

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO



## **Avaliação do efeito da micro-oxigenação na estabilidade da cor e perfil volátil dos vinhos**



Margarete Susana Alves de Sousa Trigo



2º Ciclo em Enologia



*Orientador:* Professora Doutora Ana Novo Barros

*Co-orientador:* Engenheiro José Maria Machado



**VILA REAL, 2012**

## *Agradecimentos*

---

Concluída a elaboração desta dissertação de mestrado é também o término de mais um objetivo na minha vida. Desta forma, não podia deixar de agradecer a algumas pessoas que estiveram presentes e tornaram possível esta nova etapa e que contribuíram de forma relevante para a execução do mesmo. Daí que gostaria de prestar um sincero agradecimento:

À Professora Doutora Ana Barros que novamente neste meu percurso académico me orientou este trabalho. Obrigada pela sua ajuda, apoio e disponibilidade.

À Professora Doutora Alice pela sua sempre boa disposição, disponibilidade e ajuda que me dispensou na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Nunes, por todo o tempo dispensado e por todo o apoio que deu na parte do HPLC deste trabalho.

Ao painel sensorial da UTAD pela sua disponibilidade na realização das provas sensoriais.

Ao Engenheiro José Maria, pelo convite que me fez para a realização deste trabalho, na Sociedade dos Vinhos Borges em Vila Real e também um agradecimento por todos os ensinamentos que me transmitiu.

Ao Sr. António Miranda, pela sua amizade e também sua disponibilidade.

À equipa da Sociedade dos Vinhos Borges em Vila Real, à D. Cecília, Sr. Manuel, Sr. Alberto e Sr. Joaquim, que de uma forma contribuíram também para a realização prática deste trabalho. Obrigada também pela vossa amizade.

À minha família fantástica pelo constante apoio em todos os momentos da minha vida. Muito de quem sou hoje o devo também a todos vós.

À Susete, a minha Princesa, que nesta caminhada esteve sempre comigo mas sobretudo pela Amizade.

Ao Daniel, pelo seu amor.

E por último o meu agradecimento de coração aos meus pais Nair e Zé, que são o meu orgulho e são também as pessoas mais importantes na minha vida.

## Resumo

Entre as características que definem a qualidade de um vinho, destaca-se sem dúvida a cor como sendo um factor determinante, já que é um dos atributos que sensorialmente é primeiramente avaliado pelo consumidor, sendo mesmo um parâmetro fundamental na valorização final do vinho.

Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento exponencial ao nível da investigação neste campo, de forma a conhecer quer os compostos envolvidos na cor e responsáveis pela maior estabilidade, quer nos próprios mecanismos envolvidos no processo.

Neste trabalho, procedeu-se à aplicação da técnica de micro-oxigenação a duas castas características da Região Demarcada do Douro, Touriga Nacional e Sousão, de forma a tentar favorecer a formação de novos pigmentos que estabilizam a cor do vinho, além de potenciar certos aromas positivos.

Verificou-se que apesar de o painel de análise sensorial ter valorizado e encontrado diferenças nos vinhos micro-oxigenados relativamente aos vinhos testemunha, a análise do perfil em antocianinas não nos permitiu retirar as mesmas conclusões, já que não se verificou alterações nem no perfil de antocianinas monoméricas, nem alterações consideradas significativas na intensidade corante. O momento da aplicação do oxigénio (depois da fermentação maloláctica) pode ter sido determinante nestes resultados.

## **Abstract**

Among the characteristics that define the quality of a wine, there is no doubt that the color is a determinant factor, since it is one of the attributes that is sensorially evaluated primarily by the consumer, even being an essential parameter in the final evaluation of the wine. In recent years there has been an exponential increase in the level of research in this field in order to know whether the compounds involved in and responsible for color stability, whether the mechanisms involved. In this work, we proceeded to application of the technique of micro-oxygenation the two wine varieties characteristics of the Douro Region, Touriga Nacional and Sousão. We try to encourage the formation of new pigments that stabilize the color of wine, plus certain flavorings positive. It was found that although the sensorial panel analysis have valued and found differences in micro-oxygenated wines from witness wines, the profile analysis in anthocyanins not allow us to draw the same conclusions, since there was no change in the profile of monomeric anthocyanins, nor considered significant changes in color intensity. The timing of the application of oxygen (after malolactic fermentation) can have determined these results.

## *Índice Temático*

---

<i>Agradecimentos</i> .....	<b>ii</b>
<i>Resumo</i> .....	<b>iii</b>
<i>Abstract</i> .....	<b>iv</b>
<i>Índice de Figuras</i> .....	<b>viii</b>
<i>Índice de Tabelas</i> .....	<b>x</b>
<i>Índice de Abreviaturas</i> .....	<b>xi</b>
<i>Índice de Gráficos</i> .....	<b>xii</b>
<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	<b>1</b>
1. Introdução .....	3
1.1. Enquadramento temático .....	3
1.2. Compostos fenólicos .....	4
1.2.1. Flavonóides .....	5
1.2.1.1. Antocianinas .....	9
1.2.1.1.1. Equilíbrio das antocianinas em solução .....	11
1.2.1.1.2. Copigmentação.....	13
1.2.1.1.3. Reação das antocianinas com o bissulfito.....	14
1.2.1.1.4. Influência da temperatura .....	14
1.2.1.1.5. Influência do oxigénio .....	15
1.2.1.1.6. Ação das enzimas .....	16
1.2.2. Não Flavonóides .....	16
1.2.3. Taninos .....	19
1.3. Composição fenólica e cor dos vinhos .....	23
1.4. Propriedades químicas, físicas e biológicas .....	25
1.5. Evolução das características fenólicas dos vinhos tintos .....	27
1.6. Etanal .....	28
1.7. Micro-oxigenação .....	29
1.7.1. Objetivos da micro-oxigenação .....	30
1.7.2. Fases envolvidas na micro-oxigenação.....	31
1.7.2.1. Fase de ‘Estruturação’ .....	32
1.7.2.2. Fase de ‘Harmonização’ .....	32

1.7.2.3. Fase de ‘Saturação’ .....	33
1.7.3. Características do vinho antes da micro-oxigenação .....	34
1.7.4. SO <sub>2</sub> na micro-oxigenação.....	34
1.7.5. Momento de aplicação da micro-oxigenação .....	35
1.7.6. Temperatura do vinho na micro-oxigenação .....	36
1.7.7. Dose de adição de oxigénio a aplicar .....	36
1.8. Melhoria das características da cor e estabilidade: polifenóis e reação de oxidação .....	37
1.9. Objetivos do trabalho .....	38
<b>Capítulo II – Material e Métodos .....</b>	<b>41</b>
2. Material e Métodos .....	43
2.1. Amostragem e local .....	43
2.2. Controlo de Maturação .....	43
2.3. Processo de vinificação .....	43
2.4. Processo de micro-oxigenação.....	46
2.5. Equipamento .....	47
2.6. Dosagem e temperatura .....	48
2.7. Quantificação do teor em antocianinas por HPLC .....	48
2.8. Análise do perfil volátil por GC-MS .....	49
2.9. Análise Sensorial .....	50
<b>Capítulo III – Resultados e Discussão.....</b>	<b>51</b>
3. Resultados e Discussão .....	53
3.1. Controlo de maturação .....	53
3.2. Fermentação .....	56
3.2.1. Controlo e acompanhamento da fermentação alcoólica .....	56
3.2.1. Armazenamento .....	58
3.3. Resultados do perfil das antocianinas por HPLC .....	60
3.4. Evolução da cor .....	69
3.5. Análise do perfil volátil por GC-MS.....	71
3.6. Análise sensorial – Teste triangular .....	72
<b>Capítulo IV – Conclusões.....</b>	<b>75</b>
4. Conclusões .....	77
<b>Capítulo V – Bibliografia .....</b>	<b>79</b>
5.1. Bibliografia .....	81

<b>Capítulo VI – Anexos .....</b>	<b>95</b>
<b>6.1. Anexos .....</b>	<b>96</b>

## *Índice de figuras*

---

**Figura 1:** Estrutura base dos flavonóides

**Figura 2:** Estrutura química geral dos flavonóis e flavonóis mais abundantes nos vinhos

**Figura 3:** Estrutura química geral das flavonas

**Figura 4:** Estrutura química geral das flavanonas

**Figura 5:** Estrutura química geral dos flavanonóis

**Figura 6:** Estrutura química do flavanonol, a estilbina

**Figura 7:** Estrutura química do flavanonol, a engeletin

**Figura 8:** Estrutura das agliconas das principais antocianinas presentes nas espécies *Vitis vinifera*

**Figura 9:** Estrutura das antocianidinas 3-monoglucosídicas e respetivas formas esterificadas

**Figura 10:** Formas de equilíbrio das antocianinas em solução

**Figura 11:** Reações com o catião flavílio com formação de composto incolor

**Figura 12:** Estrutura química de ácidos hidroxibenzóicos **Figura 13:** Estrutura química de ácidos hidroxicinâmicos

**Figura 14:** Estruturas químicas de estilbenos monómeros identificados no género *Vitis*: 1 e 6: *trans*- e *cis*-resveratrol; 2 e 7: *trans*- e *cis*-astringina; 3 e 8: *trans*- e *cis*-resveratrolósido; 4 e 9: *trans*- e *cis*-“piceid”; 5 e 10: *trans*- e *cis*-pteroestilbeno

**Figura 15:** Resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-estilbeno)

**Figura 16:** Estrutura química de um tanino hidrolisável

**Figura 17:** Estrutura química do núcleo 3-hidroxi-flavano

**Figura 18:** Estruturas das unidades monoméricas das principais proantocianidinas

**Figura 19:** Estrutura química das proantocianidinas

**Figura 20:** Formação do etanal a partir do etanol

**Figura 21:** Evolução das fases organoléticas dos vinhos durante a aplicação do processo de micro-oxigenação

**Figura 22:** Esquema de vinificação

**Figura 23:** Representação esquemática do sistema de micro-oxigenação

**Figura 24:** Cromatograma inicial a 525nm representativo de uma amostra do Sousão sem micro-oxigenação

**Figura 25:** Cromatograma a 525nm representativo de uma amostra do Sousão micro-oxigenado a 0,2 mg/l/mês

**Figura 26:** Cromatograma inicial a 525nm representativo de uma amostra do Touriga Nacional sem micro-oxigenação

**Figura 27:** Cromatograma a 525nm representativo de uma amostra do Touriga Nacional micro-oxigenado a 0,2 mg/l/mês

## *Índice de tabelas*

---

**Tabela 1:** Concentração dos compostos fenólicos maioritários em vinho tinto e branco

**Tabela 2:** Parâmetros físico-químicos

**Tabela 3:** Fórmulas usadas no cálculo dos índices colorimétricos

**Tabela 4:** Quantidade de oxigénio em mg/L//mês adicionado aos diferentes vinhos

**Tabela 5:** Resultados do controlo de maturação do Sousão

**Tabela 6:** Resultados do controlo de maturação da Touriga Nacional

**Tabela 7:** Análises iniciais dos mostos de Touriga Nacional e Sousão

**Tabela 8:** Resultados dos parâmetros físico-químicos

**Tabela 9:** Antocianinas e respetivo tempo de retenção

**Tabela 10:** Diferentes percentagens das antocianinas monoméricas quantificadas nas amostras em estudo do Sousão

**Tabela 11:** Diferentes percentagens das antocianinas monoméricas quantificadas nas amostras em estudo do Touriga Nacional

**Tabela 12:** Percentagem de antocianinas monoméricas encontradas no Sousão

**Tabela 13:** Percentagem de antocianinas monoméricas encontradas no Touriga Nacional

**Tabela 14:** Características cromáticas do Sousão ao longo do processo de micro-oxigenação

**Tabela 15:** Características cromáticas do Touriga Nacional ao longo do processo de micro-oxigenação

**Tabela 16:** Resultados do teste triangular para o vinho da casta Sousão

**Tabela 17:** Resultados do teste triangular para o vinho da casta Touriga Nacional

## *Índice de abreviaturas*

---

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography

**dl-3gluc:** delphinidina-3-monoglucósido

**ci-3gluc:** cianidina-3-monoglucósido

**pt-3gluc:** petunidina-3-monoglucósido

**pe-3gluc:** peonidina-3-monoglucósido

**mv-3gluc:** malvidina-3-monoglucósido

**dl-3acetilgluc:** delphinidina-3-acetilglucósido

**ci-3acetilgluc:** cianidina-3-acetilglucósido

**pt-3acetilgluc:** petunidina-3-acetilglucósido

**pe-3acetilgluc:** peonidina-3-acetilglucósido

**mv-3acetilgluc:** malvidina-3-monoacetilglucósido

**dl-3cumgluc:** delphinidina-3-cumarilglucósido

**ci-3cumgluc:** cianidina-3-cumarilglucósido

**pt-3cumarilgluc:** petunidina-3-monocumarilglucósido

**pe-3cumarilgluc:** peonidina-3-monocumarilglucósido

**mv-3cumarilgluc:** malvidina-3-monocumarilglucósido

**AHC:** Ácidos Hidroxibenzóicos

**AHB:** Ácidos Hidroxicinâmicos

**DO:** Densidade Ótica ou Absorvância;

**IC:** intensidade corante ( $Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620}$ );

## *Índice de gráficos*

---

**Gráfico 1:** Evolução dos valores de álcool provável e do pH ao longo da maturação do Sousão

**Gráfico 2:** Evolução dos valores de álcool provável e do pH ao longo da maturação do Touriga Nacional

**Gráfico 3:** Evolução da fermentação alcoólica do Sousão

**Gráfico 4:** Evolução da fermentação alcoólica do Touriga Nacional

**Gráfico 5:** Perfil sensorial do vinho da casta Touriga Nacional, com e sem micro-oxigenação

**Gráfico 6:** Perfil sensorial do vinho da casta Sousão, com e sem micro-oxigenação



---

*Capítulo I – Enquadramento Temático*

---

## 1. Introdução

### 1.1. Enquadramento temático

Em Portugal, o setor dos vinhos tem vindo a desenvolver um lugar de destaque, tanto a nível cultural, social como económico.

Nos tempos que decorrem, cada vez mais a população quer nacional quer mundial tem vindo a apresentar um interesse crescente pelo vinho, razão pela qual esta bebida tem adquirido um novo papel particularmente a nível cultural.

Nos últimos anos, o conceito de qualidade nos vinhos tem vindo a modificar-se, particularmente resultante das cada vez maiores exigências por parte dos consumidores. Tem-se verificado a necessidade crescente não só de adaptação ao gosto do consumidor, como também aos diferentes mercados que são cada vez mais competitivos, o que torna o vinho um produto que está sempre em constante mudança.

O mercado atual do vinho tinto de alta qualidade exige não só vinhos de grande intensidade de cor e de alta concentração tânica mas também ricos quer em corpo quer em estrutura. Estas exigências implicam mudanças quer no cultivo da vinha quer na elaboração dos vinhos. Assim, é fundamental que os produtores saibam adaptar-se a estas mudanças para poderem triunfar num mundo cada vez mais competitivo, onde a inovação é um ponto determinante.

Muitos vinhos tintos de alta qualidade são tradicionalmente armazenados durante bastante tempo em barricas de carvalho, que melhoram as suas características sensoriais. O envelhecimento em carvalho leva a uma estabilização de cor, diminuição da adstringência e leva ao desaparecimento do excesso de notas vegetais. Estas últimas transformações parecem estar associadas a pequenas quantidades de oxigénio que vão penetrando na porosidade da madeira.

O processo de micro-oxigenação visa “mimetizar” os efeitos da maturação lenta em barrica, dentro de um curto período. Esta técnica de micro-oxigenação é relativamente recente, mas já está implementada por muitas adegas como alternativa mais barata ao armazenamento dos vinhos em barricas de carvalho.

## 1.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos aparecem espontaneamente nas sementes, folhas, flores e frutos das plantas (Ho *et al.*, 1992; Katalinić *et al.*, 2004), sendo conhecidos em 2000 mais de 8000 compostos fenólicos em plantas (Dreosti, 2000); atualmente sabe-se que este número é consideravelmente maior. Estes compostos não estão uniformemente distribuídos nas plantas; os insolúveis são componentes das paredes celulares, enquanto os solúveis encontram-se nos vacúolos celulares (Naczka *et al.*, 2004).

É um grande grupo de compostos que está presente em todos os seres vivos vegetais superiores (Landrault *et al.*, 2002), também em produtos industrializados feitos a partir destes como o vinho (Kova *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1999) e fazem parte integral da dieta humana (Katalinić *et al.*, 2004).

Na uva, os compostos fenólicos distribuem-se de forma diferente pelas diversas partes do fruto: grainhas, polpa, vasos fibrovasculares e película. Encontram-se nos vacúolos das células da polpa associados a polissacarídeos nos vasos fibrovasculares, e/ou livres no suco vascular das células da película. Nas grainhas estão localizados nos tecidos mais externos, cutícula e epiderme. Nas películas também se podem encontrar associados a polissacarídeos das paredes celulares e a proteínas constituintes das membranas dos vacúolos (Cabrita *et al.*, 1999).

Os compostos fenólicos são constituintes das uvas, estando presentes em vinhos brancos e vinhos tintos. Têm especial relevância em Enologia, uma vez que estão direta ou indiretamente relacionados com a qualidade do vinho (Cabrita *et al.*, 1999). Contribuem de forma benéfica para a cor dos vinhos tintos (devido essencialmente à contribuição das antocianinas) podendo também contribuir de forma prejudicial para a cor dos vinhos brancos (são muitas vezes responsáveis pelo seu escurecimento por ação da enzima polifenoloxidase), corpo e sabor (adstringência) dos vinhos. São também estes os responsáveis pelas diferenças entre castas ou vinhos tintos e brancos, estando esta diferença maioritariamente relacionada com o teor de antocianinas (Cabrita *et al.*, 1999).

Os compostos fenólicos são uma família de compostos químicos, cuja estrutura comum é a presença de pelo menos um anel aromático (C6) ao qual se encontra ligado um ou mais grupos hidroxilo (-OH) (Cabrita *et al.*, 1999; Landrault *et al.*, 2002; Katalinić *et al.*, 2004).

As uvas e os vinhos contêm uma série de compostos fenólicos, todos eles derivados desta estrutura básica, sendo que os teores totais de compostos fenólicos são maiores nas uvas do que nos vinhos (Cabrita *et al.*, 1999).

Os compostos fenólicos estão associados à qualidade sensorial e funcional da frescura e processamento dos vegetais. A reação de escurecimento enzimático catalisada pela polifenoloxidase é de importância vital no processamento de vegetais e frutos, devido a possíveis alterações da cor e aroma e perda de nutrientes. Por exemplo, a polifenoloxidase é a responsável pelo escurecimento das uvas (Ho *et al.*, 1992).

Uma das possíveis classificações dos polifenóis das uvas e dos vinhos é a sua divisão em compostos flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis, antocianinas) e em não flavonóides (ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, e estilbenos).

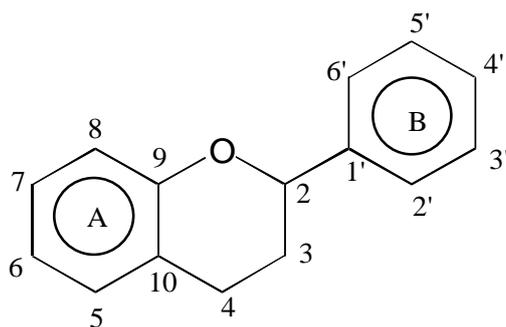
### 1.2.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos e estão distribuídos no reino vegetal, podendo ser encontrados em folhas, sementes, frutas e também noutras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (Angelo *et al.*, 2007).

Os flavonóides têm diversos papéis na ecologia e bioquímica das plantas. Algumas das suas funções incluem: atração de polinizadores, proteção da radiação UV, controlo da respiração, defesas contra infeções e estimulação da bactéria *Rhizobium* para a fixação de azoto (Pietta, 2000). Nas plantas funcionam como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores e repelentes de insetos (Pietta, 2000).

Nos compostos fenólicos, o grupo dos flavonóides é o principal responsável pelas sensações gustativas (flavan-3-óis) e pela cor dos vinhos (antocianinas), assumindo ainda grande relevância no envelhecimento dos mesmos (Jordão, 1999).

Estruturalmente, os flavonóides são compostos aromáticos com um esqueleto base constituído por 15 átomos de carbono (C<sub>15</sub>), com uma configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, possuindo dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico pirânico, denominado anel C (figura 1) (Angelo *et al.*, 2007).



**Figura 1:** Estrutura base dos flavonóides

Existem 12 classes de flavonóides que são diferentes no modo de ciclização, no grau de insaturação e no estado de oxidação do anel central, enquanto os compostos individuais numa mesma classe diferem pelo padrão de substituição nos anéis A e B (Andersen, 2007).

Os flavonóides são o grupo maioritário dos compostos fenólicos presentes em vinhos tintos e são originários da película e grainhas das uvas durante a vinificação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Podem encontrar-se livres ou polimerizados com outros flavonóides, não flavonóides, açúcares ou com combinações dos anteriores (Cabrita *et al.*, 1999).

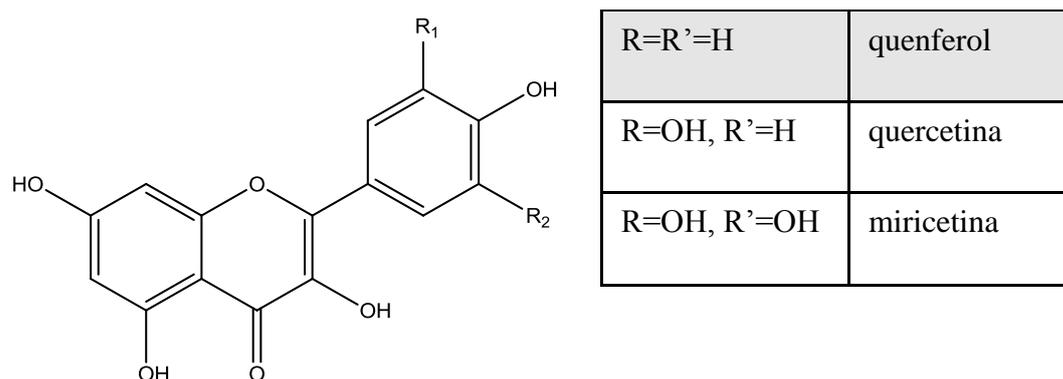
Os flavonóides encontram-se no estado livre (agliconas) ou ligados (derivados glicosilados) (Pietta, 2000).

Os flavonóides encontram-se na natureza sob a forma de glicosídeos, o que promove uma melhor absorção intestinal (Yilmaz *et al.*, 2004). No entanto, o glicosídeo apresenta menor reatividade na neutralização de radicais livres do que o flavonóide correspondente, bem como uma maior hidrossolubilidade (Flórez *et al.*, 2002).

