

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Valorização da casta Vinhão através das suas características
fitoquímicas**

- Versão Definitiva -

Dissertação de Mestrado em Enologia

Sandra da Piedade da Silva Brás

***Orientador:* Professora Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros**

***Coorientador:* Engenheiro Jorge Sousa Pinto**



Vila Real, 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Valorização da casta Vinhão através das suas características
fitoquímicas**

- Versão Definitiva -

Dissertação de Mestrado em Enologia

Sandra da Piedade da Silva Brás

Orientador: Professora Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros

Coorientador: Engenheiro Jorge Sousa Pinto

Vila Real, 2017

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.*

Não sou o que deveria ser,

mas Graças a Deus,

não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Ana Isabel Barros, a professora de eleição do meu mestrado, pelo seu apoio, orientação e dedicação como orientadora, muito obrigada.

Ao meu co-orientador Engenheiro Jorge Pinto pela disponibilidade e apoio e pelo facto de ter aceite a co-orientação da minha dissertação.

Ao Engenheiro António Cerdeira e a toda a equipa da CVRVV (Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes), que contribuíram na análise de toda a amostragem em estudo à Doutora Patrícia Porto pela simpatia e disponibilidade.

À minha família, em especial às minhas primas Marisa e Flávia pelo companheirismo e amizade, aos meus irmãos por estarem sempre presentes. À minha afilhada que foi uma bênção de Deus, que me veio dar forças e coragem. Aos meus pais, não podia deixar de lhes agradecer, a educação, os valores que me transmitiram. Ensinaram-me a ser persistente, ter coragem, ser lutadora e acreditar sempre nos meus sonhos, esta dissertação é para vocês.

A todos os meus amigos, em especial ao Tiago, Fábio e Irene, que disponibilizaram o seu tempo com uma palavra amiga de incentivo para a conclusão desta etapa. À Joana Pinto a minha “companheira de batalha”, sem ela tudo teria sido mais difícil, obrigada pelo apoio, pelas viagens partilhadas, pelos desabafos e pelos momentos de alegrias.

A toda a equipa da Adega Santa Cristina, ao Senhor António Pinto por ter disponibilizado as instalações para a recolha da amostragem, ao Bernardino pela disponibilidade e ajuda e a toda a equipa.

Aos colegas de laboratório em especial ao André e ao Nelson pelo apoio com as sábias explicações, à Iva pela simpatia e amabilidade, à Manuela pela sua disponibilidade.

À Lolita, ao Bobby e Bidu que com o seu carinho especial me motivam todos os dias.

A realização e concretização desta dissertação não teria sido possível sem o apoio de todos vocês, muito obrigada.

Resumo

A produção de vinho é considerada uma parte fundamental e essencial da cultura europeia, sendo a Europa a maior produtora de vinhos e exportadora de produtos vitivinícolas a nível mundial. Portugal tem contribuído para esse crescimento nomeadamente com na produção de Vinhos Verdes.

A produção de Vinhos Verdes é única, de notável interesse pela sua tipicidade e autenticidade devido às características únicas do vinho, frescura e jovialidade.

O Vinho Verde Tinto, produzido a partir da casta Vinhão tem vindo a ser comercializado como monocasta, mas ao longo dos últimos anos tem se verificado uma quebra na produção devido às suas características organoléticas e tendências de mercado.

Neste trabalho fez-se uma análise detalhada da casta Vinhão, efetuou-se a recolha da amostragem em diferentes fases, inicialmente a recolha dos bagos de uva, após a vinificação recolheu-se o engaço, após a vinificação foram recolhidas três amostras de mosto, um primeiro mosto recolhido do lagar no primeiro dia de vinificação (M1), o segundo mosto igual ao M1 mas pasteurizado de imediato (MP), e um terceiro mosto recolhido no terceiro dia de fermentação (M2) e o vinho no final do processo de vinificação da casta em estudo, cultivada na Região Demarcada dos Vinhos Verdes. Posteriormente em laboratório pelo processo de maceração da uva (*Vitis vinifera* L.) separou-se a película da polpa e o engaço foi seco e moído para facilitar a extração dos compostos fenólicos.

Para todas as amostras avaliou-se o conteúdo polifenólico particularmente os fenóis totais, *orto*-difenóis, flavonóides e antocianinas, analisou-se igualmente a atividade antiradicalar desta casta por dois métodos distintos, ABTS⁺ e o DPPH^{*}.

O rastreio da análise da ampla amostragem da casta em estudo teve como objetivo quantificar e valorizar o seu conteúdo polifenólico de forma a potencializar o consumo moderado deste vinho, em que o consumidor possa associar os possíveis efeitos benéficos para a saúde, e inovar criando um produto alternativo ao vinho, um possível “Sumo de Vinhão”, com melhores características organoléticas e características fenólicas similares do vinho desta casta.

Em suma, para todos os parâmetros analisados (fenóis totais, flavonoides, *orto*-difenóis e antocianinas) as amostras (película, polpa e engaço), em todos os parâmetros existem diferenças significativas entre todas as amostras analisadas. O engaço representa a amostra com maior teor de fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis. No caso das

antocianinas como se pode verificar a película é a que apresenta o maior teor, o que é espectável e neste caso o engaçó é significativamente diferente da película e da polpa com o valor mais baixo.

Comparando os métodos (ABTS e DPPH) para as amostras (película, polpa e engaçó) verifica-se que todas são significativamente diferentes entre si, sendo o engaçó a que apresenta o maior teor de atividade antiradicalar.

Esta análise traduz-nos uma importante valorização dos subprodutos da casta em estudo, pelas suas propriedades fenólicas e os seus potenciais efeitos benéficos para a saúde, podendo ser introduzida em vários sectores do mercado, nomeadamente saúde, cosmética e alimentar.

O vinho resultante da vinificação desta casta apresenta valores elevados relativamente a outros vinhos da mesma casta, comparativamente com outras castas tintas podemos verificar que as diferenças significativas se justificam uma vez que estamos a avaliar metabolitos secundários que dependem do tipo de casta, diferentes regiões de produção, das condições edafo-climáticas, o que justifica os resultados obtidos

Palavras-chave *Vitis vinifera* L, valorização da casta, compostos polifenólicos, atividade antioxidante, ABTS, DPPH

Abstract

Wine production is considered a fundamental and essential part of European culture, with Europe being the largest wine producer and exporter of wine products worldwide. Portugal has contributed to this growth, particularly in the production of Vinhos Verdes.

The production of Vinho Verde is unique, of notable interest for its typicality and authenticity due to the unique characteristics of the wine, the freshness and joviality.

The Vinho Verde Tinto, produced from the Vinhão grape variety, has increasingly been marketed as a monocast, but in the last years there has been a drop in production due to its organoleptic characteristics and market trends.

In this work a detailed analysis of the grape variety Vinhão was carried out, sampling was carried out in different phases, initially the collection of the grape berries, after vinification the collection was collected, after vinification three samples of must were collected, a first must collected from the mill on the first day of fermentation (M1), the second must equal to M1 but pasteurized immediately (MP), and a third must collected on the third day of fermentation (M2) and the wine at the end of the fermentation process. vinification of the studied grape variety, cultivated in the Demarcated Region of Vinhos Verdes. Subsequently in the laboratory by the process of maceration of the grape (*Vitis vinifera* L.) the film was separated from the pulp and the stink was dried and ground to facilitate the extraction of the phenolic compounds.

The polyphenolic content, in particular the total phenols, *ortho*-diphenols, flavonoids and anthocyanins, was also evaluated. The antiradical activity of this variety was analyzed by two different methods, ABTS + and DPPH.

The screening of the broad sample analysis of the studied grape variety had the objective of quantifying and valorizing its polyphenolic content in order to increase the moderate consumption of this wine, in which the consumer can associate the possible beneficial effects on health, and innovate creating a product alternative to wine, a possible "wine juice", with better organoleptic characteristics and similar phenolic characteristics of the wine of this variety.

In summary, for all analyzed parameters (total phenols, flavonoids, *ortho*-diphenols and anthocyanins) the samples (film, pulp and stink), in all parameters there are significant differences among all samples analyzed. The sample represents the highest total phenol content, flavonoids and *ortho*-diphenols. In the case of anthocyanins as can be seen the film is the one with the highest content, which is likely, and in this case the sting is significantly

different from the film and the pulp with the lowest value. In summary, comparing the methods (ABTS and DPPH) for the samples (film, pulp and stuck) all of them are significantly different from each other, the sting being the one with the highest content of antiradical activity. This analysis represents an important valorization of the by-products of the caste under study for its phenolic properties and its potential beneficial effects on health and can be introduced in several sectors of the market, namely health, cosmetics and food.

The wine resulting from the vinification of this grape variety shows high values in relation to other wines of the same variety, compared to other red varieties, we can verify that the significant differences are justified since we are evaluating secondary metabolites that depend on the type of grape variety, different production regions, of the soil and climatic conditions, which justifies the results obtained.

Keywords: *Vitis vinifera* L, variety valorization, polyphenolic compounds, antioxidant activity, ABTS, DPPH

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Índice de figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Enquadramento temático	2
1.2. Vitivinicultura em Portugal e no mundo.....	2
1.4 Principais sub-produtos provenientes da indústria vitivinícola.....	9
1.4.1 Composição fitoquímica da película, polpa e grainha	10
1.4.2 Composição fitoquímica do engaço	11
1.4.3 Composição fitoquímica do mosto e vinho tinto.....	13
1.5 Atividade antioxidante	14
1.6. Valorização da casta.....	16
1.6.1 Caracterização da casta (<i>Vitis vinifera</i> L.) em estudo: Vinhão	17
1.6.2 Caracterização morfológica.....	18
1.6.3 Caracterização do potencial enológico.....	20
1.6.4 Caracterização fitoquímica.....	21

1.7.	A importância do estudo de caso	21
1.8.	Objetivos	22
2.	MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1.	Amostragem.....	24
2.2.	Determinação de parâmetros físicos-químicos	25
2.2.1.	<i>Acidez total</i>	25
2.2.2.	<i>pH</i>	25
2.2.3.	<i>Grau brix</i>	26
2.2.4.	<i>Título alcoométrico volúmico em potência (Tav Provável)</i>	26
2.2.5.	<i>Massa volúmica</i>	27
2.2.6.	<i>SO₂ total</i>	27
2.2.7.	<i>Açúcares Totais</i>	27
2.2.8.	<i>Título alcoométrico volúmico adquirido</i>	28
2.3.	Extração dos compostos fenólicos	29
2.3.1.	<i>Engaço</i>	29
2.3.2.	<i>Bagos</i>	29
2.4.	Determinação do teor de fenóis totais.....	29
2.5.	Determinação do teor de flavonóides	30
2.6.	Determinação do teor de <i>orto</i> -difenóis	30
2.7.	Determinação do teor de antocianinas totais	31
2.8.	Determinação da atividade antiradicalar.....	31

2.8.1	Capacidade de neutralização do radical $ABTS^{\bullet+}$	31
2.8.2	Capacidade de neutralização do radical $DPPH^{\bullet}$	32
2.9	Análise Estatística.....	33
2.10	Análise sensorial	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1.	Parâmetros físico-químicos	36
3.2	Análise da composição fitoquímica das amostras	38
3.3	Análise da atividade antiradicalar	43
	Capítulo IV.....	46
	Conclusões e perspectivas futuras	46
4.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	47
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Índice de Figuras

Figura 1. Dados da área mundial global de superfície vitícola (adaptado OIV, 2017)	2
Figura 2. Dados relativos à produção mundial de uvas entre 2000 e 2015 (OIV, 2017)	3
Figura 3. Dados dos maiores consumidores de vinho a nível mundial (Mhl) (adaptado do OIV, 2017)	6
Figura 4. Mapa da RDVV (adaptado Estação Vitivinícola Amândio Galhano, 2017)	7

Índice de Tabelas

Tabela 1. Dados dos maiores produtores de uvas a nível mundial, entre 2011 e 2015 (adaptado OIV, 2017).....	4
Tabela 2. Dados da produção mundial de vinho entre 2010 e 2016 *previsão (adaptado OIV, 2017) ..	4
Tabela 3. Parâmetros de caracterização sensorial das amostras (adaptado CVRVV, 2015)	34
Tabela 4. Resultados dos parâmetros físico-químicos analisados das amostras em estudo	36
Tabela 5. Resultados da avaliação da composição fitoquímica dos extratos das amostras da casta estudada.....	39
Tabela 6. Resultados da avaliação da atividade antiradicalar pelo ABTS e DPPH dos extratos das amostras.....	43
Tabela 7. Resultados da análise sensorial para das amostras (MP, M2 e Vinho) em estudo	44

Lista de abreviaturas

ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal diamónio;

CE – Catechin Equivalents;

CVRVV – Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes;

DPPH - 2,2'- difenil - 1 - picrilhidrazil radical;

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations;

GAE – Gallic Acid Equivalents;

Ha – Hectares;

M1 – Mosto recolhido no primeiro dia de vinificação;

M2 – Mosto recolhido a meio da fermentação (ao fim do terceiro dia);

MeOH – Metanol;

Meur – Milhões de euros;

Mha – Milhões de hectares;

Mhl – Milhões de hectolitros;

Mkg – Milhões de kilos;

ML – Milhões de litros;

MP – Mosto pasteurizado no primeiro dia de vinificação;

Mton – Milhões de toneladas;

Nm – Nanómetros;

OIV - Organization International of Vine and Wine;

OMPI – Organização Mundial da Propriedade Intelectual;

ps – peso seco;

RDVV – Região Demarcada do Vinho Verde;

Rpm – Rotações por minuto;

TE – Trolox Equivalents;

VITIS – Regime de apoio à reestruturação e reconversão da vinha;



Capítulo I

Introdução

INTRODUÇÃO

1. Enquadramento temático

Ao longo dos tempos a casta Vinhão tem vindo a perder aceitabilidade pelos consumidores devido à sua adstringência e acidez característica, apesar de recentemente ter havido alterações no processo de vinificação, com a redução do tempo de extração em lagar, de forma a diminuir a concentração de taninos, contudo esta casta continua com menor expressão no mercado, daí a importância deste estudo.

1.1 Vitivinicultura em Portugal e no mundo

A produção vitivinícola tem vindo a verificar um aumento a nível mundial, representando um papel relevante no sector agro-económico. Em contrapartida segundo a OIV, a área ocupada pela atividade vitivinícola teve um decréscimo até 2011, verificando-se que em 2015 atingiu cerca de 7,5 Mha.

Os cinco países com maior percentagem de área vitivinícola foram descritos por ordem decrescente: a Espanha ocupando (14%) da área, a China (11%), França (10%), Itália (9%) e a Turquia com (7%), representando 50% da área plantada para a produção de vitivinícola e os restantes (50%) correspondem ao resto do mundo (**Figura 1**) (OIV, 2017).

