100 mL	V=25 mL	V=100 mL
<b>4-Vinilfenol</b>	58,3±15,84	58,3±0,26	60,5±17,86	48,3±6,44	65,0±3,62	---
<b>4-Vinilguaiacol</b>	57,4±14,98	54,8±0,34	59,4±15,91	45,4±7,50	63,8±2,97	---
<b>4-Etilfenol</b>	54,6±14,29	54,9±0,57	55,5±16,24	47,6±5,16	61,3±4,24	---
<b>4-Etilguaiacol</b>	50,7±13,07	34,5±0,40	50,9±14,78	28,6±6,08	58,1±5,90	---

<sup>a</sup>Valores expressos em média ± desvio padrão de três ensaios.

Da análise dos resultados obtidos verificou-se que o aumento do volume de amostra eluído contribuiu negativamente para a capacidade de retenção dos polímeros. De uma forma geral, verificaram-se reduções dos teores em todos os FV, sendo essa redução mais acentuada na amostra tratada com o MIP-4EF, oscilando entre os 51-61% (v=25 mL) e os 29-48% (v=100mL).

Por sua vez, o MIP-4EG apresentou taxas de retenção que variaram entre 51-53% e 35-58% para volumes de 25 e 100 mL, respetivamente.

Relativamente ao NIP, não foi possível verificar a influência do volume, uma vez que a solução de vinho sintético não eluiu através do NIP.

No entanto, em ambas as condições testadas verificou-se que todos os polímeros, apresentaram capacidade de reconhecimento molecular para as moléculas-alvo, destacando-se o NIP com a maior taxa de retenção. O facto de o NIP se apresentar mais seletivo, está de certa forma em desacordo com o que seria de esperar, ou seja, a obtenção de maior capacidade de reconhecimento da molécula-alvo por parte dos MIPs comparativamente ao NIP. A única diferença do processo de síntese dos NIPs e dos

MIPs, está na ausência de molécula-alvo na sua síntese e conseqüentemente menor capacidade de reconhecimento por falta de locais de ligação específicos.

Como se sabe, a retenção de uma determinada molécula pelos polímeros não se deve somente a esses locais de ligação, mas também a interações não específicas a nível superficial. Por esta razão, os NIPs são frequentemente utilizados como termo de comparação dessas interações não específicas.

Apesar disso, como a principal finalidade deste trabalho era a aplicação de MIPs para remoção dos FV, ambos demonstraram ser eficientes.

### Ensaio 2 (método de extração):

Neste ensaio foram avaliadas as condições de tratamento com os MIPs, sendo que ao invés de se tratar de uma coluna SPE, efetuou-se uma extração num goble com agitação magnética, com o intuito de aumentar a superfície de contacto entre a amostra e o polímero. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Influência do método de extração na capacidade de retenção dos MIPs e NIP.

Fenóis voláteis	Retenção (%) <sup>a</sup>					
	MIP-4EG		MIP-4EF		NIP	
	SPE	Agitação	SPE	Agitação	SPE	Agitação
<b>4-Vinilfenol</b>	58,3±15,84	73,9±2,24	60,5±17,86	70,3±1,32	65,0±3,62	62,8±1,82
<b>4-Vinilguaiacol</b>	57,4±14,98	71,4±2,61	59,4±15,91	67,3±1,44	63,8±2,97	60,1±2,10
<b>4-Etilfenol</b>	54,6±14,29	69,5±2,11	55,5±16,24	66,3±1,39	61,3±4,24	58,1±2,09
<b>4-Etilguaiacol</b>	50,7±13,07	64,5±2,08	50,9±14,78	61,5±1,34	58,1±5,90	52,9±2,27

<sup>a</sup>Valores expressos em média ± desvio padrão de três ensaios.

Da análise dos resultados obtidos verificou-se que a extração com agitação conduziu a uma melhor retenção dos FV nos MIP-4EF e MIP-4EG. Em contrapartida, o NIP diminuiu a sua capacidade de retenção comparativamente à extração em SPE (Tabela 4).

Os aumentos mais significativos foram obtidos com o MIP-4EG, apresentando retenções que oscilaram entre 51-58% em SPE e 65-74% quando submetido a extração com agitação. Por sua vez, o MIP-4EF apresentou taxas de retenção que oscilaram entre 51-61% e 62-70% para SPE e agitação, respetivamente. Relativamente ao NIP verificou-se que a sua capacidade de retenção diminuiu em condições de agitação (Tabela 4).

Assim sendo, podemos constatar que os MIPs melhoraram a sua seletividade e especificidade quando submetidos a agitação.

**Ensaio 3 (tempo de contacto):** neste ensaio foram testados dois tempos de contacto diferentes entre a amostra e o polímero respetivo. As condições ensaiadas foram: (i) 2h de contacto com agitação (250 rpm) e 2 h de repouso (T2), (ii) 12 h de contacto com agitação (250 rpm) e 2 h de repouso (T12). Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Influência do tempo de contacto na capacidade de retenção dos dos MIPs e NIP.

Fenóis voláteis	Retenção (%) <sup>a</sup>					
	MIP-4EG		MIP-4EF		NIP	
	T2	T12	T2	T12	T2	T12
<b>4-Vinilfenol</b>	48,1±1,69	41,3±0,90	42,3±4,78	24,1±0,63	44,0±12,57	29,1±8,66
<b>4-Etilfenol</b>	55,1±7,19	52,6±5,65	55,6±1,64	54,1±2,65	46,4±6,31	46,2±2,41
<b>4-Etilguaiacol</b>	40,3±0,89	36,5±1,05	54,3±0,59	52,1±0,63	43,0±1,00	40,8±0,88

<sup>a</sup>Valores expressos em média ± desvio padrão de três ensaios.

Os resultados obtidos demonstraram maior capacidade de retenção nas condições T2 para os três polímeros (Tabela 5). Nestas condições obtiveram-se incrementos de 4% para o MIP-4EG, 7% para o MIP-4EF e 6% para o NIP, relativamente às condições T12 (Tabela 5).

Neste ensaio foi evidente uma nítida redução da capacidade de retenção dos FV pelos polímeros quando aplicados em vinho. Provavelmente, a presença de compostos presentes nesta matriz tão complexa interferiram com a sua capacidade de retenção através de um aumento das interações não específicas.

De acordo com os resultados obtidos nos pré-ensaios, as condições selecionadas para prosseguir este estudo foram: 800 mg de polímero (MIP-4EF, MIP-4EG e NIP), 100 mL de vinho, 2 h de tempo de contacto com agitação a 250 rpm e 2 h de repouso.

Seguidamente, as amostras foram filtradas com filtros de 0,22 µm e analisadas a nível de compostos voláteis, compostos fenólicos corados e não corados.

## **4.2. Efeito na composição química**

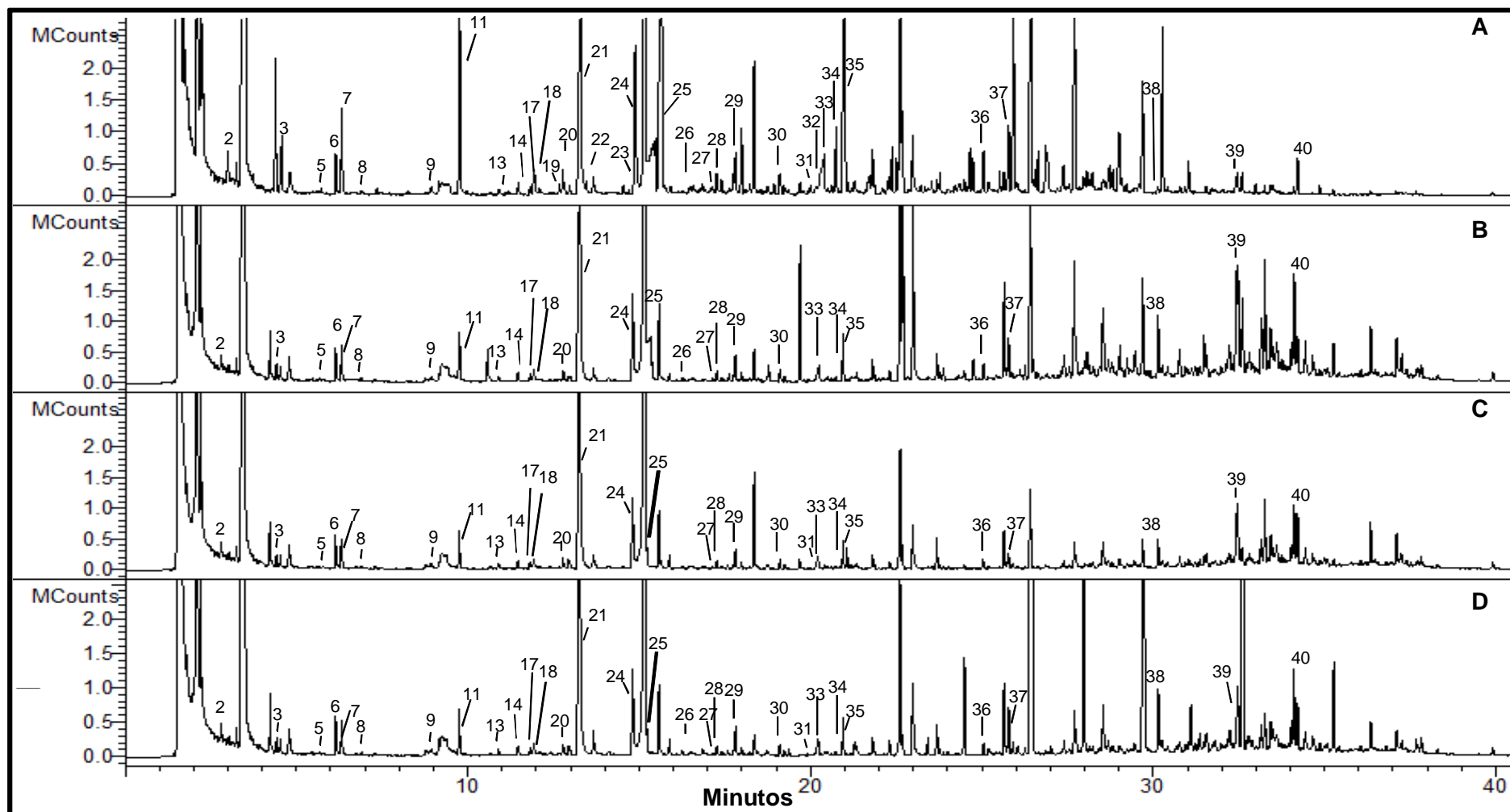
### **4.2.1. Compostos voláteis**

O aroma é uma das características mais apreciadas pelos consumidores, sendo um parâmetro fundamental a nível da avaliação da qualidade dos vinhos. Este atributo advém de uma combinação entre várias classes de compostos, nomeadamente álcoois superiores, terpenos, ésteres, ácidos voláteis, norisoprenoides, aldeídos, cetonas, lactonas, éteres, fenóis voláteis, compostos sulfurados e azotados, entre outros (38, 91, 92). O perfil usualmente exibido pelos vinhos é dependente de uma série de fatores, entre os quais podemos considerar a natureza da matéria-prima, os fatores ambientais, o processo de vinificação e fatores biológicos (129, 226).

A análise da fração volátil das amostras de vinho tinto por HS-SPME/GC-MS permitiu a identificação de 40 compostos voláteis. Os compostos identificados foram distribuídos por nove classes químicas distintas: 3 FV, 22 ésteres, 5 álcoois superiores, 1 composto sulfurado, 4 ácidos voláteis, 1 aldeído, 2 terpenos, 1 norisoprenoide e 1 sesquiterpeno (Figura 22, Tabelas 6 e 7).

De acordo com a pesquisa bibliográfica efetuada, todos os compostos identificados já haviam sido descritos previamente em vinhos (91, 227-230).

Todas as amostras analisadas apresentaram um perfil idêntico, observando-se, no entanto algumas diferenças a nível quantitativo entre a amostra controlo e as amostras tratadas (Tabelas 6 e 7).



**Figura 22.** Perfil cromatográfico de compostos voláteis das amostras de vinho tinto obtidos por HS-SPME/GC-MS. (A) Controle, (B) MIP-4EF, (C) MIP-EG, (D) NIP. A identificação dos compostos está na Tabela 6 e 7.

Nas amostras analisadas foram identificados 3 FV: o 4-EF [24], o 4-EG [29] e o eugenol [31] (Figura 22, Tabelas 6 e 7). A amostra controlo apresentou teores de 149 e 1659 µg/L para o 4-EG e 4-EF, respetivamente. Enquanto que nas amostras tratadas, os teores oscilaram ente 68-89 µg/L e 737-887 µg/L para o 4-EG e 4-EF, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios, que referem que os vinhos tintos contêm teores mais elevados em EF que VF (4, 114, 226).

O 4-EF e o 4-EG são reconhecidos como os principais compostos resultantes do metabolismo das leveduras *D. bruxellensis*, sendo os principais responsáveis por maus odores, causando elevadas perdas económicas em vinhos de elevada qualidade, uma vez que não existe nenhuma forma de recuperar este tipo de vinhos, bem como as barricas de madeira onde envelheceram.

Estes compostos são usualmente conotados negativamente pela influência que têm na qualidade dos vinhos. No entanto, a sua influência é dependente dos teores em que se encontram, por exemplo, para teores de FV superiores a 620 µg/L são considerados como adulterantes, substituindo os aromas frutados por aromas desagradáveis descritos como fenólicos, medicinais e animais (couro, suor de cavalo, estábulo), entre outros, além disso conduzem a alterações na cor e na estrutura dos vinhos (114, 115). Por sua vez, se presentes em teores inferiores a 400 µg/L contribuem para a sua complexidade aromática, conferindo-lhe aromas a especiarias, fumo, pele, entre outros, sendo que alguns vinhos com FV foram premiados em concursos internacionais (116-118).