Os glicosídeos formam-se através da união de resíduos de D-glucose à posição 3 ou posição 7 destes flavonóides, sendo a primeira substituição mais frequente. Outros resíduos de açúcares que também se podem encontrar ligados a estes tipos de compostos são a D-galactose, a L-ramnose, a L-arabinose, a D-xilose e o ácido glucurónico (Flórez *et al.*, 2002).

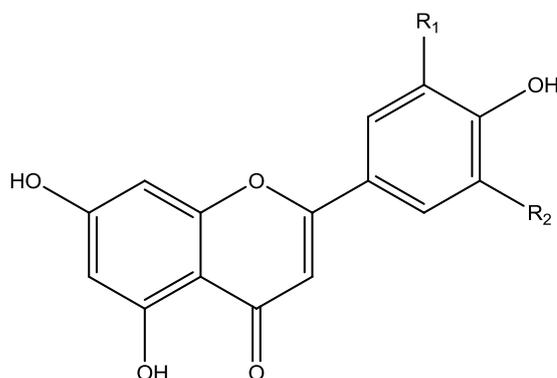
Os flavonóis são compostos caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico, uma ligação dupla em C-2 e um grupo hidroxilo em C-3. Na figura 2

encontram-se representadas as agliconas mais importantes: quenferol, quercetina e miricetina (Cabrita *et al.*, 1999), todos originários nas películas das uvas tintas e brancas, embora o vinho branco apenas contenha quenferol e quercetina. São os compostos que existem em maior quantidade no vinho e têm cor amarela. No vinho tinto existem na ordem das 100 mg/L, enquanto que no vinho branco variam entre 1 a 3 mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*; 2000).



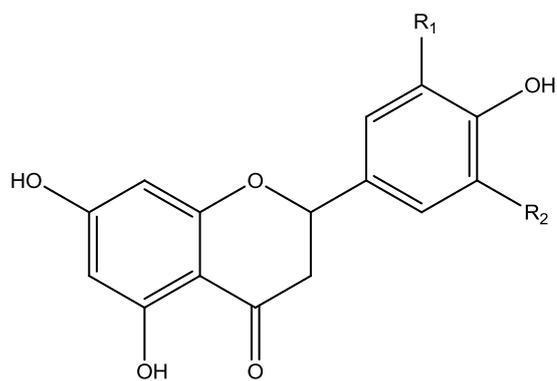
**Figura 2:** Estrutura química geral dos flavonóis e flavonóis mais abundantes nos vinhos

As flavonas diferem dos flavonóis pela ausência do grupo hidroxilo em C3 (figura 3).



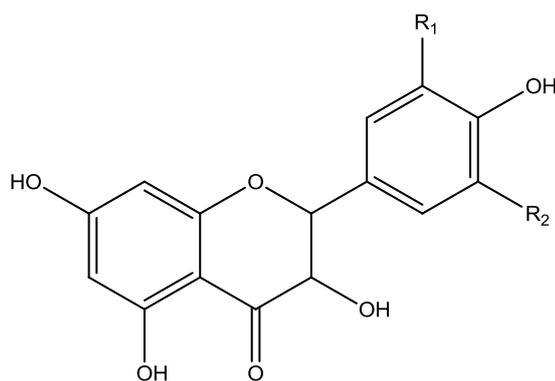
**Figura 3:** Estrutura química geral das flavonas

As flavanonas são derivadas da estrutura das flavonas por redução da ligação dupla no anel heterocíclico central (figura 4).

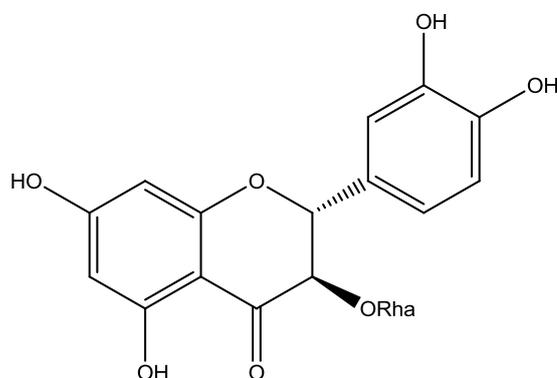


**Figura 4:** Estrutura química geral das flavanonas

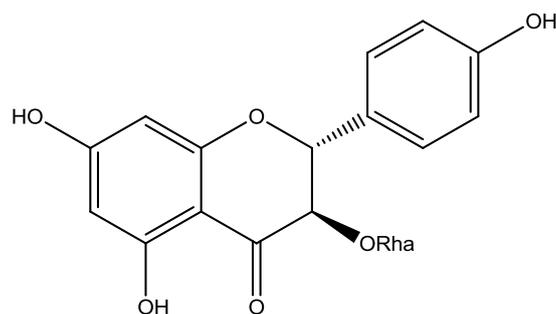
Os flavanonóis são derivados das estruturas dos flavonóis por redução da ligação dupla no grupo heterocíclico central (figura 5). A estilbina (figura 6), que ocorre de forma original nos vinhos tintos em concentrações que variam entre 8,24 e 15,13 mg/L (Landrault *et al.*, 2002), e a engeletin são exemplos destas estruturas (figura 7) (Lu *et al.*, 1999).



**Figura 5:** Estrutura química geral dos flavanonóis



**Figura 6:** Estrutura química do flavanonol, a estilbina



**Figura 7:** Estrutura química do flavanonol, a engeletin

### 1.2.1.1. Antocianinas

As antocianinas são compostos polifenólicos de particular interesse e destaque no que se refere à cor de frutos, flores, folhas e caules num espectro que vai desde o vermelho, passando pelo incolor, até ao violeta e azul-escuro (Andersen, 2007).

São o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis no reino vegetal (Strack *et al.*, 1994). As antocianinas são pigmentos vermelhos da uva e têm grande relevância no que diz respeito à cor de uvas e vinhos e, que se localizam na película e nas três a quatro primeiras camadas da hipoderme e somente em castas tintureiras se encontram na polpa. (Cabrita *et al.*, 1999).

A cor das antocianinas varia consoante as estruturas químicas e as condições físico-químicas do meio. Geralmente a cor varia desde o vermelho ao azul com o aumento dos grupos hidroxilo e o efeito inverso quando se substituem estes grupos por grupos metoxilo (Cabrita *et al.*, 1999).

Estes flavonóides apresentam como estrutura comum o catião fenil-2-benzopirílico (catião flavílio) (Campos, 2002).

Estruturalmente são glucosídeos poli-hidroxilados ou polimetoxilados dos sais de flavilium (2-fenil-benzopirilo). A sua diferença é pelo número de grupos presentes no anel lateral, o número e a natureza dos açúcares ligados à molécula, e também o número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas com os açúcares (Guerra, 1997).

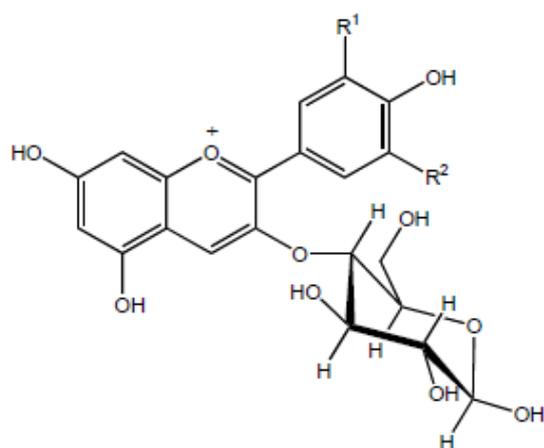
As formas agliconas (sem resíduo de açúcar) das antocianinas chamam-se antocianidinas (Timberlake *et al.*, 1996). Estes compostos são muito mais estáveis e

solúveis na forma glicosilada (antocianinas) do que na forma aglicona (antocianidinas) (Cabrita *et al.*, 1999). Variam quanto ao número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo.

A aglicona clássica presente nas antocianinas baseia-se num esqueleto em C15 com uma estrutura do tipo C6 – C3 – C6 (figura 8) (Andersen *et al.*, 2006).

Na figura 8 estão as antocianinas mais abundantes nos alimentos, a delphinidina, a cianidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina são as formas agliconas correspondentes às antocianinas presentes na espécie *Vitis vinifera*.

A cianidina (pigmentação vermelha), peonidina (vermelho escuro), delphinidina (azul), petunidina (vermelho escuro) e malvidina (púrpura) são as mais abundantes no género *Vitis* e do vinho tinto (Cabrita *et al.*, 1999; Dell'Agli *et al.*, 2004; Naczki *et al.*, 2004).

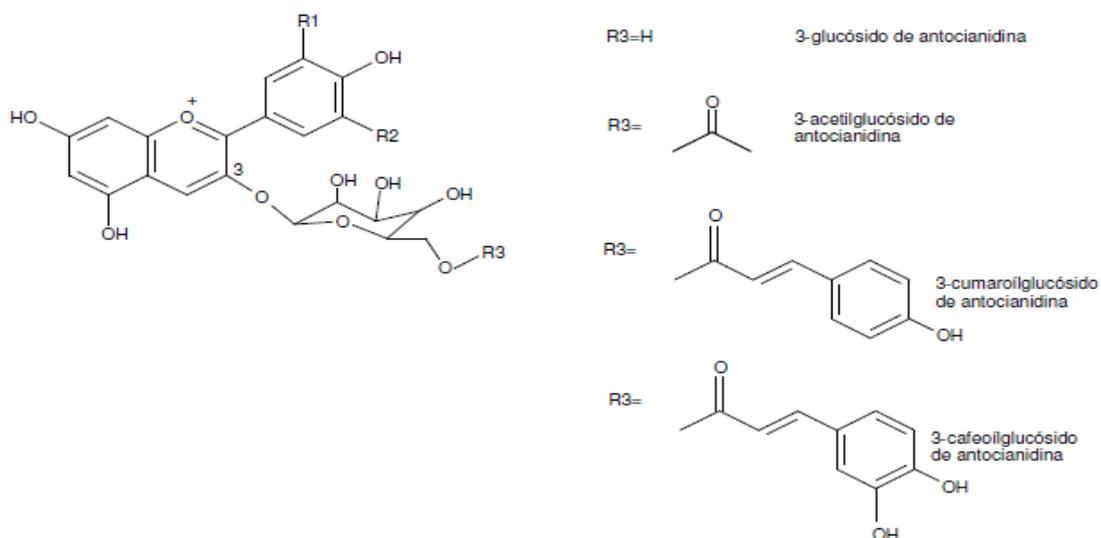


R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Antocianina
OH	H	Cianidina
OH	OH	Delfinidina
OCH <sub>3</sub>	H	Peonidina
OH	OCH <sub>3</sub>	Petunidina
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Malvidina

**Figura 8:** Estrutura das agliconas das principais antocianinas presentes nas espécies *Vitis vinifera*

A quantidade de antocianinas varia de casta para casta, mas é sempre a malvidina que se encontra em maior quantidade (Cabrita *et al.*, 1999). É típico da *Vitis vinifera* encontrar-se uma molécula de glucose ligada na posição 3 pois as outras espécies são diglicosiladas nas posições 3 e 5 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1965; Cabrita *et al.*, 1999). A molécula ligada na posição 3 é responsável pela sua solubilidade e estabilidade. Estes são os compostos responsáveis pelas mudanças de cor nos vinhos tintos (Larrauri *et al.*, 1999).

Os fragmentos glicosídicos podem apresentar-se livres ou esterificados na posição 6 com alguns ácidos, nomeadamente o ácido acético, o ácido *p* cumárico e o ácido cafeíco (figura 9) (Cabrita *et al.*, 1999).



**Figura 9:** Estrutura das antocianidinas 3-monoglucosídicas e respetivas formas esterificadas

As diferentes reações de oxidação, condensação e polimerização durante o envelhecimento do vinho tinto produzem mudanças de cor no vinho envelhecido e uma transição gradual de antocianinas monoméricas através de oligómeros a pigmentos poliméricos mais estáveis, a partir de antocianinas tal como malvidina-3-glucósido (Larrauri *et al.*, 1999).

Este tópico será abordado com mais detalhe no item da copigmentação.

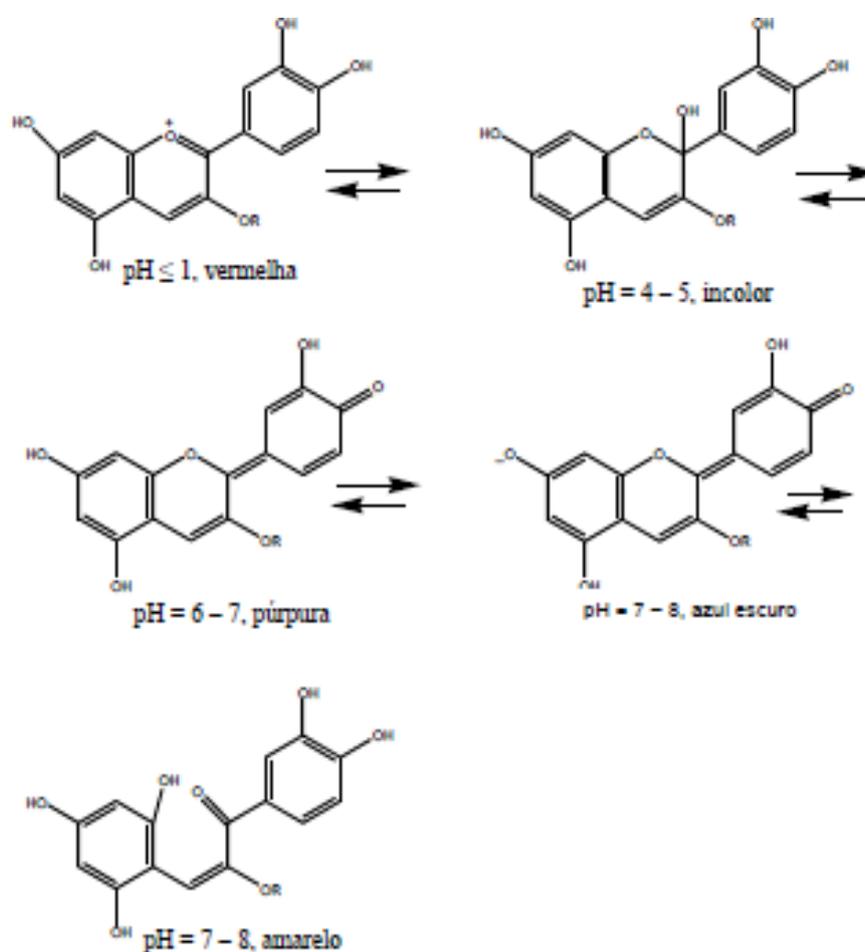
#### 1.2.1.1.1. Equilíbrio das antocianinas em solução

O pH do meio exerce um papel importante no equilíbrio entre as diferentes formas de equilíbrio das antocianinas e por conseguinte, na modificação de cor.

A cor que as antocianinas exibem em solução varia mediante as condições físico-químicas do meio e as estruturas químicas. Em geral, a hidroxilação induz um aumento do

comprimento de onda máximo (deslocamento batocrômico), enquanto que a metilação dos grupos hidroxilo reverte esta tendência (Brouillard, 1983).

O pH do meio exerce um papel importante, pois faz variar a estrutura das antocianinas em equilíbrio na solução e, conseqüentemente provoca a modificação na sua coloração (Brouillard *et al.*, 1990). Esse equilíbrio depende do pH do meio, como se pode verificar na figura 18. Ao pH do vinho, (3,0 – 4,0), a proporção da forma vermelha varia entre cerca de 5 a 40%. A acidificação do mosto ou vinho tinto e conseqüente descida do pH tem um aumento considerável dessa proporção, que se traduz pelo reforço da pigmentação vermelha. Inversamente, um aumento do pH provoca a diminuição da proporção da forma vermelha e o reforço das formas com colorações azul, amarela e da forma incolor (Cardoso *et al.*, 2005).



**Figura 10:** Formas de equilíbrio das antocianinas em solução

### 1.2.1.1.2. Copigmentação

A copigmentação consiste numa interação molecular por ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas (não coradas) que atuam como copigmentos (Davies *et al.*, 1993).

Além do pH, as interações moleculares das antocianinas com outros compostos afetam a sua estabilidade, contribuindo assim para a grande variedade de cores que estes pigmentos exibem (Heredia *et al.*, 1998).

A copigmentação tem uma importância crítica para compreensão da relação entre a composição da uvas e a cor dos vinhos, a variação na cor e na concentração de pigmentos entre vinhos e em todas as reações envolvendo antocianinas durante o envelhecimento dos vinhos. É já aceite que a copigmentação seja responsável por 30 a 50% da cor dos vinhos jovens que é primariamente influenciada pelos níveis de vários compostos fenólicos (Boulton, 2001).

O ião flavílio é uma estrutura carregada positivamente (A+), estabelecendo assim ligações com outros compostos fenólicos presentes no vinho, de diferentes cargas parciais, ocorrendo portanto o fenómeno de copigmentação (Watherhouse, 2002).

O fenómeno de copigmentação baseia-se em dois efeitos:

1. A formação do complexo de transferência  $\pi$ - $\pi$  que causa alteração na forma do ião flavílio e nas suas propriedades espectrais, aumentando a absorção de radiação (Watherhouse, 2002).

2. A estabilização do ião flavílio, através do complexo de transferência  $\pi$ - $\pi$  que favorece o seu equilíbrio devido ao aumento da carga, tornando as antocianinas mais estáveis e conseqüentemente mais duradoura a sua cor vermelha (Watherhouse, 2002).

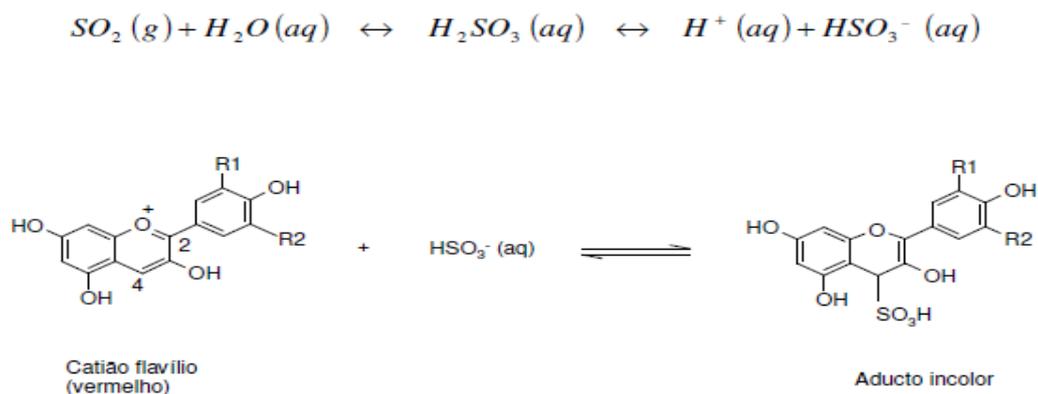
O pH do meio é um fator condicionante deste processo. A copigmentação não ocorre a pH muito baixos, dado que as antocianinas se encontram na forma de catião flavílio, nem a pH muito elevados, por não ser possível a formação de antocianinas carregadas electricamente.

Em vinhos novos, este fenómeno ocorre com facilidade devido ao facto de um vinho novo possuir uma maior concentração de antocianinas que um vinho velho.

### 1.2.1.1.3. Reação das antocianinas com o bissulfito

O dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) é muito utilizado na produção dos vinhos, atuando como antioxidante e como inibidor do crescimento de microorganismos. Apesar deste efeito benéfico, o SO<sub>2</sub> descolora as antocianinas formando compostos estáveis e incolores (Timberlake *et al.*, 1966).

O dióxido de enxofre (anidrido sulfuroso), ao pH dos mostos e vinhos, existe essencialmente sob a forma de íon bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), íon esse que devido às suas propriedades nucleofílicas se combina com as antocianinas dando origem a compostos incolores como os descritos na figura 11. Quando este é adicionado a um mosto ou um vinho tinto provoca uma diminuição da intensidade corante. A eliminação do íon bissulfito, por oxidação ou combinação, restabelece a coloração inicial (Cardoso *et al.*, 2005).



**Figura 11:** Reações com o catião flavílio com formação de composto incolor

### 1.2.1.1.4. Influência da temperatura

Na evolução das antocianinas individuais, a temperatura tem um papel de grande relevo durante o envelhecimento, uma vez que o seu aumento da temperatura conduz a uma diminuição de antocianinas individuais (Dallas *et al.*, 1995); de entre as classes de antocianinas, verifica-se que se degradam mais rapidamente as acetilaladas do que as glucosiladas (McCloskey *et al.*, 1981). À temperatura de 20°C e a pH entre 3 e 4, a

coloração das antocianinas é muito fraca mas a tonalidade da cor evolui no sentido do azul-violeta à medida que o pH aumenta, para temperaturas acima de 20°C, ocorre uma descoloração rápida das soluções (Glories, 1986).

#### **1.2.1.1.5. Influência do oxigénio**

A natureza insaturada da estrutura das antocianinas torna-as suscetíveis ao oxigénio molecular. Na presença de oxigénio ocorre o escurecimento das antocianinas. A cor das antocianinas é mantida com a substituição do O<sub>2</sub> por atmosferas ricas em azoto ou vácuo. O escurecimento é devido à oxidação enzimática dos compostos fenólicos presentes para *orto*-quinonas, que por sua vez se polimerizam rapidamente para formar pigmentos de cor castanha, as melaninas. A reação catalisada pela polifenoloxidase (PFO) processa-se em dois passos a) Hidroxilação de monofenóis a *orto*-difenois; b) Oxidação de *orto*-difenois a *orto*-quinona (Malacrida *et al.*, 2006). Estas por sua vez polimerizam, dando origem a melaninas.

A presença de oxigénio no meio também é um fator significativo na degradação de antocianinas, mesmo na ausência de luz, em todos os valores de pH. Esta degradação ocorre através de um mecanismo de oxidação direta ou indireta dos constituintes do meio que reagem com as antocianinas (Lopes *et al.*, 2007). O peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), formado pela oxidação do ácido ascórbico na presença de oxigénio e iões cobre, causa descoloração das antocianinas. Tal facto leva a crer que a degradação das antocianinas nessas condições seja mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Outra alternativa para explicar sua degradação é a ocorrência da reação de condensação entre o ácido ascórbico e as antocianinas, formando produtos instáveis que se degradam em compostos incolores (Malacrida *et al.*, 2006).

Na maturação dos vinhos tintos, desde o final da fermentação até ao engarrafamento, o oxigénio presente é responsável por transformações químicas dos pigmentos responsáveis pela cor, muito importantes no envelhecimento. Ocorre uma autooxigenação do etanol e como há presença de compostos fenólicos, origina pequenas quantidades de acetaldeído, que provocará a copolimerização de antocianinas e taninos (Timberlake *et al.*, 1976; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1983).