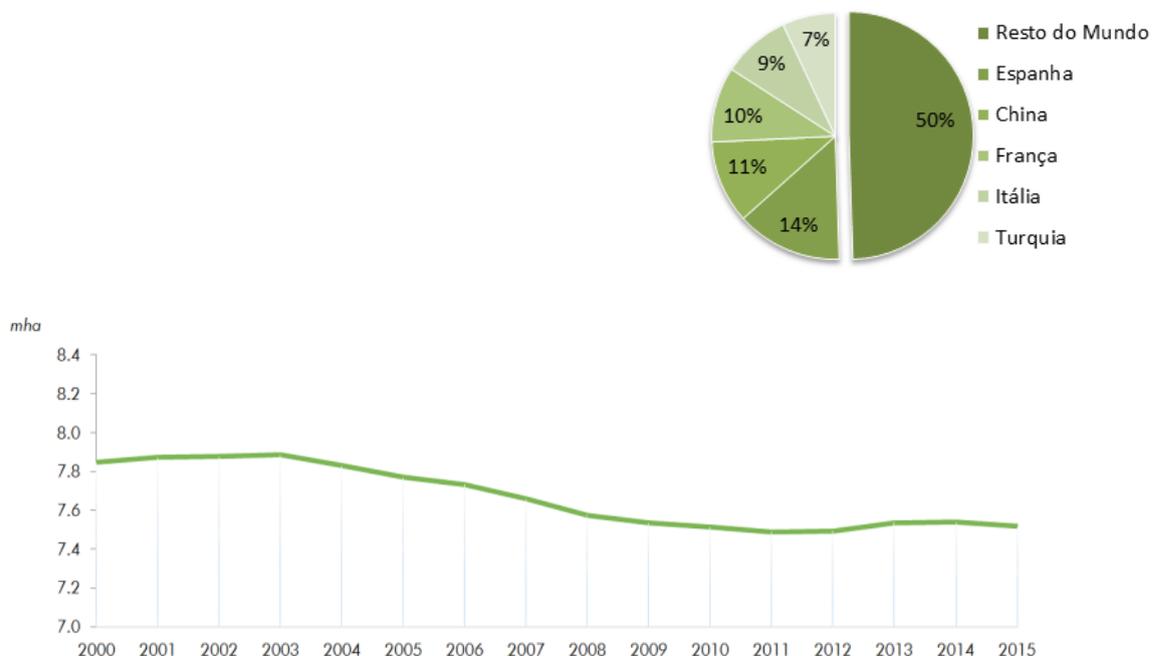


Figura 1. Dados da área mundial global de superfície vitícola (OIV, 2017)

A área plantada a nível mundial no período compreendido de 2000 a 2011 sofreu um decréscimo de 7 497 Mha, no entanto nos últimos anos tem vindo a aumentar. É de salientar que a superfície de vinha desde 2000 tem vindo a decrescer acentuadamente em Itália e Espanha, apesar de o último liderar na área de produção. A China tem crescido, estando atualmente na 2ª posição mundial, já os países do Hemisfério Sul e os Estados Unidos mantiveram a sua posição em termos de área de produção.

Portugal encontra-se na nona posição a nível mundial da área de produção vitivinícola, com cerca de 217 Mha em 2015 e representa o quarto lugar na Europa, considerando esta atividade primordial no setor económico português (FAO, 2017).

A produção mundial de uvas ao longo da última década tem vindo a sofrer algumas oscilações conforme a **figura 2**, atingindo em 2013 um pico de produção de 77 Mton. Na Europa pode-se verificar a maior produção, seguida da Ásia, América, África e finalmente Oceânia (OIV, 2017).

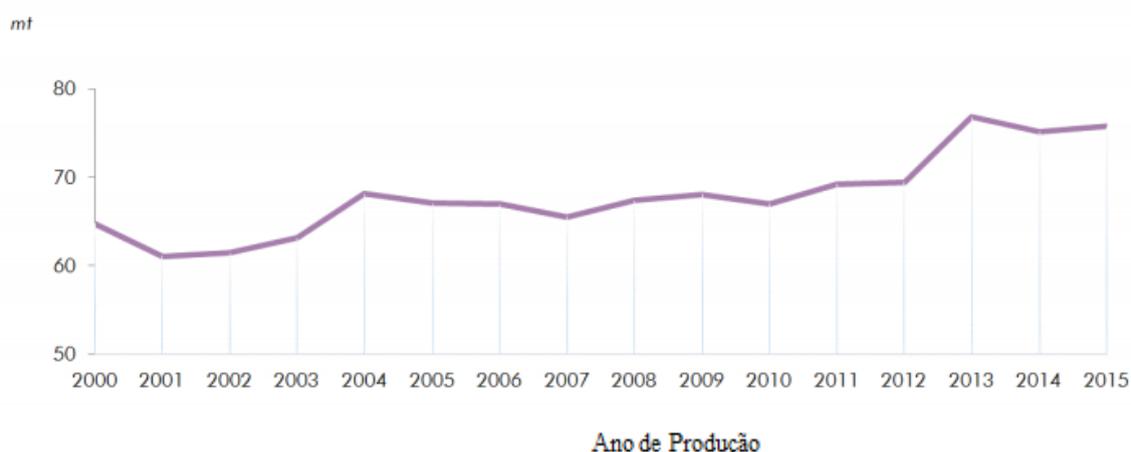


Figura 2. Dados relativos à produção mundial de uvas entre 2000 e 2015 (OIV, 2017)

A produção de uvas considerou-se importante na cultura agro-económica, produzindo-se mundialmente 75,7 Mton em 2015 conforme observado na **tabela 1**.

O objetivo desta produção, na sua maioria, teve como finalidade o consumo de uvas em fresco, uvas passas e sumos, mas uma parte desta produção é direcionada para vinificação, considerada uma atividade tradicional de grande importância no sudoeste Europeu (Itália, França, Espanha Portugal e Grécia) (FAO, 2017).

Em 2001 verificou-se uma tendência crescente na produção de uva, apesar da área de produção ter diminuindo, tal facto justifica-se pelo aperfeiçoamento das técnicas vitivinícolas e pelo aumento do rendimento de produção.

Pela análise da **tabela 1**, os cinco países que mais contribuíram para esta produção foram: a China (12,6 Mton), a Itália (8,2 Mton), os Estados Unidos da América (7,0 Mton), a França (6,3 Mton), e a Espanha (6,0 Mton).

Na produção total de uvas a nível mundial em termos de percentagem a Europa detém 40 % da produção, 31% na Ásia e 20 % América (OIV, 2017).

Tabela 1 – Dados dos maiores produtores de uvas a nível mundial, entre 2011 e 2015 (OIV, 2017)

País / Ano	2011	2012	2013	2014	2015
China	9,2	10,6	11,6	12,3	12,6
Itália	7,1	6,9	8,0	6,9	8,2
USA	6,5	6,8	7,8	7,1	7,0
França	6,6	5,4	5,5	6,1	6,3
Espanha	5,7	5,3	7,4	6,1	6,0
Turquia	4,3	4,2	4,0	4,2	3,6
Chile	3,0	2,8	2,9	2,8	3,1
Índia	2,1	2,2	2,5	2,6	2,6
Argentina	1,7	2,4	2,9	2,7	2,4
Irão	1,6	2,2	2,0	2,2	2,1
África do Sul	1,3	1,8	2,0	2,0	2,0
Austrália	1,5	1,7	1,8	1,7	1,7
Egipto	1,3	1,4	1,4	1,6	1,6
Brasil	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5
Alemanhã	1,3	1,2	1,1	1,2	1,2
Total (Mton)	69,2	69,5	76,8	75,1	75,7

A produção mundial de vinho (excluindo sumos e mostos) foi de 274,000 Mhl em 2015, havendo um decréscimo nesta produção em 2016 num total de menos de 5%, correspondente a (259 Mhl). No que refere a 2015 a Itália encontra-se a liderar a produção de vinho com (50,000 Mhl), seguida da França (47,373 Mhl), Espanha (37,300) e Estados Unidos (22,500 Mhl). Relativamente à América do Sul constata-se que as produções tiveram um decréscimo significativo, na Argentina (8,800 Mhl) no Chile (10,100 Mhl), consideradas as previsões para 2016, devido às condições climáticas, Portugal encontra-se na 11ª posição nos produtores de vinho a nível mundial com uma produção de 7,0 Mhl em 2015 (**Tabela 2**) (OIV, 2017).

Tabela 2. Dados da produção mundial de vinho entre 2010 e 2016 *previsão (OIV, 2017)

País / Ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016 *	2015-2016 Variação %
Itália	48,525	42,772	45,616	54,029	44,229	50,000	48,800	-2%
França	44,381	50,757	41,548	42,134	46,500	47,373	41,900	-12%
Espanha	35,353	33,397	31,123	45,308	39,500	37,300	37,800	1%
Estados Unidos	20,887	19,140	21,650	23,590	23,700	22,140	22,500	2%
Argentina	16,250	15,473	11,778	14,984	15,197	13,358	8,800	-34%
Chile	8,844	10,464	12,554	12,820	10,500	12,870	10,100	-22%
Austrália	11,420	11,180	12,259	12,310	11,900	11,900	12,500	5%
África do Sul	9,327	9,725	10,569	10,982	11,500	11,200	10,500	-6%
China	13,000	13,200	13,511	11,780	11,100	11,500	11,500	0%
Alemanha	6,906	9,132	9,012	8,409	9,202	8,788	8,400	-4%
Portugal	7,148	5,623	6,327	6,231	6,195	7,047	6,009	-15%
Roménia	3,287	4,058	3,311	5,113	3,700	3,500	4,900	40%
Brasil	2,459	3,460	2,967	2,710	2,732	2,800	1,400	-50%
Grécia	2,950	2,750	3,115	3,343	2,800	2,500	2,600	4%
Outros	33,451	36,672	32,871	35,257	32,245	31,724	31,291	-1%
Total (Mhl)	264,188	267,803	258,211	289,000	271,000	274,000	259,000	-5%

Em relação à produção total de vinho verificada na tabela anterior constatou-se algumas diferenças na produção, esta podendo ser influenciada pelas condições edafo-climáticas.

Conforme se verifica na **figura 3**, os Estados Unidos lideram com (31 Mhl), em oposição à Grécia como o país com menor consumo de vinho, apenas 2,6 Mhl.

Portugal consumiu 4,8 Mhl em 2015, obteve um decréscimo de 2,4% em relação a 2012. Verificamos que nos últimos anos tem surgido um novo tipo de consumidor, apostando mais na qualidade, um consumidor quase especialista em vinhos, um novo conceito de beber vinho – o vinho a copo, onde o consumidor pode experienciar diferentes vinhos, diferentes castas e diferentes regiões numa única experiência, enriquecendo desta forma a cultura vínica.

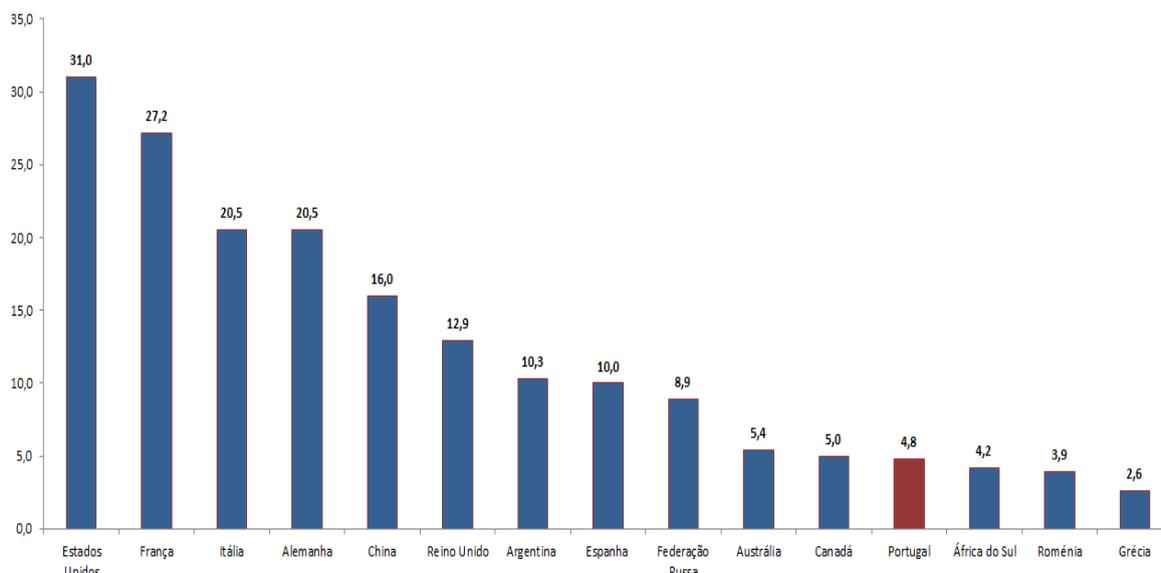


Figura 3. Dados dos maiores consumidores de vinho a nível mundial (Mhl) (OIV, 2017)

Em 2015 verificou-se um acréscimo de 1,9% (104,3 Mhl) relativo volume comercializado mundialmente, e um aumento de 10,6% no valor de exportação (28,300 Meur) em relação a 2014 (OIV, 2017).

.1. A Região Demarcada dos Vinhos Verdes

A Região Demarcada dos Vinhos Verdes (RDVV) foi criada no tempo da monarquia durante o reinado de D. Carlos, com o reconhecimento da qualidade e genuíno das diferentes regiões vitícolas, resultando a demarcação e atribuição das áreas geográficas. Mais tarde a Carta de Lei de 18 de Setembro de 1908 e Decreto de 1 de Outubro de 1908, Lisboa e a Imprensa Nacional, 1908, estabelecem e delimitam zonas de demarcação das diferentes espécies de vinhos por regiões, nascendo assim a RDVV, bem distinta de outras regiões, igualmente demarcadas e produtoras de outros tipos de vinhos. Nesta altura a RDVV foi delimitada em cinco sub-regiões: Monção, Lima, Amarante, Basto e Braga, tendo esta divisão sido baseada em fatores de ordem cultural, microclimas, tipo de cepas, modo de condução da vinha e de tipos de vinhos.

No ano de 1924, no Congresso Agrícola de Braga, apresentado pelo Conde de Azevedo Presidente da Federação dos Sindicatos Agrícolas do Norte de Portugal, foi criado um Regulamento da Produção e Comércio dos Vinhos Verdes, onde se declara o estatuto próprio da Região Demarcada. Nasce a Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV), onde são estabelecidos limites geográficos, caracterização dos vinhos, regras para

manifesto de produção, certificados da produção e origem para comercializar o Vinho Verde.

Em 1926, foi criada mais uma sub-região, a de Penafiel, já em 1929, delimitou-se finalmente a RDVV para as atuais demarcações. Atualmente divide-se em nove sub-regiões de acordo com a Portaria n.º 28/2001, de 16 de Janeiro, representadas no mapa geográfico na **figura 4**, denominadas: Monção e Melgaço, Lima, Cávado, Ave, Basto, Sousa, Amarante, Baião e Paiva.



Figura 4. Mapa da RDVV (CVRVV, 2017)

A delimitação destas sub-regiões deriva de fatores tais como: microclimas distintos, tipo de castas adaptadas, tipo de cepas e modo de condução da vinha, tipo de solos e tipo de vinho produzido, caracterizando desta forma a tipicidade, a autenticidade e diversidade de cada sub-região no que respeita ao tipo de produção vinícola. As nove sub-regiões deste estão delimitadas, e abrangem os seguintes concelhos:

- Sub-região de Amarante - engloba os concelhos de Amarante e Marco de Canaveses, situada no interior da Região;
- Sub-região do Ave - engloba os concelhos de Vila Nova de Famalicão, Fafe, Guimarães, Santo Tirso, Trofa, Póvoa de Lanhoso, Vieira do Minho, Póvoa de Varzim, Vila do Conde e o concelho de Vizela, com exceção das freguesias de Vizela (Santo Adrião) e Barrosas (Santa Eulália);
- Sub-região de Baião - engloba os concelhos de Baião, Resende (exceto a

- freguesia de Barrô) e Cinfães (exceto as freguesias de Travanca e Souselo);
- Sub-região de Basto - engloba os concelhos de Cabeceiras de Basto, Celorico de Basto, Mondim de Basto e Ribeira de Pena;
 - Sub-região do Cávado - engloba os concelhos de Esposende, Barcelos, Braga, Vila Verde, Amares e Terras de Bouro;
 - Sub-região do Lima - engloba os concelhos de Viana do Castelo, Ponte de Lima, Ponte da Barca e Arcos de Valdevez;
 - Sub-região de Monção e Melgaço - engloba os concelhos de Monção e Melgaço;
 - Sub-região do Paiva - engloba o concelho de Castelo de Paiva, e, no concelho de Cinfães, as freguesias de Travanca e Souselo;
 - Sub-região do Sousa - engloba os concelhos de Paços de Ferreira, Paredes, Lousada, Felgueiras, Penafiel e, no concelho de Vizela, as freguesias de Vizela (Santo Adrião) e Barrosas (Santa Eulália), (VinhoVerde, 2017).