Desta forma, é de todo relevante o desenvolvimento de um método eficaz para a sua remoção, que na eventualidade de não os remover na totalidade, os possa pelo menos reduzir quantitativamente para valores aceitáveis que permitam a sua comercialização.

Analisando o efeito dos tratamentos com os polímeros, podemos constatar que os MIPs apresentaram uma maior capacidade de retenção comparativamente ao NIP. As melhores taxas de adsorção foram obtidas com o MIP-4EF, apresentando retenções de 56 e 54% para o 4-EF e 4-EG, respetivamente (Tabela 6).

**Tabela 6.** Fenóis voláteis e taxas de retenção obtidos nas amostras de vinho Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP.

Fenóis voláteis	Amostras <sup>1</sup>						
	Controlo	MIP-4EF		MIP-4EG		NIP	
	(µg/L)	Tratado (µg/L)	Retenção (%)	Tratado (µg/L)	Retenção(%)	Tratado (µg/L)	Retenção (%)
<b>24 4-Etilfenol</b>	1658,9±55,06 <sup>a</sup>	737,0±41,04 <sup>b</sup>	55,6±1,64	744,8,0±116,46 <sup>b</sup>	55,1±7,19	887,0±75,50 <sup>b</sup>	46,4±6,31
<b>29 4-Etilguaiacol</b>	149,4±0,94 <sup>a</sup>	68,3±0,77 <sup>b</sup>	54,3±0,59	89,2±0,86 <sup>b</sup>	40,3±0,89	85,1±1,77 <sup>b</sup>	43,0±1,00
<b>Total</b>	1808,3	805,3		834,0		972,1	

<sup>1</sup>Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras diferentes correspondem a diferenças significativas em relação ao respetivo controlo ( $p < 0.05$ ).

Os valores obtidos com os MIPs foram superiores aos previamente reportados em vinhos tintos tratados com celulose esterificada, em que os autores obtiveram retenções na ordem dos 38 % para o 4-EF e 4-EG (190). Apesar disso, o tratamento não alterou significativamente a composição fenólica e a cor dos vinhos tintos e contribuiu para uma melhoria das propriedades sensoriais.

Por sua vez, estes resultados são inferiores aos previamente reportados em vinhos tintos tratados com MIPs, no qual os autores conseguiram retenções a rondar os 90 % para os EF (199).

No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não podem ser considerados como negativos, uma vez que alguns enologistas sugeriram que concentrações moderadas de 4-EF e 4-EG podem adicionar complexidade aromática aos vinhos (186). A redução significativa do teor em FV obtida com os polímeros possibilita o seu loteamento com outros vinhos e a sua comercialização. Assim sendo, esta metodologia pode apresentar-se como uma mais-valia para os enologistas, permitindo a comercialização de vinhos que à partida não o poderiam ser.

O Eugenol [31] foi outro FV identificado nas amostras de vinho tinto. Este composto é mais abundante na madeira de carvalho, contribuindo para o vinho com as suas notas aromáticas a cravinho (231). O eugenol é tipicamente associado com a maturação em barricas de carvalho, sendo predominantemente derivado da degradação térmica da lenhina da madeira durante o processo de queima, porém, foram reportados níveis significantes de eugenol em madeira que não foi submetida a esse processo (231, 232). Geralmente, os aromas derivados da presença de eugenol não são considerados indesejáveis, com exceção dos casos em que surjam em vinhos que não tenham estado em contacto com madeira (233).

Este composto apresentou reduções significativas nas amostras tratadas, observando-se retenções de 66 e 70 % para o MIP-4EF e MIP-4EG, respetivamente (Tabela 7), estes valores são bastante semelhantes aos observados anteriormente para o 4-EF e 4-EG (Tabela 6).

No entanto, as retenções observadas para este composto são inferiores às reportadas na bibliografia por outros autores, cuja taxa de retenção rondou os 83%, em amostras de vinho tinto tratadas com polímeros (199).

**Tabela 7.** Compostos voláteis e taxas de retenção obtidos nas amostras de vinho Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP.

Compostos	RI	RI <sup>A</sup>	ID <sup>B</sup>	QI <sup>C</sup>	A/1000 (S.D) <sup>D</sup>				
					Controlo	MIP-4EF	MIP-4EG	NIP	
<b>Ésteres</b>									
1	Isobutirato de etilo	741	751	MS (73/79)	43/71/161	146,3(4,11)	59,0(0,76) <sup>b</sup>	85,5(0,30) <sup>b</sup>	45,6(0,33) <sup>b</sup>
2	Acetato de isobutilo	757	763	MS (76/81)	43/56/73/101	153,4(1,57)	39,6(0,19) <sup>b</sup>	65,2(0,16) <sup>b</sup>	56,4(0,49) <sup>b</sup>
3	Butanoato de etilo	784	778	S,MS (85/87)	43/71/88/116	494,6(45,59)	172,1(1,19) <sup>b</sup>	194,6(15,91) <sup>b</sup>	205,4(3,17) <sup>b</sup>
4	Butirato de metilo	837	820	MS (79/80)	57/102	33,7(0,72)	9,5(0,05) <sup>b</sup>	10,1(0,12) <sup>b</sup>	7,8(0,03) <sup>b</sup>
5	Isovalerato de etilo	842	854	MS (78/80)	55/88	45,9(0,78)	5,3(0,04) <sup>b</sup>	7,5(0,12) <sup>b</sup>	6,1(0,02) <sup>b</sup>
7	Acetato de isoamilo	865	876	S,MS (84/85)	43/70	1644,0(37,51)	568,9(13,90) <sup>b</sup>	625,1(13,92) <sup>b</sup>	730,7(49,77) <sup>b</sup>
11	Hexanoato de etilo	982	998	S,MS (83/84)	43/88	598,4(6,28)	297,6(0,29) <sup>b</sup>	303,2(19,05) <sup>b</sup>	419,2(0,83) <sup>b</sup>
12	Acetato de hexilo	994	1007	S,MS (74/80)	43/55/56	38,3(1,67)	10,7(0,19) <sup>b</sup>	11,7(0,37) <sup>b</sup>	11,7(0,22) <sup>b</sup>
15	Hexanoato de 2-etilo	1030	1043	MS (76/79)	97/55/99	29,6(0,34)	6,7(0,02) <sup>b</sup>	7,4(0,09) <sup>b</sup>	10,9(0,02) <sup>b</sup>
16	Furoato de 2-etilo	1039	1047	MS (77/87)	95/112/140	24,4(0,20)	9,5(0,50) <sup>b</sup>	20,7(0,09) <sup>b</sup>	24,2(0,10) <sup>a</sup>
17	Lactato de isoamilo	1054	1047	MS (74/82)	43/45/70	101,6(0,87)	116,5(0,79) <sup>b</sup>	138,1(1,12) <sup>b</sup>	159,6(0,57) <sup>b</sup>
19	Heptanoato de etilo	1081	1096	MS (70/84)	88/113	39,3(1,28)	2,6(0,00) <sup>b</sup>	2,6(0,01) <sup>b</sup>	4,3(0,04) <sup>b</sup>
22	Octanoato de metilo	1105	1128	MS (82/87)	74787/158	123,2(3,52)	5,6(0,02) <sup>b</sup>	7,3(0,01) <sup>b</sup>	10,5(0,02) <sup>b</sup>
23	Butirato de linalilo	1149	1168	MS (72/75)	93/121	21,4(1,15)	3,1(0,07) <sup>b</sup>	3,7(0,08) <sup>b</sup>	4,5(0,05) <sup>b</sup>
26	Hexanoato de isopentilo	1202	1244	MS (76/79)	43/70/99	76,7(1,86)	4,0(0,03) <sup>b</sup>	6,5(0,05) <sup>b</sup>	4,5(0,07) <sup>b</sup>
28	Acetato de 2-feniletilo	1226	1255	MS (87/90)	43/104	433,6(20,26)	192,8(12,59) <sup>b</sup>	194,3(3,99) <sup>b</sup>	246,0(4,23) <sup>b</sup>
30	Decanoato de metilo	1269	1300	MS (70/83)	74/87	104,1(3,22)	11,5(0,30) <sup>b</sup>	10,9(0,17) <sup>b</sup>	14,6(0,22) <sup>b</sup>
34	Etil- <i>trans</i> -4-decanoato	1358	1296	MS (80/80)	88/110/69	278,4(1,51)	16,4(0,32) <sup>b</sup>	17,3(0,16) <sup>b</sup>	20,7(0,03) <sup>b</sup>
35	Decanoato de etilo	1367	1394	MS (77/78)	88/157	1535,7(64,17)	178,6(8,21) <sup>b</sup>	242,1(24,98) <sup>b</sup>	220,7(16,21) <sup>b</sup>
37	Dodecanoato de etilo	1567	1592	MS (77/77)	88/101/	546,9(54,64)	97,7(0,13) <sup>b</sup>	113,6(2,71) <sup>b</sup>	90,2(0,11) <sup>b</sup>
38	Tetradecanoato de etilo	1762	1792	MS (80/82)	88/101	27,2(7,77)	172,7(7,84) <sup>b</sup>	258,4(29,69) <sup>b</sup>	236,8(19,81) <sup>b</sup>
40	Hexadecanoato de etilo	1957	1990	MS (80/80)	88/157/384	50,8(11,03)	454,7(27,19) <sup>b</sup>	515,3(0,53) <sup>b</sup>	573,9(5,04) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>6547,1</b>	<b>2435,3</b>	<b>2841,1</b>	<b>3104,3</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>62,8</b>	<b>56,6</b>	<b>52,6</b>
<b>Álcoois</b>									
6	1-Hexanol	858	865	MS (78/80)	56/69	478,4(12,29)	425,0(3,87) <sup>b</sup>	442,3(18,81) <sup>b</sup>	455,0(3,41) <sup>b</sup>
9	1-Heptanol	957	962	S,MS (85/87)	41/56/70/116	162,2(3,48)	112,3(0,27) <sup>b</sup>	110,9(0,60) <sup>b</sup>	137,6(0,22) <sup>b</sup>
14	Benzil álcool	1023	1031	MS (86/89)	79/108	142,3(13,72)	91,5(7,30) <sup>b</sup>	125,3(2,62) <sup>a</sup>	143,0(4,39) <sup>a</sup>
18	1-Octanol	1057	1068	S,MS (82/85)	41/84	226,0(6,57)	70,9(0,42) <sup>b</sup>	69,0(0,41) <sup>b</sup>	88,7(0,38) <sup>b</sup>
21	2-Feniletanol	1097	1111	S,MS (90/92)	91/122	8194,7(751,12)	8199,7(716,05) <sup>a</sup>	7787,7(191,45) <sup>a</sup>	8666,5(311,83) <sup>a</sup>
	<b>Total</b>					<b>9203,6</b>	<b>8899,3</b>	<b>8535,3</b>	<b>9490,9</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>3,3</b>	<b>7,3</b>	<b>-3,1</b>

**Tabela 7.** Compostos voláteis e taxas de retenção obtidos nas amostras de vinho Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP (cont.)

Compostos	RI	RI <sup>A</sup>	ID <sup>B</sup>	QI <sup>C</sup>	A <sup>D</sup> /1000				
					Controlo	MIP-4EF	MIP-4EG	NIP	
<b>Compostos de enxofre</b>									
8	2-Furfuriltioll	885	905	MS (76/85)	53/81	63,7(1,38)	49,4(0,40) <sup>b</sup>	52,1(2,34) <sup>b</sup>	57,6(3,78) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>63,7</b>	<b>49,4</b>	<b>52,1</b>	<b>57,6</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>22,4</b>	<b>18,2</b>	<b>9,6</b>
<b>Acidos</b>									
10	Ácido hexanoico	972	984	S,MS (75/81)	60/73	473,3(7,30)	261,8(1,10) <sup>b</sup>	290,4(1,07) <sup>b</sup>	294,5(3,83) <sup>b</sup>
25	Ácido octanoico	1171	1201	S,MS (76/80)	60/73	576,3(2,66)	247,5(2,06) <sup>b</sup>	215,2(0,57) <sup>b</sup>	142,6(0,40) <sup>b</sup>
33	Ácido decanoico	1336	1347	S,MS (86/88)	60/73	1924,5(2,12)	204,4(4,65) <sup>b</sup>	224,7(4,63) <sup>b</sup>	274,3(11,77) <sup>b</sup>
39	Ácido palmítico	1925	1951	S,MS (72/78)	60/73	101,8(1,88)	125,5(2,46) <sup>b</sup>	134,9(1,32) <sup>b</sup>	166,6(0,63) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>3075,9</b>	<b>839,2</b>	<b>865,2</b>	<b>394,5</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>72,2</b>	<b>71,9</b>	<b>87,2</b>
<b>Aldeídos</b>									
13	(E)-2-Octanal	1014	1034	S,MS (67/77)	57/70/83	18,3(0,38)	32,5(0,16) <sup>b</sup>	26,4(0,18) <sup>b</sup>	29,4(0,10) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>18,3</b>	<b>32,5</b>	<b>26,4</b>	<b>29,4</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>-77,6</b>	<b>-44,3</b>	<b>60,7</b>
<b>Terpenos</b>									
20	β-Linalol	1084	1097	S,MS (82/87)	73/91/121	50,9(0,68)	27,6(0,41) <sup>b</sup>	25,6(1,73) <sup>b</sup>	31,3(0,03) <sup>b</sup>
27	Nerol	1223	1234	S,MS (74/78)	69/93	77,8(1,29)	28,1(1,88) <sup>b</sup>	28,1(0,05) <sup>b</sup>	37,7(0,07) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>128,6</b>	<b>55,7</b>	<b>53,7</b>	<b>69,0</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>56,7</b>	<b>58,2</b>	<b>46,3</b>
<b>Fenóis</b>									
31	Eugenol			S,MS (85/93)		38,4(0,46)	13,1(0,58) <sup>b</sup>	11,5(0,31) <sup>b</sup>	16,6(0,12) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>38,4</b>	<b>13,1</b>	<b>11,5</b>	<b>16,6</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>65,9</b>	<b>70,1</b>	<b>56,8</b>
<b>Norisoprenoides</b>									
32	TDN <sup>E</sup>	1288	1333	MS (74/85)	142/157/172	62,1(2,80)	5,3(0,04) <sup>b</sup>	5,7(0,45) <sup>b</sup>	7,6(0,09) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>62,1</b>	<b>5,3</b>	<b>5,7</b>	<b>7,6</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>91,5</b>	<b>90,8</b>	<b>87,8</b>
<b>Sesquiterpenos</b>									
36	Nerolidol	1536	1537	S,MS (82/86)	69/93	285,4(7,17)	22,4(0,30) <sup>b</sup>	26,5(0,28) <sup>b</sup>	26,3(0,26) <sup>b</sup>
	<b>Total</b>					<b>285,4</b>	<b>22,4</b>	<b>26,5</b>	<b>26,3</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>7,8</b>	<b>9,3</b>	<b>9,2</b>
	<b>Total</b>					<b>19423,1</b>	<b>12352,2</b>	<b>12417,5</b>	<b>13196,2</b>
	<b>Retenção (%)</b>						<b>92,2</b>	<b>90,7</b>	<b>90,7</b>