#### 1.2.1.1.6. Ação das enzimas

As antocianinas podem ser degradadas por enzimas endógenas presentes nos tecidos das plantas, tais como glicosidases, polifenoloxidasas e peroxidases. As glicosidases, também denominadas antocianases, hidrolizam as ligações glicosídicas com a libertação do açúcar e da aglicona. Essa última é instável e degrada-se espontaneamente formando a calcona incolor. As polifenoloxidasas atuam pelo mecanismo de oxidação, utilizando como substratos *o*-dihidroxifenóis. As *o*-quinonas resultantes podem reagir entre si ou com outros compostos, inclusivamente com as antocianinas, e formar polímeros escuros. As fenolases podem reagir diretamente com as antocianinas apesar de a reação ser mais favorecida quando outros fenólicos (que são melhores substratos para essas enzimas) estão presentes (Malacrida *et al.*, 2006).

O escurecimento enzimático devido à polifenoloxidase é de importância comercial particularmente em tecidos vegetais; normalmente os substratos fenólicos naturais (ácido cafeico, ácido protocatequico, ácido clorogênico, etc) estão separados da polifenoloxidase em tecidos intactos e o escurecimento não ocorre (Silva *et al.*, 2010).

#### 1.2.2. Não Flavonóides

A classe dos não flavonóides engloba os ácidos fenólicos e os estilbenos.

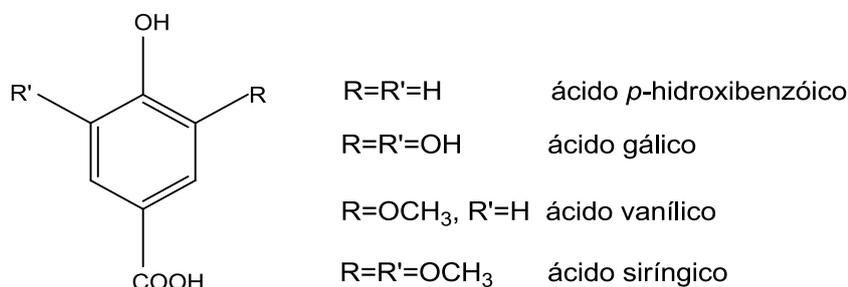
Os ácidos fenólicos subdividem-se em ácidos benzóicos (estrutura em C6-C1) e ácidos cinâmicos (estrutura em C6-C3). Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos das células da película e polpa (Póvoas, 2006).

Estes ácidos por serem hidroxilados são designados por ácidos hidroxibenzóicos (AHB) e ácidos hidroxicinâmicos (AHC), e podem ocorrer na forma livre ou associados a outras moléculas. Na classe dos ácidos fenólicos estão os derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, frequentemente na forma de ésteres de ácido tartárico (Baranowski *et al.*, 1981).

Dentro dos AHB foram identificados: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatéquico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido sirínico, ácido salicílico (ácido *orto*-hidroxibenzóico) e ácido gentísico (ácido 2',5'-di-hidroxibenzóico), figura 12. Refira-se

que alguns vinhos que sofrem envelhecimento em barril apresentam altos níveis de ácido gálico.

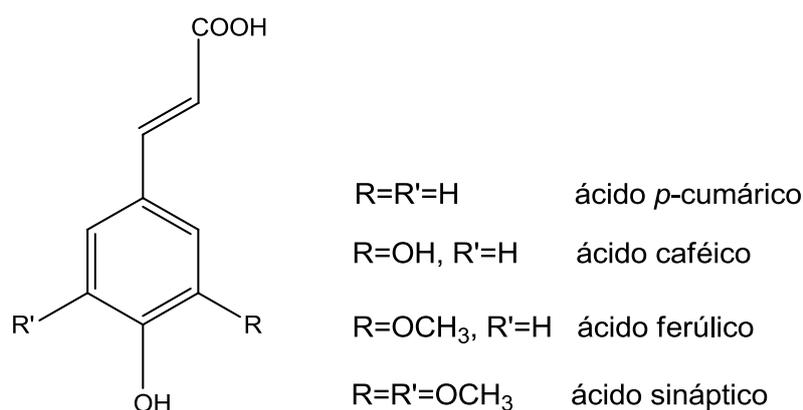
As concentrações dos ácidos benzóicos em vinhos tintos são cerca de 70 mg/L e 10 mg/L em vinhos brancos (Watherhouse, 2002).



**Figura 12:** Estrutura química de ácidos hidroxibenzoicos

Em relação aos AHC foram identificados: ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico, figura 13. As suas estruturas derivam do ácido cinâmico por substituição do anel aromático. A presença da cadeia lateral com uma ligação dupla origina a possibilidade de ocorrência de formas isoméricas *cis* e *trans*. Na natureza, os compostos ocorrem essencialmente na forma *trans*, no entanto, a interconversão das duas formas pode ocorrer facilmente, quer por isomerização fotoquímica quer por ação enzimática (Strack, 1997).

Os níveis de ácidos cinâmicos são de 130 mg/L em vinhos brancos e de 60 mg/L em vinhos tintos (Watherhouse, 2002).



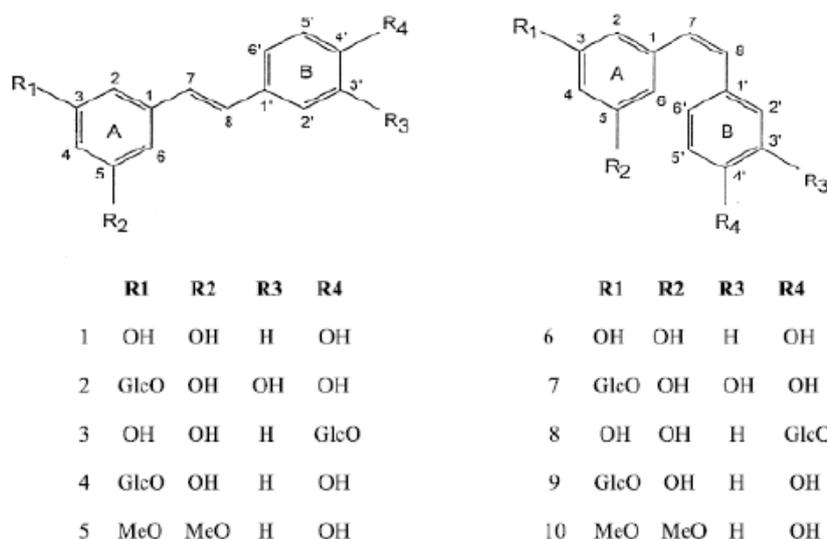
**Figura 13:** Estrutura química de ácidos hidroxicinâmicos

As suas concentrações são da ordem de 100-200 mg/L em vinho tintos e de 10-20 mg/L em vinho branco (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os ácidos fenólicos encontram-se distribuídos na casca e na polpa da uva e os seus teores diminuem com o amadurecimento e também durante a fermentação do vinho (Macheix *et al.*, 1991; Penna *et al.*, 2001).

Os estilbenos (figura14) são outra família de compostos fenólicos que fazem parte dos não flavonóides. Têm dois anéis benzénicos ligados por etileno (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), podendo existir como isómeros *cis* e *trans* (Sun *et al.*, 2005),

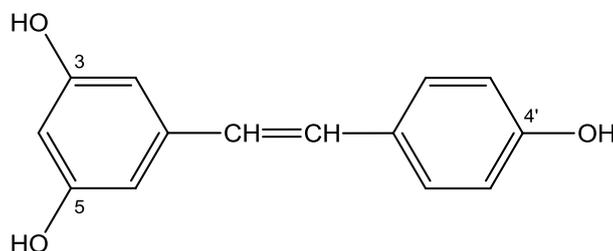
Os estilbenos podem ser monómeros (*trans*-resveratrol, *trans*-astringina e *trans*-“piceid”) e oligómeros: viniferina (0,1-1,63 mg/L) e palidol (0,38-2,22 mg/L) (Landrault *et al.*, 2002).



**Figura 14:** Estruturas químicas de estilbenos monómeros identificados no género *Vitis*: 1 e 6: *trans*- e *cis*-resveratrol; 2 e 7: *trans*- e *cis*-astringina; 3 e 8: *trans*- e *cis*-resveratrolósido; 4 e 9: *trans*- e *cis*-“piceid”; 5 e 10: *trans*- e *cis*-pteroestilbeno (Sun *et al.*, 2005)

A película da uva, contém um estilbeno extremamente importante, o resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-estilbeno), (figura 15). Ocorre nos bagos na forma de *trans*-resveratrol. Este é o principal estilbeno na uva, e é produzido em resposta às infeções fúngicas, nomeadamente pela *Botrytis cinerea* responsável pela podridão cinzenta. Tal, deve-se ao

facto do resveratrol ser precursor de umas moléculas que possuem propriedades antifúngicas (veniferinas), que conferem resistência à colonização dos bagos da uva quando atacados pelo fungo (Cardoso, 2005).



**Figura 15:** Resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-estilbeno)

O resveratrol é uma molécula importante para o organismo humano, visto que intervém em diferentes situações, tais como, na modulação da síntese de colesterol hepático; inibição da atividade de lipooxigenases; proteção das lipoproteínas contra oxidações e danos provocados por radicais livres e no efeito quimiopreventivo contra o cancro.

Os estilbenos surgem em concentrações de cerca de 7 mg/L em vinhos tintos, 2mg/L em vinhos rosés e 0,5mg/L em vinhos brancos (Watherhouse, 2002).

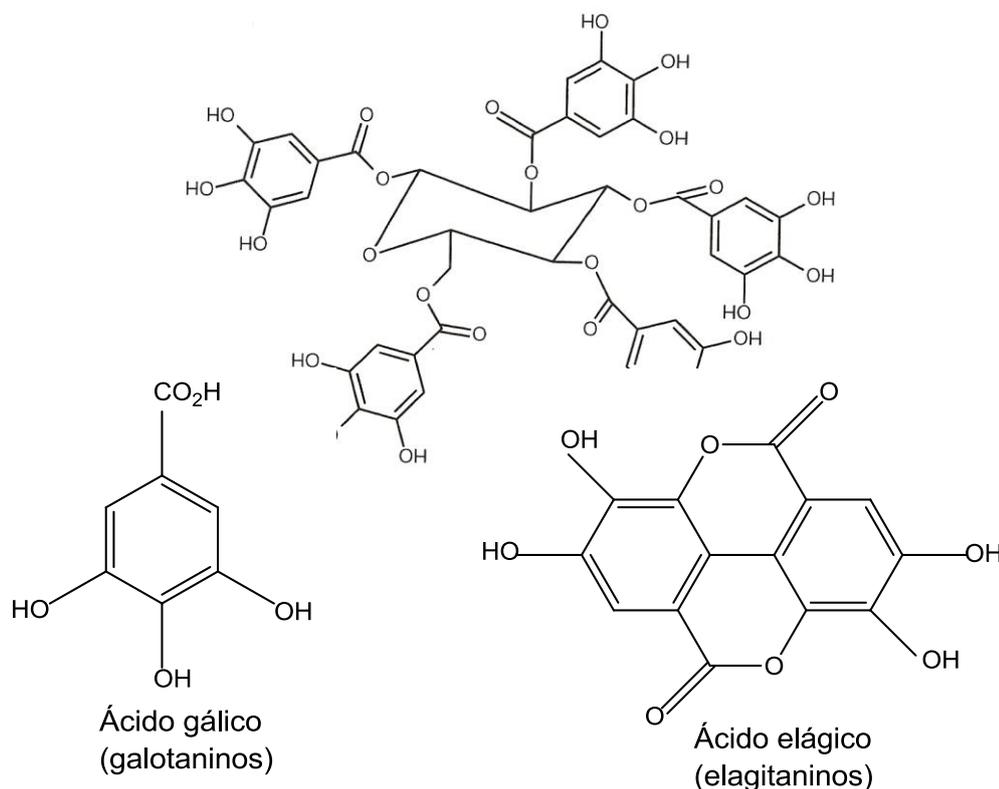
### 1.2.3. Taninos

Os taninos são grupos de compostos fenólicos de elevada massa molecular capazes de se combinar com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos, provocando a sensação de adstringência, que não é mais do que a perda do efeito de lubrificação da saliva por precipitação das proteínas (Cabrita *et al.*, 1999). Estas moléculas localizam-se nas grainhas e películas das uvas. No vinho tinto existem na ordem de 1 a 3 g/L, enquanto que no vinho branco existem em algumas dezenas de mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Podem existir na forma de taninos hidrolisáveis galotaninos e elagitaninos, e taninos condensados (proantocianidinas): monómeros de catequina e epicatequina.

A estrutura dos taninos hidrolisáveis consiste num poliol ao qual estão ligados unidades de ácido gálico ou elágico. Os taninos hidrolisáveis mais simples são ésteres do

ácido gálico e um poliol alifático (quase sempre a D-glucose), (figura 16). Estes compostos não contêm moléculas de flavonóides e não aparecem naturalmente nas uvas. Eles estão presentes na madeira e por isso podem aparecer em vinhos armazenados ou envelhecidos em barris em madeira (Cabrita *et al.*, 1999).

Os seus níveis são aproximadamente de 100 mg/L em vinhos brancos com estágio em madeira de seis meses e de 250 mg/L em vinhos tintos com estágio a partir de dois anos (Watherhouse, 2



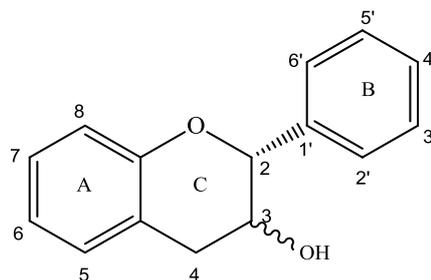
**Figura 16:** Estrutura química de um tanino hidrolisável

Os taninos condensados ou proantocianidinas aparecem nas uvas e são formados por unidades de flavonóis. Encontram-se fundamentalmente nas grainhas e não são facilmente hidrolisáveis (Cabrita *et al.*, 1999).

A unidade estrutural fundamental das proantocianidinas é o núcleo flavan-3-ol (3-hidroxi-flavano), (figura 17).

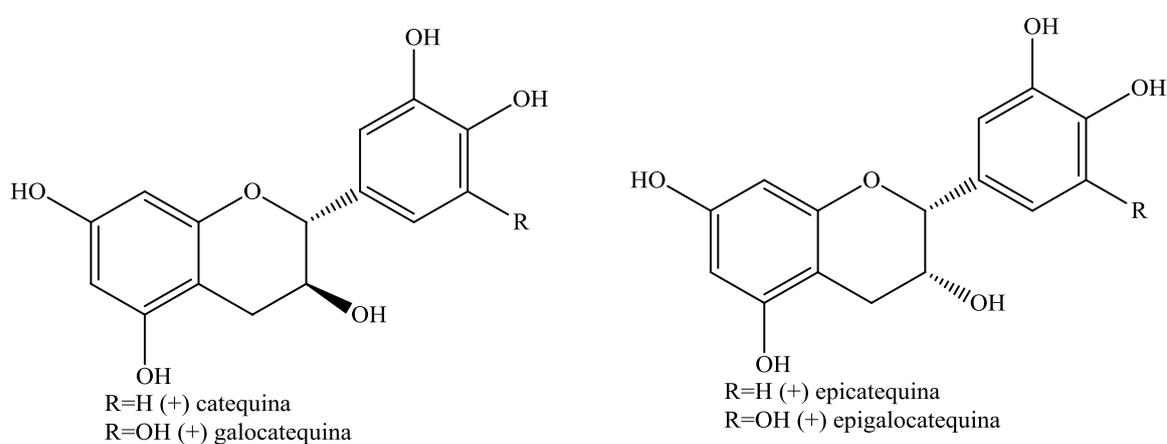
As proantocianidinas ou taninos condensados são derivados estruturais dos flavan-3-óis e consoante o número de vezes que esta unidade se repete, assim as proantocianidinas

podem ser diméricas, triméricas, oligoméricas (até 6 unidades) ou poliméricas (superior a 6 unidades) (Fernandes, 2007).



**Figura 17:** Estrutura química do núcleo 3-hidroxi flavano

A estrutura do núcleo 3-hidroxi flavano é diversamente substituída, em particular hidroxilada, nas posições 5 e 7 no anel A, na posição 3 no anel heterocíclico e na posição 3' e 4' no anel B (catequina e epicatequina) ou na posição 3', 4' e 5' no anel B (galocatequina e epigalocatequina). A hidroxilação permite distinguir as proantocianidinas em várias classes, a destacar as procianidinas (polímeros de catequinas e epicatequinas), e as prodelfinidinas (polímeros de galocatequinas e epigalocatequinas), (figura 18).



**Figura 18:** Estruturas das unidades monoméricas das principais proantocianidinas

Em oposto a outros flavonóides, estes encontram-se nas uvas no estado livre, em pequenas quantidades de galato epicatequina. Nas películas das uvas a (+)-catequina é o

flavan-3-ol mais significativo e a (-)-epicatequina aparece em menor quantidade (Cabrita *et al.*, 1999).

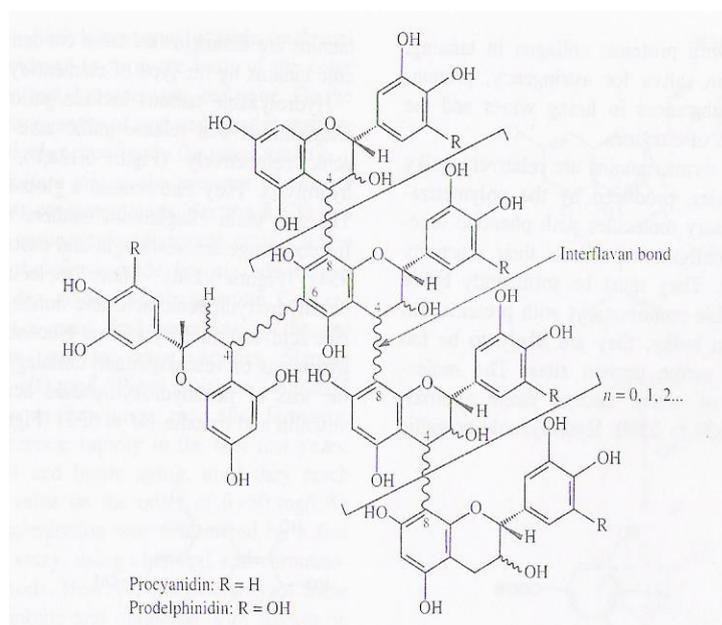
Estes são compostos que libertam antocianidinas quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a ruptura das ligações entre as unidades monoméricas (Ricardo da Silva, 1995). Consoante se liberte cianidina ou delfinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas (polímeros da catequina e epicatequina) ou prodelfinidinas (constituídas por unidades de galocatequinas e epigalocatequinas) (Cabrita *et al.*, 1999).

Em vinhos brancos onde existe um limitado contacto com as películas, as catequinas são os principais flavonóides. Estes compostos são responsáveis pelo acastanhamento dos vinhos brancos ou tintos e por algum amargo (Zoecklein *et al.*, 1995).

Na natureza apenas são encontrados os isómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina (Watherhouse, 2002).

As proantocianidinas das uvas e dos vinhos são principalmente procianidinas, ou seja oligómeros e polímeros de catequina e epicatequina (figura 15) unidas por ligações C4-C8 e em menor quantidade por ligações C4-C6 (Ricardo da Silva, 1995).

Os oligómeros (procianidinas são as mais abundantes) e polímeros estão presentes nas uvas (*V. vinifera* L.), sementes, pedúnculos e películas (Dell`Agli *et al.*, 2004).



**Figura 19:** Estrutura química das proantocianidinas

Num vinho tinto novo, a concentração total das catequinas varia entre 19 a 76 mg/L, oligómeros entre 65 a 280 mg/L e polímeros entre 335 a 611 mg/L. Com o envelhecimento do vinho tinto, as concentrações individuais de todos os compostos fenólicos, incluindo as proantocianidinas, são significativamente reduzidas (Sun *et al.*, 2005). Por outro lado, as proantocianidinas estão presentes nas uvas e vinho em formas poliméricas (60-80%), seguidas pelas formas oligoméricas (15-30%), enquanto que os monómeros 3-hidroxi-flavano (catequinas) representam só uma pequena proporção (<10%) (Sun *et al.*, 2005).

Para vinhos tintos franceses o teor médio em procianidinas é de 557,7 mg/L, vinhos brancos de 15,1 mg/L e vinhos rosés de 17,1 mg/L enquanto que para as uvas o valor é de 377 mg/Kg em fresco, repartindo-se 65% nas sementes, 20% nos pedúnculos, 14% nas películas e 1% na polpa (Auger *et al.*, 2004).

A concentração dos taninos aumenta com o envelhecimento do vinho tinto. O conteúdo em ácido tânico para vinhos novos varia de 250,5 a 525 mg/L, para velhos de 378 a 597,2 mg/L e para reservas de 323,4 a 619,4 mg/L (Larrauri *et al.*, 1999).

### **1.3. Composição fenólica e cor dos vinhos**

Os compostos fenólicos são constituintes das uvas, e conseqüentemente encontram-se presentes em vinhos brancos e tintos. A quantidade destes compostos depende de vários fatores, tais como clima, solo, casta, maturidade e maceração da uva, temperatura de fermentação, pH, dióxido de enxofre e etanol (Mamede *et al.*, 2004).

A quantidade de compostos fenólicos em vinhos tintos é consideravelmente superior à dos vinhos brancos. Estima-se cerca de 1000 a 4000 mg/L em vinhos tintos, e 200 a 300 mg/L em vinhos brancos (Mamede *et al.*, 2004). A diferença destes valores deve-se não só à presença de antocianinas (em uvas tintas, sendo responsáveis pela pigmentação), mas sobretudo pelos diferentes métodos de vinificação. Em vinhos tintos, as uvas são esmagadas e fermentadas em contacto com o engaço, película e grainha, contrariamente às uvas brancas, gerando assim uma maior quantidade de compostos fenólicos posteriormente presentes no produto final, o vinho (Mamede *et al.*, 2004).

De acordo com Mamede *et al.*, 2004, a catequina e a epigalocatequina são os compostos fenólicos maioritários em vinhos brancos, dado que se encontram em maior quantidade no extrato das películas de uvas brancas e nos vinhos tintos a catequina e o ácido gálico.

Entre as características que definem a qualidade geral dos vinhos, a cor constitui um fator determinante. Sensorialmente é o primeiro atributo observado na degustação. Através do aspeto (intensidade e tonalidade), temos a perceção de possíveis defeitos mas também virtudes, do seu corpo, da sua idade e da sua evolução ao longo do tempo.

A cor do vinho é determinada pela sua composição fenólica, sobretudo em termos de antocianinas, além da copigmentação, da idade do vinho, do pH e da utilização de SO<sub>2</sub>. Os compostos fenólicos maioritários dos vinhos tintos e brancos encontram-se na tabela 1.