A RDVV abrange todo o noroeste de Portugal, que coincide com a zona tradicionalmente conhecida Entre-Douro-e-Minho, considerada a maior Região Demarcada Portuguesa, uma das maiores da Europa e das mais antigas de Portugal. Delimita-se a norte com o rio Minho (limítrofe com a Espanha), a sul com o rio Douro e a oeste com o Oceano Atlântico. A RDVV tem uma área total de cerca de 823 034 hectares dos quais 35000 hectares ocupados com a área de vinha, cerca de 15% da área vitícola nacional.

Em termos climáticos a RDVV apresenta um clima temperado e com níveis de humidade atmosférica elevada devido à influência marítima do oceano Atlântico. Com solos profundos, graníticos, níveis de acidez e fósforo baixos, consequentes da atividade humana ao longo dos tempos com incorporação de adubações tornando-os bastante férteis, contribuindo assim para a leveza, frescura e elegância dos vinhos verdes (VinhoVerde, 2017).

A nível de produção de vinho verde tinto, esta região tem vindo nos últimas décadas a sofrer um decréscimo ao nível da sua produção como se pode verificar na **Figura 5**.

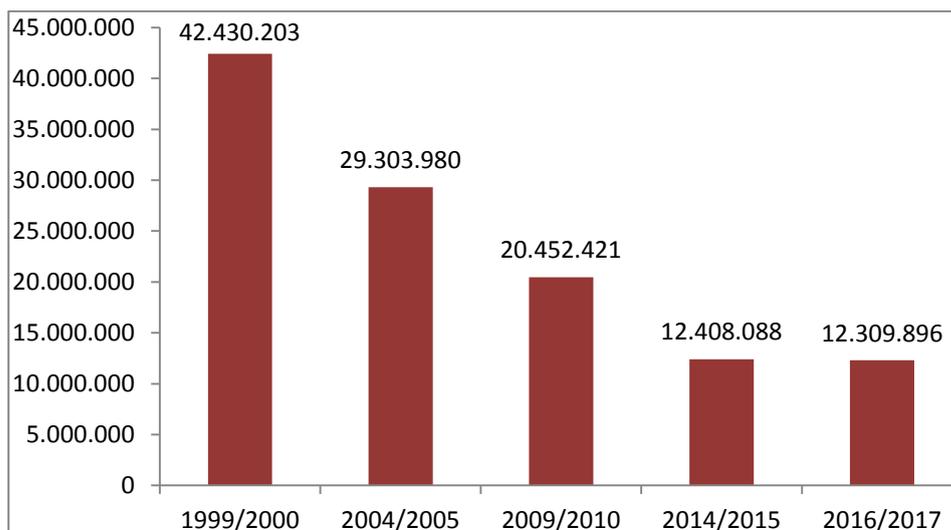


Figura 5. Dados da produção de vinho verde tinto, campanha de 1999/2000 a 2016/2017 (VinhoVerde, 2017)

Verifica-se que na campanha de 1999/2000, esta região produzia mais do triplo a nível de mosto e vinho verde (42.430.203 milhões de litros) em relação à campanha de 2016/2017, o decréscimo inclusive na casta vinhão deve-se a vários fatores, como as características organoléticas (adstringência e acidez) dos vinhos verdes, aumento do mercado dos vinhos brancos, instalação de novos projetos onde predomina a plantação das castas brancas e o arranque de vinhas velhas, onde havia ainda um equilíbrio em relação às castas tintas.

1.4 . Principais subprodutos provenientes da indústria vitivinícola

Portugal é caracterizado pela sua grande produção de vinho, de onde derivam anualmente toneladas de subprodutos associados à produção vitivinícola. No norte do país estima-se a produção de subprodutos residuais em cerca de 1,5Mton por ano (Dominguez-Perles *et al*, 2014).

Segundo Silva *et al.*, (2010), verificou-se que na produção de cada 100 litros de vinho, se obtêm 25 kg de subprodutos.

Durante o processo de vinificação podemos obter diferentes subprodutos tais como: bagaços, engaços, grainhas, películas e borras resultantes do processo de fermentação, como ilustrado na figura 6, estes subprodutos consideram-se resíduos e um problema ambiental (Teixeira *et al.*, 2014).

O volume de subprodutos provenientes da transformação da uva em vinho pode representar um desperdício que pode ser rentabilizado pelas suas características físicas e químicas, podendo assim ser reaproveitados para outras finalidades e acrescentar valor

económico à cadeia de produção.

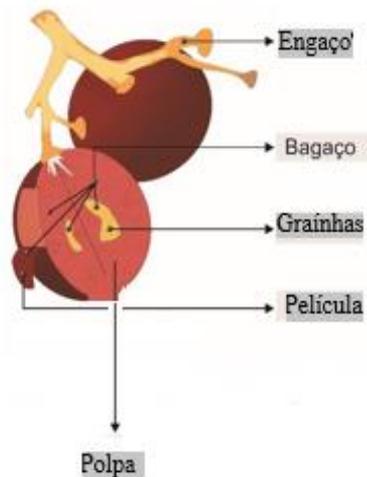


Figura 6. Esquema dos subprodutos resultantes da produção de vinho (Teixeira et al., 2014)

Na sequência do seu reaproveitamento e valorização, têm-se desenvolvido estudos dos extratos dos resíduos, considerando-os uma fonte de antioxidantes naturais e uma riquíssima fonte natural de polifenóis de grande interesse para a exploração e comercialização na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, tornando o processo mais rentável e amigo do ambiente (Alonso *et al.*, 2002; Makris *et al.*, 2007a; Makris *et al.*, 2007b, Karvela *et al.*, 2009).

1.4.1 Composição fitoquímica da película, polpa e grainha

No reino vegetal podemos encontrar metabolitos secundários como os compostos fenólicos, estes derivam das plantas (Anklam, 1998) mas o teor dos compostos fenólicos varia nas diferentes partes da planta, desde as folhas, flores, frutos, sementes (Seigler, 2000)

Estes compostos consideram-se importantes na multiplicação e desenvolvimento das plantas (Popa *et al.*, 2002; Bravo, 1998).

Foram identificados e quantificados compostos fenólicos nas camadas internas da película e da grainha, assim como na polpa mas em concentrações mais reduzidas. O teor destes compostos pode-se restringir ao tipo de casta e às condições edafo-climáticas a que a planta está sujeita (Pérez-Magariño e González-San José, 2006).

Dependendo da família fenólica, o teor de compostos fenólicos pode aumentar ao longo do estado de maturação da uva (González-San José *et al.*, 1991; Mazza *et al.*, 1999; Pérez-Magariño e González-San José, 2006). Durante o processo de maturação da uva, o teor

de açúcares pode variar, assumindo que a acumulação máxima de açúcares na uva difere da concentração máxima de compostos fenólicos (Maujean *et al.*, 1983).

As antocianinas diferenciam qualitativamente e quantitativamente as uvas das castas tintas. (Pirie e Mullins, 1977). Foram identificadas devido à coloração vermelha e azul que conferem às películas das uvas através dos pigmentos responsáveis (Moreno-Arribas e Polo, 2009).

Segundo Cadenas e Packer, (2002); Ribéreau-Gayon *et al.*, (2006); Moreno-Arribas e Polo, (2009), foram identificadas quinze antocianinas diferentes que correspondem aos monoglucósidos de cinco antocianidinas primárias: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina nas uvas. em que a malvidina é a que se encontra em maior concentração nas castas, mas este teor pode variar de casta para casta. Durante a maturação ocorre a redução dos polifenóis , as procianidinas em 60% e os monómeros flavan-3-ol em 90% (Kennedy, 2000).

No que se refere ao conteúdo total de polifenóis nas grainhas, a catequina, detém a maioria com 49,8% do conteúdo, a epicatequina (26,0%), epigalocatequina (9,3%) e procianidinas B1 (5,8%) e B2 (5,1%), entre os constituintes com menor conteúdo estão a epigalocatequina galato e ácido gálico (Guendez et al, 2005). As procianidinas ocorrem nas partes sólidas da uva, nas películas e grainhas, onde o teor de catequinas e procianidinas se encontra em maior abundância (Bourzeix, 1986).

Os polifenóis biflavanois divididos na forma de proantocianinas oligoméricas identificadas na película e grainhas das uvas, são interligados quimicamente por dois ou mais monómeros (procianidinas B1, B2, B3, B4 e B5) e dois trímeros (C1 e C2). Segundo Fuleki T. d., (1997) as grainhas contêm (38%) das formas oligoméricas (dímeros e trímeros), os engaços (33%), as películas (28%) e a polpa (1%) (Brouzeix,1986). Para Jordão, (1996) observou-se para as grainhas com (27%), engaços (27%) e as películas nas formas monoméricas, seguindo a mesma análise.

1.4.2 Composição fitoquímica do engaço

O desenvolvimento científico permite fazer o rastreio da composição fitoquímica do engaço, valorizando este subproduto pela sua constituição como fibra dietética e compostos bioativos benéficos, servindo de âncora para a sua valorização, permitindo a sua aplicação no desenvolvimento de produtos inovadores e com valor acrescentado para o mercado alimentar, farmacêutico e cosmético (Levin *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2014).

Llobera *et al.*, 2007 e González-Centeno *et al.*, 2010, descrevem a concentração de aproximadamente 60-90% da matéria seca total de fibras presentes no engaço da uva. Estas fibras contêm na sua composição celulose e lenhina com média de 22,5%.

Relativamente aos compostos bioativos, são descritos como metabolitos secundários, produzidos pelas plantas em condições adversas como o stress resultante de agressões externas (radiações, infeções), por duas vias biossintéticas, a via chiquimato e a via acetato (Nacz *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos, identificados e quantificados em particular no engaço foram a astilbina, flavan-3-ol, proantocianidinas e antocianinas, descritos pelos seus efeitos benéficos para a saúde no combate aos radicais livres presentes no nosso organismo, o *trans*-resveratrol a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina), quercetina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-glicoronídeo, o consumo regular e a introdução na dieta alimentar traduz efeitos benéficos para o organismo, como a prevenção e irradicação de doenças do sistema vascular (Barros *et al.*, 2014; Domínguez-Perles *et al.*, 2014; Azevedo *et al.*, 2009).

Segundo Basha *et al.*, (2004) e Barros *et al.*, (2014) são os dímeros de procianidina B, a quercetina-3-*O*-glicuronídeo, a catequina, quercetina-3-*O*-rutenosídeo, ácido gálico, ácido siríngeo, ácido caftárico e ácido ferúlico.

Comparativamente à composição polifenólica, segundo a investigação científica, o conteúdo fitoquímico do engaço é principalmente constituído por ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis, flavan-3-óis, e estilbenos, que atingem até 5,8% do peso seco (Katalinic *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2014), alguns destes foram quantificados em relação ao conteúdo presente no engaço e agrupados da seguinte forma: 2 derivados de ácidos hidroxicinâmicos, 5 flavonóis, 6 proantocianidinas 3 antocianinas e 1 estilbeno, (Karvela *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2014). Barros *et al.*, 2014, Teixeira *et al.*, 2014 indicam que na análise do conteúdo dos estilbenos, o *trans*-resveratrol e a Σ -viniferina.

Os compostos flavan-3-óis, proantocianidinas, flavonas, flavonóis e antocianinas inserem-se no grupo flavonoides, representam a maior parte dos compostos fenólicos presentes no engaço.

Relativamente à presença de flavanóis, aos teores mais elevados descrevem-se a epicatequina, os dímeros de procianidina e a catequina, são os compostos fenólicos maioritários nos engaços de uva, a sua constituição ultrapassa até 30 vezes o teor de ácidos fenólicos, flavonóis ou estilbenos (Barros *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2014).

No que se refere ao teor de flavonóis estes são assumidos por derivados de glicosídeos,

glucorónicos, galactosídeos e diglicosídeos, com maior teor a quercetina-3-O-glicuronídeo e quercetina-3-O-rutenosídeo, quercetina-3-O-glicoronídeo, e também kaempferol--3-O-rutinosídeo (Jeffery *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2014).

Em relação às antocianinas presentes no engaço, estas reagem com outros compostos (taninos condensados) dando origem a outros pigmentos (taninos pigmentados) mais estáveis, com inúmeras aplicações na indústria (Montealegre *et al.*, 2006; Suriano *et al.*, 2015). Identificam-se três classes de pigmentos derivados: antocianidinas (cianidina, delphinidina e malvidina), as portisinas (cianidina-portisina, delphinidina-portisina e malvidina-portisina) e as antocianidinas-3-O-glicosídeo (cianidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3-O-glicosídeo) (Azevedo *et al.*, 2009).

No que diz respeito aos ácidos fenólicos, o ácido gálico, o ácido sirínico e o ácido caftárico, em ordem decrescente de concentração são os ácidos fenólicos presentes em maiores concentrações no engaço de uva, destacando-se o ácido caftárico como o mais representativo no engaço (Barros *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2014).

1.4.3 Composição fitoquímica do mosto e vinho tinto

Desde sempre o vinho foi considerado um agente promotor de saúde e bem-estar, quando consumido moderadamente, foi no século XX com novas investigações científicas associadas ao vinho através de estudos epidemiológicos, onde se verificaram os seus efeitos benéficos para a saúde, relacionando a ingestão moderada à redução de doenças cardiovasculares, daí surgiu o denominado Paradoxo Francês publicado por Dr. Serge Renaud e Dr. Lorgeril no artigo “Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease”. Este Paradoxo traduz que o estilo de vida desta população francesa, dominada pelo sedentarismo, alimentação à base de gorduras animal e tabagismo, fatores que originavam o desenvolvimento de doenças cardíacas. Mas em contrapartida esta população apresentou uma baixa incidência de doenças cardiovasculares devido ao consumo moderado e regular de vinho tinto às refeições (Béliveau e Gringas, 2007; Sun *et al.*, 2002).

O vinho é considerado um alimento funcional devido à sua atividade antioxidante no nosso organismo, essa atividade proporciona efeitos benéficos para a saúde do consumidor desde que ingerido de forma equilibrada, um dos efeitos benéficos é a capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigénio.

É no vinho onde se concentram a maior quantidade de compostos fenólicos com características antioxidantes, apesar de derivarem na sua maioria das uvas (Cadenas & Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

As categorias de compostos fenólicos identificadas segundo Cadenas & Packer, 2002 foram: os flavonóides e os não flavonóides. De entre os flavonóides mais importantes, destacam-se os flavan-3-óis (taninos condensados ou proantocianidinas), antocianinas (Moreno-Arribas e Polo, 2009) e flavanóis (Cadenas e Packer, 2002; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Moreno-Arribas e Polo, 2009). Na classe dos flavanóis monoméricos mais significativos no vinho, podem distinguir-se (-) epicatequina e os isómeros (+)-catequina, atribuindo o sabor amargo aos vinhos. No que se refere aos flavanóis poliméricos, as proantocianidinas (taninos condensados) onde se agrupam os polímeros e os oligómeros, responsáveis pela adstringência (Moreno-Arribas e Polo, 2009).