RI, índice de retenção. <sup>A</sup>RI, índice de retenção reportado na literatura para uma coluna VF-5 ms capilar ou equivalente. <sup>B</sup>ID, método de identificação; S, identificado por comparação com composto de referência; MS, tentativamente identificado pela NIST05. <sup>C</sup>QI, iões de quantificação. <sup>D</sup>A, área expressa em unidades arbitrárias; S.D, desvio-padrão do triplicado. <sup>E</sup>TDN, 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno. Na mesma linha, letras diferentes correspondem a diferenças significativas relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ).

Os **ésteres** são uma classe de compostos aromáticos presentes em inúmeros produtos alimentares, seguidamente à água, etanol e álcoois superiores, estes representam o maior grupo de constituintes nos vinhos, além disso, consideram-se como sendo a principal fonte de aromas frutados, principalmente os ésteres etílicos (234). Esta classe apresentou a maior diversidade de compostos identificados nas amostras de vinho tinto, com um total de 22 compostos, destacando-se o acetato de isoamilol **[7]** pela sua abundância em todas as amostras analisadas (Tabela 7). De uma forma geral, o tratamento com os MIPs provocou uma redução considerável nos níveis de ésteres, obtendo-se taxas de retenção na ordem dos 63 e 57 % para o MIP-4EF e MIP-4EG, respetivamente. No entanto, da pesquisa bibliográfica efetuada, Garde-Cérdan et al. (199) obtiveram taxas de retenção de 84% para o acetato de 2-feniletanol em vinhos tintos envelhecidos e tratados com MIPs.

Os **álcoois** são compostos orgânicos que contêm um ou mais grupos hidroxilo, além do etanol, eles representam 50 % dos componentes aromáticos de um vinho. Se presentes em baixas concentrações, contribuem para a complexidade aromática. Porém, quando presentes em elevadas concentrações podem marcar determinados aromas e sabores dos vinhos. Por outro lado, contribuem claramente para um aumento da sensação de calor, resultante da prova de um vinho (57). Nas amostras analisadas foram identificados cinco álcoois, destacando-se o 2-feniletanol **[21]** como o mais representativo em todas as amostras analisadas. O perfil destes compostos não foi influenciado pelos tratamentos com os MIPs e NIP (Tabela 7), revelando a inexistência de afinidade dos polímeros usados com esta classe de compostos.

Os **compostos de enxofre**, podem ser divididos em várias sub-classes com base na natureza dos grupos funcionais respetivos: tióis, sulfuretos, polisulfuretos, tioésteres, tioálcoois e compostos de enxofre heterocíclicos (235). Estes compostos são caracterizados por uma alta volatilidade e reatividade, de uma forma geral são considerados como compostos odorantes poderosos, mesmo quando presentes em baixas concentrações (236).

No entanto, são usualmente conotados negativamente por dar origem a aromas próximos do ácido sulfídrico, assemelhando-se a cheiro a ovos podres. No entanto, deve ter-se em atenção que o seu aparecimento nos vinhos é controlado pelas práticas enológicas, que são usualmente suficientes para manter as quantidades abaixo do limiar de perceção (235).

O único composto de enxofre identificado foi o 2-furfuriltiol **[8]**, obtendo-se taxas de retenção na ordem dos 22, 18 e 10 % para os tratamentos com MIP-4EF, MIP-4EG e NIP, respetivamente (Tabela 7). Os resultados sugerem a existência de baixa afinidade do polímero para este tipo de compostos.

Os **ácidos gordos** são formados durante a fermentação alcoólica e podem também ser oriundos de alterações microbiológicas, estes compostos influenciam direta ou indiretamente o aroma dos vinhos. Esta classe de compostos exerce uma influência direta quando estão presentes como ácidos gordos voláteis e ésteres etílicos frutados. Porém, quando os ácidos gordos são precursores de aldeídos e álcoois de seis carbonos com sabores herbáceos, a influência é exercida de forma indireta (237). Além disso, estes compostos influenciam a formação de espuma e estabilidade dos vinhos, e alguns deles (ácidos gordos de cadeia média) estão descritos como sendo tóxicos para as leveduras e para as bactérias malolácticas (237).

Nas amostras de vinho tinto analisadas foram identificados 4 compostos, destacando-se o ácido decanoico [33] como o principal composto presente em todas as amostras (Tabela 7).

Este ácido caracteriza-se por apresentar aromas associados a gordura, ranço e sabão. Outros ácidos presentes são descritos como possuidores de maus odores, por exemplo, o ácido hexanoico [10] apresenta odores a ranço, queijo, bode e a óleo vegetal, enquanto que o ácido octanoico [24] emana um odor a gordura, laticínios e ranço (227, 238, 239).

A sua presença nos vinhos pode ser considerada indesejável sempre que estejam presentes acima dos limiares de percepção sensorial, 6,70; 2,20 e 1,40 mg/L para os ácidos hexanoico, octanoico e decanoico, respetivamente.

Os resultados obtidos revelaram que os polímeros possuem afinidade para esta classe de compostos, uma vez que se observaram retenções na ordem dos 72 % para as amostras tratadas com MIP-4EF e MIP-4EG, e 87 % para o NIP (Tabela 7). Os polímeros testados neste trabalho apresentaram uma grande afinidade com os ácidos gordos presentes nos vinhos.

Os **aldeídos** foram outra das classes identificadas nas amostras, estes caracterizam-se por apresentarem propriedades notórias a nível do odor, além disso são formados a partir de álcoois e outros precursores por oxidação, estando as alterações no aroma diretamente relacionadas com a oxidação (240). Estes compostos são usualmente classificados como constituintes naturais da fração volátil dos vinhos, sendo relevantes no aroma, sabor e na sua deterioração (fenómenos oxidativos) (241).

O (*E*)-2-octenal[13] foi o único aldeído identificado, os resultados obtidos revelaram que os tratamentos com os polímeros conduziram a um incremento da sua concentração de 77, 44, 61 % para o MIP-4EF, MIP-4EG e NIP, respetivamente (Tabela 7). Este facto pode explicar-se possivelmente pelo tratamento com os polímeros e conduzir a uma concentração destes compostos nas amostras. Efeito que se pode justificar por uma das aplicações dos polímeros que é o facto de poderem contribuir para a pré-concentração de alguns compostos em determinadas matrizes.

A classe dos **terpenos** desempenha um papel importante no aroma de diversas flores e frutos. Nos vinhos, estes compostos são usualmente derivados das uvas, sendo úteis para a caracterização de inúmeras variedades (ex. Moscatel) (88, 97).

Os terpenos podem diferenciar-se em várias sub-classes, consoante o número de unidades isopreno que apresentem, sendo divididos em monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades) e triterpenos (seis unidades).

Nos vinhos podem ser detetados terpenos em três formas diferentes: (i) álcoois monoterpénicos livres, (ii) complexados com glicósidos e (iii) di- ou trióis, sendo as formas livres aquelas que têm maior contribuição para o aroma e conseqüentemente um maior impacto na qualidade dos vinhos.

As suas propriedades podem alterar-se durante a vinificação, uma vez que eles são parte integrante de inúmeras reações durante a produção do vinho, induzidas pelo período de armazenamento (envelhecimento), pH relativamente baixo e a presença de compostos que possam interagir com eles (98, 242).

A sua relevância nos vinhos tintos não possui grande significado, excetuando-se o facto de que a sua participação nas reações supracitadas possa levar á libertação das formas livres, como os derivados de ácidos hidroxicinâmicos, podendo funcionar como precursores de FV (100).

Nas amostras de vinho analisadas foram identificados dois compostos pertencentes a esta classe: o  $\beta$ -linalol [20] e o nerol [27] (Figura 22, Tabela 7). Através dos resultados obtidos podemos observar que o tratamento com os polímeros conduziu a reduções significativas destes compostos, na ordem dos 57, 58 e 46 % para o MIP-4EF, MIP-4EG e NIP, respetivamente.

Uma vez que estes compostos podem estar implicados na libertação de derivados de ácidos hidroxicinâmicos, que são precursores de FV, a sua retenção pode ser útil para prevenir a sua formação e conseqüente depreciação da qualidade organolética dos vinhos tintos.

Os **sesquiterpenóides** representam uma sub-classe de terpenos, com extrema importância em *Vitis vinifera*, devido às suas propriedades aromáticas e também às propriedades bioativas que apresentam, destacando-se a sua atividade antibacteriana (243), que ocorre pelo aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana e a suscetibilidade a compostos antimicrobianos exógenos (244).

Nas amostras analisadas identificou-se apenas o nerolidol [36], obtendo-se uma taxa de retenção na ordem dos 90%, revelando uma elevada afinidade dos polímeros para este composto (Tabela 7).

Estes resultados sugerem que estes materiais possam eventualmente ter utilização noutras áreas, permitindo a sua extração de matrizes mais ou menos complexas e a obtenção de extratos enriquecidos em sesquiterpenos, por forma a tirar proveito das suas atividades biológicas, como por exemplo, da sua atividade antibacteriana, uma vez que são reportados na bibliografia dados que demonstram o seu potencial sinérgico, aumentando a suscetibilidade bacteriana aos antibióticos (245, 246).

Alguns derivados **norisoprenoides** são frequentemente reportados nos vinhos e também classificados como importantes contribuidores para o seu aroma, devido aos seus agradáveis descritores aromáticos, caracterizados normalmente por possuírem um baixo limiar de perceção. Estes compostos são derivados da degradação de carotenoides como o  $\beta$ -caroteno, a luteína, a neoxantina e a violaxantina ou da hidrólise de moléculas de glucose durante o processo de vinificação ou envelhecimento (247).

O TDN [32] é um norisoprenóide, proveniente da degradação direta do  $\beta$ -caroteno (248), foi o único composto desta classe identificado nas amostras analisadas. O TDN apresenta um baixo limiar de perceção, na ordem dos 20  $\mu\text{g/L}$ , quando presente em concentrações mais elevadas leva à formação de odores desagradáveis, afetando negativamente a qualidade de um vinho (108).