**Tabela 1.** Concentração dos compostos fenólicos maioritários em vinho tinto e branco (adaptado de Mamede *et al.*, 2004)

Compostos Fenólicos	Vinho Tinto (mg/L)	Vinho Branco (mg/L)
Catequina	191	35
Epigalocatequina	82	21
Ácido Gálico	95	7
Cianidina	3	0
Malvidina-3-Glucósido	24	1
Rutina	9	0
Quercetina	8	0
Miricetina	9	0
Ácido Caféico	7,1	2,8
Resveratrol	1,5	0
Teores médios de compostos fenólicos totais*	2567	239

\* Expressos em equivalentes de ácido gálico em mg/L.

---

#### 1.4. Propriedades químicas, físicas e biológicas dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são constituintes das uvas e conseqüentemente estão presentes no vinho, estando mais concentrados no vinho tinto do que no branco (Kanner *et al.*, 1994; Jang *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2009) e os subprodutos e resíduos da vinificação, na sua maioria, podem manter quantidades apreciáveis.

Os compostos fenólicos presentes no vinho são ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (proantocianidinas). Tal como referido anteriormente, a catequina e a epigallocatequina são os compostos fenólicos maioritários do vinho branco, e a catequina e o ácido gálico os presentes em maior abundância no vinho tinto (Katalinić *et al.*, 2004). Apresentam múltiplos efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo as atividades vasodilatadoras com propriedades arteroscleróticas, as anti-inflamatórias, as anticancerígenas, as antivirais e os efeitos antibacterianos (Soleas *et al.*, 2002; Katalinić *et al.*, 2004; Quirós *et al.*, 2009; Radovanović *et al.*, 2009; Rastija *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009), que proporcionam um efeito protetor contra acidentes vasculares e doenças neurodegenerativas (Virgili *et al.*, 2000; Katalinić *et al.*, 2004). Têm, ainda, ação no tratamento de problemas circulatórios pela inibição da oxidação das proteínas de baixa densidade (LDL) (Katalinić *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2009; Mudnic *et al.*, 2010). Os benefícios para a saúde dos polifenóis surgem dos efeitos antioxidativos, baseados na capacidade de sequestrar os diferentes radicais livres que conduzem à proteção de moléculas biológicas contra a oxidação (Rastija *et al.*, 2009; Mudnic *et al.*, 2010).

Biologicamente, os compostos polifenólicos assumem um papel muito importante devido às suas excelentes propriedades, o que leva a serem usados como suplementos alimentares (Póvoas, 2006).

Beneficamente, estes compostos orgânicos possuem as seguintes propriedades:

- Contribuem para o sabor e aroma de diversos alimentos, tanto de origem animal como de origem vegetal (Lule *et al.*, 2005).
- Favorecem a adstringência de alimentos, de particular relevância enológica (Póvoas, 2006).
- Constituem pigmentos naturais de frutos e vegetais, sendo por isso responsáveis pela sua coloração (Lule *et al.*, 2005).
- Proporcionam a resistência às plantas em situações de stress mecânico, resultante de

picadas de insetos, ou ainda em casos de stress biológico causado por infeções fúngicas, bacterianas e víricas, tornando-se assim em excelentes agentes antifúngicos antibacterianos, e antivíricos (Lule *et al.*, 2005).

- Possuem atividade anticancerígena - a ingestão moderada de vinho é capaz de inibir a incidência de certos tipos de cancro (Mamede *et al.*, 2004).
- Possuem atividade farmacológica - os extratos de gralha de uva com cerca de 92% e 95% de compostos polifenólicos são excelentes recursos para dois grandes mecanismos de ação; por um lado, como cofactores da vitamina C na regeneração do colagénio (Póvoas, 2006); por outro, como antioxidantes, visto que estas substâncias (sintéticas ou naturais) são capazes de aniquilar radicais, que evitam reações radicalares em cadeia (Barros, 2004).

O vinho tinto representa uma fonte rica de compostos fenólicos tais como as antocianinas e as proantocianidinas que são os mais determinantes na sua qualidade, porque influenciam a cor, o amargor, a adstringência e a estabilidade química para a oxidação (Dell'Agli *et al.*, 2004; Monagas *et al.*, 2006), e o sabor, sendo também os principais responsáveis pelo seu poder antioxidante (Katalinić *et al.*, 2004).

A adstringência e o amargor dos vinhos novos são devidos aos ácidos fenólicos e taninos condensados. Os ácidos hidroxicinâmicos e taninos condensados, juntos com os flavonóis, também atuam como copigmentos de antocianinas (Monagas *et al.*, 2006).

As antocianinas são progressivamente transformadas em pigmentos oligoméricos e poliméricos mais estáveis, os quais dão origem a importantes alterações na cor (do vermelho vivo ao vermelho tijolo) e na adstringência dos vinhos, devido a mecanismos como reações de condensação que ocorrem durante o envelhecimento do vinho tinto (Monagas *et al.*, 2006).

Os flavonóides, uma das classes mais importantes, possuem um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular, além de manifestarem propriedades antivirais, anti-inflamatórias, antialérgicas e outras (Hertog *et al.*, 1992; Robards *et al.*, 1997; Bravo, 1998; Merken *et al.*, 2000; Pietta 2000).

Vários estudos epidemiológicos têm mostrado que o aumento da ingestão de compostos fenólicos antioxidantes está correlacionado com a redução da doença cardíaca coronária. Isto poderá ajudar a explicar o “paradoxo Francês”, ou seja, a baixa taxa de mortalidade por doença cardíaca entre populações que regularmente bebem vinho tinto embora a sua dieta seja rica em gorduras saturadas. De facto, os vinhos tintos contêm

compostos fenólicos em níveis elevados (Lu *et al.*, 1999), um grande número dos quais podem atuar como antioxidantes, com envolvimento de ambos os mecanismos de eliminação de radicais livres e de quelatação de metais (Ghiselli *et al.*, 1998).

O processo oxidativo é iniciado através da oxidação de derivados do catecol tais como a (+)-catequina / (-)-epicatequina, galocatequina, ácido gálico e os seus ésteres, e o ácido cafeico, que constituem a família de compostos fenólicos mais facilmente oxidáveis no vinho (Singleton, 1987; Singleton, 2000; Kilmartin *et al.*, 2001).

Estima-se que a ingestão de 25 a 50 mg de compostos fenólicos por dia proporciona menor risco de doenças cardiovasculares (Mamede *et al.*, 2004).

### **1.5. Evolução das características fenólicas nos vinhos tintos**

O envelhecimento do vinho tinto é caracterizado por uma evolução harmoniosa dos diferentes constituintes de aroma, cor e sabor (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

O vinho suaviza e a adstringência vai diminuindo. Contudo, a velocidade destas reações não é a mesma para todos os vinhos e depende das condições exteriores impostas (ligadas aos fenómenos oxidativos (O<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>), à temperatura, tempo, entre outras) e também da constituição do próprio vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Assim sendo, as antocianinas e os taninos vão sendo progressivamente transformados em pigmentos oligoméricos e poliméricos mais estáveis, mas com características físico-químicas distintas dos seus precursores colaborando desta forma para a alteração das características organoléticas como a cor e o sabor do vinho (Monagas *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos, as antocianinas e os taninos em particular, são os principais constituintes dos vinhos que estão relacionados com fenómenos de oxidação, que se traduzem por alterações de cor (acastanhamento) e por uma evolução do gosto (perda ou aumento de adstringência). Durante o envelhecimento de um vinho tinto há uma diminuição de antocianinas monoméricas que depende das condições de armazenamento e também das características iniciais de um vinho (Cabrita *et al.*, 1999).

A concentração de antocianinas, copigmentos, acetaldeído e outros metabolitos das leveduras, bem como o pH, a temperatura e a presença de luz, de oxigénio e de dióxido de enxofre são fatores que afetam o desenrolar de reações químicas durante o envelhecimento

dos vinhos (Dallas *et al.*, 1995; Somers *et al.*, 1986; Romero *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2000).

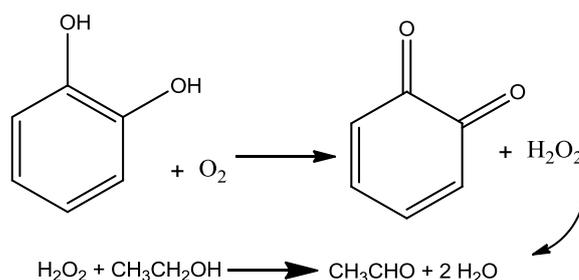
Na evolução da cor é de distinguir a importância de aldeídos como o acetaldeído e outros, cuja presença no vinho se deve a uma série de fatores: são subprodutos da fermentação e produtos da oxidação do etanol e álcoois superiores (Wildenradt *et al.*, 1974).

## 1.6. Etanal

O etanal ( $\text{CH}_3\text{-CHO}$ ) ou acetaldeído é um produto da fermentação alcoólica que apresenta incidência na acidez volátil, na estabilidade da matéria corante e gustativa. A presença de etanal, produto da oxidação do etanol, está relacionada com fenômenos de oxidação-redução e intervém no mecanismo da fermentação alcoólica.

O oxigénio que se vai dissolvendo no vinho reage com os polifenóis e origina  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oxidante potente, capaz de formar acetaldeído (Usseglio-Tomasset, 1998).

Os polifenóis nos vinhos tintos têm grande importância (Cabrita *et al.*, 1999). Por oxidação, estes compostos formam radicais de quinonas ou semi-quinonas que podem ainda reagir com outros compostos fenólicos, numa forma regenerativa denominada polimerização. Durante a formação das quinonas, forma-se um produto secundário, o peróxido, que tem como consequência indireta à oxidação do etanol em etanal (figura 20). Para além das consequências diretas sobre a coloração das antocianinas, estas reações afetam também o peso molecular final dos compostos fenólicos do vinho. Na presença de grandes quantidades de antocianinas monoméricas, as reações conduzem a espécies de peso molecular bastante baixo. A polimerização induzida pelo etanal acaba quando os extremos da cadeia são ocupados por uma antociana. Na prática, a conduta da micro-oxigenação é determinada também, pela intensidade gustativa e aromática do etanal (Capri *et al.*, 2003).



**Figura 20:** Formação do etanal a partir do etanol

### 1.7. Micro-oxigenação

A oxigenação refere-se normalmente à exposição deliberada do vinho ao oxigénio e apresenta um impacto positivo no vinho (Gómez-Plaza *et al.*, 2011). Em contraste, o termo oxidação (ou oxidado) é frequentemente associado ao excesso de oxigénio com consequências negativas (Gómez-Plaza *et al.*, 2011). A influência do oxigénio no desenvolvimento de características sensoriais dos vinhos tintos durante a maturação tem sido reconhecida há mais de 130 anos tendo os estudos sido iniciados por Pasteur (Gómez-Plaza *et al.*, 2011). Nos dias de hoje, o oxigénio desempenha um papel muito importante em quase todas as reações que acontecem durante os processos de vinificação. Exemplos destas reações são as oxidações, a polimerização de taninos, alterações na parte aromática, estabilização da cor, etc. (Lemaire, 1995) e ainda é responsável pela oxidação dos compostos voláteis e fenólicos e a sua presença, em dose adequada melhora as características sensoriais do vinho (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

O oxigénio tem influência direta na composição dos compostos fenólicos e indireta no efeito de algumas características sensoriais como a cor, a adstringência e o aroma, aspetos que determinam a qualidade de um vinho, resultante do papel importante que o oxigénio tem nas reações de oxidação, condensação e polimerização, nos diferentes compostos, principalmente os compostos fenólicos. Estas reações levam à formação de novos pigmentos e compostos poliméricos que podem estabilizar a cor do vinho (Pérez-Magariño *et al.*, 2007).

A micro-oxigenação é uma técnica que consiste na adição de pequenas e controladas quantidades de oxigénio ao vinho (Ortega-Heras *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2007) de forma a que a sua velocidade seja sempre inferior à velocidade do consumo do mesmo no interior da cuba. Desta forma, reproduzem-se as reações que ocorrem durante o envelhecimento (Castel *et al.*, 2000).

Foi na década de 90 que este processo foi desenvolvido em França por Patrick Ducournau e a família Laplace (Pérez-Magariño *et al.*, 2007; Du Toit *et al.*, 2006); viticultores da denominação de origem de Madeiran (Pérez-Magariño *et al.*, 2007), decidiram investigar e estudar as contribuições do oxigénio na fabricação do vinho, tendo como base a estabilização da cor e diminuição da adstringência que normalmente ocorre em barricas de madeira (Cejudo-Bastante *et al.*, 2011).

A micro-oxigenação nasceu pensada como ferramenta de gestão e controlo de um dos parâmetros mais importantes na elaboração dos vinhos: o oxigénio. Não é uma tecnologia para acelerar o processo, mas uma ferramenta para a dirigir e conseguir expressar todas as qualidades positivas do vinho, corrigindo algumas menos positivas e aumentando a sua longevidade (Vinnovation, 2000; Ducournau *et al.*, 1998; Lemaire, 1995).

Em 1991, a técnica de micro-oxigenação foi empregue comercialmente em França como uma técnica de tratamento de vinho. A técnica e a metodologia da micro-oxigenação foram na sua maioria desenvolvidas pelo esforço de Patrick Ducournau e Thierry Lemaire da companhia francesa Oenodev (Vinnovation, 2000). Desde a sua invenção, muitas adegas de todo o mundo adoptaram esta técnica no processo de elaboração dos seus vinhos tintos (González-del Pozo *et al.*, 2010).

### **1.7.1. Objetivos da micro-oxigenação**

O maior interesse do efeito da micro-oxigenação é tornar um vinho com melhor estrutura e estabilização de cor, obtendo também mais volume e equilíbrio (Nevares *et al.*, 2009).

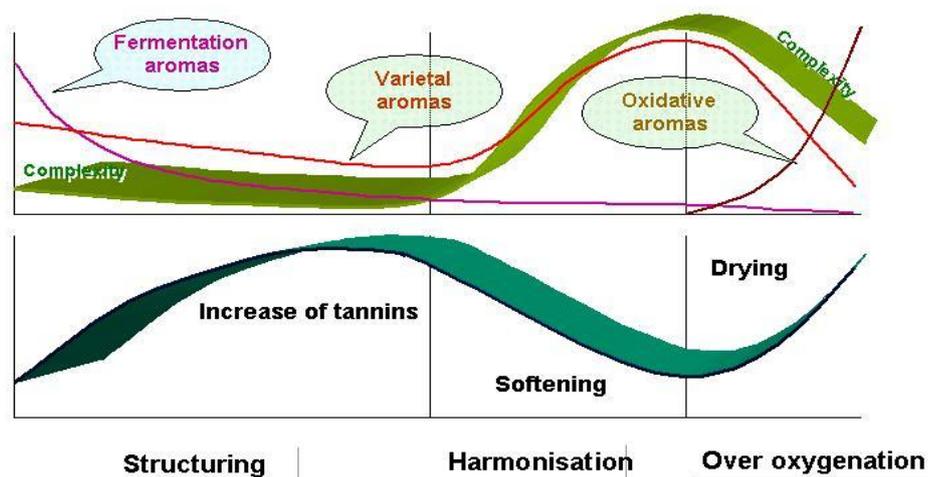
A finalidade da micro-oxigenação é trazer mudanças desejáveis ao vinho, ou seja com efeitos benéficos para este, como: estabilizar a cor do vinho, melhorar a boca (corpo e textura), diminuir a adstringência, reduzir o vegetal indesejável e aromas herbáceos, aumentar notas frutadas, remover sulfitos e diminuir a presença de características de

redução (Cano-López *et al.*, 2006; Pérez-Magariño *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2007; Gómez-Plaza *et al.*, 2011; Cejudo-Bastante *et al.*, 2011).

Contudo, o uso de uma dosagem em excesso de oxigénio pode levar a uma maior adstringência, formando moléculas grandes, levando à precipitação de material polimérico, diminuição da frescura, oxidação de fenóis e atividade microbiana negativa (Cano-López *et al.*, 2006; Pérez-Magariño *et al.*, 2007).

### 1.7.2. Fases envolvidas na micro-oxigenação

A aplicação desta técnica permitiu definir três fases essenciais dentro da evolução dos vinhos. A primeira fase é denominada “fase de estruturação”, durante a qual a presença de aromas de vinhos jovens diminui, havendo um correspondente aumento do carácter tânico reforçando assim o poder redutor. Os vinhos ganham intensidade havendo um aumento das absorvâncias a 520 e 620 nm. A segunda fase denomina-se por “fase de harmonização”, assiste-se a um aumento da complexidade aromática dos vinhos, um desaparecimento do carácter herbáceo, e diminuição da adstringência. E por último a “fase de saturação” (Lesica *et al.*, 2009; Du Toit *et al.*, 2006; Vinovation, 2000).



**Figura 21:** Evolução das fases organoléticas dos vinhos durante a aplicação do processo de micro-oxigenação (adaptado de Lesica *et al.*, 2009)

### 1.7.2.1. Fase de “Estruturação”

A primeira fase da micro-oxigenação é denominada por estruturação e é caracterizada por um aumento na agressividade e intensidade de taninos no paladar (Lesica *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo verifica-se um declínio correspondente na intensidade aromática e complexidade do vinho. O fim desta fase é determinado pela inversão destas tendências organoléticas levando a um amaciar do vinho (Lemaire, 1995). As características aromáticas vegetativas diminuem também neste momento. O sucesso desta fase depende das condições de temperatura que se relacionam diretamente com a velocidade de consumo de oxigénio. Se não houver presença de oxigénio nesta fase, é natural que o vinho em questão apareça mas reduzido e mais “duro” em boca. A melhor altura para se começar a introduzir oxigénio é quando a fermentação alcoólica está completa (Ducournau *et al.*, 1998).

### 1.7.2.2. Fase de “Harmonização”

A fase de harmonização tem como principais objetivos:

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

A fase de harmonização é posterior à fase de estruturação.

É o período de tempo que vai do envelhecimento até ao engarrafamento do vinho. Esta fase é caracterizada por um aumento de suavidade dos taninos e complexidade do vinho de uma forma geral (Lemaire, 1995; Lesica *et al.*, 2009). Todas as modificações que ocorrem são irreversíveis ao contrário do que acontece na fase de estruturação. A fase de harmonização contrasta muitas vezes com a fase de estruturação, uma vez que quanto mais longa for a fase de estruturação mais necessária é a fase de harmonização. Esta fase, numa forma geral é sempre a mais longa e a mais difícil de seguir, porque o vinho se torna cada vez mais sensível (Vinnovation, 2000).

Os riscos são o desenvolvimento duma adstringência e/ou uma maturação excessiva acompanhada pela perda de frescura e expressão aromática que se reduz. A temperatura tem também um papel importante nesta fase. Estes riscos são especialmente agravados se a qualidade do vinho for fraca (Ducournau *et al.*, 1998).

A dose ideal de oxigénio aplicada é determinada normalmente provando, procurando um maior benefício aromático, mas não causando secura (Lemaire, 1995). Assim que os taninos começarem a parecer demasiado secos, é necessário limitar o oxigénio ou até mesmo parar a micro-oxigenação. Se a micro-oxigenação for mantida neste momento, o resultado será um vinho muito liso e fraco, e os aromas da oxidação podem aparecer de uma forma irreversível (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1983). Ou seja, se os taninos forem duros, significa que o vinho necessita de algum oxigénio para os tornar mais macios, e que a fase de harmonização deve continuar. Se os taninos estiverem secos, significa que a contribuição do oxigénio deve ser limitada.

De acordo com a definição destes termos, o início de secagem de taninos é acompanhado por uma perda do corpo e estrutura do vinho, segue geralmente este teste padrão:

- Durante a fase de estruturação, quanto mais oxigénio se adicionar, mais duros se tornam os taninos.
- Durante a fase de harmonização, os taninos amaciam automaticamente, mas se a dose de oxigénio for demasiado elevada, os taninos secarão a boca.

### **1.7.2.3. Fase de “Saturação”**

Se o vinho é micro-oxigenado por muito tempo, os taninos tendem a secar bastante e tornam-se demasiado adstringentes (Lesica *et al.*, 2009).

Vários fatores podem afetar os resultados obtidos quando a micro-oxigenação é aplicada nos vinhos tintos, destacando-se como mais importantes o momento de aplicação, as doses de oxigénio a aplicar e as características fenólicas do vinho (Cano-López *et al.*, 2008).

### 1.7.3. Características do vinho antes da micro-oxigenação

De um modo geral, os vinhos mostram diferenças relevantes na capacidade de consumir oxigénio. Normalmente essa capacidade está diretamente relacionada com a concentração de polifenóis, pois os compostos fenólicos são os principais consumidores de oxigénio (60%), junto com etanol (20%) e SO<sub>2</sub> (12%) (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

A micro-oxigenação é mais adequada para vinhos tintos com elevado teor de fenólicos, considerando que o tratamento pode ocorrer rapidamente com vinhos com pouca intensidade de cor e em que a micro-oxigenação deve ser usada de forma cuidadosa. (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

Cano-López *et al.*, (2008) mostraram que vinhos distintos foram afetados de modo diferente pela micro-oxigenação. Em geral, vinhos micro-oxigenados tiveram maior percentagem de novos pigmentos derivados de antocianinas. Estes compostos aumentaram significativamente a intensidade da cor dos vinhos e os que continham poucos compostos fenólicos foram menos influenciados pela micro-oxigenação (Gómez-Plaza *et al.*, 2011; Cano-López *et al.*, 2008).

### 1.7.4. SO<sub>2</sub> na micro-oxigenação

O dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) é uma ferramenta insubstituível em Enologia. Apresenta ainda um conjunto de propriedades como: ação antioxidante, ação dissolvente, ação anti-séptica e ação antidiastásica (Cardoso, 2007). Interfere ainda com muitas reações de oxidação chave de interesse, como por exemplo, ele reage com o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e acetaldeído, que são necessários nas reações de condensação e também se liga diretamente com antocianinas, inibindo a produção de pigmentos poliméricos. Além disso, enquanto que a interação do oxigénio é direta, a do bissulfito é muito improvável de ocorrer com alguma significância no vinho, devido à actividade do radical captador dos polifenóis, o SO<sub>2</sub> tem também a capacidade de reduzir os polifenóis oxidados. Portanto, a micro-oxigenação requer baixas concentrações efetivas de SO<sub>2</sub> (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

Os resultados de Tao, Dykes e Kilmartin (2007) mostram que o SO<sub>2</sub> tem um efeito moderado na interação do oxigénio com os polifenóis do vinho uma vez que tem

capacidade de reduzir os polifenóis oxidados e remove o peróxido. A micro-oxigenação dos vinhos depois da adição de SO<sub>2</sub> leva a reações mais lentas e menos significativas. Em elevados níveis de SO<sub>2</sub>, a micro-oxigenação será mais difícil e levará mais tempo para produzir o mesmo efeito. Uma elevação do nível normal de SO<sub>2</sub> livre, limitará consequentemente o efeito de estruturação do oxigênio. Este fenômeno explica a ocorrência, muitas vezes, de um efeito negativo do oxigênio no vinho, antes da fermentação maloláctica, pois nesta altura os níveis de SO<sub>2</sub> muitas vezes, ainda não foram ajustados (Vinovention, 2000).