Relativamente aos compostos fenólicos não flavonóides na sua maioria os ácidos hidroxicinâmicos, ácidos benzóicos e estilbenos. Os ácidos hidroxicinâmicos encontrados nos vinhos são os ácidos cumárico, cafeico e ferúlico (Cadenas e Packer, 2002; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Moreno-Arribas e Polo, 2009).

Os ácidos benzóicos aparecem no vinho em menor percentagem, sendo o mais importante o ácido gálico, em seguida ácidos vanílico, siríngico e salicílico, que aparecem ligados às paredes celulares (Cadenas e Packer, 2002; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Moreno-Arribas e Polo, 2009).

1.5 . Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de uma e qualquer matriz vegetal poderá sugerir a contribuição relativa da soma dos seus constituintes com ação antioxidante. (Egea *et al.*, 2010). A prática de uma dieta mediterrânica rica em frutas e legumes está na base da prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares, anticancerígenas. Com este fundamento a Food and Agriculture Organization of the United Nations e a World Health Organization adverte para o consumo mínimo diário de 400 gramas de legumes e frutas, (Bonany, J., *et al.*, 2013) ricos em compostos antioxidantes.

Ao longo do tempo realizaram-se estudos epidemiológicos que têm comprovado a associação supra mencionada (Soobrattee, M. A., *et al.*, 2005; Lorenzo, J. M., *et al.*, 2013), apesar dos efeitos benéficos e protetores serem principalmente atribuídos aos seguintes antioxidantes: vitamina C, E e β -caroteno, compostos fenólicos derivados de diferentes

plantas (Soobrattee, M. A., *et al.*, 2005; Lorenzo, J. M., *et al.*, 2013).

A descoberta de que a utilização de antioxidantes sintéticos, como o BHA (Butil-hidroxianisolo) e o BHT (Butil-hidroxitolueno), rotulados como possíveis cancerígenos e introduzidos na nossa alimentação, vem fortalecer todo o interesse na sua substituição por compostos naturais, estes fortemente benéficos para a saúde (Soobrattee, M. A., *et al.*, 2005; Lorenzo, J. M., *et al.*, 2013).

Os antioxidantes traduzem-se por substâncias com capacidade para retardar e obstruir e proteger o nosso organismo de danos oxidativos de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos provocados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigénio (Adil, Í. H., *et al.*, 2007, Bayili *et al.*, 2011) encontrando-se disponíveis em pequenas concentrações, em comparação com o agente oxidante (Maisuthisakul *et al.*, 2007).

Salientam-se os radicais superóxido, peróxido de hidrogénio, hidroxilo e o oxigénio singuleto, de entre as espécies reativas, por se manifestarem mais prejudiciais nos processos biológicos (Tawaha, 2007).

Os antioxidantes podem dividir-se em dois grupos, os antioxidantes preventivos e os antioxidantes de quebra de cadeia. No primeiro grupo enquadram-se os quelantes de metais (proteínas metalotioneína, neuromelanina, transferina), as proteínas responsáveis pelo transporte e armazenamento de metais de transição e as enzimas oxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutatona reductase). O segundo grupo refere-se aos resgatadores de radicais livres, que resultam do bloqueio da propagação das reações em cadeia (Ciz, M., *et al.*, 2010).

Alguns antioxidantes são produzidos endogenamente pelo nosso organismo como forma de proteção, como as enzimas de moléculas de baixo peso molecular ou de cofatores enzimáticos, também diversos são os componentes lipossolúveis envolvidos no sistema antioxidante como vitamina E e os carotenoides; e ainda os componentes hidrossolúveis, como ácido ascórbico e glutatona, e os componentes enzimáticos, como glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase (McClean *et al.*, 2005).

Relativamente aos antioxidantes produzidos exógenamente, estes derivam de fontes dietéticas, podendo ser agrupados em diferentes classes como polifenóis, vitaminas, carotenóides, compostos organossulfurados e minerais (Ratnam *et al.*, 2006). Os antioxidantes também são importantes na pós-colheita, atuam como defesa natural do fruto, protegendo-o de pragas, infeções, contendo benefícios para a saúde humana. (Gara *et al.*, 2003; Hodges *et al.*, 2004). Quando se encontram em concentrações insuficientes, podem originar lesões oxidativas de

caráter cumulativo, nesta situação é de valorizar a sua ação na estabilização e inativação dos radicais livres antes de atingirem as partes biológicas nas células (Sousa *et al.*, 2007).

O organismo humano em atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, reagem com o ADN, ARN, proteínas e outras substâncias oxidáveis, provocando o envelhecimento celular, doenças degenerativas, inflamatórias, cancro, arteriosclerose, VIH, diabetes e doenças neuronais denominadas de Reactive Oxygen Species (ROS) - espécies reativas de oxigénio, originando o stress oxidativo. (Melo *et al.*, 2006, Manton *et al.*, 2004)

O vinho é considerado um alimento funcional pois contém componentes que exercem efeitos benéficos para a saúde do consumidor desde que ingeridos em doses adequadas para o equilíbrio fisiológico. Um desses efeitos benéficos é a capacidade de neutralização de espécies químicas - os radicais livres considerados oxidantes, têm-se evoluído em vários métodos químicos, biológicos e eletroquímicos para avaliar a atividade antioxidante dos compostos como os polifenóis presentes nos vinhos (Brena *et al.*, 2001).

1.6. Valorização da casta

A casta em estudo pertence à sub-região de Basto enquadrada na Região Demarcada dos vinhos verdes, nesta região predominava a produção e consumo do vinho verde tinto, devido às novas tendências de mercado, a vinha foi estruturada através de novos modos de condução, novas plantações com a predominância de castas brancas para dar resposta ao mercado de consumo. Verificando-se assim um grande decréscimo na produção de vinho tinto nomeadamente a casta Vinhão, este decréscimo está associado aos valores de acidez e adstringência.

Assim, este trabalho foi desenvolvido em diferentes fases após a recolha das amostras seguiu-se o processo de maceração e extração dos compostos fenólicos das amostras de forma a avaliar a composição físico-química e fenólica. Para além do teor em compostos fenólicos, nomeadamente fenóis totais, *orto*-difenois e flavonóides e antocianinas, analisou-se a atividade antiradicalar por dois métodos distintos, ABTS⁺ e DPPH^{*} para verificar o possível potencial benéfico para a saúde, pelas propriedades antiradicalares.

Ao mesmo tempo, pela análise dos diferentes mostos, tenta-se potencializar o surgimento de uma bebida inovadora a ser introduzida no mercado de consumo, “Sumo de Vinhão”, resultante do mosto da casta mas pasteurizado, com propriedades similares ao vinho da mesma casta, e reconhecidas como benéficas para a saúde e assim contornar a

adstringência e acidez característica desta casa, bem como a possibilidade de incorporação em mercados de sumos já existentes.

Assim como a aplicação dos extratos dos sub-produtos da vinificação, que até ao momento são considerados resíduos, pelo reconhecimento das suas potencialidades benéficas para a saúde, podendo assim impulsionar o interesse para a aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar.

Contribuindo desta forma para a valorização da casta Vinhão, motivar o interesse e aumento da sua produção, contribuindo para a defesa do património vitícola e trazendo retorno económico para as regiões.

1.6.1 Caracterização da casta (*Vitis vinifera* L.) em estudo: Vinhão

A sua origem terá sido no Norte de Portugal na zona do Minho, onde se designa desde há vários anos por Vinhão tinto, na região de Basto. Pode ainda ser reconhecida pela sinonímia Tinto (a), Tinto (a) Nacional ou Tinto Antigo, ainda no concelho de Monção conhecida por Negrão ou Negrão Pé de Perdiz e também Espadeiro Preto, em Melgaço chamam-lhe Tinto da Parada ou Pinta Fêmea, em Valença Espadeiro da Tinta, em Arcos de Valdevez o Espadeiro Basto, na região do Douro o Sousão e provavelmente na Galiza é a Tinta Fêmea e ainda Sousón (VinhoVerde, 2017).

A casta Vinhão **figura 7** é cultivada em toda a Região dos Vinhos Verdes, encontra-se em grande expansão pela sua qualidade, com uma área de 6.851 (ha), que corresponde a 20% do encepamento da região. Distribuída atualmente por uma superfície vitícola de 6100 (ha), e com uma utilização a nível nacional de 1,2%, com tendência crescente de desenvolvimento de 2,2% (Vinetowinecircle, 2017).

O Vinhão não é considerado uma casta verdadeira tintureira, a sua polpa é levemente rosada, sem a cor intensa das outras tintureiras, mas em contrapartida a película depois de macerada possui uma extraordinária cor carregada que torna os mostos e os vinhos mais carregados de Portugal.



Figura 7 – Foto imagem da casta Vinhão (Mota e Garrido, 2001).

O vinho resultante desta casta possui grande potencial enológico é apreciado pelas suas propriedades corantes, com mostos mais ricos em açúcar comparativamente com as castas Espadeiro, Amaral e Borraçal mas com níveis de acidez total maior que outras castas. Os vinhos apresentam-se de cor intensa e opacos à luz, vermelho-granada; um aroma vinoso, com conotação a frutos silvestres como a amora e a framboesa. Ao nível do paladar exibem-se bastante vinosos, encorpados e ligeiramente adstringentes. Ao longo dos tempos esta casta foi perdendo reconhecimento, mas atualmente revela grande notoriedade pela sua introdução nas vinhas novas e a grande expansão de vinhos monocasta produzidos a partir do Vinhão (Portodigital, 2017).

1.6.2 Caracterização morfológica

Esta casta é considerada vigorosa e regular na produção, possui uma boa afinidade com a maioria dos porta-enxertos usados na Região dos Vinhos Verdes. Apresenta um índice de fertilidade médio, com duas inflorescências em média por ramo, originando cachos médios e medianamente compactos, que a considera de produção média.

O seu ciclo vegetativo é curto, comparativamente com outras castas tintas, tardia no abrolhamento, recuperando na floração e uma das mais precoces no pintor, maturação intermédia, depois das castas Padeiro, Alvarelhão e Pedral e antecipada ao Espadeiro, Borraçal e Amaral. De uma forma resumida apresentam-se descritas as características morfológicas da casta Vinhão, (Mota e Silva, 1986):

- Abrolhamento - classifica-se como aberto, muito cotanilhoso, branco e com orla levemente carminada.
- Extremidade do ramo jovem - classifica-se por aberto, com pigmentação média na orla e muito cotanilhosa.

- Folha jovem - cor amarela com manchas bronze, alguma pigmentação antociânica em manchas, cotanilhosa e francamente cerdosa sobre as nervuras principais, na página inferior, acompanhada de manchas carminadas.
- Flor - classifica-se como Hermafrodita.
- Pâmpano - com os nós e entrenós com estrias vermelhas na face dorsal, verdes na face ventral, gomos verdes, porte ereto e meio ereto.
- Gavinhas - são médias e descontínuas de comprimento médio e tearâneas, vigorosas e divididas.
- Folha adulta - com tamanho médio, cuneiforme, trilobada com três ou por vezes cinco lóbulos, às vezes quinquelobada, com cor verde médio, perfil em goteira, fraca a fortemente bolhosa, dentes curtos e médios, de lados retilíneos, com lados convexo-concâvos. Raras vezes apresenta enrolamento e ondulação entre as nervuras principais. Seio peciolar pouco aberto, com base em V e seios laterais superiores com base em V, por vezes em U. Página inferior cotanilhosa, mas menos intensamente no que se refere às nervuras principais. Peciolo penugento e mais curto que a nervura principal média.
- Cacho - tamanho médio, cilindro-cônico e alado, compacidade média a forte, pedúnculo médio de média lenhificação.
- Bago - tamanho médio e uniforme, arredondado, negro-azul, com bastante pruína, película de espessura média e hilo pouco aparente, polpa corada, mole, suculenta e de sabor especial, pedicelo de comprimento médio e fácil separação.
- Película - com espessura média e fortemente pruínado.
- Grainhas - de tegumento duro, predominam em número de três por bago. Tamanho médio, piriformes, de bico comprido pouco pronunciado.
- Polpa - com cor ligeiramente corada, mole e suculenta, pedicelo de comprimento médio.
- Sarmento - de secção transversal elíptica, superfície estriada e costada, cor

castanha amarelada, com entrenós de comprimento médio e nós relativamente volumosos, gomos de tamanho médio, em cúpula e salientes.

1.6.3 Caracterização do potencial enológico

Apresenta-se como uma casta vigorosa e regular na produção, com um índice de fertilidade e produtividade média. Com um ciclo curto e de maturação intermédia, originando vinhos de cor intensa, vermelho granada e aroma vinoso, essencialmente a frutos silvestres, sabor também vinoso, bastante encorpado e levemente adstringente (Mota e Garrido, 2001). A casta apresenta os seguintes parâmetros de potencial enológico, relativos ao mosto e ao vinho, (Vinetowinecircle, 2017). A caracterização do mosto desta casta pode ser avaliada tendo em conta os seguintes parâmetros:

- Grau alcoólico provável – médio (11,5 % vol).
- Acidez total – elevada (7 - 9 g/l de acidez tartárica).
- Sensibilidade do mosto à oxidação – baixa.
- Intensidade da cor – elevada.

A caracterização do vinho desta casta pode ser avaliada tendo em conta os seguintes parâmetros:

- Tonalidade – vermelho granada.
- Sensibilidade do vinho à oxidação – baixa.
- Análise laboratorial dos aromas - vinosos, adstringentes e sabor a frutos silvestres.
- Capacidade de envelhecimento – boa.
- Recomendação para lote - loteado com castas pouco corantes e ricas aromaticamente como o Borraçal.
- Monovarietal – boa aptidão para vinho verde de monocasta.
- Ficha de prova – vermelho granada, cor intensa, aroma e paladar vinoso, sabor frutos silvestres (amora e framboesa), encorpado e adstringente.
- Padrão de qualidade – média.

1.6.4 Caracterização fitoquímica

A casta Vinhão relativamente à sua caracterização fitoquímica é ainda pouco abordada na bibliografia enológica.

Relativamente ao conteúdo de polifenóis podemos encontrar flava-3-ols (catequina, epicatequina) presentes na película e grainha da casta Vinhão. Verificaram-se também as seguintes quantificações de (31,0%) de fibras, (16,4%) de óleos nas grainhas e (13,18 %) de proteínas na película.

Quanto às antocianinas presentes no vinho desta casta, foram descritas uma pequena concentração de antocianinas monoméricas de polímeros ou pigmentos condensados responsáveis pela coloração vermelha dos vinhos, especificamente ao conteúdo de antocianinas temos a delphinidina-3-glucósido, a cianidina-3-glucósido e a petunidina-3-glucósido. Em relação à presença dos ésteres cinâmicos, sobressaem os cumáricos (Canas *et al.*, 2000).

Em relação ao conteúdo de estilbenos verifica-se a presença de três compostos do tipo viniferina identificados como ϵ -viniferina-2-Glucosido, ϵ -viniferina-glucósido e um polímero de duas moléculas de ϵ -viniferina (Lima *et al.*, 2009).

1.7. A importância do estudo de caso

O estudo desta casta desde a análise do conteúdo fitoquímico e a atividade antiradicalar considerando-a com potenciais efeitos benéficos para a saúde.