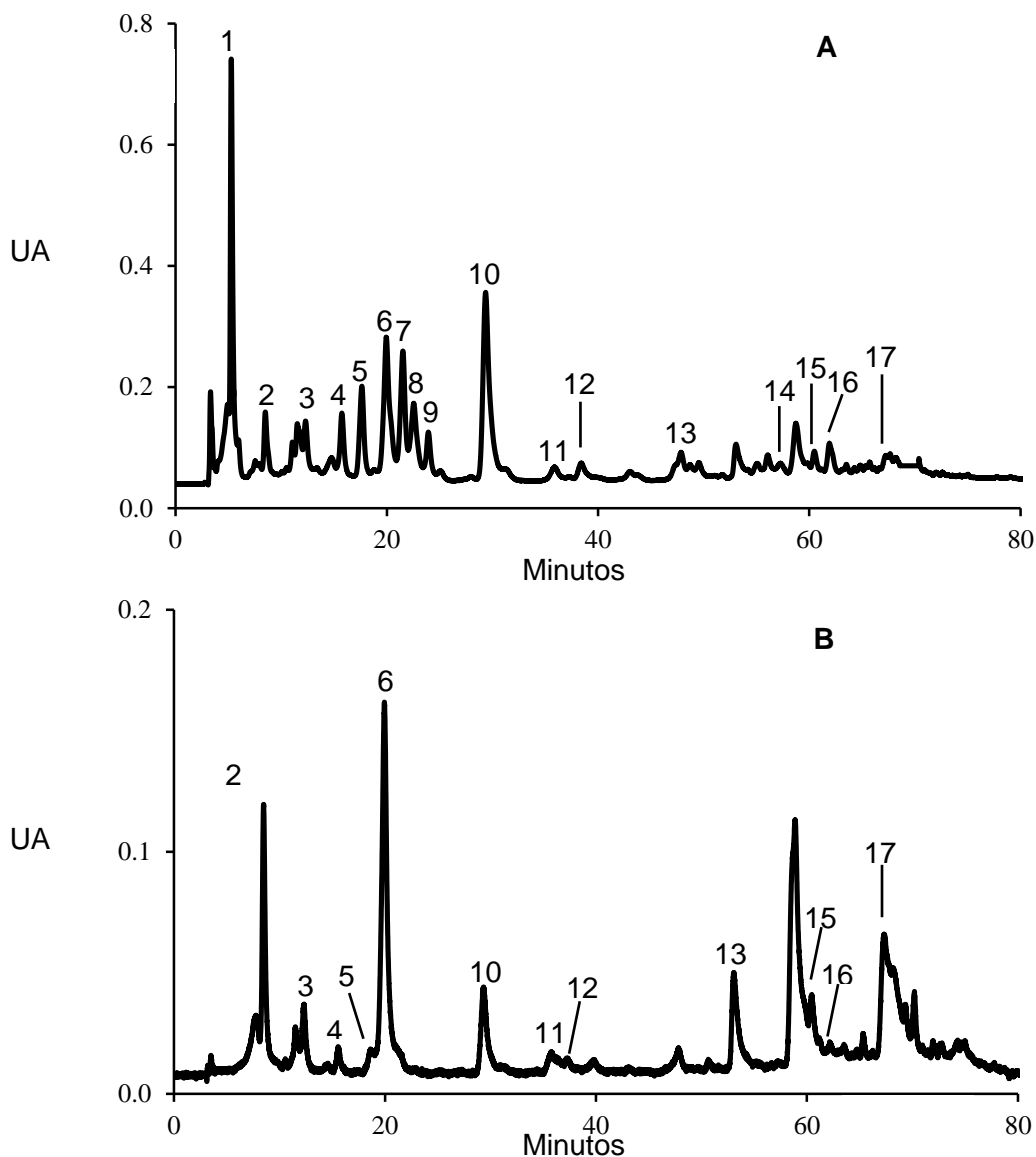
Os resultados obtidos revelaram uma elevada afinidade entre os polímeros e este composto, obtendo-se retenções na ordem dos 92, 91 e 88 % para o MIP-4EF, MIP-4EG e NIP, respetivamente. A diminuição dos teores em TDN nos vinhos pode ser benéfica a nível sensorial.

#### **4.2.2. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são reconhecidos pelas suas funções estruturais e protetoras nas plantas. Nos vinhos são considerados como compostos determinantes por constituírem um dos parâmetros de qualidade mais importante, uma vez que contribuem para as propriedades organolépticas: cor, sabor, amargura e adstringência do produto final (27). Nos últimos anos, o interesse destes compostos nos vinhos incrementou devido aos efeitos benéficos na saúde humana (249), associado às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (14, 15). Nomeadamente, estudos epidemiológicos recentes demonstraram a sua atividade antioxidante contra espécies reativas envolvidas no envelhecimento e também em doenças crónicas autoimunes, inflamatórias, coronárias e degenerativas (16-19).

##### **4.2.2.1. Compostos fenólicos não corados**

Os compostos fenólicos não corados presentes nas amostras de vinho foram caracterizados por HPLC/DAD, tendo-se identificado 17 compostos: ácidos gálico, *trans*-cafeoil tartárico, *trans-p*-cumaroil-tartárico, vanílico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, elágico e cinâmico, catequina, epicatequina, epigalhocatequina-3-*O*-galhato, epicatequina-3-*O*-galhato, miricetina, isorhamnetina-3-*O*-glucósido e quercetina (Figura 23). Todos estes compostos fenólicos foram previamente descritos em vinhos (129, 250).



**Figura 23.** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos não corados identificados no vinho controle obtido por HPLC/DAD. Detecção a (A) 280 nm e (B) 350 nm. Compostos: (1) ácido gálico, (2) ácido *trans*-cafeoil tartárico, (3) ácido *trans-p*-cumaroil-tartárico, (4) catequina, (5) ácido vanílico, (6) ácido cafeico, (7) ácido siríngico, (8) epicatequina, (9) epigalhocatequina-3-*O*-galhato, (10) ácido *p*-cumárico, (11) ácido ferúlico, (12) epicatequina-3-*O*-galhato, (13) ácido elágico, (14) ácido cinâmico, (15) miricetina, (16) isoramnetina-3-*O*-glucósido, (17) quercetina.

Os compostos fenólicos não corados identificados integram várias classes: ácidos hidroxibenzoicos [1], [5], [7]e[13]; ácidos hidroxicinâmicos [2], [3], [6], [10], [11]e[14]; flavonóis [15]-[17] e flavan-3-óis [4], [8], [9] e [12].

Os **ácidos hidroxibenzoicos** pertencem aos ácidos fenólicos. Estes são normalmente compostos minoritários nos vinhos, encontrando-se por norma em menores proporções, comparativamente aos ácidos hidroxicinâmicos. Estes compostos podem ser detetados inicialmente nas uvas, ou nos vinhos, sendo provenientes da hidrólise de taninos hidrolisáveis (ésteres de ácido gálgico ou elágico).

Nas amostras de vinho analisadas foram identificados 4 ácidos hidroxibenzoicos: gálgico [1], vanílico [5], siríngico [7] e elágico [13].

O ácido gálgico [1] foi o composto maioritário desta classe de compostos nas amostras analisadas, caracterizando-se como o principal ácido hidroxibenzoico, este composto destaca-se pelas suas propriedades antioxidantes(35).

O conteúdo total em ácidos hidroxibenzoicos variou entre os 6,5-22,4 mg/L na amostra controlo e os 0,8-20,5 mg/L nas amostras tratadas (Tabela 8). A quantificação destes compostos revelou diferenças significativas entre as amostras tratadas e o controlo ( $p < 0.05$ ), constatando-se que o tratamento com os polímeros conduziu a reduções significativas a nível desta sub-classe, obtendo-se retenções na ordem dos 31, 32 e 22 % para o MIP-4EF, MIP-4EG e NIP, respetivamente (Tabela 8).

Os **ácidos hidroxicinâmicos** são uma sub-classe de compostos não flavonoides e constituem o maior grupo de compostos fenólicos nos vinhos brancos, existindo no entanto em quantidades comparáveis nos vinhos tintos. Por serem facilmente oxidáveis, estes compostos são frequentemente associados ao escurecimento dos vinhos brancos (21, 35), mas também exercem um efeito considerável a nível da descoloração nos vinhos tintos.

Nas amostras de vinho foram identificados 6 ácidos hidroxicinâmicos: *trans*-cafeoil tartárico [2], *trans-p*-cumaroil-tartárico [3], cafeico [6], *p*-cumárico [10], ferúlico [11] e cinâmico [14].

O conteúdo total em ácidos hidroxicinâmicos variou entre os 0,4-9,2 mg/L na amostra controlo e os 0,1-5,9 mg/L nas amostras tratadas (Tabela 8). A quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos revelou reduções significativas ( $p < 0.05$ ) entre as amostras tratadas e o controlo, obtendo-se retenções na ordem dos 56, 52 e 41% para o MIP-4EF, MIP-4EG e NIP, respetivamente. Os valores obtidos, evidenciaram a capacidade dos MIPs para a retenção deste tipo de compostos.

**Tabela 8.** Compostos fenólicos não corados e taxas de retenção das amostras de vinho Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP

Compostos fenólicos <sup>1</sup>	Amostras <sup>2</sup>			
	Controlo (mg/L)	MIP-4EF (mg/L)	MIP-4EG (mg/L)	NIP (mg/L)
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>				
1	22,4±0,03 <sup>a</sup>	19,1±0,01 <sup>b</sup>	19,0±0,00 <sup>b</sup>	20,5±0,02 <sup>b</sup>
5	8,1±0,01 <sup>a</sup>	5,9±0,02 <sup>b</sup>	5,1±0,12 <sup>b</sup>	7,0±0,04 <sup>b</sup>
7	7,0±0,21 <sup>a</sup>	4,4±0,00 <sup>b</sup>	4,4±0,03 <sup>b</sup>	5,5±0,02 <sup>b</sup>
13	6,5±0,04 <sup>a</sup>	0,8±0,03 <sup>b</sup>	1,0±0,00 <sup>b</sup>	1,3±0,00 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>30,2</b>	<b>29,5</b>	<b>34,3</b>
<b>Retenção (%)</b>		<b>31,4</b>	<b>33,0</b>	<b>22,1</b>
<b>Ácidos hidroxicinâmicos</b>				
2	8,6±0,03 <sup>a</sup>	4,8±0,01 <sup>b</sup>	5,1±0,01 <sup>b</sup>	5,9±0,02 <sup>b</sup>
3	3,5±0,04 <sup>a</sup>	1,6±0,04 <sup>b</sup>	1,9 ±0,00 <sup>b</sup>	2,3±0,00 <sup>b</sup>
6	9,2±0,05 <sup>a</sup>	4,2±0,03 <sup>b</sup>	4,4±0,00 <sup>b</sup>	5,5±0,05 <sup>b</sup>
10	7,5±0,07 <sup>a</sup>	2,5±0,01 <sup>b</sup>	2,7±0,00 <sup>b</sup>	3,7±0,02 <sup>b</sup>
11	0,4±0,00 <sup>a</sup>	0,1±0,00	0,1±0,01 <sup>b</sup>	0,2±0,00 <sup>b</sup>
14	0,6±0,01 <sup>a</sup>	nq	0,1±0,00 <sup>b</sup>	0,1±0,00 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>29,8</b>	<b>13,2</b>	<b>14,3</b>	<b>17,7</b>
<b>Retenção (%)</b>		<b>55,7</b>	<b>52,0</b>	<b>40,6</b>
<b>Flavonóis</b>				
15	2,1±0,01 <sup>a</sup>	0,2±0,00 <sup>b</sup>	0,3±0,00 <sup>b</sup>	0,3±0,00 <sup>b</sup>
16	0,2±0,00 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
17	3,3±0,04 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
<b>Total</b>	<b>5,6</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
<b>Retenção (%)</b>		<b>90,5</b>	<b>85,7</b>	<b>85,7</b>
<b>Flavan-3-óis</b>				
4	45,8±1,45 <sup>a</sup>	27,3±0,5 <sup>b</sup>	25,5 ±0,52 <sup>b</sup>	35,8±0,09 <sup>b</sup>
8	36,1±0,23 <sup>a</sup>	20,2±0,78 <sup>b</sup>	21,7±0,28 <sup>b</sup>	27,2±0,46 <sup>b</sup>
9	1,1±0,01 <sup>a</sup>	0,6±0,00 <sup>b</sup>	0,7±0,00 <sup>b</sup>	0,9±0,01 <sup>b</sup>
12	3,1±0,05 <sup>a</sup>	1,0±0,02 <sup>b</sup>	1,3±0,00 <sup>b</sup>	1,5±0,02 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>86,1</b>	<b>49,1</b>	<b>49,2</b>	<b>65,4</b>
<b>Retenção (%)</b>		<b>43,0</b>	<b>41,9</b>	<b>24,0</b>
<b>Total</b>	<b>165,5</b>	<b>92,7</b>	<b>93,3</b>	<b>117,7</b>

<sup>1</sup>Compostos identificados de acordo com a Figura 23. <sup>2</sup>Valores expressos em média ± desvio padrão de três ensaios. nd, não detetado. nq, não quantificado. Na mesma linha, letras diferentes correspondem a diferenças significativas relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ).

Os **flavonóis** são um grande grupo dos compostos flavonoides, estão presentes em diversas fontes alimentares vegetais, sendo normalmente encontrados na forma de 3-O-glucósidos de quatro agliconas principais: a quercetina, a miricetina, o campferol e a isoramnetina (22). No entanto, além de estarem presentes nesta forma podem também estar presentes na forma de 3-O-glucurónidos e di-glucósidos(46).

Estes compostos estão associados a determinadas propriedades no vinho, nomeadamente coloração por copigmentação (56), amargor (57), atividade antioxidante (58) e são também reconhecidos pelas suas propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogénicas (35).

Nas amostras de vinho analisadas foram identificados 3 flavonóis: a miricetina [15], a isoramnetina-3-O-glucósido [16] e a quercetina [17] (Tabela 8). A quercetina [17] foi o composto maioritário nas amostras analisadas, caracterizando-se como o flavonol mais frequentemente encontrado na natureza, principalmente nas uvas (55), no vinho é encontrado com maior frequência na forma de dihidroquercetina (4).

A quantificação dos flavonóis, revelou diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre as amostras tratadas com polímeros e a amostra controlo. Os teores em flavonóis oscilaram entre 0,2-3,3 mg/L na amostra controlo, enquanto que nas amostras tratadas apenas de detetou a miricetina [15], cujos teores oscilaram entre 0,2-0,3 mg/L.

Desta forma, o facto dos outros flavonóis não terem sido detetados nas amostras de vinho, pode sugerir que o tratamento tenha conduzido a uma retenção total desses compostos. A nível da miricetina [15], obteve-se uma retenção na ordem dos 90% para o MIP-4EF e 86% para o MIP-4EG e NIP, evidenciando uma elevada especificidade dos polímeros para este tipo de composto. Estes resultados revelam uma elevada afinidade para os compostos flavonóis, sendo que parte deles deixam de ser detetados após o tratamento (Tabela 8).

Os **flavan-3-óis** são compostos flavonoides e constituem o grupo mais abundante dos compostos fenólicos presentes nas uvas, no vinho e em outros alimentos (maçãs, infusões e chocolate) (64). Além disso, são influentes na estrutura dos vinhos tintos, mais especificamente, influenciam as suas propriedades organoléticas a nível da adstringência e amargor (29).