Dykes (2007) executou um pequeno ensaio para medir o efeito do SO<sub>2</sub> no desenvolvimento dos polifenóis do vinho com e sem oxigênio. A presença de SO<sub>2</sub> teve um efeito significativo no grau de polimerização das proantocianidinas e na concentração estável dos pigmentos. O grau de polimerização foi observado, diminuindo ao longo de seis semanas, independentemente da adição ou não de oxigênio. O grau de polimerização, para os tratamentos sem SO<sub>2</sub>, aumentou de forma constante ao longo do ensaio e diminuiu nos tratamentos com SO<sub>2</sub>.

### **1.7.5. Momento de aplicação da micro-oxigenação**

Se a micro-oxigenação começar imediatamente a seguir à fermentação alcoólica, o vinho tem tendência a ter uma fase de estruturação mais longa e mais intensa. Verificou-se também, que as vantagens em intensidade corante e em estruturação do vinho são muito superiores, e que o trabalho não representa riscos consideráveis (Vinovention, 2000).

A micro-oxigenação pode ser aplicada durante a vinificação e no envelhecimento. No entanto, a estabilização da cor é o principal objetivo, a distinção foi feita entre a influência da micro-oxigenação antes ou depois da fermentação maloláctica, relacionadas parcialmente na diferença de concentração de SO<sub>2</sub>, mas também na concentração de antocianinas livres (Gómez-Plaza *et al.*, 2011). A micro-oxigenação parece ser muito mais eficaz na melhoria da estrutura do vinho antes da fermentação maloláctica, quando os taninos e antocianinas ainda estão na sua maioria de forma monomérica simples. As reações dos taninos e antocianinas ocorrem independentemente da micro-oxigenação, assim, se o tratamento é iniciado após a fermentação maloláctica, este vai agir em alguns substractos que já passaram a polimerização e condensação (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

A micro-oxigenação antes da fermentação maloláctica, num vinho rico em antocianinas livres, permite a estabilização das antocianinas e limita a polimerização dos taninos, uma vez que as antocianinas são fixadas no final da estrutura dos taninos e bloqueia a polimerização (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

Depois a fermentação maloláctica, o SO<sub>2</sub> é normalmente adicionado para proteger o vinho e isso pode limitar o efeito da micro-oxigenação. Deve-se ter especial atenção quando a micro-oxigenação é aplicada depois da fermentação maloláctica, uma vez que o excesso de acetaldeído se pode acumular no vinho (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

### **1.7.6. Temperatura do vinho na micro-oxigenação**

A temperatura tem um importante efeito na solubilidade do oxigénio e nas reações de oxidação (Gómez-Plaza *et al.*, 2011). A solubilidade do oxigénio é afetada, aumentando, quando a temperatura diminui. No Inverno é muito frequente as temperaturas diminuírem bastante; assim, se a temperatura diminuir, deve-se parar o processo de adição ou limitar a adição de oxigénio, para evitar a acumulação no vinho de oxigénio dissolvido (Vinnovation, 2000; Ducournau *et al.*, 1998).

A temperatura do vinho para a micro-oxigenação, deve ser cerca dos 15°C, pois se a temperatura é muito alta, conduzirá a uma fraca solubilidade do oxigénio e se for muito baixa, as reações químicas ocorrem muito lentamente e há acumulação de oxigénio. Portanto, é normalmente recomendado que a temperatura de micro-oxigenação deve ser controlada em cerca dos 15 °C (Gómez-Plaza *et al.*, 2011; Du Toit *et al.*, 2006).

### **1.7.7. Dose de adição de oxigénio a aplicar**

A dose de adição de oxigénio é muito importante e deve ser sempre controlada. Estas doses são administradas consoante o objetivo geral do tratamento e são também determinadas em função da concentração em compostos fenólicos, o grau de maturidade fenólica e consumo de etanal. A dose de oxigénio deve ser adequada à estrutura fenólica do vinho e pode variar com as diferentes castas e vindimas (Gómez-Plaza *et al.*, 2011; Vinnovation, 2000)

Muitos fornecedores recomendam a dose de 10-30 ml/l/mês antes da fermentação maloláctica, mas depende do teor de compostos fenólicos no vinho. Após a fermentação maloláctica as doses podem variar de 1 a 5 ml/l/mês, durante um a quatro meses (Gómez-Plaza *et al.*, 2011). Segundo Du Toit *et al.*, (2006) pode usar-se de 1-4 mg/l/dia apenas depois da fermentação maloláctica.

### **1.8. Melhoria das características da cor e estabilidade: polifenóis e reação de oxidação**

Os compostos fenólicos, além de serem responsáveis por muitas propriedades organoléticas nos vinhos tintos de qualidade (Cano-López *et al.*, 2008), como o amargor, adstringência e cor são também os mais importantes constituintes do vinho em termos de concentração (Segade *et al.*, 2009; Gómez-Plaza *et al.*, 2011). As antocianinas e os taninos têm especial importância, pois são responsáveis pela cor, estrutura e corpo dos vinhos tintos (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

A cor é um dos atributos principais na qualidade dos vinhos tintos. A intensidade de cor vai diminuindo ao longo do tempo, e a sua tonalidade muda gradualmente desde o vermelho-púrpura, que é a cor característica dos vinhos jovens, até vermelho-acastanhado, cor dos vinhos envelhecidos. Esta evolução é causada pelas transformações das antocianinas onde se incluem diversas interações com componentes do vinho. A cor inicial dos vinhos tintos é principalmente devido às antocianinas monoméricas livres, e antocianinas pigmentadas com cofactores como flavonóis, flavanóis e ácidos hidroxicinâmicos (González-del Pozo *et al.*, 2010).

As antocianinas são os principais componentes responsáveis pela cor vermelho-roxo dos vinhos jovens. Estas são instáveis e participam em reações durante a fermentação e envelhecimento e formam mais pigmentos complexos, que surgem principalmente a partir de interações entre antocianinas e outros compostos fenólicos, especialmente flavan-3-ol. Vários mecanismos têm sido propostos e confirmados para a formação desses novos pigmentos (Gómez-Plaza *et al.*, 2011; Cano-López *et al.*, 2010):

- Reações diretas entre antocianinas e flavanóis;
- Reações entre antocianinas e flavanóis envolvendo acetaldeído;

Formação de piranoantocianinas através de reações entre antocianinas e outros compostos, como ácido pirúvico, vinilfenóis e vinilflavanóis, em que o acetaldeído pode estar envolvido.

(Gómez-Plaza *et al.*, 2011; González-del Pozo *et al.*, 2010; Cano-López *et al.*, 2010)

Todas estas transformações resultam na formação de compostos mais estáveis que estabilizam a cor do vinho e resistem à descoloração por parte do SO<sub>2</sub> e proporcionam uma melhor estabilidade da cor ao pH do vinho. A estrutura dos produtos finais, não depende apenas da composição inicial do vinho mas também da presença de leveduras e exposição ao oxigênio

Os taninos ou proantocianidinas são os principais responsáveis pela sensação de amargor e adstringência no vinho tinto, incluindo compostos pigmentados, antocianinas-taninos, isto é, pigmentos poliméricos. A ligação direta entre fenóis poliméricos presentes no vinho e a percepção de adstringência ainda não foi conclusiva até à data, apesar de numerosos artigos sugerirem que eles são responsáveis pela percepção das sensações de adstringência (Gómez-Plaza *et al.*, 2011).

Como já foi dito anteriormente, a micro-oxigenação proporciona o amaciamento dos taninos, estabilização de cor e redução de aromas vegetais. As reações dos compostos polifenólicos do vinho, são vistas como a chave destes processos, incluindo mudanças nas proantocianinas de cadeias longas e a sua influência na adstringência do vinho e a ligação de antocianinas com taninos do vinho, para formar estruturas coloridas mais estáveis como as piranoantocianinas, mediadas por acetaldeído, gerado a partir da oxidação do etanol (Tao *et al.*, 2007).

## 1.9. Objetivos do trabalho

A atividade vitivinícola tem uma grande importância e relevância para a economia Portuguesa. Neste trabalho, propõe-se usar a micro-oxigenação como forma de melhorar as características de estabilidade de cor e características sensoriais de duas castas de relevo na região demarcada do Douro; a casta Touriga Nacional, com reconhecimento a nível

mundial como sendo uma casta de grande qualidade, e o Sousão, que tem a particularidade de ser uma casta tintureira e ainda pouco estudada.



---

## *Capítulo II – Material e Métodos*

---

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Amostragem e local**

Este trabalho foi realizado na Sociedade dos Vinhos Borges, no centro de vinificação de Vila Real.

Para a elaboração do mesmo, as uvas utilizadas nos processos de vinificação foram as castas Touriga Nacional e Sousão, colhidas nas vinhas da Quinta da Soalheira, propriedade da Sociedade dos Vinhos Borges e que se situa na Região Demarcada do Douro, na sub-região do Cima Corgo, em São João da Pesqueira. Estas vinhas situam-se a uma altitude entre os 350 e 450 metros.

### **2.2. Controlo de Maturação**

Foi necessária a realização de quatro controlos de maturação compreendidos entre os dias 24 de Agosto e 20 de Setembro para marcar uma data provável para se iniciar a vindima.

O controlo foi feito da seguinte maneira:

- Recolheram-se no campo cerca de 250 bagos ao acaso de partes diferentes de cada parcela, tendo em conta a exposição do cacho.
- As recolhas das amostras foram realizadas pela manhã bem cedo.
- Levaram-se as amostras para o laboratório.
- Fez-se o esmagamento de cada amostra, e obteve-se o mosto das uvas colhidas.
- Foram feitas as seguintes análises físico-químicas com a apreciação visual de cor das grainhas e mostos: medição álcool provável pelo refratómetro ocular, valor de pH e Acidez total tartárica).

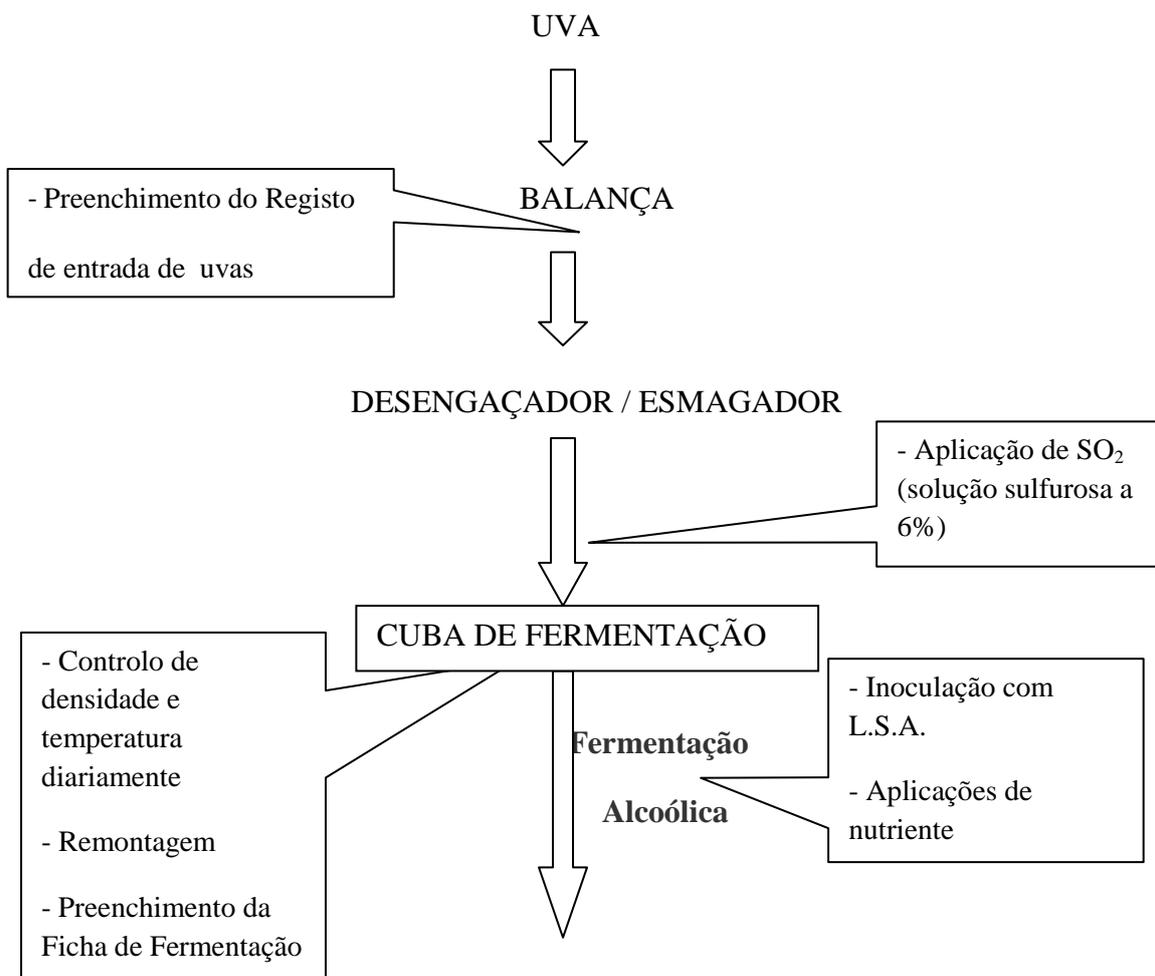
### **2.3. Processo de vinificação**

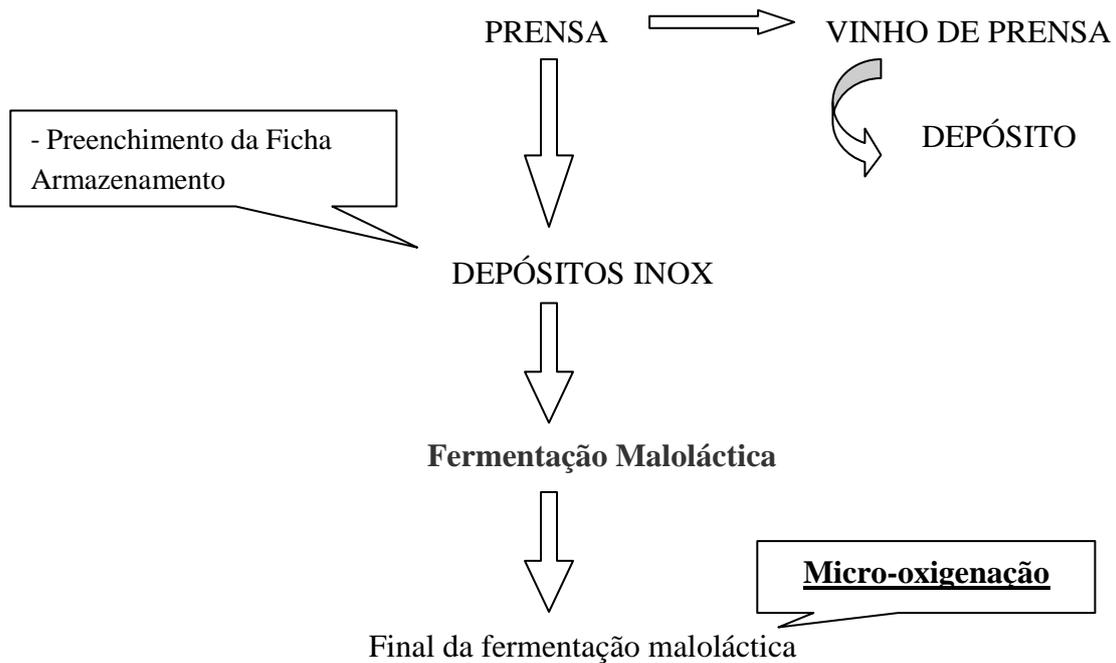
A colheita das uvas para a elaboração deste trabalho teve início a 7 e 15 de Outubro para as castas Touriga Nacional e Sousão, respetivamente. As uvas foram transportadas para a adega onde posteriormente foram desengaçadas e esmagadas, tendo-se nesta altura

adicionado solução sulfurosa a 6%. Foram vinificadas em cubas de fermentação separadas por casta e foram inoculadas com LSA (leveduras secas ativas). A fermentação ocorreu sempre com temperatura controlada e durou em média de 7 dias. A fermentação alcoólica é controlada através de medições diárias de temperatura e densidade das duas cubas de fermentação.

No final da fermentação alcoólica, o Touriga Nacional esteve em maceração pós-fermentativa de 20 dias e o Sousão durante 17 dias, durante os quais a manta foi regada uma vez por dia. Esta maceração foi controlada por prova diária, medição da densidade ótica a 420, 520 e 620 nm (tabela 2). Após maceração, procedeu-se às desencubas a 3 e 8 de Novembro para o Touriga Nacional e Sousão, respetivamente. O vinho passou então para o armazenamento em cubas de inox, onde foi iniciada a fermentação maloláctica. Diariamente, foram tiradas amostras para o controlo da fermentação maloláctica por cromatografia em papel e a temperatura do vinho mantido cerca dos 15°C.

### Esquema de vinificação





**Figura 22:** Esquema de vinificação

Na tabela 2 estão apresentados os parâmetros físico-químicos que foram realizados no final da fermentação alcoólica, final da fermentação maloláctica e depois da correção  $\text{SO}_2$  após a micro-oxigenação.

As normas utilizadas foram: na acidez total OIV-AS-313-01-ACITOT – Método tipo I; acidez volátil OIV-AS-313-02-ACIVOL – método tipo I; pH OIV-AS-313-15-pH – método tipo I;  $\text{SO}_2$  – Método de Ripper; Massa específica, densidade – Reg (CEE) 2676/90.

**Tabela 2:** Parâmetros físico-químicos

Análises físico-químicas	Método Analítico
Densidade a 20 °C	Densímetria
SO <sub>2</sub> Livre (mg/L)	Método de Ripper
SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	Método de Ripper
Acidez Total (g/L ácido tartárico)	Titulação com fenolftaleína
Acidez Volátil (g/L ácido acético)	Destilação (Cazenave, seguido de titulação com fenolftaleína)
pH	Potenciómetro
DO (420, 520 e 620 nm)	Espetrofotometria
Intensidade corante	Soma DO 420, 520 e 620 nm
Grau alcoólico % (v/v)	Destilação
Quantificação do teor em antocianinas	HPLC
Quantificação do ácido málico	Cromatografia em papel

Na tabela 3 estão apresentadas as fórmulas que foram seguidas neste trabalho para o cálculo dos índices colorimétricos.

**Tabela 3:** Fórmulas usadas no cálculo dos índices colorimétricos segundo Sudraud (1958) e Glories (1984)

Índice	Fórmula
Intensidade Corante (IC)	$IC = (Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620})$
% Amarelo	$\% Am = (Abs_{420}/IC) \times 100$
% Vermelho	$\% Vm = (Abs_{520}/IC) \times 100$
% Azul	$\% Az = (Abs_{620}/IC) \times 100$

#### 2.4. Processo de Micro-oxigenação

Terminada a fermentação maloláctica, os vinhos foram passados a limpo para cubas de inox, onde se fizeram lotes de 5000 L de Touriga Nacional e 12200 L de Sousão, lotes estes que foram em seguida micro-oxigenados. Posteriormente engarrafaram-se 36 amostras de cada vinho monovarietal, servindo de amostras iniciais ou controlo (sem micro-oxigenação). As cubas de armazenagem tinham uma altura superior a dois metros

para garantir a dissolução das microbolhas de oxigénio. Iniciou-se então a aplicação da técnica de micro-oxigenação nas cubas de inox.

Semanalmente foram tiradas amostras das duas cubas para análise do teor em antocianinas por HPLC, medição da densidade óptica e análise sensorial. Estas amostras serão designadas ao longo do trabalho com a numeração de 1 a 10, de acordo com a semana correspondente.

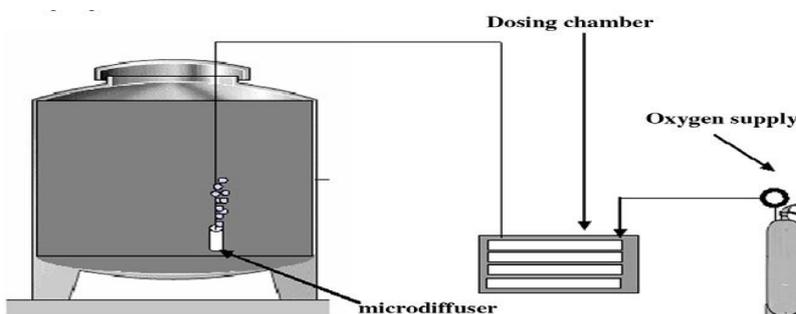
## 2.5. Equipamento

O sistema de micro-oxigenação utilizado foi da Oenodev (France de capacidade 50 a 500 hl de quatro saídas). O equipamento básico necessário para micro-oxigenar inclui uma alimentação de oxigénio com os respetivos controlos de pressão, um sistema de dosagem e um micro-difusor, como se pode ver na figura 22.

A dose de oxigénio para ser injetado no vinho foi obtido através do preenchimento de uma câmara de volume conhecido de uma alta pressão fixa. Este volume foi então transferido através de um circuito de baixa pressão para o difusor na cuba.

O micro-difusor foi pendurado dentro da cuba, mas tendo o cuidado deste não tocar no fundo da mesma. O difusor, uma membrana de cerâmica, converte o fluxo de gás num fluxo de bolhas finas que dispersam rapidamente no vinho. Este difusor permitiu uma taxa de fluxo lento e constante de alguns mililitros de oxigénio por litro de vinho por mês.

Este aparelho pode estar fixo ou não, e mover-se como o operador pretender. Apresenta um painel de controlo, que monitoriza todas as operações e parâmetros de programação.



**Figura 23:** Representação esquemática do sistema de micro-oxigenação (adaptado de Gómez-Plaza *et al.*, 2011)

## 2.6. Dosagem e temperatura

A dosagem adotada para este trabalho foi de 1,5 e 2 mg/L/mês. Na tabela 4 é apresentado o número de dias e a quantidade de oxigénio adicionado a cada um dos vinhos em estudo.

O processo de micro-oxigenação começou quando a temperatura atingiu os 15°C. Diariamente, a temperatura foi controlada e registada. A temperatura de micro-oxigenação esteve compreendida entre os 15°C e os 20°C.