A sua valorização é importante na Região dos Vinhos Verdes e na sub-região de Basto, a sua produção tem vindo a decrescer a nível regional, ainda mantida em algumas vinhas velhas, mas pouco introduzida nos novos projetos. Reconhecida na região e conotada pela sua adstringência e sabor característico, atribuindo para a cor única carregada aos vinhos jovens verdes tintos.

A amostragem em estudo foi recolhida numa adega da sub-região de Basto, com o objetivo de realizar um rastreio da casta desde a análise do cacho da uva (película, polpa e engaço), mosto em vários estados (mosto do primeiro dia de vinificação (M1), mosto do primeiro dia de vinificação e pasteurizado (MP), e mosto ao fim de três dias de fermentação (M2) e a análise do produto final o vinho resultante da fermentação.

A finalidade deste estudo é o seu reconhecimento a nível regional, nacional e internacional, pelas suas potenciais propriedades fitoquímicas e antiradicalares benéficas para a saúde, como forma de valorizá-la futuramente, e incentivar a sua forte implementação em

projetos futuros de produções enológicas. Ao mesmo tempo despertar a inovação e criação de novos subprodutos alternativos derivados desta casta nas várias vertentes: alimentar como sumos a partir de mostos pasteurizados, área da saúde e cosmética pelas propriedades antioxidantes.

1.8. Objetivos

Este estudo tem como objetivo a valorização da casta Vinhão na Região dos Vinhos Verdes de forma a afirmar a sua potencialidade benéfica para a saúde pela análise da uva, dos subprodutos bioativos, dos mostos e do vinho.

Para concretizar o objetivo principal, definiram-se os seguintes objetivos secundários: determinar os parâmetros físico-químicos (acidez total, ph, grau brix, tav provável, massa volúmica e SO₂ total, tava e açúcares totais) das amostras; quantificar o conteúdo fitoquímico (fenóis totais, flavonóides, *orto*-difenois e antocianinas) dos componentes do cacho da uva (película, polpa, engaço), dos mostos e do vinho como produto resultante do processo de vinificação; avaliar a atividade antioxidante das amostras, através dos métodos de ABTS e DPPH

Por fim, analisar as amostras a nível sensorial com uma prova descritiva dos mostos e vinho para averiguar a sua conformidade de acordo com a legislação.



Capítulo II

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

A colheita das amostras foi efetuada durante a vindima de 2014, entre os meses de Setembro e Outubro na Adega Santa Cristina, Rua de Santa Cristina, n.º 80 Veade, 4890 - 573 Celorico de Basto, na Região dos Vinhos Verdes, com as coordenadas GPS da quinta 8°00.299` W e 41° 24.339` N.

Neste trabalho foi utilizada a casta de uvas (*Vitis vinifera* L.) Vinhão, a colheita dos bagos fez-se em triplicado, com cinco bagos cada amostra, resultando três réplicas de cada amostra, a colheita fez-se aquando da receção das uvas na adega, estas amostras foram congeladas até ao momento da sua análise.

Os engaos foram recolhidos no momento do desengace durante o processo de vinificação, lavados, depois congelados até à sua utilização. Posteriormente descongelados e secos em estufa durante 72 h a 40 °C e reservados em local seco. Procedeu-se a moagem do engao seco.

Os mostos foram recolhidos iniciando-se pelo (M1), recolhido diretamente do lagar após a “pisa a pé” e acondicionado em frascos esterilizados e congelado até a sua utilização.

Seguidamente o (MP), após a “pisa a pé ”das massas retirou-se uma amostra para o procedimento de pasteurização, este procedimento foi baseado num método de pasteurização caseiro em que o mosto foi acondicionado dentro de um frasco devidamente esterilizado, encheu-se até cerca de 2 cm do bordo e imediatamente fechou-se bem com a tampa de metal também esterilizada. Posteriormente foram imersos em água a ferver até cerca de 2/3 da altura do frasco, com o tempo de fervura de 60 min e após arrefecimento, reservou-se à temperatura ambiente.

A recolha do (M2) ocorreu após o 3º dia de fermentação, recolheu-se a amostra de mosto diretamente do lagar acondicionou-se em garrafa e foi reservado no congelador. Todas as amostras foram recolhidas e reservadas em triplicado.

Relativamente ao vinho reservou-se três garrafas de vinho da casta Vinhão após todo o processo de vinificação, já pronto a ser consumido.

2.2 Determinação de parâmetros físicos-químicos

2.2.1 Acidez total

Acidez total caracteriza-se pela soma de todos os ácidos tituláveis de pH 7 em que se excluí o CO₂. Os valores de acidez total devem ser superiores a 3,5g/dm³ expresso em gramas de ácido tartárico (OIV, 2017).

A análise foi efetuada segundo o método interno MI 075 (FTIR) do laboratório da CVRVV.

Procedeu-se à aceitação do equipamento para iniciar as análises das amostras. Começou-se por colocar um MRI (Material de Referência Interno) que consiste na utilização de padrões de verificação de justeza, antes das amostras a analisar e depois também no fim do ensaio. Posteriormente encheu-se os tubos do amostrador (10 cm³) com as amostras e MRI's, depois colocaram-se os tubos no tabuleiro do amostrador automático iniciando na posição 1 do círculo externo e assim sucessivamente (nesta fase confirmou-se se o amostrador 1 se encontra posicionado por baixo do capilar de aspiração). Em seguida iniciaram-se as leituras conforme o procedimento operativo PO 060/YY, depois aceitam-se os resultados. No fim dos ensaios, retiraram-se os tubos do mostrador e procedeu-se à manutenção do equipamento conforme descrito no procedimento operativo.

2.2.2 pH

O pH transmite-nos as condições de acidez dos mostos e dos vinhos, é também importante para se controlar as condições acéticas que condicionam o crescimento e desenvolvimento de leveduras e bactérias nos mostos durante as fermentações.

Para o procedimento da análise do pH fez-se inicialmente uma verificação do equipamento, o teste da justeza, este procedimento é feito em cada análise e após a execução e aceitação dos testes de alinhamento ótico, em que consiste numa verificação do equipamento (curva de calibração) em que se analisaram os padrões de verificação de justeza. Se os padrões de verificação de justeza estiverem acondicionados no frigorífico, retirá-los e aguardar aproximadamente 60 minutos para estabilizar à temperatura ambiente, também se podem colocar num banho termostatzado a 20°C e aguardar cerca de 20 minutos.

Posteriormente encheram-se os 2 tubos, do amostrador (10 cm³) com cada padrão, e foram colocados no tabuleiro do amostrador automático, inicialmente na posição 1 do círculo externo e assim consecutivamente (nesta fase confirmou-se se o amostrador 1 se encontra posicionado por baixo do capilar de aspiração). Depois deu-se início às leituras conforme o

procedimento operativo PO 060 / YY, depois aceitam-se os resultados.

2.2.3 Grau brix

A determinação do grau brix realizou-se recorrendo à refractometria (OIV, 2017), utilizando-se um refratômetro de mão. O valor obtido representa a percentagem de sacarose por 100 g de solução existente na amostra.

2.2.4 Título alcoométrico volúmico em potência (Tav Provável)

Entende-se por título alcoométrico volúmico em potência, o número de volumes de álcool puro a uma temperatura de 20°C suscetíveis de serem produzidos por fermentação total dos açúcares contidos em 100 volumes do produto considerado a essa temperatura.

O método baseia-se no rendimento da fermentação alcoólica dos açúcares. A legislação Vitivinícola da União Europeia (CVRVV, 2017) assume que o teor em açúcar do mosto, em g/l, multiplicado pelo fator 0,05943 corresponde à obtenção de 1% vol. de álcool, para se efetuar o cálculo do título alcoométrico volúmico em potência tem por base a determinação dos açúcares redutores / açúcares totais.

Para se obter um resultado final é necessário recorrer a dois cálculos:

- Cálculo do título alcoométrico volúmico em potência com base nos açúcares totais, com a aplicação da seguinte fórmula de cálculo.

$$TAVP = ATOT \times 0.05943$$

Em que:

TAVP – é o título alcoométrico volúmico em potência expresso em % vol.

ATOT – é o teor de açúcares totais expressos em g/ dm³.

- Cálculo do título alcoométrico volúmico em potência com base nos açúcares redutores, com a aplicação da seguinte fórmula de cálculo.

$$TAVP = AR \times 0.05943$$

Em que:

TAVP – é o título alcoométrico volúmico em potência expresso em % vol.

AR – é o teor de açúcares redutores expressos em g/ dm³.

Os resultados do título alcoométrico volúmico em potência são apresentados às décimas e expressos em % vol.

2.2.5 Massa volúmica

A determinação da massa volúmica apresenta algumas vantagens principalmente quanto à concentração de açúcares existentes nos mostos (Curvelo- Garcia 1988)

A análise da massa volúmica foi efetuada pelo método interno MI 072 utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da CVRVV.

2.2.6 SO₂ total

Foram efetuados os ensaios da determinação do dióxido de enxofre total pelo método interno MI 104 que utiliza a técnica de potenciometria da CVRVV.

Após a preparação do sistema e aferição do titulante, procedeu-se à análise das amostras, começando-se por medir para copos específicos do titulador automático 25,0 cm³ de cada amostra colocá-las no tabuleiro, com início na posição 1 e preenchendo sequencialmente as posições a seguir, em que a última amostra foi colocada em duplicado e realizou-se a titulação potenciométrica. O teor de dióxido de enxofre livre (SO₂ L), em mg/dm³, é calculado automaticamente pelo software do equipamento a partir da expressão $SO_2 L = V(I_2) \times C(I_2) \times 64000/V_a$

Em que:

* V(I₂), representa o volume da solução de iodo 0,01 M gasto na respetiva titulação (cm³);

* C(I₂), representa a concentração rigorosa da solução titulante de iodo; * V_a, representa o volume de amostra (25,0 cm³).

2.2.7 Açúcares Totais

O método em causa consiste numa análise por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de compostos que apresentam bandas de absorção na região da radiação infravermelha do espectro eletromagnético. O espectro da amostra analisada apresenta bandas de absorção características de determinados compostos que são comparadas com os usados na calibração de cada um deles e assim determinado o seu valor analítico. O método utilizado foi segundo o método interno da CVRVV para a análise dos açúcares totais. Foi efetuado o ensaio de açúcares totais (glucose + frutose) e calculado pelo software do equipamento em função da calibração em vigor. Os resultados são apresentados com uma casa decimal e nas unidades de g/dm³.

2.2.8 Título alcoométrico volúmico adquirido

O título alcoométrico volúmico adquirido (Tava) considera-se o número de dm^3 de etanol contidos em 100 dm^3 de amostra, sendo ambos medidos à temperatura de 20°C . O método em causa consiste numa análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de compostos que apresentam bandas de absorção na região da radiação infravermelha do espectro eletromagnético. O espectro da amostra analisada apresenta bandas de absorção características de determinados compostos que são comparadas com os usados na calibração de cada um deles e assim determinado o seu valor analítico. A análise foi efetuada pelo método interno MI 005 da CVRVV.

2.3 Extração dos compostos fenólicos

2.3.1 Engaço

Ao iniciar o processo de extração pesaram-se 40 mg de engaço seco moído, aos quais se adicionou 1,5 ml de MeOH/H₂O (70:30, v/v). Ficando a agitar (Edmund Bühler KL2 7400, Tübingen, Alemanha) pelo período de 30 minutos à temperatura ambiente. Após o processo de extração procedeu-se à centrifugação das amostras (Sigma 2-16 K) pelo período de 15 minutos a 5000 (*rpm*), procedeu-se à remoção do sobrenadante. Este procedimento foi repetido 5 vezes para cada amostra. Para a conclusão do processo fez-se um acerto do volume de extrato num balão volumétrico de 10 (mL) e analisadas 3 réplicas de cada amostra.

2.3.2 Bagos

Para a extração dos compostos fenólicos dos bagos, procedeu-se à separação dos componentes do bago (película, polpa). Foram identificadas 3 réplicas de amostragem (A,B,C). Em seguida, pesaram-se as amostras, para a película (A=1,5216g; B=1,6520g; C=1,6605g) adicionou-se 10 mL de MeOH/H₂O (70:30, v/v) para se proceder à extração, este procedimento repetiu-se 5 vezes para cada amostra. No final o volume do extrato foi aferido num balão volumétrico de 50 mL e analisaram-se 3 réplicas de cada amostra.

Para a polpa pesou-se as amostras (A=7,7593g; B=6,4535g; C=6,1955g) adicionou-se 10mL de MeOH/HCl (v/v) para se proceder à extração, este procedimento repetiu-se 3 vezes para cada amostra. No final o volume do extrato foi aferido num balão volumétrico de 25 mL, e analisaram-se três réplicas de cada amostra.

2.4 Determinação do teor de fenóis totais

O método utilizado para a determinação do teor de fenóis totais das amostras foi o do Índice de Folin-Ciocalteu, descrito por Curvelo-Garcia (1988). Para a determinação dos fenóis totais, usou-se o método espectrofotométrico por reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, análise colorimétrica, descrito por Domínguez-Perles *et al.*, (2014).

O seu princípio baseia-se na redução em meio alcalino, da mistura dos ácidos fosfotungstíco (H₃PMo₁₂O₄₀) e fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀) a óxidos de tungsténio (W₈O₂₃) e de molibdénio (Mo₈O₂₃).

Começou-se por pipetar 1 mL de amostra, num tubo de ensaio, e adicionar sequencialmente: 0,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu, 2 mL de solução Na₂CO₃ [20% (p/v)] e 6,5 ml H₂O destilada.

Após homogeneização, introduziu-se num banho a 70°C durante um período de 30 minutos. Finalmente arrefeceu-se em água corrente e procedeu-se à leitura das absorvâncias a 750 nm, em cuvetes de 10 mm de percurso ótico.

Para a construção da reta de calibração, preparou-se uma solução padrão de ácido gálico, nas diferentes concentrações de 200, 150, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/L⁻¹, que permitiu adquirir uma reta de calibração $y = 0,0085x + 0,0845$ com $r^2 = 0,9992$ (em que, por interpolação, usada para quantificar o conteúdo de fenóis totais de cada amostra em estudo).

O conteúdo de fenóis totais foi expresso em equivalentes de miligramas de ácido gálico por grama de peso seco de amostra (mg GAE g⁻¹ ps).

2.5 Determinação do teor de flavonóides

Para determinar o teor de flavonóides presente nas amostras usou-se o método colorimétrico por complexação com cloreto de alumínio, originando uma coloração alaranjada, descrito por Zhishen *et al.*, (1999). Para a análise seguiu-se uma metodologia previamente descrita Barroso *et al.*, (2011) num tubo de ensaio colocou-se 0,5 mL de amostra e 150 mL de solução de nitrito de sódio ((NaNO₂) 50 g L⁻¹), aguardou-se 5 minutos. Em seguida, 150 mL de solução de cloreto de alumínio ((AlCl₃)100 g L⁻¹), e aguardou-se a reação durante 6 minutos. Posteriormente adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio ((NaOH) (1M)) Finalmente agitou-se no vortex durante 30 segundos e leu-se a absorvância a 510 nm.

Procedeu-se de igual modo para os padrões de catequina nas concentrações de (250, 150, 100, 50, 25, 10, 5, 0 mg L⁻¹), que foram utilizados na construção da reta de calibração $y = 0,009x + 0,056$ com $r^2 = 0,9999$ e também para quantificação do conteúdo em flavonóides nas amostras. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de miligramas de catequina por grama de peso seco de amostra (mg CE g⁻¹ ps).