Nas amostras de vinho analisadas foram identificados 4 compostos flavan-3-óis: a catequina [4], a epicatequina [8], a epigalocatequina-3-O-galható [9] e a epicatequina-3-O-galható [12]. A catequina e a epicatequina foram os compostos maioritários (Tabela 8). Ambos os compostos estão habitualmente presentes nos vinhos tintos em concentrações significativas, são importantes componentes do ponto de vista antioxidante e podem atuar como inibidores da oxidação das lipoproteínas de baixo peso molecular (129, 251, 252).

A quantificação dos flavan-3-óis apresentou variações totais entre 1,1-45,8 mg/L na amostra controlo e 0,6-35,8 mg/L nas amostras tratadas.

Os resultados obtidos revelaram que o tratamento com polímeros conduziu a reduções significativas ( $p < 0,05$ ) nos teores dos flavan-3-óis (Tabela 8) revelando diferenças significativas entre as amostras tratadas e o controlo, tendo-se observado reduções na ordem dos 43% para o MIP-4EF e MIP-4EG, 24 % para o NIP, respetivamente.

A análise comparativa entre os resultados obtidos para as várias classes de compostos não corados revelaram algumas diferenças a nível da taxa de retenção. Os MIPs e o NIP revelaram maior especificidade e seletividade para os flavonóis (86-91%), seguindo-se os ácidos hidroxicinâmicos (41-56%), os flavan-3-óis (24-43%) e por fim os ácidos hidroxibenzoicos (22-33%).

Os MIPs foram sintetizados com os FV como moléculas alvo e deveriam ser mais específicos e seletivos para esses compostos, e eventualmente para moléculas estruturalmente semelhantes. Desta forma, no caso de reterem outros compostos, esperava-se que retivessem em maior proporção os ácidos hidroxicinâmicos, uma vez que são os seus precursores, do que os outros compostos presentes.

No entanto, os MIPs demonstraram maiores afinidades com os flavonóis (Tabela 8).

A capacidade de retenção dos compostos fenólicos por parte dos MIPS poderá ser aproveitada no futuro para utilização noutras áreas, por exemplo a nível da pré-concentração de matrizes complexas, ou beneficiar de extratos ricos neste tipo de compostos bioativos.

A influência dos MIPs a nível do perfil de compostos fenólicos não corados no vinho, foi reportada previamente, alguns autores publicaram estudos científicos sobre o efeito da aplicação dos MIPs a nível da especificidade e seletividade de determinados compostos flavonoides (197) e não flavonoides nos vinhos (213) e em matrizes alimentares (224).

Molinelli et al. (197), desenharam um MIP para servir como material de adsorção em SPE para a quercetina presente numa amostra de vinho tinto, obtendo-se taxas de retenção na ordem dos 98%.

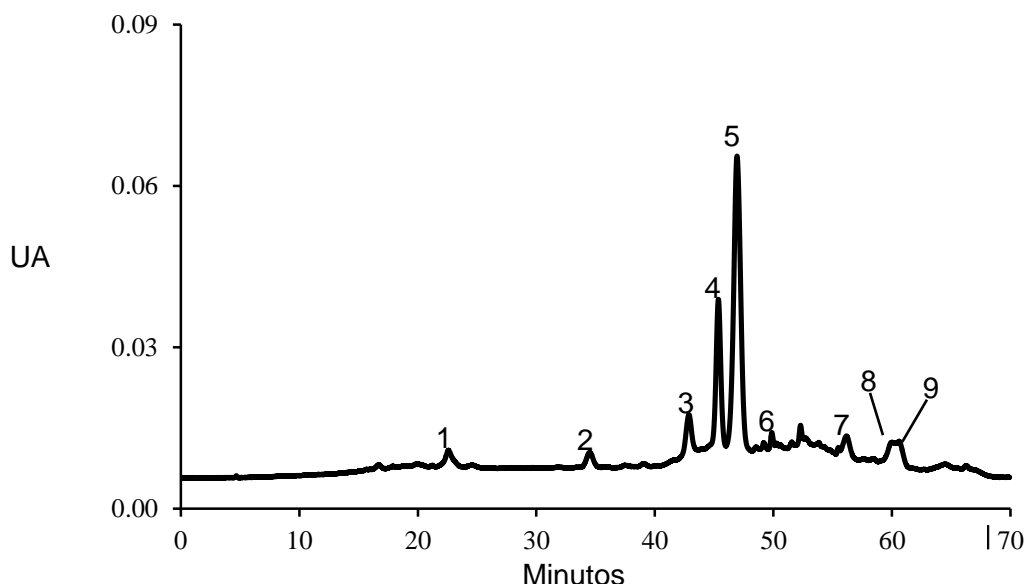
Num outro estudo, Chen et al. (213), desenvolveram um MIP para o reconhecimento seletivo do resveratrol em vinhos, obtendo-se taxas de retenção que oscilaram entre os 79-91%.

Castro-López e et al. (224) reportaram retenções na ordem dos 90 a 100% com a aplicação de MIPs para adsorção de catequinas de chá branco. A capacidade de retenção diminuiu para valores que rondavam os 50% em amostras de chá vermelho, verde, preto e cacau.

#### 4.2.2.2. Antocianinas

A cor dos vinhos tintos é o primeiro atributo a ser analisado pelos consumidores representando uma das mais importantes características sensoriais. As antocianinas são os compostos responsáveis pela cor vermelha/violeta dos vinhos tintos, especialmente nos vinhos jovens (253).

As antocianinas presentes nas amostras de vinho foram caracterizadas por HPLC/DAD, permitindo a identificação de 9 compostos: malvidina-3,5-O-diglucósido [1]; cianidina-3-O-glucósido [2]; cianidina-3-O-rutinósido [3]; peonidina-3-O-glucósido [4]; malvidina-3-O-glucósido [5]; delphinidina [6]; petunidina [7]; pelargonidina [8]; malvidina [9] (Figura 24). Todas as antocianinas identificadas neste trabalho já haviam sido previamente descritas em vinhos tintos (226)(254, 255).



**Figura 24.** Perfil cromatográfico das antocianinas da amostra de vinho controlo obtido por HPLC/DAD. Detecção a 500 nm. Compostos: (1) malvidina-3,5-O-diglucósido; (2) cianidina-3-O-glucósido; (3) cianidina-3-O-rutinósido; (4) peonidina-3-O-glucósido; (5) malvidina-3-O-glucósido; (6) delphinidina; (7) petunidina; (8) pelargonidina; (9) malvidina.

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que todas as amostras apresentavam um perfil semelhante (Tabela 9).

Do ponto de vista quantitativo, a amostra controlo destacou-se pelo maior conteúdo em antocianinas com um teor total de 170 mg/L. Os conteúdos totais obtidos para as amostras tratadas foram inferiores, obtendo-se 128,6; 129,1 e 139,4 mg/L nas amostras tratadas com MIP-4EF, MIP-4EG e NIP, respetivamente.

Todas as amostras apresentaram a malvidina-3-O-glucósido [5] como o composto maioritário, representando 69 a 77% do conteúdo total nas amostras analisadas. Este resultado vai de encontro ao obtido em trabalhos anteriores que haviam reportado, este composto como sendo o maioritário em uvas e vinhos tintos (226, 256).

**Tabela 9.** Antocianinas e taxas de retenção das amostras de vinho Controlo, MIP-4-EF, MIP-4EG e NIP.

Antocianinas <sup>1</sup>	Amostras <sup>2</sup>			
	Controlo (mg/L)	MIP-4EF (mg/L)	MIP-4EG (mg/L)	NIP (mg/L)
1	6,3±0,02 <sup>a</sup>	5,1±0,03 <sup>b</sup>	5,3±0,01 <sup>b</sup>	5,7±0,05 <sup>b</sup>
2	0,6±0,01 <sup>a</sup>	0,8±0,00 <sup>b</sup>	0,6±0,00 <sup>a</sup>	0,4±0,00 <sup>b</sup>
3	6,4±0,02 <sup>a</sup>	5,7±0,01 <sup>b</sup>	5,5±0,01 <sup>b</sup>	5,8±0,02 <sup>b</sup>
4	15,1±0,05 <sup>a</sup>	11,5±0,02	11,6±0,07 <sup>b</sup>	12,6±0,00 <sup>b</sup>
5	118,1±0,42 <sup>a</sup>	97,8±1,33 <sup>b</sup>	99,3±1,04 <sup>b</sup>	106,9±0,03 <sup>b</sup>
6	0,3±0,00 <sup>a</sup>	0,1±0,00 <sup>b</sup>	0,1±0,00 <sup>b</sup>	0,1±0,23 <sup>b</sup>
7	5,1±0,02 <sup>a</sup>	3,5±0,01 <sup>b</sup>	3,7±0,04 <sup>b</sup>	3,9±0,03 <sup>b</sup>
8	2,3±1,3 <sup>a</sup>	0,3±0,00 <sup>a</sup>	0,5±0,00 <sup>a</sup>	0,7±0,00 <sup>a</sup>
9	16,2±0,33 <sup>a</sup>	3,8±0,02 <sup>b</sup>	2,5±0,02 <sup>b</sup>	3,3±0,00 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>170,4</b>	<b>128,6</b>	<b>129,1</b>	<b>139,4</b>
<b>Retenção (%)</b>		<b>24,5</b>	<b>24,2</b>	<b>18,2</b>

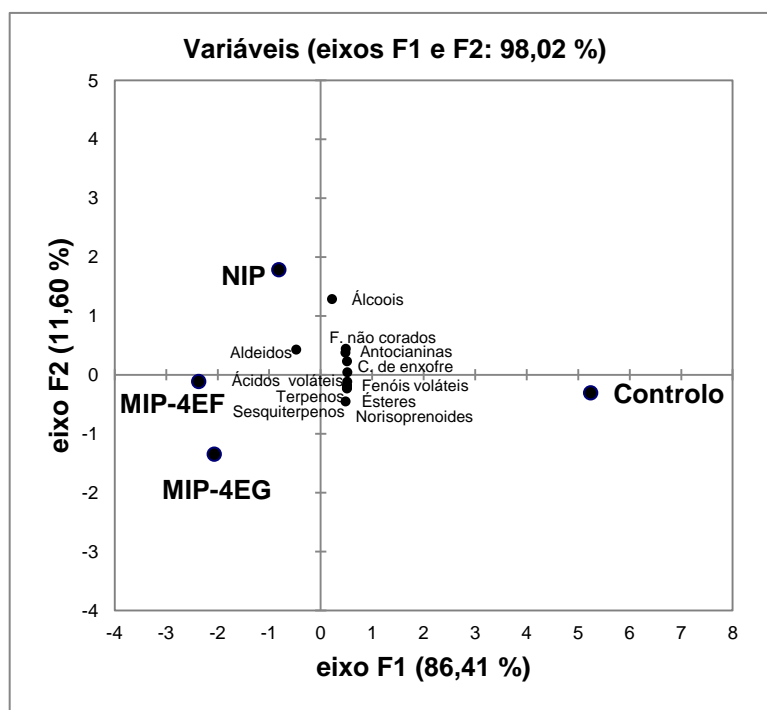
<sup>1</sup>Compostos identificados de acordo com a Figura 24. <sup>2</sup>Valores expressos em média ± desvio padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras diferentes correspondem a diferenças significativas relativamente ao controlo ( $p < 0.05$ ).

A quantificação das antocianinas revelou diferenças significativas entre as amostras tratadas e o controlo ( $p < 0.05$ ), verificando-se que o tratamento com os polímeros conduziu a reduções significativas a nível das antocianinas identificadas, com taxas de retenção que rondam os 24% para o MIP-4EF e MIP-4EG, e os 13 % para o NIP (Tabela 9).

Os resultados obtidos evidenciam a existência de alguma afinidade dos MIPs para este tipo de compostos. No entanto, quando comparados com as retenções obtidas para os compostos fenólicos não corados, estes valores foram consideravelmente inferiores.

### 4.3. Análise de componentes principais

Os resultados obtidos para as classes de compostos analisados foram tratados através de análise de componentes principais (PCA) de forma a avaliar a influência do tratamento com os polímeros no perfil metabólico do vinho tinto analisado. A Figura 25 apresenta a projeção das variáveis, agrupadas por classes químicas obtidas para as 4 amostras (Controlo, MIP-4EF, MIP-4EG e NIP) no plano composto pelos eixos principais F1 e F2, contendo 98,02% da variância total.



**Figura 25.** Diagrama dos componentes principais do perfil metabólico das amostras analisadas. As componentes 1 e 2 representaram 98,02 % da variância total.

A amostra controlo está projetada no plano formado pelo eixo F1 positivo e F2 negativo, devido à maior presença de FV, compostos fenólicos corados e não corados, ésteres, norisoprenoides, compostos de enxofre, terpenos, sesquiterpenos e ácidos gordos.

As amostras tratadas com MIP-4EF e MIP-4EG, surgem projetadas no plano formado pelo eixo F1 negativo e F2 negativo, devido ao seu maior conteúdo em aldeídos e menor conteúdo em FV, compostos fenólicos corados e não corados, ésteres, norisoprenoides, compostos de enxofre, terpenos e ácidos gordos.

Por último, a amostra tratada com NIP surge no plano formado pelos eixos F1 negativo e F2 positivo, de um modo geral esta amostra apresentou teores intermédios entre a amostra controlo e os MIPs.

As amostras tratadas com polímeros exibiram aumentos significativos nos teores de aldeídos e uma diminuição muito significativa nos teores em FV, ésteres, norisoprenoides, terpenos, sesquiterpenos e ácidos voláteis (Tabelas 6 e 7). No entanto, também contribuíram para uma diminuição dos teores em álcoois, antocianinas, compostos fenólicos não corados e compostos de enxofre (Tabelas 7, 8 e 9).