**Tabela 4:** Quantidade de oxigénio em mg/L//mês adicionado aos diferentes vinhos

Vinho Monovarietal	Vindima 2010	
	Primeira dose	Segunda dose
	1,5mg/l/mês O <sub>2</sub>	2 mg/l/mês O <sub>2</sub>
Sousão	35 dias	35 dias
Touriga Nacional	35 dias	35 dias

## 2.7. Quantificação do teor em antocianinas por HPLC

O método utilizado foi a cromatografia em coluna moderna – HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

A quantificação de compostos através do processo de cromatografia consiste no conjunto de métodos físicos de separação, nos quais os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases, uma fixa (fase estacionária), e outra móvel (fase móvel).

Durante este processo de separação, os componentes da mistura são arrastados pela fase móvel ao longo da fase estacionária, sendo que a velocidade de migração destes depende da respetiva afinidade relativa para as duas fases.

Na cromatografia por HPLC, as partículas de enchimento da coluna são extremamente pequenas (diâmetros de 3 a 10  $\mu\text{m}$ ), sendo necessário recorrer a pressões muito elevadas para intensificar a deslocação da fase móvel ao longo da coluna. De notar que o poder de separação deste tipo de colunas é muito elevado.

No presente trabalho, a cromatografia em coluna moderna – HPLC foi utilizada como método de separação das antocianinas. Para a análise por RP-HPLC-DAD foi utilizado um aparelho Dionex 3000 ultimate (Dionex Corporation) equipado com um detector de conjunto de fotodíodos. A coluna utilizada foi um Teknocroma C-18 de 250 cm de comprimento X 4 mm de diâmetro e 5 mm de partícula (Teknocroma, Barcelona). A fase móvel A foi uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% (usado como fase móvel, para ajustar o pH, devido à sua volatilidade e características acidificantes) e a fase móvel B metanol, ambos de qualidade analítica dos laboratórios Panreac. A água ultra-pura foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q da marca Millipore. O gradiente utilizado foi 5% B, 5 min; gradiente até 60% de B em 60 min; 60% B 5 min, 5% B, 5 min. O detector de conjunto de fotodíodos foi operado entre 200-600nm, e o perfil cromatográfico foi registado a 520nm. O volume de amostra injetado foi de 50 mL e o fluxo foi de 1mL/min, sendo a análise realizada a 35°C. Cada uma das antocianinas foi identificada tendo como base a literatura (Dallas, 1994), pela ordem de eluição, tempos de retenção e espectros de ultra violeta- visível.

## 2.8. Análise do perfil volátil por GC-MS

A análise por GC-MS foi realizada num equipamento da Marca ThermoFinnningam utilizando um GC Trace e o MS Polaris Q, o qual contem um analisador de massa do tipo “ion trap”. A coluna utilizada foi uma DB-5MS com 30 m de comprimento 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. A temperatura do injetor foi de 230°C. O volume de amostra injectado foi de 1 microlitro. A injeção foi realizada no modo de Split com uma razão de Split de 1:70. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com um fluxo constante de 1 mL/min. O forno apresentava uma temperatura inicial de 80°C e foi mantida a esta temperatura durante 1 min após a injeção. Após este tempo a temperatura do forno aumentou até 150°C a uma velocidade de 4°C/min, e a temperatura do forno foi mantida a 150°C durante 1 min. Após este tempo a temperatura do forno aumentou novamente até 220°C a uma velocidade de 1,5°C/min, e foi mantido a 220°C durante 1 min, e finalmente a temperatura do forno foi elevada até 300°C a uma velocidade de 15°C/min e mantida a esta temperatura durante 1 min. A linha de transferência foi mantida a 280°C durante toda a corrida. A fonte do detector foi mantida a 220°C, e este foi operado em modo scan entre m/z

85-500, com uma velocidade de scan de 0,45 s. A ionização foi realizada por impacto electrónico e a deteção realizada no modo positivo.

## 2.9. Análise Sensorial

Por mais completa que seja a análise físico-química de um vinho, pode não nos dar informação suficiente relativamente à qualidade do produto, nomeadamente a nível organolético. Além disso dois vinhos com um boletim de análise idêntico, podem ter características organoléticas totalmente diferentes.

A degustação é considerada como o estado final do controlo dos vinhos de qualidade. O consumo de um vinho impressiona sempre de forma mais ou menos agradável os sentidos do gosto e aroma. Assim, a avaliação sensorial tem por objetivo determinar e depois descrever as diversas impressões provocadas pelo vinho nos órgãos dos sentidos (Navarre, 1997).

Por estas razões, e pela importância que a análise sensorial representa no mundo dos vinhos, foram realizadas provas sensoriais dos vinhos estudados neste trabalho, com o objetivo de complementar os resultados obtidos nas análises físico-químicas.

A análise sensorial foi realizada por um painel treinado formado por nove provadores pertencentes ao painel sensorial da UTAD.

Durante o ensaio de micro-oxigenação foram realizadas quatro provas sensoriais discriminantes, mais especificamente, o Teste triangular (ISO 4120:2004). Em anexo 1, está a tabela utilizada para o Teste triangular. Paralelamente foi também realizada na última prova uma análise descritiva onde foram avaliados três atributos: aspeto, aroma e perceção oral ou gosto (sabor), de acordo com padrões de referência (Noble *et al.*, 1987). Os atributos foram quantificados utilizando escalas que variaram de 3 a 10 pontos: aspeto 3 pontos; aroma 7 pontos e perceção oral ou gosto 10 pontos (ISO 4121, 2003). Todas as análises organoléticas decorreram numa sala com ambiente controlado e material necessário para cada tarefa, segundo a norma ISO 8589:2007 (Norma Portuguesa NP 4258:1993). Os vinhos foram apresentados codificados, tendo-se atribuído um código de três dígitos a cada vinho. As amostras foram servidas à temperatura ambiente, em copos normalizados (ISO 3591:1977). Foram fornecidos água mineral e tostas para limpeza do palato entre a avaliação das amostras. As sessões de prova decorreram entre as 16.00 - 17.00 horas.



---

*Capítulo III – Resultados*

---

### **3. Resultados e Discussão**

Tendo como objetivo a caracterização das castas Touriga Nacional e Sousão antes, durante e após o processo de micro-oxigenação, bem como a diferenciação das duas castas, o estudo iniciou-se com o controlo de maturação, seguido da vindima propriamente dita, da vinificação e da micro-oxigenação. Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos do estudo da influência da micro-oxigenação sobre os parâmetros enológicos clássicos, a composição fenólica ao nível das antocianinas, cor associada a esta composição, e análise sensorial.

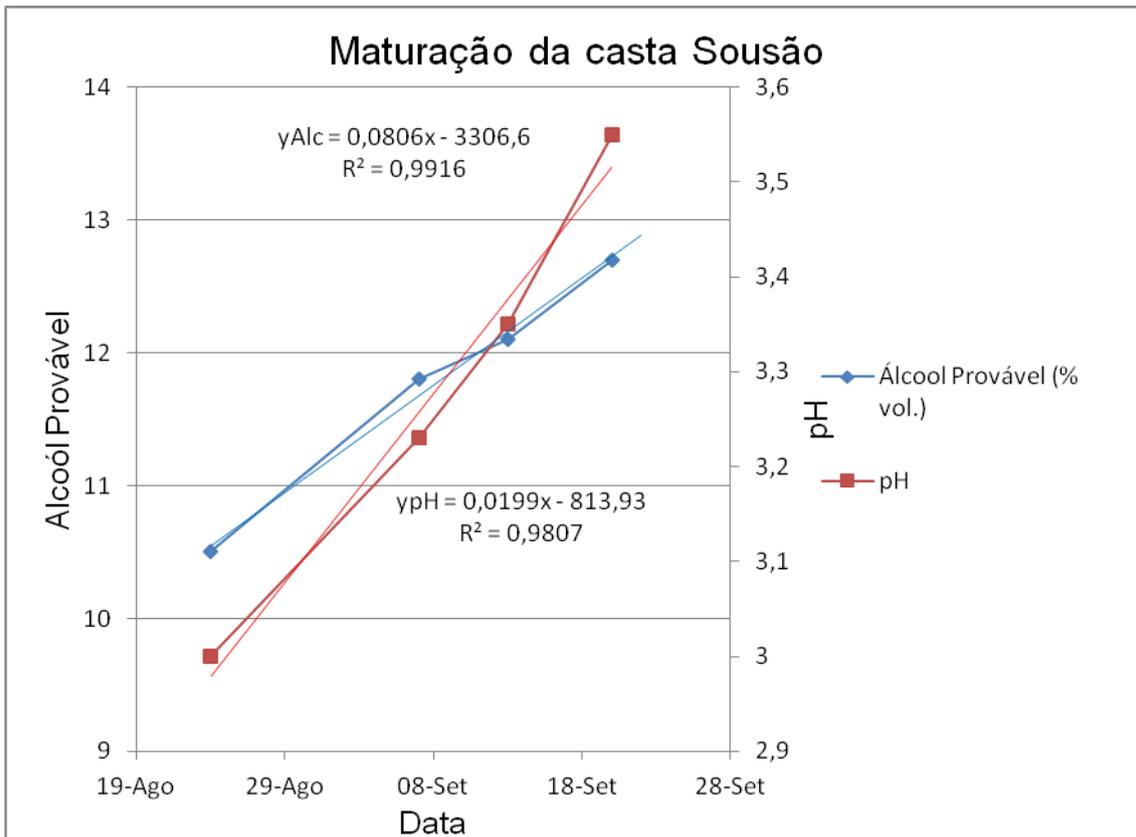
Nos vinhos analisados foi necessário aplicar a micro-oxigenação depois da fermentação maloláctica, já que estes vinhos tiveram uma maceração pós-fermentativa. De salientar que neste caso, a aplicação da micro-oxigenação (depois da fermentação maloláctica) teve que ser muito mais controlado do que se tivesse sido antes da mesma, uma vez que as doses são menores, e em alguns casos, o tempo de aplicação pode prolongar-se, sendo este facto condicionado pela resposta do vinho, dependendo da sua composição.

#### **3.1. Controlo de maturação**

Antes do início da vindima, durante vários dias, foram feitos controlos de maturação às castas Touriga Nacional e Sousão, nas diferentes parcelas da quinta. Nas tabelas 5 e 6, estão apresentados os resultados relativos a cada casta, cujas uvas foram utilizadas para este trabalho. Estão também representados nos gráficos 1 e 2 a evolução de álcool provável e do pH ao longo da maturação de ambas as castas.

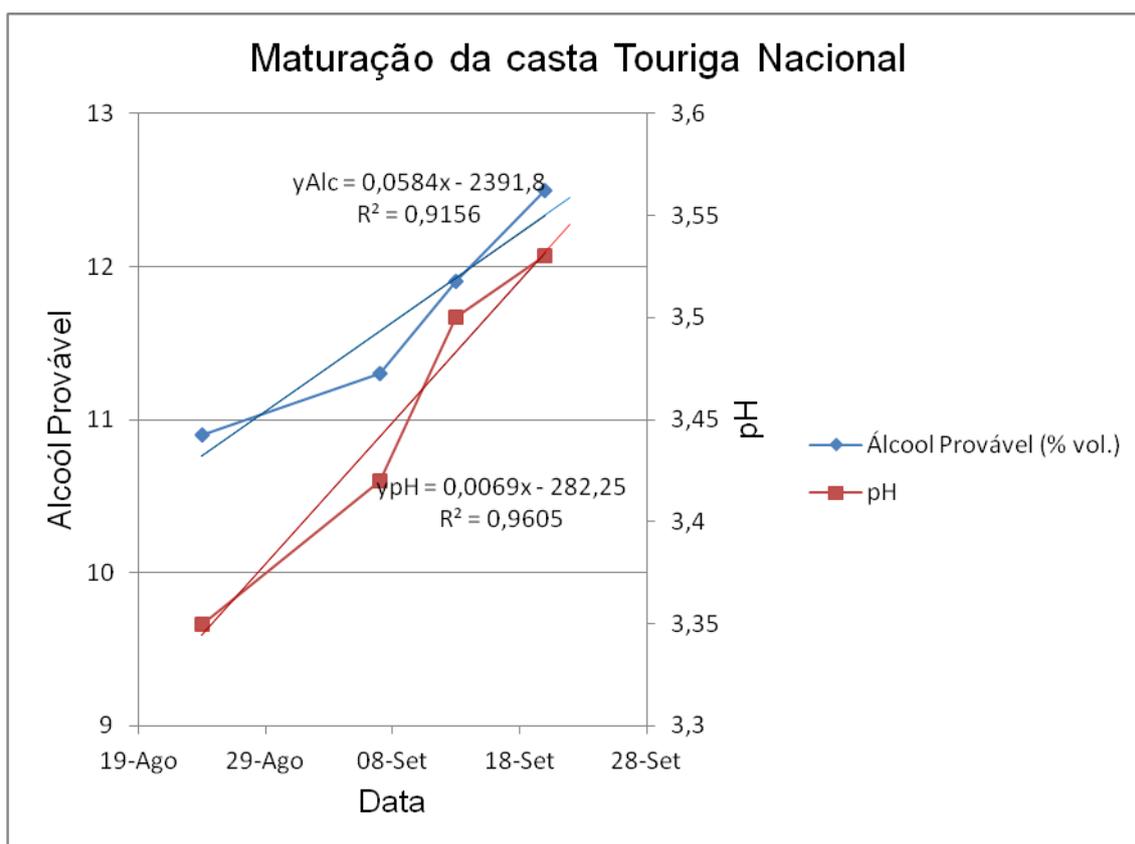
**Tabela 5:** Resultados do controlo de maturação do Sousão

Dias	Álcool Provável (% vol.)	pH
24 Agosto	10,5	3,00
7 Setembro	11,8	3,23
13 Setembro	12,1	3,35
20 Setembro	12,7	3,55

**Gráfico 1:** Evolução dos valores de álcool provável e do pH ao longo da maturação do Sousão

**Tabela 6:** Resultados do controlo de maturação da Touriga Nacional

Dias	Álcool Provável (% vol.)	pH
24 Agosto	10,9	3,35
7 Setembro	11,3	3,42
13 Setembro	11,9	3,5
20 Setembro	12,5	3,53

**Gráfico 2:** Evolução dos valores de álcool provável e do pH ao longo da maturação do Touriga Nacional

Como podemos verificar pela análise das tabelas 5 e 6 e dos gráficos 1 e 2, durante o período de maturação dos bagos, houve um aumento progressivo dos valores de pH, o que está de acordo com o descrito na literatura. Segundo Manfroi *et al.*, 2003, o pH apresenta um aumento linear, o qual é devido à diminuição nas concentrações dos ácidos tartárico e málico, à salificação dos ácidos orgânicos, especialmente do tartárico, e ao aumento do catião potássio.

Dos fenómenos mais importantes que podem condicionar a maturação é a acumulação de açúcares no bago, pois traduz o potencial em álcool no decurso da maturação (Magalhães, 2008).

Como era previsível houve também um aumento gradual do teor de açúcar e conseqüentemente do álcool provável. Os açúcares são transportados até ao bago, em forma de sacarose, em que esta se hidrolisa em glucose e frutose, sendo estes os açúcares predominantes ao nível da polpa (Magalhães, 2008). Ao longo da maturação vai havendo um aumento de açúcares, o que nos leva ao aumento do teor alcoólico.

Na tabela 7 apresentam-se as análises iniciais dos mostos das duas castas em estudo.

**Tabela 7:** Análises iniciais dos mostos de Touriga Nacional e Sousão

	Data	Álcool Provável %	Densidade	SO <sub>2</sub> Livre (mg/L)	SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	Acidez Total (g/L ácido tartárico)	pH
Sousão	15/10	13,9	1100	52	93	6,52	3,57
Touriga Nacional	7/10	13,1	1095	45	85	3,83	3,60

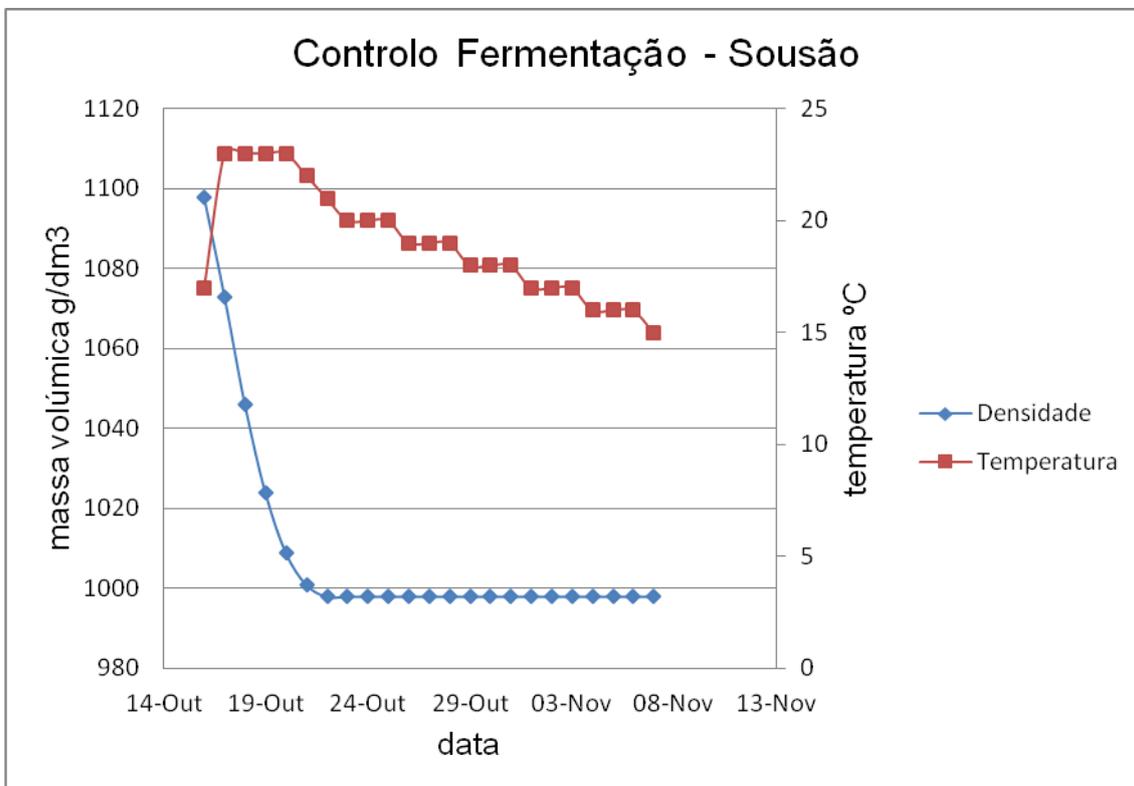
Nesta tabela, destaca-se casta Sousão, por apresentar o teor mais elevado de acidez total, o que está de acordo com a bibliografia, pois é uma casta que se caracteriza pela sua elevada acidez (Magalhães, 2008; Guerra *et al.*, 2008).

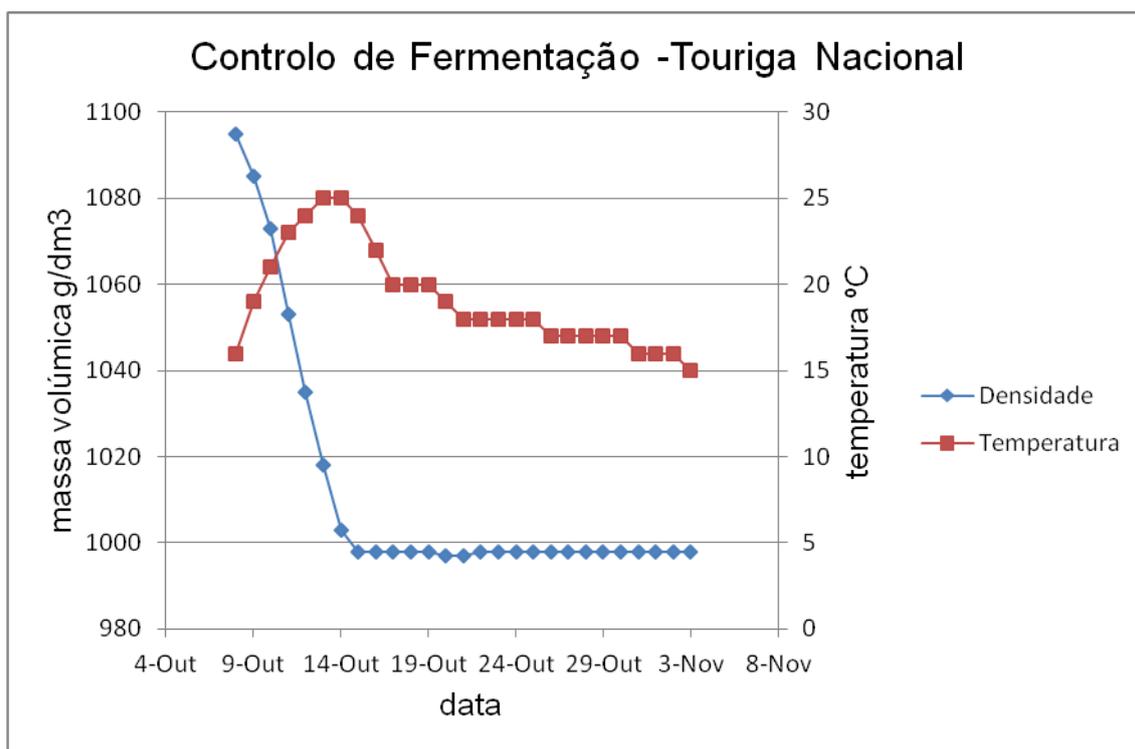
## 3.2. Fermentação

### 3.2.1. Controlo e acompanhamento da Fermentação Alcoólica

Durante o decorrer da fermentação alcoólica, foram medidos diariamente os valores de densidade e temperatura, para facilitar o controlo e, se necessário, proceder a correções para atingir as condições pretendidas. Na recolha das amostras, teve-se especial atenção, para que estas fossem representativas do volume total presente na cuba de fermentação. De seguida, são apresentados os resultados relativos a esse controlo (gráficos 3 e 4).

**Gráfico 3:** Evolução da fermentação alcoólica do Sousão



**Gráfico 4:** Evolução da fermentação alcoólica do Touriga Nacional

Em Anexo 2 e 3, encontram-se os valores de densidade e temperatura durante a fermentação alcoólica dos vinhos em estudo.

Como poderemos verificar através dos gráficos, com o início da fermentação alcoólica, a temperatura aumentou, tendo sido estabilizada no decorrer da fermentação, através dum sistema de frio implantado na adega, e descendo gradualmente no final desta fase.

A densidade, como era de esperar, diminuiu também ao longo da fermentação, devido à degradação dos açúcares.

### 3.2.2 Armazenamento

Decorrida a fermentação alcoólica, os vinhos foram armazenados noutra tipo de cubas e foram realizados os parâmetros físico-químicos no final da fermentação alcoólica, no final da fermentação maloláctica e logo depois da correção do SO<sub>2</sub>. Esses parâmetros estão apresentados na tabela 8.