2.6 Determinação do teor de *orto*-difenóis

A determinação do teor em *orto*-difenóis presente nas amostras foi efetuada pelo método colorimétrico da complexação dos *orto*-difenóis com os iões molibdato de sódio, descrito por Mateos *et al.*, (2001) atribuindo uma cor alaranjada. Inicialmente procedeu-se à adição num tubo de ensaio 4 mL de amostra e 1 mL de solução de molibdato de sódio (50 g L⁻¹), agitou-se e incubou-se as reações protegidas da luz à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após esse período fizeram-se as leituras da absorvância a 375 nm, em que se obteve uma reta de calibração $y = 0,103x + 0,1452$ com $r^2 = 0,9995$ para todas as amostras,

procedeu-se de forma semelhante para a construção da reta de calibração com soluções L⁻¹. O ácido gálico usou-se como padrão na determinação dos *orto*-difenóis. O conteúdo de *orto*-difenóis presente nas amostras foi calculado por interpolação dos valores obtidos a partir da reta de calibração e foi expresso em equivalentes de miligramas de ácido gálico por grama de peso seco de amostra (mg GAE g⁻¹ ps).

7. Determinação do teor de antocianinas totais

O método utilizado para determinar o teor de antocianinas foi o doseamento de antocianinas por diferença de pH, descrito por Curvelo-Garcia, (1988), em que a diferença de pH, provoca uma variação da intensidade de cor. Esta variação foi quantificada espectrofotometricamente e traduziu-se na concentração de antocianinas totais em mg/L.

Para a quantificação das antocianinas totais, prepararam-se dois tubos de ensaio, ao primeiro tubo (tubo I): adicionou-se 1 mL de amostra concentrada, 1 mL de solução etanólica 0,1% HCl concentrado e 10 mL de solução tampão HCl a 2% com pH 3,5; e no segundo tubo (tubo II): adicionou-se 1 mL de amostra concentrada, 1 mL de solução etanólica 0,1% HCl concentrado e 10 mL de uma solução de HCl a 2% com pH 0,6 (Lee *et al.*, 2005).

As absorvâncias dos tubos I e II foram lidas a 520 nm, depois de determinadas as absorvâncias dos tubos I e II, foram designadas por AI e AII, para o cálculo da quantidade de antocianinas totais presentes em cada amostra através da fórmula:

$$\text{Antocianinas totais (mg/L)} = 400 \times (\text{AII} - \text{AI}).$$

8. Determinação da atividade antiradicalar

8.1 Capacidade de neutralização do radical ABTS^{•+}

Para determinar a atividade antioxidante das amostras em estudo foi utilizado o método de ABTS (2,2- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (Mena *et al.*, 2011). Numa fase inicial foi preparado o catião radical de ABTS^{•+} em que se misturou uma solução de persulfato de potássio 148 mM com uma de ABTS 7 mM numa solução aquosa (5 mL) (88:5000 v/v). Deixou-se reagir durante 12-16h no escuro à temperatura ambiente para o seu estado oxidativo estabilizar.

Prosseguiu-se com a preparação da solução de trabalho de ABTS^{•+} com a diluição da solução anterior (1:88) com o tampão de acetato de sódio 100 mM (pH 4,5), até estabilizar a absorvância entre 0.70±0.02 a 734 nm e lida numa cuvete de 1 cm de largura, usou-se o

padrão Trolox. A solução de Trolox 1 mM foi preparada por diluição da solução 5 mM em tampão de acetato de sódio.

Esta solução de trabalho foi diluída 1:5 (v/v) em solução tampão de acetato de sódio para chegar à solução de Trolox 0,2 mM. Desta última diluição efetuaram-se as diluições sucessivas de ½ em tampão de acetato de sódio (0,2 – 0,034 mM) para obter a reta de calibração $y = 3429,2x - 0,8205$ com $r^2 = 0,9925$ usada para a determinação da capacidade de captação de radicais livres dos compostos polifenólicos das amostras, à exceção do vinho usou-se a reta de calibração $y = 3989,7x - 1,1383$ com $r^2 = 0,9959$.

Para a determinação da atividade antiradicalar das amostras pelo método do ABTS, seguiu-se a mesma metodologia em tubos de ensaio. Assim, adicionou-se em 3 tubos de ensaio 2 mL da solução de trabalho de ABTS•, 200, 100 µL de amostra diluída e 100, 150 µL de água para completar o volume dos tubos de ensaio que não continham 2,2 mL. Este ensaio foi realizado em duplicado. Após 15 minutos de espera leu-se a absorvância a 734nm. Por interpolação a partir da reta de calibração, foi determinada a atividade antioxidante das amostras. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox/g de película (Ozgen *et al.*, 2006).

2.8.1 Capacidade de neutralização do radical DPPH•

A solução de DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) apresenta uma cor violeta forte e encontra-se comercialmente disponível, a análise do DPPH é uma forma fácil e rápida para a determinação da capacidade antioxidante.

Previamente foi preparada uma solução de trabalho de DPPH, dissolução do DPPH em metanol absoluto (8,87 mM). De forma a quantificar a capacidade antioxidante, dilui-se em MeOH/H₂O (70:30, v/v), uma alíquota da solução de trabalho. Esta solução teve um ajuste até ler-se a absorvância de aproximadamente 1,000 num comprimento de onda de 520 nm.

Foi elaborada uma reta de calibração, usando como solução padrão o Trolox, esta foi diluída em MeOH/H₂O (50:50, v/v) para obter uma solução de 5 mM. Sendo esta de novo diluída em MeOH/H₂O (50:50, v/v) para se obter uma concentração de 2,5 mM. A partir da qual foram feitas diluições em série (1.250, 0.625, 0.313, e 0.156 mM) em MeOH/H₂O (50:50, v/v) o que permitiu obter a reta padrão, $y = 25,112x + 10,953$ com $r^2 = 0,999$ usada posteriormente para quantificar a atividade antioxidante das amostras à exceção do vinho que tem a seguinte reta de calibração $y = 22,923x + 2,3906$ com $r^2 = 0,9901$. Os resultados da atividade da captação do radical DPPH das amostras foram calculados como equivalentes de

Trolox (TE) e expressos em equivalentes de μmoles de trolox por grama de peso seco ($\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ ps}$).

Em cada poço da microplaca adicionou-se 196 μL da solução etanólica de DPPH e 4 μL de cada amostra (diluída) que fez o volume total de 200 μL por poço. A solução de DPPH foi preparada sempre no momento da análise e conservada ao abrigo da luz e em temperatura controlada. As reações foram incubadas protegidas da luz solar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após incubação foram lidas as absorvâncias 520 nm e os resultados foram expressos em mg de trolox por 100 mL amostra (Mena *et al.*, 2011).

2.9 Análise Estatística

Para analisar as diferenças estatísticas entre os resultados, todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a um teste de gama múltipla (teste de Tukey), através do software estatístico IBM SPSS 21.0. Os dados apresentados são valores médios \pm desvio padrão. A análise de correlação foi realizada para corroborar as relações entre os parâmetros selecionados e as correlações significativas foram fixadas em $p < 0,05$.

2.10 Análise sensorial

Para a preparação da amostra colocaram-se dois copos de prova referentes a cada uma das amostras a analisar, e foram numerados sequencialmente por ordem crescente (1,2,3,4..) a amostra foi homogeneizada antes de se abrir, os copos de prova foram lavados com a amostra a ensaiar.

Depois verteu-se para cada copo, enchendo-os até cerca de 1/3 do seu volume, as amostras e servidas na sequência, correspondendo ao registo da primeira amostra de cada sessão o copo de prova com o número 1.

O ensaio foi realizado individualmente pelos provadores, que trocaram impressões no final da análise de cada amostra. Os resultados da discussão foram registados no documento “Ficha de prova de decisão”. O preenchimento foi efetuado pelos provadores com o registo dos seguintes dados referidos (**Tabela 3**).

Tabela 3 Parâmetros de caracterização sensorial das amostras (CVRVV, 2017)

Aspeto	Limpidez Cor Espuma	Referiu-se a limpidez da amostra. Referiu-se a cor da amostra. Referiu-se a existência de espuma na amostra e a caracterização.
Aroma	Caracterizou-se o aroma da amostra, usando-se termos ligeiros para definir intensidades médias de qualidade ou de defeito.	
Sabor	Caracterização do sabor da amostra, usando-se o termo ligeiro para definir intensidades medias de qualidade ou de defeito.	



Capítulo III

Resultados e Discussão

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros físico-químicos

Como referido no capítulo anterior, foram analisados os parâmetros físico-químicos das amostras (bagos, mostos e vinho) em estudo. Os parâmetros analisados foram: acidez total, pH, grau brix, título alcoométrico volúmico em potência, massa volúmica a 20°C e dióxido de enxofre total, açúcares totais e título alcoométrico volúmico adquirido conforme os resultados descritos na **tabela 4**.

Todos os parâmetros analisados encontram-se de acordo com o padrão estabelecido para vinhos e mostos, de acordo com a Legislação da Comunidade Europeia, nomeadamente Reg. (CE), nº 491/2009, anexo III.

Tabela 4 Resultados dos parâmetros físico-químicos analisados das amostras em estudo

Análises físico-químicas								
Amostras	Acidez total (g/ dm ³)	pH	Brix (% m/m)	Tav provável (% vol)	Massa vol 20 °c (g/cm ³)	SO2 Total (g/cm ³)	Tava (%/v/v)	Açúcares (mg/l)
Bagos	8,8	3,10	18,2	10,0	1,1	25,0	-	-
M1	10,3	3,10	17,6	9,8	1,1	32,7	-	-
MP	10,3	3,10	17,5	9,8	1,1	26,7	-	-
M2	-	3,30	3,8	10,5	1,0	22,2	-	156,0
Vinho	7,1	3,40	10,4	-	1,0	23,6	10,4	-

Iniciando a observação da **tabela 4** para a análise dos parâmetros físico- químicos dos bagos, em relação à acidez total, o valor apresentado foi de 8,8 g /dm³, de acordo com o trabalho de Santos, (2015) foram analisadas amostras de dois anos anteriores da casta Sousão na Região Demarcada do Douro, em que foi obtido o valor para o ano de colheita de 2012 (5,2 g/l de ácido tartárico) e em 2013 (3,2 g/l de ácido tartárico). Os valores obtidos estão de acordo com o estabelecido no Regulamento (CE) 491/2009, anexo III- 1 d, que estabelece o valor limite superior 3,5 g/l, exceto o valor apresentado referente ao ano de 2013 que é ligeiramente inferior ao valor limite.

Relativamente ao pH analisado dos bagos verificou-se o valor de 3,10, no trabalho de Santos, (2015) o valor referido para o ano de colheita de 2012 foi (3,36) e em 2013 (3,71).

Os bagos analisados obtiveram o valor de 18,2% (m/m) relativo ao grau brix, na literatura foi verificado o valor para o ano de colheita de 2012 (22,0 % (m/m)) e em 2013 (24,0 % (m/m)). O valor do Tav provável analisado foi de 10,0% vol.), comparativamente

com Santos, (2015) podemos verificar o valor para o ano de colheita de 2012 (12,8% (v/v)) e em 2013 (14,2 % (v/v)). Quanto à massa volúmica a 20°C apresentou o valor de 1,1 g/ dm³. Relativamente ao teor de dióxido de enxofre total obteve-se o resultado de 25,0 g/dm³.

Na sequência da análise dos parâmetros físico-químicos dos mostos, em relação à acidez total, para as amostras (M1 e MP) obtiveram-se os mesmos valores (10,3 g /dm³). Quanto ao pH dos mostos analisados podemos verificar que apresenta o mesmo resultado de 3,10 referente ao M1 e MP, exceto para o M2 que apresenta o valor de pH de 3,30. Como se pode verificar pelos valores relativos ao grau brix, existe diferenças o M1 apresentou o valor de 18,2 % (m/m), o MP o valor de 17,6% (m/m) e o M2 com um valor discrepante de 3,8 % (m/m).

No final da maturação, os bagos podem atingir valores superiores a 25 °Bx que correspondem a um potencial em álcool acima de 15%. É de salientar que a composição dos açúcares no bago tem como base a glicose e a frutose (hexoses), dando mais tarde origem ao álcool presente no vinho. Porém, ainda se encontram açúcares que não intervêm na fermentação alcoólica, em parte condensados constituídos por pentoses (Peynaud, 1989).

No que se refere aos valores da Tav provável analisada verifica-se o mesmo resultado para o M1 e MP (9,8% vol.) e (10,5% vol.) para o M2. Quanto à massa volúmica a 20 C° pode-se verificar o mesmo que no parâmetro anterior o valor de (1,1 g/ dm³) para o M1 e MP e (1,0 g/ dm³) referente ao M2.

Relativamente ao teor de dióxido de enxofre total obtiveram-se diferentes resultados (32,7 g/dm³, 26,7 g/dm³, 22,2 g/dm³) para o M1, MP e MP; respetivamente. Para os açúcares totais, registou-se para o M2, o valor de 156,0 mg/l.

No que se refere à análise do vinho pela observação da **tabela 4**, o valor apresentado foi de 7,1 g/dm³, a acidez total é considerada um parâmetro muito importante na conservação dos vinhos e auxiliar no controlo sobre a flora microbiana, de acordo com o trabalho de Tralhão, 2015 foram analisadas 12 amostras de vinhos da casta vinhão em que o valor médio de acidez total verificou-se (6,9 g/L de ácido tartárico). Pode-se concluir e de acordo com os valores apresentados, que estes estão de acordo com o estabelecido no Regulamento (CE) 491/2009, anexo III- 1 d, que estabelece o valor limite superior 3,5 g/L, assim como os valores referidos sendo característicos da casta em estudo, pela sua adstringência singular (Infowine, 2017).

Relativamente ao pH analisado verificou-se o valor de 3,4 que vai de encontro ao apresentado por Tralhão, (2015) 3,42 (valor médio das 12 amostras de vinho analisado da

mesma casta), a determinação deste parâmetro é de extrema importância na atividade enológica pelo efeito na atividade microbiana, intensidade da cor e sabor dos vinhos, assim como na prevenção de contaminações. O valor de pH pode variar devido ao ano de produção, condições edafo-climáticas (exposição solar da vinha, clima e solo) e ao processo de vinificação.

O vinho analisado apresentou o valor de 10,4% m/m relativo ao grau brix. Quanto à massa volúmica a 20 C° o valor analisado foi de 1 g/ dm³. O nível de dióxido de enxofre total analisado foi de 24 g/dm³, ligeiramente superior ao referenciado na literatura supra mencionada que referiu o valor médio de 20 mg/l. Segundo a OIV, (2017). Pode-se afirmar que os valores apresentados nos garantem uma boa conservação dos vinhos e que estão de acordo com o estabelecido na legislação em vigor que define o SO₂ total o valor máximo de 180 mg/l para vinhos tintos. Pode-se ainda referir conforme Stefenon, (2009). A importância da caracterização deste parâmetro com a finalidade de proteção e ação antimicrobiana e antioxidante. Para além da ação enzimática que protege da oxidação os compostos orgânicos do vinho e também no processo de oxidação dos ésteres e polifenóis, contribuindo desta forma para a qualidade total e longevidade dos vinhos.

Em relação ao título alcoométrico volúmico adquirido analisado foi de 10,4% (v/v) ligeiramente inferior ao referido por Tralhão, (2015) que apresenta o valor de 11,79% (v/v), este teor considera-se dentro da normalidade para a casta em questão (VinhoVerde, 2017).