## V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no âmbito desta dissertação permitiram retirar as seguintes conclusões:

- Nas amostras de vinho tinto analisadas foram identificados 40 compostos voláteis, 17 compostos fenólicos não corados e 9 compostos fenólicos corados.
- A amostra controlo apresentou teores mais elevados em todas as classes químicas de compostos estudados, exceto para os aldeídos.
- Os tratamentos com os polímeros provocaram alterações consideráveis no perfil metabólico do vinho tinto analisado.
- O MIP-4EF demonstrou maior capacidade de retenção dos FV, considerando-se como o mais eficiente para o efeito pretendido.
- Os polímeros não apresentaram especificidade apenas para os FV, retendo também outros compostos voláteis, compostos fenólicos corados e não corados.
- Os polímeros apresentaram taxas de retenção superiores a 80% para os sesquiterpenos, norisoprenoides e flavonóis.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Navarre C. Enología-Técnicas de Produção do Vinho. n.º 137049/6763 ed: Publicações Europa - América, LDA.; 1997.
2. Rivero-Pérez MD, Muñiz P, González-Sanjosé ML. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(8):2815-22.
3. Oliveira C. Resistência de vinhos à oxidação: Universidade de Aveiro; 2006.
4. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdiou D. 2. Chimie Du Vin Stabilisation Et Traitements: Dunod, Paris; 1998.
5. Jackson RS. Wine Science: Principles, Practice, Perception. Second ed 1994.
6. Dohadwala MM, Vita JA. Grapes and Cardiovascular Disease. *The Journal of nutrition*. 2009;139(9):1788S-93S.
7. Friedman LA, Kimbal AW. Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. *American Journal of Epidemiology*. 1986;124:481-9.
8. Klatsky AL, Armstrong MA. Alcoholic beverage choice and risk of coronary artery disease mortality: do red wine drinkers fare best? *American Journal of Epidemiology*. 1993;73:467-9.
9. St-Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979;1:1017-20.
10. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potencial of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:493-506.
11. Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ*. 1996;312(731-736).
12. Di Castelnuovo A, S. R, Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*. 2002;105:2836-44.
13. Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA, Kipp H. Wine, liquor, beer and mortality. *American Journal of Epidemiology*. 2003;158:585-95.
14. López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Valle-Ribes CD. The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2003;43(2):233-44.
15. Beer D, Joubert E, Gelderblom WCA, Manley M. Phenolic Compounds: A Review of Their Possible Role as *In Vivo* Antioxidants of Wine. *S Afr J Enol Vitic*. 2002;23.
16. Odeh RM, Cornish LA. Natural antioxidants for the prevention of atherosclerosis. *Pharmacotherapy*. 1995;15:648-59.

17. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res.* 2004;24:851-74.
18. German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:561-93.
19. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007;18:567-79.
20. Pedroza MA, Carmona M, Alonso GL, Salinas MR, Zalacain A. Pre-bottling use of dehydrated waste grape skins to improve colour, phenolic and aroma composition of red wines. *Food Chemistry.* 2013;136(1):224-36.
21. Waterhouse AL. Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2002;957(1):21-36.
22. Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2005;45(2):85-118.
23. Soto ML, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering.* 2011;105(1):1-27.
24. Cheynier V, Duenas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet JM, Sarni-Manchado P, et al. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am J Enol Viticulture.* 2006;57:298-305.
25. García-Falcón MS, Pérez-Lamela C, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry.* 2007;105(1):248-59.
26. Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi Lv, Rotilio D, Pastore GM, et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry.* 2003;82(3):409-16.
27. Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J. Phenolic compounds in fruit processing. In *Fruit Phenolics.* 1990:295-358.
28. Lee CY, Jaworski A. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry.* 1987;35:257-9.
29. Singleton VL, Essau P. *Phenolic Substances in Grapes and Wine, and their Significance.* Academic Press, New York. 1969.
30. Schreier P. Flavor composition of wines: A review. *CRC Crit Rev Food Sci Nat.* 1979;12:59-111.
31. Yong-Sheng Tao HL. Active volatiles of cabernet sauvignon wine from Changli County.1:176-82.

32. Matějček D, Mikeš O, Klejdus B, Štěřbová D, Kubáň V. Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. *Food Chemistry*. 2005;90(4):791-800.
33. Harbone J, Dey P. *Plant biochemistry*. London 1997.
34. Bruneton J. Composés phénoliques, shikimates, acétates. In *Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales* Paris: Editions TEC & TOC. 1999.
35. [wine.wsu.edu/research-extension/2007/07/grape-and-wine-phenolics-a-primer/](http://wine.wsu.edu/research-extension/2007/07/grape-and-wine-phenolics-a-primer/).
36. Su CT, Singleton VL. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Pytochem*. 1969;8:1553-8.
37. Zou H, Kilmartin PA, Inglis MJ, Frost A. Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Aust J Grape Wine Res*. 2002;8:163-74.
38. Pozo-Bayón MA, Hernández MT, Martín-Álvarez PJ, Polo MC. Study of low molecular weight phenolic compounds during aging of sparkling wines manufactured with red and white grapes varieties. *J Agric Food Chem*. 2003;51:2080-95.
39. Moreno-Arribas M, Polo M. *Wine Chemistry and Biochemistry* Springer Science+Business Media New York. 2009:437-529.
40. Ong BY, Nagel CW. Hydroxycinnamic acid-tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of white riesling grapes. *Am J Enol Viticulture*. 1978;29:277-81.
41. Singleton VL, Zaya J, Trousdale E. Compositional changes in ripening grapes: caftaric and coutaric acids. *Vitis*. 1986;25:107-17.
42. Cheynier V, Moutounet M, Sarni-Manchado P. Les composés phénoliques. In: *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*. Collection Scientifiques et Techniques Agroalimentaires, Cood Claude Flanzly, Ed Lavoisier & Doc: Paris. 1998.
43. Singleton VL, Salgues M, Zaya J, Trousdale E. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wines. *Am J Enol Viticulture*. 1985;36:50-6
44. Cheynier V, Trousdale EK, Singleton VL, Salgues MJ, Wylde R. Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J Agric Food Chem*. 1986;34:217-21
45. Sarni-Manchado P, Fulcrand H, Souillol V, Souquet JM, Cheynier V. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *J Sci Food Agric*. 1995;69:385-91.

46. Cheynier V, Rigaud J. HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinasault. *Am J Enol Viticulture*. 1986;37:248-52.
47. Korhammer S, Reniero F, Mattivi F. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Pytochem*. 1995;38:1501-4.
48. Sandler M, Pinder R. *Wine, a Scientific Exploration* 2003.
49. Mattivi F, Reniero F, Korhammer S. Isolation, characterization and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1995;43:1820-3.
50. Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1996;44:1253-7.
51. Lamuela-Raventos RM, Romero-Perez AI, Waterhouse AL, de la Torre-Boronat MC. Direct HPLC Analysis of cis- and trans-Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red *Vitis vinifera* Wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1995;43(2):281-3.
52. Romero-Pérez AI, Lamuela-Raventós RM, Waterhouse AL, de la Torre-Boronat MC. Levels of cis- and trans-Resveratrol and Their Glucosides in White and Rosé *Vitis vinifera* Wines from Spain. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1996;44(8):2124-8.
53. Brutenon J. Composés phénoliques, shikimates, acétates. Editions TEC & DOC. ed: *In Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales*. Paris; 1999.
54. Monagas M. Evolución en botella de vinos tintos monovarietales y mezclas de *Vitis vinifera* L. Polifenoles y color. [Ph. D Thesis.]: Universidad Autónoma de Madrid, Spain.; 2004.
55. Harbone JB. *In Methods in plant biochemistry*. Dey, P.M. Harbone, J.B. ed1989.
56. Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am J Enol Viticulture*. 2001;52:67-87.
57. Jackson D. *Wine tasting: A professional Handbook*. San Diego, California 92101-4495, USA: Elsevier Academic Press; 2002.
58. Majo D, Guardia ML, Giammanco S, Neve L, Giammanco M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*. 2008;111:45-9.
59. Flint SD, Jorda PW, Caldwell MM. Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: Leaf optical properties of photosynthesis. *Photochem photobio*. 1985;41:95-9.
60. Asen S, Stewart RN, Norris KH. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*. 1972;11:1139-44.
61. Prince SF, Breen PJ, Vallado M, Watson BT. Cluster sun exposure and quercetin in pinot noir grapes and wines. *Am J Enol Viticulture*. 1995;46:187-94.

62. Haselgrove L, Botting D, van Heeswijck R, Høj PB, Dry PR, Ford C, et al. Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch sun exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries. *Aust J Grape Wine Res.* 2000;6:141-9.
63. McDonald MS, Hughes M, Burns J, Lean MEJ, Matthews D, Croziers A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem.* 1998;46:368-75.
64. Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. A-Type Proanthocyanidin Trimers from Cranberry that Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated *Escherichia coli*. *Journal of natural products.* 2000;63(9):1225-8.
65. Czochanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J Chem Soc* 1979;1:2278-86.
66. Whalley WB. *The Chemistry of Flavonoid Compounds.* Geissman TA, editor 1962.
67. Ricardo da Silva JM, Rosec JP, Bourzeix M, Heredia N. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high-performance reversed-phase liquid chromatography. *J Sci Food Agric.* 1990;53:85-92.
68. De Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Prodelphinidins and related flavanols in wine. *Int. J Food Sci Tech.* 2000;35:33-40.
69. Ritchey JG, Waterhouse AL. A standard red wine: monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines. *Am J Enol Viticulture.* 1999;50:91-100.
70. Porter LJ, Hirstich LN, Chang BG. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Pytochem.* 1986;25:223-30.
71. Waterhouse AL, Ignelzi S, Shirley JR. A Comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *Am J Enol Viticulture.* 2000;51:383-9.
72. Ribichaud JL, Noble AC. Astringency and bitterness of selected phenolic in wines. *J Sci Food Agric.* 1990;53:343-53.
73. Togores JH. *Tratado de enologia.* Ediciones Mundi-Prensa: Madrid ed2003.
74. Ricardo da Silva JM, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M, Cabanis JC, Bourzeix M. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J Sci Food Agric.* 1991;57:111-25.
75. Haslam E. In *Vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines.* *Pytochem.* 1980;16:1625-70.
76. Papoušková B, Bednář P, Hron K, Stávek J, Balík J, Myjavcová R, et al. Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic. *Journal of Chromatography A.* 2011;1218(42):7581-91.

77. Robinson WB, Weirs LD, Bertino JJ, Mattick LR. The relation of anthocyanin composition to color stability of New York State wines. *Am J Enol Viticulture*. 1966;17:178-84.
78. Wenzel K, Dittrich HH, Heimfarth M. Die Zusammensetzung der Anthocyane in den Beeren verschiedener Rebsorten. *Vitis*. 1987;26:65-78.
79. Mazza G, Minati E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, Grains. CRC Press BR, Florida USA, editor1993.
80. Brouillard R. Chemical structure of anthocyanins. . Markakis P, editor1982.
81. Glories Y. La couleur des vins rouges 2<sup>e</sup> partie: mesure, origine et interprétation. *Vin. CV*, editor1984.
82. Somers TC, Vérette E. Phenolic Composition of Natural Wine Types. In: Linskens H-F, Jackson J, editors. *Wine Analysis*: Springer Berlin Heidelberg; 1988. p. 219-57.
83. Gómez-Plaza E, Gil-Muñoz R, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A, Fernández-Fernández JI. Maintenance of Colour Composition of a Red Wine During Storage. Influence of Prefermentative Practices, Maceration Time and Storage. *LWT - Food Science and Technology*. 2002;35(1):46-53.
84. Somers TC, Wescombe LF. Red wine quality, the critical role of SO<sub>2</sub>, during vinification and conservation.1982.
85. Somers TC, Evans ME. Evolution of red grapes. I. Ambient influences on colour composition during early maturation.1986.
86. Mendes B, Gonçalves J, Câmara JS. Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines—A comparative study. *Talanta*. 2012;88(0):79-94.
87. Garde-Cerdán T, Jarauta I, Salinas M, Ancín-Azpilicueta C. Comparative study of the volatile composition in wines obtained from traditional vinification and from the Ganimede method. *Journal of the science of food and agriculture*. 2008;88(10):1777-85.
88. Rapp A, Mandery H. Wine aroma. *Experientia*. 1986;42(8):873-84.
89. Ebeler SE, Thorngate JH. Wine Chemistry and Flavor: Looking into the Crystal Glass. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(18):8098-108.
90. Zalacain A, Marín J, Alonso GL, Salinas MR. Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*. 2007;71(4):1610-5.
91. Paula Barros E, Moreira N, Elias Pereira G, Leite SGF, Moraes Rezende C, Guedes de Pinho P. Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines. *Talanta*. 2012;101(0):177-86.