**Tabela 8:** Resultados dos parâmetros físico-químicos

<b>Sousão</b>			
<b>Parâmetros físico-químicos</b>	<b>Final da fermentação alcoólica</b>	<b>Final da fermentação maloláctica</b>	<b>Depois da correção SO<sub>2</sub> após micro-oxigenação</b>
Acidez Total (g/L)	7,57	7,12	7,12
Acidez Volátil (g/L)	0,42	0,48	0,54
pH	3,51	3,58	3,58
Grau alcoólico (% v/v)	12,85	12,85	12,85
DO 420	9,18	10,2	8,1
DO 520	20,3	21,2	14,5
DO 620	3,48	4,2	3,2
IC	32,96	35,6	25,8
SO <sub>2</sub> Livre (mg/L)	-	-	67
SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	-	-	97
<b>Touriga Nacional</b>			
Acidez Total (g/L)	6,52	6	6
Acidez Volátil (g/L)	0,36	0,42	0,48
pH	3,48	3,55	3,55
Grau alcoólico (% v/v)	13,3	13,3	13,3
DO 420	4,76	5,93	4,44
DO 520	10,5	12	7,78
DO 620	1,79	2,43	1,71
IC	17,05	20,36	13,93
SO <sub>2</sub> Livre (mg/L)	-	-	56
SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	-	-	102

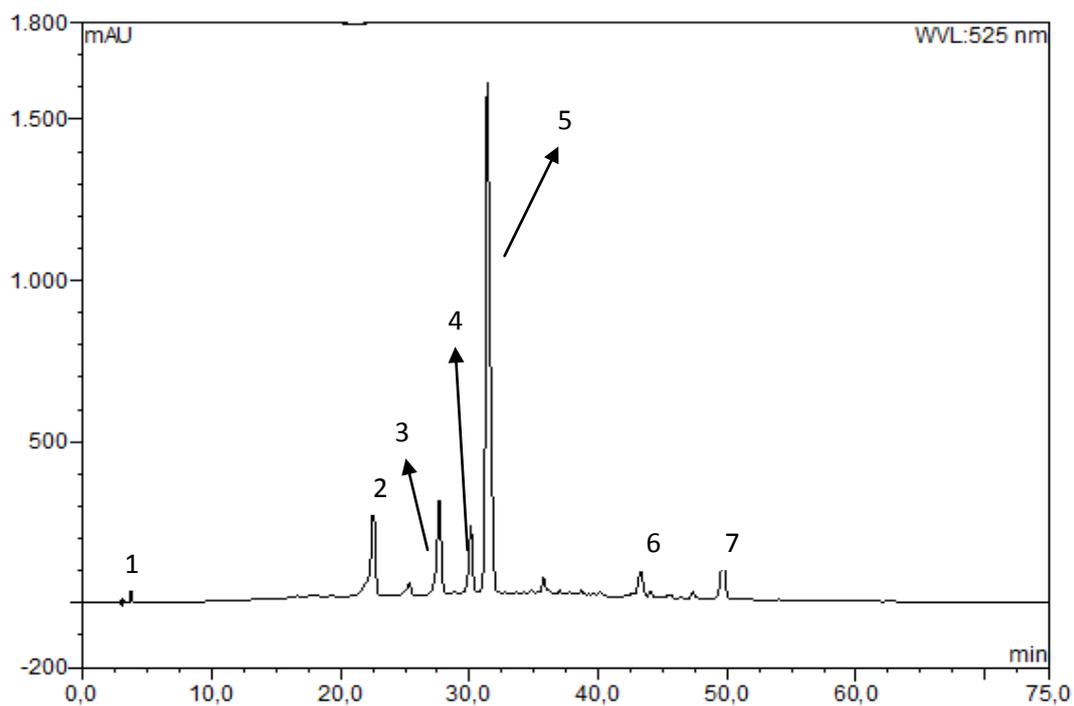
IC- intensidade corante ( $Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620}$ ); DO – densidade ótica ou absorvância

Verifica-se que os valores dos parâmetros em estudo, acidez total, acidez volátil, pH e grau alcoólico, não alteraram muito desde o final da fermentação para o depois da correcção de SO<sub>2</sub>. Os parâmetros da cor em ambas as castas pouco variam do final fermentação alcoólica para o final da fermentação maloláctica, mas o que não acontece desde esta até à correcção do SO<sub>2</sub>, pois como era de prever, com adição de SO<sub>2</sub> houve diminuição de cor, mas que gradualmente se recuperou. No entanto, os valores obtidos na Acidez total do Sousão comparativamente aos valores do Touriga Nacional, são muito diferentes, em que Acidez total do Sousão é mais elevada, o que é explicada pela tipicidade desta casta, pois é um dos aspetos que a caracteriza.

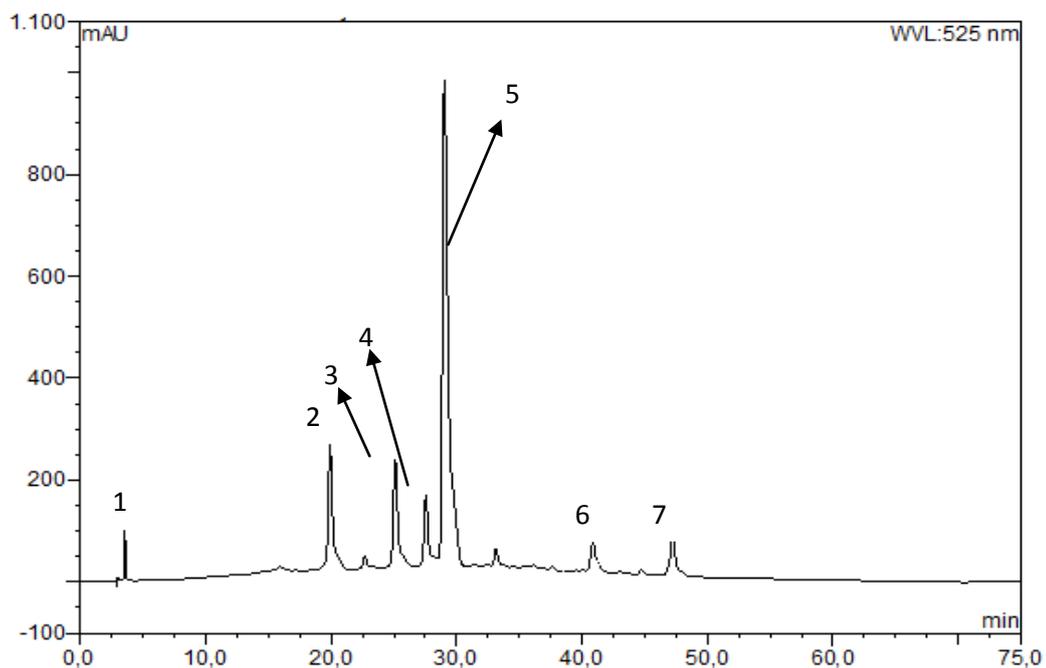
Com os resultados obtidos, permitiu-nos verificar que o vinho estava estável, com um valor de pH correto, dentro do normal para esta região, bem como o teor da Acidez volátil baixo.

### **3.3. Resultados do perfil em antocianinas por HPLC**

De acordo com o descrito anteriormente, as antocianinas monoméricas foram identificadas tendo em conta a ordem de eluição, tempo de retenção e espectros de ultra violeta- visível. Os diferentes cromatogramas obtidos antes e após a micro-oxigenação para cada uma das castas são apresentadas da figura 24 à figura 27.

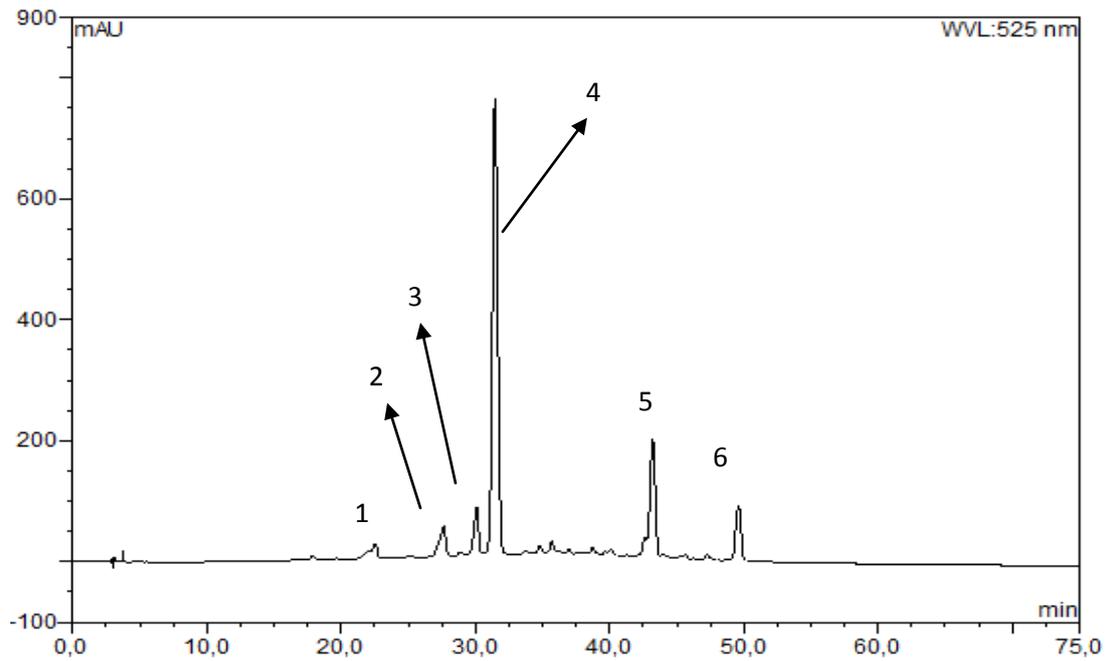


**Figura 24:** Cromatograma inicial a 525nm representativo de uma amostra do **Sousão** sem micro-oxigenação

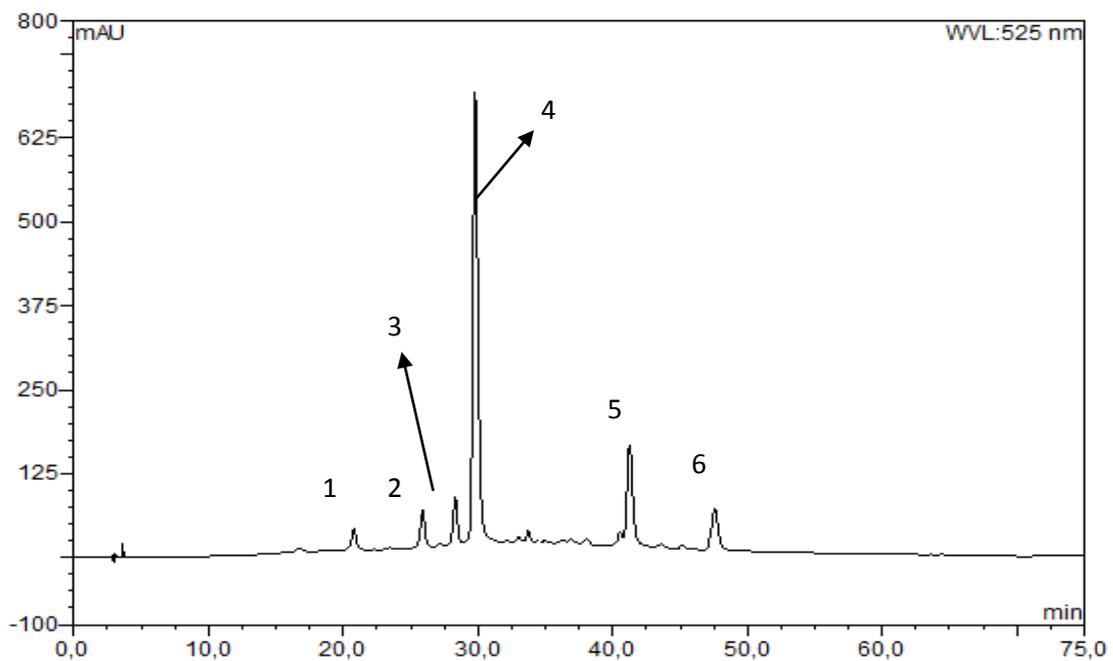


**Figura 25:** Cromatograma a 525nm representativo de uma amostra do **Sousão** micro-oxigenado a 0,2 mg/l/mês

**Legenda:** 1: n.i; 2: n.i; 3: pt-3gluc; 4: pe-3gluc; 5: mv-3gluc; 6: mv-3acetilgluc; 7: mv-3cumgluc



**Figura 26:** Cromatograma inicial a 525nm representativo de uma amostra do Touriga Nacional sem micro-oxigenação



**Figura 27:** Cromatograma a 525nm representativo de uma amostra do Touriga Nacional micro-oxigenado a 0,2 mg/l/mês

**Legenda:** 1: ci-3gluc; 2: pt-3gluc; 3: pe-3gluc; 4: mv-3gluc; 5: mv-3acetilgluc; 6: mv-3cumgluc.

Na tabela 9 são apresentados os valores dos tempos de retenção de cada uma das antocianinas identificadas para cada uma das castas.

**Tabela 9:** Antocianinas e respetivo tempo de retenção

Antocianina	Tempo de retenção (min)
n.i 1(Sousão)	3,66±0,06
dl-3gluc	16,96±0,09
ci-3gluc	21,20±0,26
n.i 2(Sousão)	23,79±0,79
pt-3gluc	26,28±0,24
pe-3gluc	28,72±0,24
mv-3gluc	30,12±0,29
dl-3acetilgluc	34,19±0,34
ci-3acetilgluc	35,64±0,18
pt-3acetilgluc	37,19±0,14
pe-3acetilgluc	38,56±0,16
mv-3acetilgluc	41,66±0,25
dl-3cumgluc	41,50±2,98
ci-3cumgluc	44,79±0,48
pt-3cumgluc	29,64±9,49
pe-3cumgluc	25,52±3,17
mv-3cumgluc	47,99±0,26

**LEGENDA:** n.i (1 e 2 no Sousão) – não identificável; **dl-3gluc**-delfinidina-3-glucósido; **ci-3gluc**-cianidina-3-glucósido; **pt-3gluc**-petunidina-3-glucósido; **pe-3gluc** -peonidina-3-glucósido; **mv-3gluc**-malvidina-3-glucósido; **dl-3acetilgluc**-delfinidina-3-acetilglucósido; **ci-3acetilgluc**-cianidina-3-acetilglucósido; **pt-3acetilgluc**-petunidina-3-acetilglucósido; **pe-3acetilgluc**-peonidina-3-acetilglucósido; **mv-3acetilgluc**-

malvidina-3-acetilglucósido; **dl-3cumgluc**-delfinidina-3-cumarilglucósido; **ci-3cumgluc**-cianidina-3-cumarilglucósido; **pt-3cumgluc**-petunidina-3-cumarilglucósido; **pe-3cumgluc**-peonidina-3-cumarilglucósido; **mv-3cumgluc**-malvidina-3-cumarilglucósido

Nas tabelas 10 e 11 são apresentados os resultados referentes às diferentes percentagens das antocianinas monoméricas quantificadas nas amostras de Touriga Nacional e Sousão analisadas, e nas tabelas 12 e 13 são apresentados os resultados relativos às percentagens globais de cada série de antocianinas (glucosiladas, acetiladas e cumariladas) para as mesmas amostras em estudo.

Tabela 10 – Diferentes percentagens das antocianinas monoméricas quantificadas nas amostras em estudo do Sousão

Antociani na (%) Amostra	n.i 1	dl-3gluc	ci-3gluc	n.i 2	pt-3gluc	pe-3gluc	mv-3gluc	dl- 3acetilgluc	ci-3acetilgluc	pt-3acetilgluc	pe-3acetilgluc	mv-3acetilgluc	dl-3cumgluc	ci-3cumgluc	pt- 3cumgluc	pe-3cumgluc	mv-3cumgluc
Inicial	1,46±0,54	0,28±0,08	11,34±2,60	1,27±0,67	10,30±1,89	5,93±1,56	57,46±4,18	0,17±0,45	1,92±0,70	0,17±0,09	0,28±0,10	3,16±1,63	0,49±0,25	0,03±0,005	0,40±0,22	0,53±0,40	4,79±1,50
1	0,11±0,05	0,01±0,008	0,84±0,36	1,24±0,63	0,77±0,21	0,44±0,16	4,24±1,63	0,01±0,008	0,18±0,09	0,04±0,008	0,01±0,007	0,26±0,11	0,04±0,005	0,01±0,002	0,01±0,004	0,03±0,005	0,35±0,05
2	1,09±0,33	1,32±0,21	11,85±2,35	1,53±0,78	10,45±1,76	5,89±1,67	56,59±3,90	1,18±0,60	0,03±0,002	0,44±0,29	0,30±0,05	3,75±1,18	0,18±0,09	0,07±0,005	0,50±0,30	0,01±0,002	4,80±1,45
3	1,37±0,33	0,70±0,24	11,31±2,23	1,26±0,65	10,23±1,32	5,98±1,99	57,09±4,09	1,61±0,70	0,06±0,004	0,43±0,30	0,47±0,15	3,99±1,20	0,14±0,06	0,05±0,004	0,46±0,28	0	4,89±1,50
4	1,89±0,47	0,72±0,24	11,55±2,10	1,23±0,67	10,21±1,26	5,95±1,35	56,47±3,85	1,48±0,48	0,16±0,09	0,51±0,30	0,38±0,19	3,40±1,13	0,13±0,05	0,52±0,25	0,51±0,30	0,02±0,002	4,84±1,55
5	0,73±0,09	0,55±0,17	11,49±2,54	1,31±0,64	10,47±1,33	6,10±1,36	57,83±4,25	1,49±0,50	0,14±0,07	0,33±0,14	0,39±0,21	3,51±1,15	0,19±0,08	0,08±0,005	0,51±0,30	0,02±0,001	4,87±1,40
6	1,33±0,25	0,66±0,18	11,02±2,67	1,65±0,66	10,59±1,31	5,59±1,43	54,74±3,50	3,63±1,10	0,55±0,55	0,91±0,39	0,71±0,24	3,45±1,10	0,14±0,07	0,14±0,06	0,44±0,28	0,01±0,001	4,44±1,28
7	0,94±0,23	0,70±0,18	11,38±2,56	1,23±0,54	10,18±1,09	5,85±1,67	56,84±3,95	2,58±1,47	0,28±0,14	0,48±0,28	0,48±0,25	3,65±1,14	0,18±0,08	0,07±0,005	0,46±0,22	0,01±0,001	4,69±1,36
8	0,94±0,32	0,74±0,46	11,68±2,74	1,04±0,42	10,28±1,20	5,68±1,45	58,19±4,40	1,26±0,62	0,29±0,14	0,36±0,23	0,49±0,23	3,86±1,20	0,12±0,02	0,03±0,006	0,43±0,24	0	4,59±1,35
9	0,89±0,25	0,59±0,19	11,41±2,98	0,86±0,21	10,60±1,78	5,08±1,30	59,04±4,55	2,11±1,40	0,26±0,15	0,24±0,10	0,11±0,05	3,79±1,19	0,18±0,09	0,33±0,22	0	0	4,49±1,30
10	0,88±0,23	0,16±0,09	11,40±2,87	1,45±0,45	11,27±1,98	4,86±1,10	57,99±4,30	3,49±1,20	0,31±0,19	0,22±0,10	0,11±0,05	3,58±1,10	0,05±0,003	0,33±0,24	0	0	4,32±1,25

**Legenda** – 1 a 10 corresponde a cada amostra recolhida semanalmente; **n.i** (1 e 2) – não identificável; **dl-3gluc** – delfinidina-3-glucósido; **ci-3gluc** – cianidina-3-glucósido; **pt-3gluc** – petunidina-3-glucósido; **pe-3gluc** – peonidina-3-glucósido; **mv-3gluc** – malvidina-3-glucósido; **dl-3acetilgluc** – delfinidina-3-acetilglucósido; **ci-3acetilgluc** – cianidina-3-acetilglucósido; **pt-3acetilgluc** – petunidina-3-acetilglucósido; **pe-3acetilgluc** – peonidina-3-acetilglucósido; **mv-3acetilgluc** – malvidina-3-acetilglucósido; **dl-3cumgluc** – delfinidina-3-cumarilglucósido; **ci-3cumgluc** – cianidina-3-cumarilglucósido; **pt-3cumgluc** – petunidina-3-cumarilglucósido; **pe-3cumgluc** – peonidina-3-cumarilglucósido; **mv-3cumgluc** – malvidina-3-cumarilglucósido

Tabela 11 – Diferentes percentagens das antocianinas monoméricas quantificadas nas amostras em estudo do Touriga Nacional

Antocianina (%) Amostra	dl-3gluc	ci-3gluc	pt-3gluc	pe-3gluc	mv-3gluc	dl-3acetilgluc	ci-3acetilgluc	pt-3acetilgluc	pe-3acetilgluc	mv-3acetilgluc	dl-3cumgluc	ci-3cumgluc	pt-3cumgluc	pe-3cumgluc	mv-3cumgluc
<b>Inicial</b>	0,51±0,16	2,83±1,30	4,80±1,15	5,15±1,30	58,76±7,30	0,74±0,18	1,31±0,33	0,37±0,10	0,46±0,19	16,28±2,90	0,46±0,10	0,19±0,09	0,38±0,10	0,49±0,10	7,83±1,40
<b>1</b>	0,50±0,15	2,91±1,34	4,86±1,20	5,20±1,40	58,84±7,25	0,72±0,40	1,29±0,29	0,38±0,09	0,42±0,15	16,09±3,10	0,36±0,09	0,67±0,20	0	0,54±0,17	7,21±1,68
<b>2</b>	0,54±0,18	2,93±1,30	4,64±1,15	5,14±1,15	58,92±7,20	0,66±0,37	1,36±0,35	0,38±0,10	0,43±0,10	16,16±2,95	0,48±0,15	0,63±0,10	0,07±0,005	0,51±0,15	7,14±1,60
<b>3</b>	0,52±0,17	2,89±1,39	4,57±1,30	5,20±1,20	60,28±7,80	1,04±0,20	0,09±0,005	1,61±0,30	1,03±0,45	15,15±2,70	0	0,45±0,15	0	0	7,16±1,30
<b>4</b>	0,86±0,20	2,79±1,30	4,49±1,14	5,07±1,25	58,95±7,70	0,97±0,40	0,13±0,008	1,32±0,25	1,08±0,38	16,15±2,90	0,59±0,20	0,44±0,12	0,05±0,007	0	7,09±1,50
<b>5</b>	0,79±0,19	2,7±1,28	4,52±1,10	5,09±1,10	58,73±7,65	1,45±0,50	0,39±0,09	1,46±0,5	1,03±0,40	15,87±2,80	0,56±0,15	0,35±0,10	0	0	7,04±1,30
<b>6</b>	0,57±0,15	2,72±1,20	4,46±1,16	4,89±1,15	58,24±7,55	2,35±1,15	0,88±0,15	2,21±1,05	1,13±0,34	14,67±2,50	0,11±0,005	0,59±0,15	0,47±0,12	0,11±0,09	6,62±1,20
<b>7</b>	0,49±0,14	2,73±1,30	4,52±1,20	5,06±1,30	58,73±7,45	1,43±0,25	0,35±0,1	1,60±0,20	1,05±0,25	15,34±2,65	0,61±0,10	0,61±0,10	0,49±0,16	0,12±0,05	6,87±1,65
<b>8</b>	0,66±0,20	2,61±1,25	4,47±1,30	4,87±1,20	58,24±7,40	2,35±1,12	0,87±0,24	2,05±0,99	1,16±0,3	14,83±2,39	0,57±0,17	0,47±0,19	0,11±0,09	0,09±0,005	6,64±1,70
<b>9</b>	0,63±0,19	2,93±1,29	4,72±1,35	4,91±1,25	61,77±7,85	0,36±0,15	0,13±0,08	0,31±0,09	0,79±0,15	15,78±2,90	0,45±0,18	0,33±0,09	0	0	6,90±1,80
<b>10</b>	0,88±0,5	2,70±1,20	4,93±1,38	4,56±1,20	60,08±7,80	1,13±0,20	0,05±0,008	2,30±1,05	1,21±0,27	15,08±2,60	0,39±0,10	0,31±0,10	0	0	6,40±1,50