3.2 Análise da composição fitoquímica das amostras

A quantificação de fenóis totais, *orto*-difenois, flavonóides e antocianinas totais dos extratos fenólicos da película, polpa, engaço, mostos e vinho da casta em estudo encontra-se descrito na tabela seguinte (**tabela 5**).

Tabela 5 Resultados da avaliação da composição fitoquímica dos extratos das amostras da casta estudada.

Amostra	Fenóis totais (mg GAE g ⁻¹)	Flavonóides (mg CAT g ⁻¹)	Orto-difenóis (mg GAE g ⁻¹)	Antocianinas Totais (mg/L)
Película	9,37 ± 0,38 ^b	10,31 ± 0,70 ^b	23,62 ± 1,41 ^b	878,87 ± 33,99 ^c
Polpa	0,43 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,05 ^a	192,27 ± 41,35 ^b
Engaço	21,17 ± 0,07 ^c	24,12 ± 0,04 ^c	43,69 ± 0,13 ^c	99,4 ± 2,55 ^a
M1	561,47 ± 32,65 ^a	505,21 ± 8,68 ^a	1667,9 ± 39,12 ^a	730,4 ± 49,13 ^a
MP	580,78 ± 5,87 ^a	1142,13 ± 29,23 ^b	1992,64 ± 23,45 ^b	791,93 ± 4,69 ^a
M2	1413,68 ± 29,13 ^b	1612,27 ± 8,04 ^c	3552,91 ± 57,65 ^c	364,8 ± 8,95 ^b
Vinho	3409,97 ± 1,60 ^a	10,51 ± 1,46 ^a	2141,10 ± 2,49 ^a	627,53 ± 6,18 ^a

*Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para cada parâmetro avaliado (teste Tukey).

Os resultados obtidos (**Tabela 5**) evidenciaram diferenças significativas entre as diferentes amostras em estudo.

Relativamente ao conteúdo de fenóis totais, neste método o reagente de Folin é reduzido na presença dos compostos fenólicos, adquirindo uma tonalidade azul, tanto mais intensa quanto maior o teor de fenóis totais, ocorrendo uma reação de oxidação/redução.

Este teor de fenóis totais avaliado corresponde a $9,37 \pm 0,38$ GAE g⁻¹ para a película $0,43 \pm 0,02$ mg GAE g⁻¹ para a polpa e $21,17 \pm 0,07$ mg GAE g⁻¹ para o engaço.

Verifica-se que das amostras anteriores todas apresentam diferenças significativas, sendo o engaço a amostra com o teor mais elevado de fenóis totais.

Pelos resultados obtidos podemos ainda constatar que a amostra com valores mais baixos de fenóis totais e significativamente diferente das restantes é a polpa com teores de $0,43 \pm 0,02$ mg GAE g⁻¹.

Comparativamente aos valores descritos por Santos, (2015) para a película, em que apresentava para a casta Sousão valores de $29,44 \pm 3,61$ GAE g⁻¹ para o ano de 2012 e $31,50 \pm 0,54$ GAE g⁻¹ para o ano de 2013, os valores apresentados neste trabalho encontram-se visivelmente abaixo dos descritos, o que pode estar relacionado com as condições edafoclimáticas associadas a cada ano de estudo. E ainda no trabalho de Ruberto *et al.*, (2007) para a casta Cabernet Sauvignon apresentava 10,65 mg ácido Gálico/g película, pelo que os valores deste estudo se encontram muito próximos. Já para a casta Merlot Noir descrito por Abe *et al.*,

(2007) que doseou 3,37 mg ácido gálico/g película, um valor bastante inferior ao apresentado neste estudo.

A fundamentação para os diferentes resultados obtidos no presente trabalho comparando-os com os dados bibliográficos, pode derivar da diferente região de produção, ano de colheita e estudo, das diferentes condições edafo-climáticas associadas a cada amostragem, assim como da metodologia utilizada, e ainda de diferentes castas.

No trabalho de Klapa,(2015) são descritos para o engaço da mesma casta teores de $23,9 \pm 0,15$ GAE g⁻¹, sendo estes muito próximos dos apresentados neste estudo.

Na análise da composição fitoquímica (flavonóides, *orto*-difenóis), os valores obtidos em cada uma das partes das amostras (película, polpa e engaço) são significativamente diferente entre si.

Em relação aos flavonóides dos diferentes componentes analisados, obtiveram-se teores de $10,31 \pm 0,70$ mg CAT g⁻¹ para a película; $0,33 \pm 0,00$ mg CAT g⁻¹ para a polpa e $24,12 \pm 0,04$ mg CAT g⁻¹ para o engaço.

Comparativamente aos valores descritos por Santos, (2015) para a película, em que apresentava para a casta Sousão valores de $11,28 \pm 1,86$ mg CAT g⁻¹ para o ano de 2012 e $10,61 \pm 0,26$ mg CAT g⁻¹ para o ano de 2013, os valores apresentados neste trabalho são valores muito próximos dos descritos. Em comparação com outra casta Merlot Noir segundo Katalinić, *et al.*, (2010), o valor de flavonóides obtido foi de 1,07 mg catequina/g película, valor bastante inferior ao apresentado neste estudo.

O teor de *orto*-difenóis analisado, corresponde a $23,62 \pm 1,41$ GAE g⁻¹ para a película; $0,80 \pm 0,05$ mg GAE g⁻¹ para a polpa e $43,69 \pm 0,13$ mg GAE g⁻¹ para o engaço.

Comparativamente aos valores descritos por Santos, (2015) para a película, em que apresentava para a casta Sousão valores de $30,75 \pm 4,26$ mg GAE g⁻¹ para o ano de 2012 e $30,80 \pm 1,28$ mg GAE g⁻¹ para o ano de 2013, os valores apresentados neste trabalho são valores relativamente próximos dos descritos.

Na análise do teor de antocianinas totais para os valores obtidos em cada uma das partes das amostras (película, polpa e engaço) os valores analisados evidenciam diferenças significativas entre si. Neste trabalho verificaram-se os resultados de $878,87 \pm 33,99$ mg/L para a película; $199,27 \pm 41,35$ mg/L para a polpa e $99,4 \pm 2,55$ mg/L para o engaço.

Comparativamente aos valores descritos por Santos, (2015) para a película, em que

apresentava para a casta Sousão valores de $1411,22 \pm 4,28$ mg/L para o ano de 2012 e $1528,33 \pm 9,75$ mg/L para o ano de 2013, os valores apresentados neste trabalho são valores claramente mais baixos que os dos descritos, o que se pode justificar mais uma vez, tendo em conta que estão a ser analisados metabolitos secundários, cujo teor depende consideravelmente das condições edafo-climáticas.

Em suma, para todos os parâmetros analisados (fenóis totais, flavonoides, *orto*-difenóis e antocianinas) as amostras (película, polpa e engaço), em todos os parâmetros existem diferenças significativas entre todas as amostras analisadas. O engaço representa a amostra com maior teor de fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis. No caso das antocianinas como se pode verificar a película é a que apresenta o maior teor, o que é espectável e neste caso o engaço é significativamente diferente da película e da polpa com o valor mais baixo.

Refira-se ainda, que alguns trabalhos usados para comparação dos resultados aqui obtidos, são de amostras de Sousão da Região do Douro, enquanto a, amostragem em estudo é da casta Vinhão da sub-região de Basto. Este facto pode afetar consideravelmente os resultados obtidos. E outros trabalhos da mesma região demarcada, mas de sub-regiões diferentes com diferentes microclimas que afetam consideravelmente os resultados.

Relativamente aos mostos analisados, o teor de fenóis totais apresentado $561,47 \pm 32,65$ mg GAE g⁻¹ (M1), $580,78 \pm 5,87$ 29,13 mg GAE g⁻¹ (MP) $1413,68 \pm 29,13$ mg GAE g⁻¹ para o (M2). Tal como referido no capítulo de material e métodos, os mostos (M1, MP, M2) correspondem respetivamente a amostras de mosto com um dia, pasteurizado no 1º dia e ao fim do 3º dia de fermentação. Neste caso verifica-se que entre o M1 e o MP (a única diferença é o processo de pasteurização), no caso dos fenóis totais não se verificaram diferenças significativas, no caso da amostra M2, esta já apresenta diferenças significativas das anteriormente referidas.

Em relação ao teor de flavonóides observou-se valores de $505,21 \pm 8,68$ mg CAT g⁻¹ (M1), $1142,13 \pm 29,23$ mg CAT g⁻¹ (MP) e $1612,27 \pm 8,04$ mg CAT g⁻¹ para o (M2).

No que diz respeito ao teor de *orto*-difenóis analisado, verificou-se valores de $1667,9 \pm 39,12$ mg GAE g⁻¹ (M1), $1992,64 \pm 23,45$ mg GAE g⁻¹ para o (MP) e $3552,91 \pm 57,65$ mg GAE g⁻¹ para o (M2).

Em relação aos mostos analisados para os teores de (flavonóides e *orto*-difenóis) pode-se dizer que apresentam diferenças significativas, entre todas as amostras analisadas

(M1, MP e M2).

Pela análise das antocianinas totais para os diferentes mostos, podemos constatar que não apresentam diferenças significativas, exceto para o M2 que apresenta diferença significativa dos restantes. O teor de antocianinas verificado foi de $730,4 \pm 49,13$ mg/L (M1), $791,93 \pm 4,69$ mg/L (MP) e $364,8 \pm 8,95$ mg/L para o (M2).

Em suma, na análise dos mostos podemos observar que tanto para os parâmetros (fenóis totais e antocianinas), não se verificam diferenças significativas para o M1 e MP, sendo que o M2, o que apresenta o maior teor de fenóis totais e antocianinas e significativamente diferente do M1 e MP. Pela análise dos resultados (*orto*-difenois e flavonoides) verifica-se diferenças significativas para todos os mostos analisados, sendo o M2 também aquele que apresenta o maior teor de *orto*-difenois e flavonóides, este valor é significativamente diferente dos mostos estudados.

Para o Vinho analisado neste trabalho e para todos os parâmetros fitoquímicos em estudo, verificou-se então: teor de fenóis totais ($3409,97 \pm 1,60$ mg GAE g⁻¹), teor de flavonóides ($10,51 \pm 1,46$ mg CAT g⁻¹), teor de *orto*-difenois ($2141,10 \pm 2,49$ mg GAE g⁻¹) e teor de antocianinas totais ($627,53 \pm 6,18$ mg/L).

Em comparação com o publicado por Castilho-Sánchez *et al.*, (2007) apresentava teores de antocianinas com valores entre 1835 e 2000 mg/L, e ainda no trabalho de Tralhão, (2015) verifica resultados do estudo de 12 amostras da mesma casta e da mesma região, que apresentava valores de fenólicos totais entre 2000,0 mg/L e 3916,7 mg/L (EAG), estes valores apresentados encontram-se em unidades diferentes não podendo ser comparados.

Jordão *et al.*, (2011), num trabalho sobre alguns vinhos tintos monocasta obteve para a casta Aragonez, os valores de TFT de 1392-2904 mg/L (EAG), enquanto para a Touriga Nacional, a concentração de fenólicos totais é de 887 a 3216 mg/L (EAG), valores claramente abaixo dos encontrados neste estudo.

Em suma podemos referir que existe neste estudo valores apresentados discrepantes, relativamente à literatura descrita, no que se refere à quantificação da composição fitoquímica pode ter variabilidade devido a vários fatores como: ano de colheita da amostra, variação climática e influência de microclimas das sub-regiões (seca ou pluviosidade), influência da região geográfica e respetiva região demarcada, variação de pH.

3.3 Análise da atividade antiradicalar

A avaliação da atividade antiradicalar foi realizada através de dois métodos, ABTS e DPPH, o que permitiu uma análise comparativa e uma apreciação acerca da capacidade de eliminação de radicais específicos dos extratos das amostras (**Tabela 6**).

Tabela 6 Resultados da avaliação da atividade antiradicalar pelo ABTS e DPPH dos extratos das amostras

Amostra	ABTS ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g}$)
Película	$3,91 \pm 0,11^b$	$9,94 \pm 0,72^a$
Polpa	$0,61 \pm 0,01^a$	$21,82 \pm 0,07^b$
Engaço	$11,63 \pm 0,58^c$	$28,75 \pm 2,50^c$
M1	$10,92 \pm 0,02^b$	$21,32 \pm 0,36^a$
MP	$7,87 \pm 0,06^a$	$28,02 \pm 1,05^b$
M2	$18,25 \pm 0,19^c$	$43,16 \pm 1,12^c$
Vinho	$21,05 \pm 0,22^a$	$31,03 \pm 1,32^a$

*Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para cada parâmetro avaliado (teste Tukey).

Verifica-se que independentemente da matriz em estudo, os valores obtidos para a capacidade antioxidante determinada pelo método de DPPH são sempre superiores aos obtidos pelo método de ABTS. Na avaliação da atividade antiradicalar, quer pelo método de ABTS quer pelo método de DPPH, verificou-se um comportamento distinto entre as amostras, verificando-se algumas diferenças significativas.

Em relação ao método de ABTS, os resultados obtidos para a capacidade antioxidante foram de $3,91 \pm 0,11 \mu\text{mol Trolox/g}$ (película) e $0,61 \pm 0,01 \mu\text{mol Trolox/g}$ (polpa) e entre $11,63 \pm 0,58 \mu\text{mol Trolox/g}$ (engaço).

Comparativamente aos valores descritos por Santos, (2015) para a película, em que apresentava para a casta Sousão valores de $0,10 \pm 0,003 \mu\text{mol Trolox/g}$ para o ano de 2012 e $0,26 \pm 0,007 \mu\text{mol Trolox/g}$ para o ano de 2013, os valores apresentados neste trabalho são valores claramente mais elevados que os dos descritos.

Em comparação com os resultados apresentados por Pinto, (2016) relativamente á atividade antiradicalar (ABTS e DPPH), comparando o engaço em estudo com os engaços das diferentes castas Tinto Cão, Tinta Roriz, Touriga Nacional, Touriga Franca e Tinta Barroca, o engaço da casta em estudo apresenta valores claramente superiores aos descritos.

Em suma, comparando os métodos (ABTS e DPPH) para as amostras (película, polpa e engaço) verifica-se que todas são significativamente diferentes entre si, sendo o engaço a que apresenta o maior teor de atividade antiradicalar.

Relativamente aos mostos verificou-se $10,92 \pm 0,02$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ (M1), $7,87 \pm 0,06$ (MP), e $18,25 \pm 0,19$ para o (M2), e o teor de $21,05 \pm 0,22$ correspondente ao vinho.

Em relação ao método de DPPH o teor de captação de radicais apresenta valores de $9,94 \pm 0,72$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ (película) e $9,94 \pm 0,72$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ (polpa) e entre $28,75 \pm 2,50$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ (engajo).

Relativamente aos mostos verificou-se $21,32 \pm 0,36$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ (M1), $28,02 \pm 1,05$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ (MP), e $43,16 \pm 1,12$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ para o (M2).

O vinho apresenta o teor $31,03 \pm 1,32$ $\mu\text{mol Trolox/g}$, em comparação com o trabalho de Tralhão, (2015) que apresenta resultados do estudo de 12 amostras de Vinhão da mesma Região Demarcada, que apresentava valores 2317,3 mg/L e 4462,7 mg/L (ET). Os trabalhos utilizados para comparar com este estudo apresentam-se diferentes unidades, não podendo ser feita a comparação, os métodos utilizados também diferem, daí a discrepância de valores serem de outra ordem de grandeza. Também a diferença pode derivar das diferentes castas analisadas, da região de produção, e das condições edafo-climáticas.