92. Martí MP, Mestres M, Sala C, Busto O, Guasch J. Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry Analysis of Successively Diluted Samples. A New Approach of the Aroma Extract Dilution Analysis Applied to the Characterization of Wine Aroma. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(27):7861-5.
93. Vilanova M, Martínez C. First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* cv. Castañal grown in Galicia (NW Spain). *Eur Food Res Technol*. 2007;224(4):431-6.
94. Gómez-Míguez MJ, Cacho JF, Ferreira V, Vicario IM, Heredia FJ. Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*. 2007;100(4):1464-73.
95. Sponholz WR. Alcohols Derived from Sugars and Other Sources and Fullbodiedness of Wines. In: Linskens H-F, Jackson J, editors. *Wine Analysis*: Springer Berlin Heidelberg; 1988. p. 147-72.
96. Amerine MA, Roessler EB. *Wines, Their Sensory Evaluation*. Freeman, editor. New York 1980.
97. Strauss Christopher R, Wilson B, Gooley Paul R, Williams Patrick J. Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. *Biogenesis of Aromas: American Chemical Society*; 1986. p. 222-42.
98. De Pinho PG, Falqué E, Castro M, E Silva HO, Machado B, Ferreira ACS. Further Insights into the Floral Character of Touriga Nacional Wines. *Journal of food science*. 2007;72(6):S396-S401.
99. Gunata YZ, Bayonove CL, Tapiero C, Cordonnier RE. Hydrolysis of grape monoterpenyl .beta.-D-glucosides by various .beta.-glucosidases. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1990;38(5):1232-6.
100. Dugelay I, Gunata Z, Sapis JC, Baumes R, Bayonove C. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1993;41(11):2092-6.
101. Araújo I. Características aromáticas e cromáticas das castas Amaral e Vinhão. [Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia.]. Porto: Universidade do Porto; 2004.
102. Masson G, Guichard E, Fournier N, Puech JL. Teneurs en stéréo-isomères de la  $\beta$ -méthyl- $\gamma$ -octalactone des bois de chêne européens et américaines. Application aux vins et aux eaux-de-vie. *J Sci Tech Tonnellerie*. 1997;3:1-8.
103. Silva Ferreira AC, Guedes de Pinho P. Nor-isoprenoids profile during port wine ageing—influence of some technological parameters. *Analytica chimica acta*. 2004;513(1):169-76.
104. Botelho GMdA. Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonez and Trincadeira *Vitis vinifera* L.cultivars. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2008.

105. Riu-Aumatell M, López-Barajas M, López-Tamames E, Buxaderas S. Influence of Yield and Maturation Index on Polysaccharides and Other Compounds of Grape Juice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(16):4604-7.
106. Pueyo E, Martínez-Rodríguez A, Polo MC, Santa-María G, Bartolomé B. Release of Lipids during Yeast Autolysis in a Model Wine System. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1999;48(1):116-22.
107. Escudero A, Gogorza B, Melús MA, Ortín N, Cacho J, Ferreira V. Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(11):3516-24.
108. Marais J. The Significance of 1,1,6-Trimethyl-1,2- Dihydronaphthalene in the Production of High Quality Riesling Wines. *Carotenoid-Derived Aroma Compounds: American Chemical Society*; 2001. p. 273-84.
109. Correia CAC. *Espectroscopia de infravermelho na análise de mostos e vinhos: Universidade de Aveiro*; 2011.
110. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. The Grape and its Maturation. *Handbook of Enology: John Wiley & Sons, Ltd*; 2006. p. 241-97.
111. Castro Mejías R, Natera Marín R, de Valme García Moreno M, García Barroso C. Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A*. 2003;995(1–2):11-20.
112. Cabrita MJ, Palma V, Patão R, Costa Freitas AM. The conversion of hydroxycinnamic acids into volatile phenols (in a synthetic medium and in red wines) by *Dekkera bruxellensis*. 2012.
113. Suárez R, Suárez-Lepe JA, Morata A, Calderón F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*. 2007;102(1):10-21.
114. Chatonnet P, Dubourdie D, Boidron J-n, Pons M. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the science of food and agriculture*. 1992;60(2):165-78.
115. Ávila L. *Estudo de Brettanomyces/Dekkera e Etil-Fenóis Em Vinhos Tintos Brasileiros: Universidade Federal do Rio Grande do Sul* 2010.
116. Fugelsang K, Edwards C. *Wine Microbiology. UK: The Chapman & Hall Enology Library*; 2007.
117. Chatonnet P, Boidron JN, Dubourdieu D. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en éthyl-phénols. *J Int Sci Vigne Vin*. 2003;27:277-98.
118. Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. Spoilage yeasts in the wine industry. *International journal of food microbiology*. 2003;86(1–2):23-50.

119. Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production. *S Afr J Enol Vitic.* 2006;27:15-39.
120. Oelofse A, Pretorius IS, du Toit M. Significance of Brettanomyces and Dekkera during Winemaking: A Synoptic Review. *S Afr J Enol Vitic.* 2008;29.
121. Chatonnet P, Viala C, Dubourdieu D. Influence of Polyphenolic Components of Red Wines on the Microbial Synthesis of Volatile Phenols. *American journal of enology and viticulture.* 1997;48(4):443-8.
122. Dias L, Dias S, Sancho T, Stender H, Querol A, Malfeito-Ferreira M, et al. Identification of yeasts isolated from wine related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology.* 2003;20:565-74.
123. Martorell P, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Fernández-Espinar MT, Loureiro V, Querol A. Molecular typing of the yeast species Dekkera bruxellensis and Pichia guilliermondii recovered from wine related sources. *International journal of food microbiology.* 2006;106(1):79-84.
124. Couto JA, Campos FM, Figueiredo AR, Hogg T. Ability of Lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *Am J Enol Viticulture.* 2006;57:166-71.
125. Suezawa Y, Suzuki M. Bioconversion of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol and 4-Ethylguaiacol and of 4-Vinylguaiacol to 4-Ethylguaiacol by Halotolerant Yeasts Belonging to the Genus *Candida*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 2007;71(4):1058-62.
126. Sangorrín M, Lopes C, Jofré V, Querol A, Caballero A. Spoilage yeasts from Patagonian cellars: characterization and potential biocontrol based on killer interactions. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24(7):945-53.
127. Barata A, Nobre A, Correia P, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Growth and 4-ethylphenol production by the yeast Pichia guilliermondi in grape juices. *Am J Enol Viticulture.* 2006;57:133-8.
128. Chatonnet P, Boidron JN, Pons M. Maturation of red wines in oak barrels: evolution of some volatile compounds and their aromatic impact. *Science des Aliments.* 1990;10:565-87.
129. Silva LsR, Andrade PB, Valentão Pc, Seabra RM, Trujillo ME, Velázquez E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of Dekkera bruxellensis yeast. *Food Chemistry.* 2005;89(2):185-9.
130. Dias L, Pereira-da-Silva S, Tavares M, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast Dekkera bruxellensis in enological conditions. *Food Microbiology.* 2003;20:377-84.

131. Licker JL, Acree TE, Henick-Kling T. What Is "Brett" (*Brettanomyces*) Flavor?: A Preliminary Investigation. *Chemistry of Wine Flavor*: American Chemical Society; 1998. p. 96-115.
132. Gerbeaux V, Jeudy S, Monamy C. Study of phenol volatiles in Pinot noir wines in Burgundy. *Bulletin de l'OIV*. 2000;73:581-99.
133. Barata A, Pagliara D, Piccininno T, Tarantino F, Ciardulli W, Malfeito-Ferreira M, et al. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS yeast research*. 2008;8(7):1097-102.
134. Gerbeaux V, Vincent B, Bertrand A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines. *American journal of enology and viticulture*. 2002;53:131-7.
135. Pérez-Prieto LJ, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A, Pardo-Mínguez F, Gómez-Plaza E. Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51:5444-9.
136. Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*. 2000;63:976-81.
137. Teoh, Leng A, Heard G, Cox J. Yeast ecology of kombucha fermentation. *International journal of food microbiology*. 2004;95:119-26.
138. Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. *Dekkera/Brettanomyces* spp. *Food Spoilage microorganisms*. Abington, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd; 2006. p. 353-98.
139. Gilliland RB. BRETTANOMYCES. I. OCCURRENCE, CHARACTERISTICS, AND EFFECTS ON BEER FLAVOUR. *Journal of the Institute of Brewing*. 1961;67(3):257-61.
140. Krumbholz G, Tauschanoff W. *Mycotorula intermedia* n. sp., ein Beitrag zur Kenntnis der Gärungserreger im Wein. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abteilung*. 1933;88.
141. Custers MTJ. Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*. [PhD Thesis]. The Netherlands: Delft University Delft; 1940.
142. Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Zironi R, Comi G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wine. *Applied Environmental Microbiology*. 2004;70:1347-55.
143. Alguacil M, Fidalgo M, Jimenez J, Lozano J, Neva M, Perdigonos F. Detección de *Dekkera/Brettanomyces* en instalaciones de vendimia mediante PCR. *Alimentos Equipos y Tecnología*. 1998;10:81-5.

144. Heresztyn T. Formation of Substituted Tetrahydropyridines by Species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* Isolated from Mousy Wines. *American journal of enology and viticulture*. 1986;37(2):127-32.
145. Wright J, Parle I. *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry. *New Zealand Journal of Agriculture Research*. 1974;17:273-8.
146. Fugelsang KC. Wine microbiology. In: London. CSUaFCH, editor. 1996.
147. Du Toit WJ, Pretorius IS, Lonvaud-Funel A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;98(4):862-71.
148. Silva LR. Caracterización de los microorganismos presentes en vinos tintos de la región del Dão en Portugal. Identificación de los microorganismos productores de fenoles volátiles. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2004.
149. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5 ed 2011.
150. Zuehlke JM, Petrova B, Edwards CG. Advances in Control of Wine Spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:57-78.
151. Fugelsang KC, Zoecklein BW. Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *American journal of enology and viticulture*. 2003;54(4):294-300.
152. Oelofse A, Lonvaud-Funel A, du Toit M. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology*. 2009;26(4):377-85.
153. Ciani M, Maccarelli F, Fatichenti F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World J Microbiol Biotechnol*. 2003;19:419-22.
154. Caruso M, Fiore C, Contursi M, Salzano G, Paparella A, Romano P. Formation of biogenic amines: criteria for the selection of wine yeasts. *World J Microbiol Biotechnol*. 2002;69:323-8.
155. Mittrakul CM, Henick-Kling T, Egli CM. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DN finger-printing methods. *Journal of Food Microbiology*. 1999;16:3-14.
156. Snowdon EM, Bowyer MC, Grbin PR, Bowyer PK. Mousy Off-Flavor: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(18):6465-74.
157. Aguilar Uscanga MG, Délia ML, Strehaiano P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61(2):157-62.

158. Freer SN, Dien B, Matsuda S. Production of acetic acid by Dekkera/Brettanomyces yeasts under conditions of constant pH. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003;19(1):101-5.
159. Van der Walt JP, Van Kerken AE. The wine yeast of the Cape. Part I. A taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines. . *Antoine van Leeuwenhoek.* 1958;24:239-52.
160. Mansfield AK, Zoecklein BW, Whiton RS. Quantification of Glycosidase Activity in Selected Strains of Brettanomyces bruxellensis and Oenococcus oeni. *American journal of enology and viticulture.* 2002;53(4):303-7.
161. Fia G, Giovani G, Rosi I. Study of b-glucosidase production by wine related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J Appl Microbiol.* 2005;99:509-17.
162. Morata A, González C, Suárez-Lepe JA. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *International journal of food microbiology.* 2007;116:144-52.
163. Gafner J. Biological Stability of Wine and Biogenic Amines. In: Proc. 32<sup>nd</sup>. Annual New York Wine Industry Workshop. 2003:74-80.
164. Connel L, Stender H, Edwards CG. Rapid detection and identification of Brettanomyces from winery air samples based in peptide nucleic acid analysis. *Am J Enol Viticulture.* 2002;53:24-7.
165. Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ, Henick-Kling T, Bisson LF. Genetic and physiological characterization of Brettanomyces bruxellensis strains isolated from wines. *Am J Enol Viticulture.* 2006;57:139-47.
166. Pretorius IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 2000;16(8):675-729.
167. Renouf V, Falcou M, Miot-Sertier C, Perello MC, De Revel G, Lonvaud-Funel A. Interactions between Brettanomyces bruxellensis and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology.* 2006;100(6):1208-19.
168. Malfeito-Ferreira M, Laureano P, Barata A, D'Antuono I, Stender H, Loureiro V. Effect of different barrique sanitation procedures on yeasts isolated from the inner layers of wood. *American journal of enology and viticulture.* 2004;55.
169. Park, Won S, Hong, Ki Y, Kim, Wook S, et al. Ethanol production by an immobilized thermotolerant mutant of Brettanomyces custersii HI-39 from wood hydrolyzate media. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.* 2000;28:172-9.
170. Lonvaud-Funel A, Renouf V. Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barriques usagées. . *Revue Française d'Oenologie.* 2005;211:10-3.

171. Loureiro V. Subtilezas aromáticas dos vinhos de qualidade. *Revista dos vinhos*. 1996;42-6.
172. Chatonnet P, Dubourdieu D, Boidron JN. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American journal of enology and viticulture*. 1995;46:463-72.
173. Yap A, Jiranek V, Grbin P, Barnes M, Bates D. Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection. *J Aus Wine Ind*. 2007;22:96-104.
174. Garde-Cerdan T, Lorenzo C, Carot JM, Esteve MD, Climent MD, Salinas MR. Effects of composition, storage time, geographic origin and oak type on the accumulation of some volatile oak compounds and ethylphenols in wines. *Food Chemistry*. 2010;122:1076-82.
175. Murat ML, Dumeau F. Impact of fining on population levels of certain spoilage micro-organisms in red wines. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*. 2003;478:92-4.
176. Ruiz-Hernández M. Casein for correction of defects caused by *Brettanomyces* and *Dekkera*. *Semana Vitivinícola*. 2003;58:1462-3.
177. Millet V, Lonvaud-Funel A. The viable but non culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in applied microbiology*. 2000;30:136-41.
178. Caldéron F, Morata A, Uthurry C, Suárez JA. Aplicaciones de la ultrafiltración en la industria enológica. Últimos avances tecnológicos. *Tecnología del vino*. 2004;16:49-54.
179. Delfini C, Gaia P, Schellino R, Strano M, Pagliara A, Ambro S. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50:5605-11.
180. Gómez-Rivas L, Escudero-Abarca BI, Aguilar Uscanga MG, Hayward-Jones PM, Mendonza P, Ramírez M. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *J Ind Microbiol Biotech*. 2004;31:16-22.
181. Renouf V, Strehaiano P, Lonvaud-Funel A. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*. 2007;19:208-16.
182. Puig A, Vilavella M, Daoudi L, Guamis B, Minguez S. Microbiological and biochemical stabilization of wines by application of high pressure processing. *Bull de l'OIV*. 2003;76:596-617.
183. Toit M, Pretorius IS. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2000;21:74-92.