Em suma, no que diz respeito à atividade antiradicalar dos mostos pode-se concluir que existem diferenças significativas para todos os mostos avaliados, sendo que o M2 apresenta o maior teor e significativamente diferente dos restantes mostos,

3.4. Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada de acordo com o regulamento interno da CVRVV, pela camara de provadores certificada para o efeito, o que permitiu obter uma análise descritiva da qualidade dos mostos e vinhos em estudo (**Tabela 7**).

Tabela 7 Resultados da análise sensorial para das amostras (MP, M2 e Vinho) em estudo

Amostra	Aspecto – Limpidez MI 051	Aspecto – Cor MI 051	Aroma – Prova descritiva
Mosto Pasteurizado	Ligeiramente turvo	Vermelho rubi	Ligeiramente vinoso
Mosto 2	Turvo	Vermelho rubi	Compota frutos vermelhos
Vinho	Ligeiramente turvo	Vermelho rubi	Jovem

Os dados obtidos da análise sensorial das amostras representados na **tabela 7**, resultam de uma prova descritiva, em que foi efetuada uma análise qualitativa das amostras, nas quais

não foi detetado qualquer defeito significativo, podendo assumir-se que cumprem os critérios mínimos de certificação para mostos e vinhos.

Podemos assumir que, de acordo com o regulamento interno da CVRVV (reconhecida como uma entidade certificada) e da qual se rege a camara de provadores que procedeu às análises das amostras propostas (mostos e vinho) à análise sensorial, pelos resultados obtidos e transpostos numa escala sensorial de 0 a 10, podemos afirmar que todas as amostras apresentam valores superiores a 5, podendo concluir-se que todas as amostras tem qualidade e possuem características passíveis de serem certificadas com a denominação Denominação de Origem Vinho Verde, nomeadamente o MP, comprovando deste modo a sua aceitabilidade sensorial na criação de um novo produto da casta em estudo.



Capítulo IV

Conclusões e Perspetivas Futuras

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Pela análise dos compostos fenólicos para as diferentes amostragens do cacho da casta em estudo pode-se concluir que é no engaço da uva onde se concentram maioritariamente os compostos fenólicos e apesar da casta em estudo não ser considerada uma verdadeira casta tintureira, os valores dos seus compostos fenólicos são mais baixos na polpa.

No que respeita ao subproduto engaço, verifica-se como sendo uma importante fonte de compostos fenólicos e antioxidantes que podem ser utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, valorizando assim os subprodutos desta casta.

Pela análise dos mostos, podemos verificar que o M2, o que possui o maior teor em de compostos fitoquímicos (fenóis totais, flavonóides, *orto*-difenois) assim como capacidade antiradicalar, este mosto pode vir a ser usado como um novo produto alternativo ao vinho com características fitoquímicas e antiradicalares benéficas para a saúde.

Aferiu-se também que quanto mais elevado for o teor de fenóis totais ou flavonóides, maior é a atividade antiradicalar.

Em termos de matrizes avaliadas e nomeadamente o vinho, verifica-se que comparado com outras castas, a casta em estudo apresenta valores superiores o que pode ser importante para apelar ao consumidor o seu consumo moderado e associando os efeitos benéficos para a saúde.

Como perspetivas futuras, seria muito importante realizar uma análise HPLC, de forma a identificar e quantificar a composição fitoquímica presente em cada uma das amostras analisadas da casta Vinhão, podendo assim desta forma obter uma melhor ilação e explicação acerca dos resultados obtidos e as diferenças significativas.

Assim como, usar diferentes linhas celulares, como linhas celulares de cancro, para encontrar o potencial da atividade anticancerígena dos compostos fenólicos.



Capítulo V

Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, L.T., da Mota, R.V., Lajolo, F.M., Genovese, M.I.,(2007) Compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L. *Ciênc.Tecnol. Aliment.*,27, 394-400.

Adil, Í. H., Çetin, H. Í., Yener, M. E., & Bayindirli, A. (2007). Subcritical (carbon dioxide+ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids* 43, pp. 55-63.

Alonso, A. M., Guillén, A., Barroso, C. G., Puertas, B., García, A. “Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content.”.

Anklam, E., (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem* 63, 549-562

Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Oliveira, J., Fernandes, A., Freitas, V., Mateus, N. “Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins”. *Food Chemistry*, 119, 518-523

Bayili, R.G., Abdoul-Latif, F., Kone, O.H., Diao. M., Imael H., Bassole, N., Dicko H.M., (2011) Phenolic compounds and antioxidant activities in some fruits and vegetables from Burkina Faso. *Afr J Biotechnol* 10 (62), 13543-13547.

Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Teixeira, A., Collado-González, J., Moreno, D. A., Gil Izquierdo, A., Rosa, E., Domínguez-Perles, R. “Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study.” *Food Research International*, 2014: 65, 375-384.

Basha, S. M., Musingo, M., Colova, V. S. “Compositional differences in the phenolics compounds of muscadine and bunch grape wines.” *African Journal of Biotechnology*, 2004: 523-528.

Belitz H.-D., G. W. (1986). Olive oil. In *Food Chemistry* (p. 417). Springer-Verlag.

Berna, A., Cháfer, A., Montón, J. B. (2001). High-pressure solubility data of the system

resveratrol (3) + etanol (2) + CO₂ (1). *Journal of Supercritical Fluids* 19, 133-139

Bonany, J., Buehler, A., Carbó, J., Codarin, S., Donati, F., Echeverria, G., et al. (2013). Consumer eating quality acceptance of new apple varieties in different European countries. *Food Quality and Preference* 30, 250-259.

Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N. (1986). Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne. *Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin*, 59, 669-670; 1171- 1254.

Bravo, L., (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56, 317-333.

Cadenas, C., & Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidants*. Chapter 20 – The Phenolic Wine Antioxidants. 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

Canas S., Belchior A.P., Caldeira I., Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2000). La couler et son évolution dans les eux-de-vie *Lourinhã* pedant les trois premières années du vieillissement. *Ciência e Tec. Vitiv.*, 15 (1), 1-14.

Castilho-Sánchez J.X. Castillo-Sánchez a, M.S. García-Falcón c,*, J. Garrido b, E. Martínez Carballo, L.R. Martins-Dias, X.C. Mejuto (2007). Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines Influence of wine-making protocol and fining agents.

Číž, M., Čížová H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., & Lojek A. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control* 21, 518-523.

Curvelo-Garcia, A.S. *Controlo de qualidade dos vinhos*. Lisboa: Instituto da Vinha e do Vinho, 1988.

Domínguez-Perles, R., Teixeira, A. I., Rosa, E., Barros, A. I. “Assessment of (poly)phenols in grape (*Vitis vinifera* L.) stems by using food/pharma industry compatible solvents and response surface methodology”. *Food Chemistry*, 2014: 164, 339-346.

Egea, I. et al. (2010). Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, pp. 121-129.

- Fuleki, T., & Ricardo-da-Silva, J. M. (1997). Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1156-1160.
- Gara, L. D., Pinto, M. C., Tommasi, F., (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Phys Biochem*, 41, 863-870.
- Garrido, J., Borges, F. “Wine and grape polyphenols—A chemical perspective.” *Food Research International*, 2013: 54, 1844–1858.
- Gharras, H. E. “Polyphenols: Food sources, properties and applications—A review”. *International Journal of Food Science & Technology*, 2009:44 2512-2518.
- González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. R., López, F., Femenia, A. “ Physico- chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems.” *LWT- Food Science and Technology*, 2010: 43, 1580; 1586.
- González-Sanjosé, M., Barren, L.J.R., Junquera, B., Robredo, L.M. (1991). Application of principal component analysis to ripening indices for wine grapes. *Journal of Food Composition and Analysis*,4, 245-255.
- Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape seeds extract: correlation with antiradical activity. *Food Chemistry* , 100, 1-9.
- Hodges, D. M.,Lester, G. E., Munro, K. D., Toivonen, P. M. A., (2004) Oxidative stress: importance for postharvest quality. *Hortscience*, 39, 924-929.
- Jeffery, D. W., Parker, M., Smith, P. A. “Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography.” *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 2008: 14, 153–161.
- Jordão, A. (1996). *Evolução das antocianinas e Procianidinas ao longo da Maturação de uvas Tintas das castas Periquita e Touriga Francesa: Incidência da prática da rega* . Lisboa Universidade Técnica de Lisboa.

Jordão A.M., Ricardo-da-Silva J.M., Laureano O. (2001). Evolution of catechin and procyanidin composition during grape maturation of two varieties (*Vitis vinifera* L.), Castelão Francês and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 230–234.

Jordão A.M., Simões S., Correia A.C., Gonçalves F.J. (2011). Antioxidant activity evolution during Portuguese red wine vinification and their relation with the proanthocyanidin and anthocyanin composition. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36 (4), 298-309.

Karvela, E., Makris, D. P., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V. T., Kefalas, P. “Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction.” *European Food Research and Technology*, 2009: 22, 731-742.

Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., Boban, M. “Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia)”. *Food Chemistry*, 2010: 119, 715-723.

Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2, 41-60.

Kennedy, J. M. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55, 77-85.

klapa, (2015) Bioenergy and industrial applications of grape pomace from “Vinho Verde”.

Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., (2005) Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *JAOAC Inter*, 88, 1269- 1278.

Levin, L., Diorio, L., Grassi, E., Forchiassin, F. “Grape stalks as substrate for white rot fungi, lignocellulolytic enzyme production and dye decolorization.” *Revista Argentina de Microbiologia* , 2012: 44, 105-112.

Llobera, A., Canellas, J. “Dietary fibre and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem .” *Food Chemistry*, 2007: 101(2), 659–666.

Lorenzo, J. M., González-Rodríguez, R. M., Sánchez, M., Amado, I. R., & Franco, D. (2013)

Effects of natural (grape seed and Chestnut extracts) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage “chorizo”. *Food Research International* 54, 611-620.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R., (2007) Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem* 100, 1409-1418.

Manton, K. G., Volovik, S., Kulminski, A., (2004) ROS Effects on Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease and Related Disorders: On Environmental Stresses of Ionizing Radiation, *Cur Alzhei Res*, 1,4, 277-293(17).

Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. “Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts.” *Food Composition and Analysis*, 2007a: 20, 125-132.

Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. “Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures.” *Bioresource Technology*, 2007b: 98, 2963- 2967.

Mateos, R., Espertero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcludia, F. “Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection.” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001: 49(5), 2185-2192.

Maujean, A., Brun, O., Vesselle, G., Bureau, G., Boucher, J. M., Coisin, M., (1983) Investigations on grapevine maturation in the Champagne region: Method of forecasting the harvesting date, *Vitis*, 22, 137-150.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B., (1999) Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *J Agric Food Chem*, 47, 4009-4017.

McLean, J. A., Karadas, F., Surai, P., McDevitti, R., Speake, B., (2005) Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comp Biochem Physiol* 141, 366- 372.

Melo E.A., Maciel M.I.S., Lima V.L.A.G., Leal F.L.L., Caetano A.C.S., Nascimento R.J. (2006). Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos Campinas*, 26 (3), 639-644.

Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartuarl, J., Saura, D., Martí, N. “Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grow in Spain.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011: 91, 1893-1906.

Montealegre, P. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. L. C., Gascueña, J. M., Romero, G. “Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate.” *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006: 19, 687–693.

Moreno-Arribas, M., Polo, M., (2009) *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer.

Mota, M.T., Silva, M., 1986. Catálogo das Castas – Região Demarcada dos Vinhos Verdes. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Instituto de Gestão e Estruturação Fundiária, Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, Lisboa, Portugal (in Portuguese).

Mota, T., Garrido, J. (2001). *Implantação da Vinha. Castas, Porta-enxertos, Sistemas de Condução e Plantação. Manual técnico, CVRVV. Tip. Artes Gráficas Bacelar & Irmaos, Arcos de Valdevez.*

Naczki, M., Shahidi, F. “Extraction and analysis of phenolics in food.” *Journal of Chromatography A*, 2004: 1054, 95-111.

Ozgen, M., Reese, R. N., Scheerens, J. C., Tullio, A. Z., Miller, A. R. “Modified 2, 2-Azino bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2- ϕ -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006: 54, 1151– 1157

Peynaud, E. (1989). *Enologia Prática, Conhecer e trabalhar o vinho*, . Madrid: Mundi Prensa.

Pérez-Magariño, S., González-San José, M., (2006) Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.*, 96, 197-208;

Pinto, (2016) Desenvolvimento de bebidas licorosas com elevado teor de compostos bioativos através da valorização do engaço.

Pirie, A.J.G., Mullins, M.G., (1977) Interrelationships of sugars, anthocyanins, total phenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening. *Am J Enol Vitic*, 28, 204;

Popa, V. I., Agache, C., Beleca, C., Popa, M., (2002) Polyphenols from spruce bark as plant growth regulator. *Crop Res* 24, 398 – 406;

Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., Ravikumar, M. N. V., (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Contr Rele* 113, 189- 207.

Regulamento (CE) N° 491/2009 do Conselho de 25 de Maio de 2009, que altera Regulamento (CE) n° 1234/2007 que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas (Regulamento «COM única»). *Jornal Oficial da União Europeia*, 17.6.2009. L154.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). *Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex. 141-205 Science+Business Media. New York. 437-529.

Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., Tommasi, N., (2007) Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem*, 100, 203 – 210.

Santos, (2015) Estudo de parâmetros químicos e bioquímicos de castas tintas cultivadas na Região Demarcada do Douro.

Seigler, D., (2000). *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 1- 435.

Silva M. L. C. *et al.* (2010). Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Ciências Agrárias*, 31(3), pp. 669-682.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T.. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579, 200-213.

Sousa, (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova* 30 (2), 351- 355.

Stefenon C. (2009). O papel do dióxido de enxofre nos vinhos. *Revista Adega*.

Suriano, S., Alba, V., Tarricone, L., Di Gennaro, D. “Maceration with stems contact fermentation: Effect on proanthocyanidins compounds and color in Primitivo red wines.” *Food Chemistry*, 2015: 177, 382–389.

Sun A.Y., Simoniy A., Sun G.Y. (2002). The french paradox and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology e Medicine*, 32, 314-318.

Tawaha (2007) Antioxidante activity and total phenolic content of selected jordanian plant sciences. *Food chem* 104, 1372- 1378.

Tralhão, (2015) Propriedades antioxidantes e compostos bioactivos em vinhos portugueses monocasta.

www.cvrvv.pt (acedido em fevereiro de 2017).

www.fao.org (acedido em fevereiro de 2017) .

www.infovini.pt (acedido em fevereiro de 2017).

www.ivv.min-agricultura.pt (acedido em fevereiro de 2017).

www.oiv.int (acedido em fevereiro de 2017).

www.portodigital.pt (acedido em outubro de 2015).

www.vinetowinecircle.com (acedido em 30 novembro de 2015).

www.vinhoverde.pt (acedido em fevereiro de 2017).

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jiamming, W. “The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.” *Food Chemistry*, 1999: 64, 555-559.

“Não falta quem garanta ser o ritual das vindimas um momento mágico, feito de mãos que recolhem cachos de bagos maduros como se pegassem em pássaros feridos; de cestos de vime levados às costas como iniciados que assim fossem para ser presentes numa cerimónia pagã; de pés que, abençoados por invisíveis deuses, se empenhassem na tarefa de calcar o mosto para acordar a vida secreta que as uvas contêm; de uma poderosa alquimia que transforma a seiva dos frutos tenros em espirituoso néctar...”

(.....)

Verdes...