184. Guilloux-Benatier M, Chassagne D, Alexandre H, Carpenter C, Feuillat M. Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of "Brettanomyces/Dekkera" in wine. *J Int Sci Vigne Vin*. 2001;35:157-64.
185. Pollnitz AP, Pardon KH, Sefton MA. Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *Journal of Chromatography A*. 2000;874:101-9.
186. Ugarte P, Agosin E, Bordeu E, Villalobos J. Reduction of 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol Concentration in Red Wines Using Reverse Osmosis and Adsorption. *American journal of enology and viticulture*. 2005;56:30-6.
187. Chassagne D, Giulloux-Benatier M, Alexandre H, Voilley A. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry*. 2005;91:39-44.
188. Pradelles R, Alexandre H, Ortiz-Julien A, Chassagne D. Effects of yeast cell-wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56:11854-61.
189. Pradelles R, Vichi S, Alexandre H, Chassagne D. Influence of the drying processes of yeasts on their volatile phenol sorption capacity in model wine. *International journal of food microbiology*. 2009;135:152-7.
190. Larcher R, Puecher C, Rohregger S, Malacarne M, Nicolini G. 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol depletion in wine using esterified cellulose. *Food Chemistry*. 2012;132(4):2126-30.
191. Andersson LI. Molecular imprinting for drug bioanalysis: A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000;739(1):163-73.
192. Euterpio MA, Pagano I, Piccinelli AL, Rastrelli L, Crescenzi C. Development and Validation of a Method for the Determination of (E)-Resveratrol and Related Phenolic Compounds in Beverages Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;61(8):1640-5.
193. Lachová M, Lehotay J, Skacáni I, Jozef C. Study of Selectivity of Molecularly Imprinted Polymers Prepared Under Different Conditions. *Journal of Chromatographic Science*. 2010;48(5):395-8.
194. Ramström O, Mosbach K. Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1999;3(6):759-64.
195. Vasapollo G, Sole RD, Mergola L, Lazzoi MR, Scardino A, Scorrano S, et al. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(9):5908-45.
196. Puoci F, Cirillo G, Curcio M, Iemma F, Spizzirri UG, Picci N. Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of alpha-tocopherol in bay leaves. *Analytica chimica acta*. 2007;593(2):164-70.

197. Molinelli A, Weiss R, Mizaikoff B. Advanced Solid Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymers for the Determination of Quercetin in Red Wine. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(7):1804-8.
198. Lehotay J, Lachová M, Mocák J. Imprinted Polymers in Analytical Chemistry. *Nova Biotechnologica*. 2009:341-7.
199. Garde-Cerdán T, Zalacain A, Lorenzo C, Alonso JL, Salinas MR. Molecularly Imprinted Polymer-Assisted Simple Clean-Up of 2,4,6-Trichloroanisole and Ethylphenols from Aged Red Wines. *American journal of enology and viticulture*. 2008;59(4):396-400.
200. Farrington K, Regan F. Investigation of the nature of MIP recognition: The development and characterisation of a MIP for Ibuprofen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(6):1138-46.
201. Morelli I, Chiono V, Vozzi G, Ciardelli G, Silvestri D, Giusti P. Molecularly imprinted submicronspheres for applications in a novel model biosensor-film. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010;150(1):394-401.
202. Scorrano S, Mergola L, Del Sole R, Vasapollo G. Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers for Amino Acid Derivates by Using Different Functional Monomers. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(3):1735-43.
203. Longo L, Vasapollo G. Molecularly Imprinted Polymers as Nucleotide Receptors. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2008;5(3):163-70.
204. Sellergren B. Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1999;18(3):164-74.
205. Shi X, Wu A, Qu G, Li R, Zhang D. Development and characterisation of molecularly imprinted polymers based on methacrylic acid for selective recognition of drugs. *Biomaterials*. 2007;28(25):3741-9.
206. Haginaka J. Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. *Journal of Chromatography B*. 2008;866(1-2):3-13.
207. Schirmer C, Meisel H. Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Polymers (MIP) with Affinity for the Polypeptide Nisin. *Food Anal Methods*. 2009;2(4):257-63.
208. Xu L, Qiao X, Ma Y, Zhang X, Xu Z. Preparation of a Hydrophilic Molecularly Imprinted Polymer and Its Application in Solid-Phase Extraction to Determine of Trace Acrylamide in Foods Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal Methods*. 2013;6(3):838-44.
209. Tamayo FG, Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*. 2007;1152(1-2):32-40.

210. Piletsky SA, Turner NW, Laitenberger P. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics—Future potential and existing problems. *Medical Engineering & Physics*. 2006;28(10):971-7.
211. Zhu S, Hu F, Yang T, Gan N, Pan D, Cao Y, et al. Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer for the determination of trace tributyltin in seawater and seafood by liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatography B*. 2013;921–922(0):21-6.
212. Li W, Li S. *Molecular Imprinting: A Versatile Tool for Separation, Sensors and Catalysis. Oligomers - Polymer Composites - Molecular Imprinting*: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 191-210.
213. Chen F-F, Xie X-Y, Shi Y-P. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for selective recognition of resveratrol in wine. *Journal of Chromatography A*. 2013;1300(0):112-8.
214. Maier NM, Buttinger G, Welhartizki S, Gavioli E, Lindner W. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. *Journal of Chromatography B*. 2004;804(1):103-11.
215. Longo L, Vasapollo G. Phthalocyanine-Based Molecularly Imprinted Polymers as Nucleoside Receptors. *Metal-Based Drugs*. 2008;2008.
216. Tamayo FG, Casillas JL, Martin-Esteban A. Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecularly imprinted polymers. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005;381(6):1234-40.
217. Baggiani C, Anfossi L, Giovannoli C. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Analytica chimica acta*. 2007;591(1):29-39.
218. Martin-Esteban A, Tadeo JL. Selective molecularly imprinted polymer obtained from a combinatorial library for the extraction of bisphenol A. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2006;9:747,51.
219. Dirion B, Cobb Z, Schillinger E, Anderson LI, Sellergren B. Water-compatible molecularly imprinted polymers obtained via high-throughput synthesis and experimental design. *J Am Chem Soc*. 2003;125(15101-15109).
220. Piletsky SA, Andersson HS, Nicholls IA. Combined Hydrophobic and Electrostatic Interaction-Based Recognition in Molecularly Imprinted Polymers. *Macromolecules*. 1999;32(3):633-6.
221. Sun H-w, Qiao F-x. Recognition mechanism of water-compatible molecularly imprinted solid-phase extraction and determination of nine quinolones in urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1212(1–2):1-9.

222. Singh M, Kumar A, Tarannum N. Water-compatible 'aspartame'-imprinted polymer grafted on silica surface for selective recognition in aqueous solution. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013;405(12):4245-52.
223. Urraca JL, Moreno-Bondi MC, Hall AJ, Sellergren B. Direct Extraction of Penicillin G and Derivatives from Aqueous Samples Using a Stoichiometrically Imprinted Polymer. *Analytical Chemistry*. 2006;79(2):695-701.
224. Castro López MM, Cela-Pérez C, Dopico-García MS, López Vilariño JM, González Rodríguez MV, Barral-Losada LF. Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins. *Analytica chimica acta*. 2012;721:68-78.
225. Cela-Pérez MC, Castro-López MM, Lasagabáster-Latorre A, López-Vilariño JM, González-Rodríguez MV, Barral-Losada LF. Synthesis and characterization of bisphenol-A imprinted polymer as a selective recognition receptor. *Analytica chimica acta*. 2011;706(2):275-84.
226. Valentão P, Seabra RM, Lopes G, Silva LR, Martins V, Trujillo ME, et al. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*. 2007;100(1):64-70.
227. Silva ASGd. Avaliação dos compostos voláteis e fenólicos ao longo da vinificação: Universidade de Aveiro; 2012.
228. Zhang M, Xu Q, Duan C, Qu W, Wu Y. Comparative Study of Aromatic Compounds in Young Red Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, and Cabernet Gernischt Varieties in China. *Journal of food science*. 2007;72(5):C248-C52.
229. Loizzo MR, Bonesi M, Di Lecce G, Boselli E, Tundis R, Pugliese A, et al. Phenolics, Aroma Profile, and In Vitro Antioxidant Activity of Italian Dessert Passito Wine from Saracena (Italy). *Journal of food science*. 2013;78(5):C703-C8.
230. Perestrelo R, Barros AnS, Câmara JS, Rocha SIM. In-Depth Search Focused on Furans, Lactones, Volatile Phenols, and Acetals As Potential Age Markers of Madeira Wines by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry Combined with Solid Phase Microextraction. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(7):3186-204.
231. Kennison KR, Gibberd MR, Pollnitz AP, Wilkinson KL. Smoke-Derived Taint in Wine: The Release of Smoke-Derived Volatile Phenols during Fermentation of Merlot Juice following Grapevine Exposure to Smoke. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(16):7379-83.
232. Santos RSF. Estágio de um vinho tinto em barricas de madeira com diferentes tostas, provenientes da mesma tanoaria: Efeitos na composição química e análise sensorial.: Instituto Superior de Agronomia: Universidade Técnica de Lisboa.; 2011.

233. Sun Q, Gates MJ, Lavin EH, Acree TE, Sacks GL. Comparison of Odor-Active Compounds in Grapes and Wines from *Vitis vinifera* and Non-Foxy American Grape Species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(19):10657-64.
234. Sumbly KM, Grbin PR, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*. 2010;121(1):1-16.
235. Moreira N, Guedes de Pinho P, Santos C, Vasconcelos I. Volatile sulphur compounds composition of monovarietal white wines. *Food Chemistry*. 2010;123(4):1198-203.
236. Rauhut D. Production of sulphur compounds. Chapter 6. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Suíça: Harwood Academic Publishers; 1993.
237. Gallart M, Francioli S, Viu-Marco A, López-Tamames E, Bruxaderas S. Determination of free fatty acids and their methyl esters in musts and wines. *Journal of chromatography A*. 1997;776:283-91.
238. Tao YS, Li H, Wang HC, Zhang L. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China). *J Food Compos Anal*. 2008;21:689-94.
239. Jiang B, Zhang Z. Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China. *Molecules*. 2010;15(12):9184-96.
240. Azzara CD, Campbell LB. Off-flavors of dairy products. In *Off-flavors in foods and beverages*, Charalambous, G. Elsevier E, editor. Amsterdam 1992.
241. Culleré L, Cacho J, Ferreira V. An Assessment of the Role Played by Some Oxidation-Related Aldehydes in Wine Aroma. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(3):876-81.
242. Dziadas M, Jeleń HH. Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach. *Analytica chimica acta*. 2010;677(1):43-9.
243. Chen B, Teranishi R, Kawazoe K, Takaishi Y, Honda G, Itoh M, et al. Sesquiterpenoids from *Ferula kuhistanica*. *Phytochemistry*. 2000;54(7):717-22.
244. Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004;68(3):538-59.
245. Petronilho SL. Caracterização da fracção sesquiterpénica de populações de camomila (*Matricaria recutita* L.). Universidade de Aveiro; 2008.
246. Gonçalves OdCQ. Pesquisa de compostos terpénicos do bagaço de *Vitis vinifera* L.. Estabelecimento de bases químicas e biológicas para o desenvolvimento de estratégias conducentes à sua valorização como produto de valor acrescentado.: Universidade de Aveiro; 2009.

247. Baumes R, Wirth J, Bureau S, Gunata Y, Razungles A. Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica chimica acta*. 2002;458(1):3-14.
248. Vinholes J, Coimbra MA, Rocha SM. Rapid tool for assessment of C13 norisoprenoids in wines. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(47):8398-403.
249. Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, Cayuela JM, Martínez-Cachá A, Pardo F, et al. Changes during Storage in Conventional and Ecological Wine: Phenolic Content and Antioxidant Activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(16):4694-700.
250. Andrade PB, Mendes G, Falco V, Valentão P, Seabra RM. Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties. *Food Chemistry*. 2001;73:397-9.
251. Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1994;42(1):64-9.
252. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, et al. Reduced Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice Following Consumption of Red Wine, or Its Polyphenols Quercetin or Catechin, Is Associated With Reduced Susceptibility of LDL to Oxidation and Aggregation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(11):2744-52.
253. Oliveira J, Silva MA, Parola AJ, Mateus N, Brás NF, Ramos MJ, et al. Structural characterization of A-type linked trimeric anthocyanin derived pigment occurring in a young Port wine. *Food Chemistry*. 2013.
254. Ortiz J, Marín-Arroyo M-R, Noriega-Domínguez M-J, Navarro M, Arozarena I. Color, Phenolics, and Antioxidant Activity of Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), Blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and Apple Wines from Ecuador. *Journal of food science*. 2013;78(7):C985-C993.
255. Pinho C, Melo A, Mansilha C, Ferreira IMPLVO. Optimization of Conditions for Anthocyanin Hydrolysis from Red Wine Using Response Surface Methodology (RSM). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;59(1):50-5.
256. Mateus N, Machado JM, de Freitas V. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the science of food and agriculture*. 2002;82(14):1689-95.