**Legenda** – 1 a 10 corresponde a cada amostra recolhida semanalmente; **dl-3gluc** – delfinidina-3-glucósido; **ci-3gluc** – cianidina-3-glucósido; **pt-3gluc** – petunidina-3-glucósido; **pe-3gluc** – peonidina-3-glucósido; **mv-3gluc** – malvidina-3-glucósido; **dl-3acetilgluc** – delfinidina-3-acetilglucósido; **ci-3acetilgluc** – cianidina-3-acetilglucósido; **pt-3acetilgluc** – petunidina-3-acetilglucósido; **pe-3acetilgluc** – peonidina-3-acetilglucósido; **mv-3acetilgluc** – malvidina-3-acetilglucósido; **dl-3cumgluc** – delfinidina-3-cumarilglucósido; **ci-3cumgluc** – cianidina-3-cumarilglucósido; **pt-3cumgluc** – petunidina-3-cumarilglucósido; **peo-3cumgluc** – peonidina-3-cumarilglucósido; **mv-3cumgluc** – malvidina-3-cumarilglucósido

**Tabela 12:** Percentagem de antocianinas monoméricas encontradas no Sousão

	Glucosiladas(%)	Acetiladas (%)	Cumariladas (%)	n.i(%)
Inicial	88,04	5,72	6,24	2,73
Amostra 1	99,06	0,50	0,44	1,35
Amostra 2	88,72	5,70	5,56	2,62
Amostra3	87,92	6,56	5,54	2,63
Amostra4	88,03	5,94	6,02	3,12
Amostra5	88,47	5,86	5,67	2,04
Amostra6	85,58	9,25	5,17	2,98
Amostra7	87,10	7,48	5,41	2,17
Amostra 8	88,55	6,27	5,17	1,98
Amostra 9	88,47	6,52	5,0	1,75
Amostra 10	88,01	7,71	4,70	2,33
Total	977,95	67,51	54,92	25,70

**Tabela 13:** Percentagem de antocianinas monoméricas encontradas no Touriga Nacional

	Glucosiladas(%)	Acetiladas (%)	Cumariladas(%)
Inicial	72,05	19,66	9,35
Amostra 1	72,32	18,91	8,78
Amostra 2	73,16	19,01	8,83
Amostra 3	73,46	18,93	7,61
Amostra 4	72,17	19,66	8,17
Amostra 5	71,84	20,20	7,96
Amostra 6	70,87	21,27	7,89
Amostra 7	71,53	19,77	8,70
Amostra 8	70,85	21,27	7,88
Amostra 9	74,96	17,36	7,68
Amostra 10	73,13	19,77	7,10
<b>Total</b>	<b>796,34</b>	<b>215,81</b>	<b>89,95</b>

Da análise dos resultados ressalta que:

1. A malvidina 3-monoglucósido é a antocianina mais abundante, independentemente da casta.
2. A malvidina é a antocianina mais abundante, independentemente da série e da casta, como descrito na literatura (Cabrita *et al.*, 1999)
3. As antocianinas glucosiladas são as mais abundantes, seguidas das acetiladas, e por fim as cumariladas, facto que está de acordo com o descrito na literatura (Cabrita, 1999).
4. Apesar deste facto, verifica-se que a diferença do teor de antocianinas glucosiladas relativamente às esterificadas é muito superior no Sousão do que no

Touriga Nacional. No caso do Sousão, verifica-se mesmo que o teor de antocianinas acetiladas e cumariladas, é semelhante.

5. Em ambas as castas, as antocianinas peonidina e petunidina esterificadas com ácido cumárico, por vezes não são identificadas.

Contrariamente ao citado noutros estudos (Cabrita *et al.*, 1999), nos quais é referido que a cianidina não é identificada em nenhum dos vinhos, no presente trabalho verificou-se que em alguns casos esta é identificada e quantificada, com percentagens mesmo superiores a outras antocianinas da mesma série (glucosilada, acetilada ou cumarilada). A cianidinaglucozilada é mesmo a 2<sup>a</sup> antocianina mais abundante no Sousão.

Além das antocianinas glucosiladas e esterificadas com ácido acético e ácido cumárico, também foram registadas em quantidades doseáveis outras antocianinas com tempos de retenção correspondentes à série das antocianinas glucosiladas na casta Sousão; no entanto, estes compostos que não foram por nós identificados, já que não se conseguiu na literatura dados que permitissem a sua correta identificação. De referir que a percentagem de área é relativamente elevada, e em alguns casos, mesmo superior a outras antocianinas da mesma série.

De acordo com o descrito na literatura (Cano-López *et al.*, 2006), estudos efetuados com outros vinhos sujeitos a micro-oxigenação, o teor de antocianinas monoglucoziladas, acetiladas e cumariladas diminui significativamente no final da micro-oxigenação, quando comparado esse teor com o testemunho. No presente trabalho, tal facto não foi observado. Verifica-se que a percentagem de antocianinas glucosiladas, acetiladas e cumariladas para ambas as castas em estudo, se mantém praticamente igual. Esta evidência deve-se essencialmente ao facto de se ter procedido à maceração pós-fermentativa, mas também ao facto de a micro-oxigenação só se ter iniciado após a fermentação maloláctica, o que fez com que as antocianinas já não estivessem disponíveis para polimerizar.

### 3.4. Evolução da cor

A cor dos vinhos foi avaliada através dos índices colorimétricos de Glories: intensidade corante, percentagem de amarelo, percentagem de vermelho e percentagem de azul.

Nas tabelas 14 e 15 estão apresentados os resultados relativos a estes parâmetros.

**Tabela 14:** Características cromáticas do Sousão ao longo do processo de micro-oxigenação

Amostra	DO420	DO520	DO620	IC
Inicial	8,57	15,89	3,44	27,90
1	8,50	15,86	3,43	27,79
2	9,23	18,50	3,77	31,50
3	8,44	15,90	3,44	27,78
4	9,23	18,24	3,80	31,27
5	9,39	18,54	3,92	31,85
6	9,06	17,28	3,74	30,08
7	8,88	17,07	3,68	29,63
8	9,02	17,37	3,74	30,13
9	8,41	15,21	3,44	27,06
10	9,33	17,76	3,86	30,95

**Tabela 15:** Características cromáticas do Touriga Nacional ao longo do processo de micro-oxigenação

Amostra	DO420	DO520	DO620	IC
Inicial	4,30	7,48	1,64	13,42
1	4,32	7,59	1,65	13,56
2	4,43	7,77	1,70	13,90
3	4,92	8,95	1,88	15,75
4	4,75	8,77	1,85	15,37
5	4,80	8,86	1,87	15,53
6	4,86	8,81	1,88	15,55
7	5,06	9,40	1,94	16,40
8	5,00	9,27	1,95	16,22
9	5,17	9,52	2,00	16,69
10	4,89	9,10	1,94	15,93

Através da análise das tabelas anteriores, é possível verificar que, quer para o Sousão quer para o Touriga Nacional, a intensidade corante é superior no vinho micro-oxigenado, o que está de acordo com o descrito por alguns autores (Cano López *et al.*, 2005; Pérez-Magariño *et al.*, 2007 e Iniesta *et al.*, 2005). O aumento da intensidade corante nos vinhos micro-oxigenados em estudo pode dever-se, apesar da perda de antocianinas livres, ao maior nível de antocianinas poliméricas, pigmentos responsáveis pela estabilidade de cor dos vinhos ao longo do tempo.

A cor amarela, representada pela densidade ótica a 420 nm, aumentou de 8,57 para 9,33 no Sousão, enquanto que no Touriga Nacional aumentou de 4,30 para 4,89 durante a micro-oxigenação. Essa evolução é característica normal dos vinhos tintos durante o amadurecimento.

A cor vermelha (520 nm) é derivada das antocianinas e suas combinações sob a forma de catião flavílio. No Sousão, iniciou em 15,89 e chegou aos 17,76. Já no Touriga Nacional iniciou em 7,48 chegando aos 9,10.

A densidade ótica a 620 nm indica quantos polímeros de cor violeta estão presentes no vinho. Os polímeros de cor violeta provêm da união entre as proantocianidinas e antocianinas através de ponte de etanal, que é a ligação entre o C8 da proantocianidina e do C4 da antocianina. No Sousão, a cor violeta aumentou de 3,44 para 3,86 e no Touriga Nacional aumentou de 1,64 para 1,94 durante a micro-oxigenação.

Os valores de intensidade de cor são obtidos com a soma dos comprimentos de onda obtidos a 420 e 520 nm.

A intensidade corante aumentou ao longo da micro-oxigenação, no Sousão passou de 27,90 para 30,95, no Touriga Nacional o aumento foi de 13,42 para 15,93.

### **3.5. Análise do perfil volátil por GC-MS**

As amostras de vinho Sousão e Touriga Nacional foram injectadas semanalmente entre a 1ª e a 4ª semana de micro-oxigenação, de forma a verificar o que este processo influenciava em termos de compostos voláteis, sendo sempre estas amostras comparadas com a referência, ou seja, a amostra sem micro-oxigenação. Findas as 4 semanas, não se verificou qualquer alteração, nem do perfil nem das quantidades relativas dos compostos voláteis presentes nestes vinhos.

Assim, só foram injectados os vinhos ao fim das 10 semanas de micro-oxigenação, e comparados sempre com as amostras anteriores e com o vinho não micro-oxigenado. Também neste caso, não houve alterações ao nível dos compostos voláteis, estes não foram identificados por não se dispor de padrões nem de dados da literatura que o permitissem.

### 3.6. Análise sensorial – Teste triangular

No teste triangular, o painel de provadores só detetou diferenças significativas ( $P < 0.05$ ; tabela Teste triangular em anexo – Anexo 1) entre o vinho da casta Sousão, com ou sem micro-oxigenação, no final da quarta sessão de provas (tabela 16). Por outro lado, detetaram diferenças significativas entre os vinhos da casta Touriga Nacional, com ou sem micro-oxigenação, no final da terceira e quarta sessão (tabela 17). Em termos gerais, os vinhos com micro-oxigenação foram os mais preferidos pelos provadores.

**Tabela 16:** Resultados do teste triangular para o vinho da casta Sousão

Júri	resultado 1 <sup>a</sup> prova	resultado 2 <sup>a</sup> prova	resultado 3 <sup>a</sup> prova	resultado 4 <sup>a</sup> prova
1	0	1	0	1
2	0	0	1	1
3	1	1	0	1
4	0	0	1	0
5	1	0	1	0
6	0	0	0	1
7	0	1	0	1
8	0	0	1	0
9	1	1	0	1

0 – O provador não acertou; 1 – O provador acertou no copo diferente

**Tabela 17:** Resultados do teste triangular para o vinho da casta Touriga Nacional

Júri	resultado 1 <sup>a</sup> prova	resultado 2 <sup>a</sup> prova	resultado 3 <sup>a</sup> prova	resultado 4 <sup>a</sup> prova
1	0	0	1	1
2	1	0	1	1
3	1	0	1	1
4	0	0	0	0
5	0	0	1	0
6	0	0	1	1
7	0	0	0	1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	1

Em termos de avaliação organolética, a presença de oxigénio (micro-oxigenação) mostrou melhorar as características sensoriais do vinho como descrito pelos autores (DuToit *et al.*, 2006).

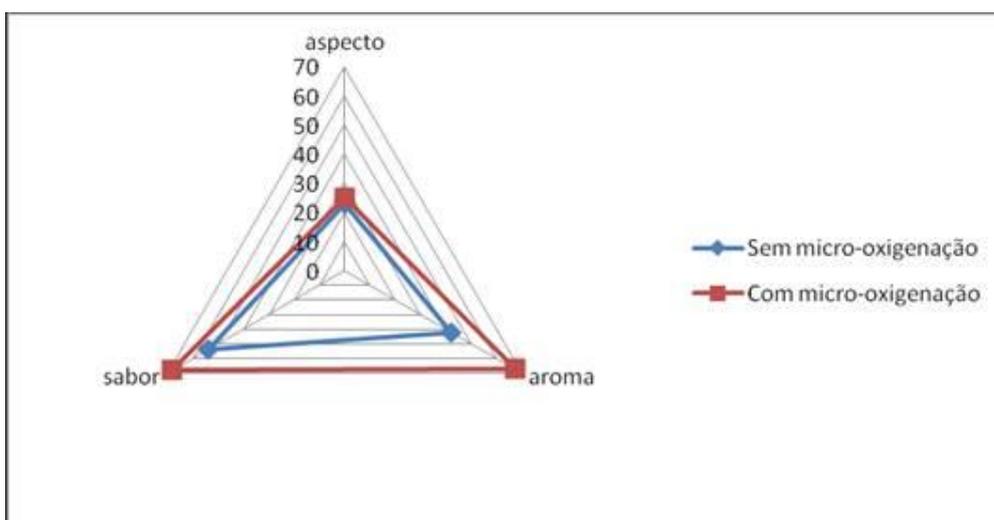
Na última sessão de provas, foi realizada de forma complementar, uma análise descritiva, onde as características avaliadas foram: aspecto, aroma e sabor, dos vinhos com e sem micro-oxigenação.

As diferenças foram notórias nos vinhos micro-oxigenados.

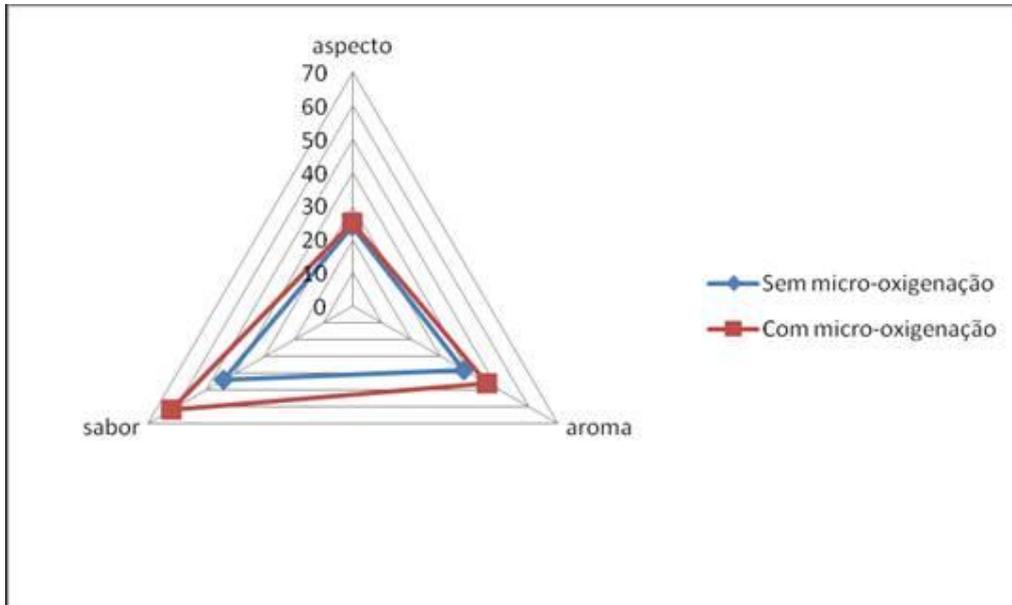
No Touriga Nacional, o aroma e sabor evidenciam-se pela positiva no vinho micro-oxigenado. Verificou-se em termos de sabor um ligeiro decréscimo da adstringência, tendo este ficado mais macio e com mais volume de boca. Em termos de aroma, o painel detetou a redução de aromas herbáceos no vinho micro-oxigenado, sobrepondo-se os aromas a frutos vermelhos, no vinho micro-oxigenado (gráfico 5).

No Sousão micro-oxigenado, verificou-se que o sabor tinha melhorado, onde o painel anuiu que o vinho estava muito menos adstringente e mais equilibrado em termos de boca. No que diz respeito ao aroma, este melhorou, apesar de não ter sido identificado nenhum aroma em particular (gráfico 6). Em anexo 4 encontra-se a ficha de prova utilizada ao longo das provas sensoriais.

**Gráfico 5:** Perfil sensorial do vinho da casta Touriga Nacional, com e sem micro-oxigenação



**Gráfico 6:** Perfil sensorial do vinho da casta Sousão, com e sem micro-oxigenação





---

*Capítulo IV – Conclusões*

---

#### 4. Conclusões

De acordo com Iglesias, 2004, os resultados mais evidentes resultantes do processo de micro-oxigenação, são os obtidos quando esta é aplicada logo após a fermentação alcoólica, já que, desta forma é assegurada uma maior produção de etanal, indispensável para a formação de novos pigmentos. Tal facto permite a estabilização da cor, o aumento da estrutura e diminuição da adstringência. No presente trabalho, a micro-oxigenação só pode ser iniciada no final da fermentação maloláctica, uma vez que, vários contratemplos foram encontrados no desenrolar da parte experimental, destacando-se o facto de não haver cubas disponíveis com a capacidade exigida para o correto funcionamento do micro-oxigenador. Isto levou a que, quando encontradas as condições ideais para a aplicação do oxigénio nas cubas corretas, já se tivesse iniciado a fermentação maloláctica, o que influenciou de forma notória os resultados obtidos. Tal facto, influenciou também a análise de voláteis, uma vez que não conseguimos obter qualquer resultado conclusivo desta análise.

No entanto, apesar deste facto, e de as análises químicas não terem mostrado alterações significativas nos vinhos micro-oxigenados, a análise sensorial revelou que os provadores atribuíram melhores características sensoriais aos vinhos micro-oxigenados, quando comparados com o testemunho.

Assim, as principais conclusões a tirar deste trabalho são:

- Os vinhos monovarietais das duas castas em estudo apresentam perfis em antocianinas diferentes.
- Para ambos os vinhos analisados com e sem micro-oxigenação, as antocianinas glucosiladas foram identificadas em maiores percentagens de área.
- Para ambos os vinhos analisados, a malvidina (independentemente da série glucosilada, acetilada ou cumarilada) foi sempre a antocianina identificada em maior percentagem de área relativa.
- Nas condições de micro-oxigenação aplicadas na adega, não se obtiveram alterações consideráveis em termos de perfil antociânico.

- Há para ambos os vinhos uma diminuição das áreas relativas das antocianinas monoméricas, sendo no entanto essa diminuição pouco acentuada relativamente ao que seria de esperar.
- Há no entanto para ambas as castas a diminuição do teor em antocianinas cumariladas.
- Apesar de não serem notórias alterações no perfil de antocianinas nem de compostos voláteis nos dois vinhos analisados, o painel de provadores considerou que houve diferenças notórias nos vinhos micro-oxigenados.
- Evidenciou-se para os dois vinhos analisados a diminuição da adstringência e a melhoria do aroma.



---

## *Capítulo V – Referências Bibliográficas*

---

## 5. Bibliografia

- Andersen, Ø. M. (2007). Recent Advances in the Field of Anthocyanins. In Polyphenols – Recent Advances in Research, Lattanzio, V., Daayf, F., Eds., Blackwell: London, *in press*.
- Andersen, Ø. M.; & Jordheim, M. (2006). The Anthocyanins. In Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, Andersen, Ø. M., Markham, K. R., Eds., CRC Press: Boca Raton, pp 471–553.
- Angelo, P.M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66 (1): 1-9.
- Auger, C., Al-Awwadi, N., Bornet, A., Rouanet, J. M., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P. L. (2004). Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Research International*, 37, 233-245.
- Baranowski, J. D.; & Nagel, C. W. (1981). Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white riesling wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 5-13.
- Barros, A. I. R. N. A. (2004). Síntese e transformação de novos compostos do tipo nitro- e aminoflavonóide: quinolinas e N-flavonilglicinas, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.

Brouillard, R. (1983). The in vivo expression of anthocyanins colour in plants. *Phytochemistry*, 22, 1311-1323.

Brouillard, R., & Lang, J. (1990). The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canad. J. Chem.*, 68, 755-761.

Cabrita, M. J.; & da Silva, J. R.; Laureano, O. (1999). Os Compostos Polifenólicos das Uvas e dos Vinhos, I Seminário Internacional de Vitivinicultura, I.S.A. Universidade Técnica de Lisboa.

Campos, L. S.; & Mourato, M. (2002). *Nomenclatura dos Compostos Orgânicos*, Escolar Editora, Lisboa.

Cano López, M.; Fuentes Peralta, S.; Pardo-Minguez, F.; López-Roca, J. M.; & Gómez Plaza, E. (2005). Efectos de la microoxigenación en vino tinto. *Enólogos*, 34, p. 46-50.

Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., López-Roca, J., Fernandez-Fernandez, J., & Gómez-Plaza, E. (2006). Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3), 325-331.

Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., Schmauch, G., Saucier, C., Teissedre, P. L., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). Effect of microoxygenation on colour and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents. *Food Chemistry*, 56, 5932-5941.

Cano-López, M., López-Roca, J.M., Pardo-Minguez, F.; & Gómez-Plaza, E. (2010). Oak barrel maturation vs. Micro-oxygenation: effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour. *Food Chemistry*, 119, 191-195.

Cardoso, A. D.; Carvalheira, J.; Coimbra, M. A.; & Rocha, S. (2005). Tecnologia dos Vinhos Tintos, edição conjunta dos Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Instituto da Vinha e do Vinho, Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral e Estação Vitivinícola Bairrada, Coimbra.

Cardoso, A. D. (2007). O Vinho da Uva à Garrafa; Âncora Editora.

Castel, C., Morand, A., Pujol, G., Peuron, D., & Naurin, R. (2000). Influence de la micro-oxygenation sur la composition phenolique et les caracteres sensoriels des vins rouges. Ossigena e caratteri sensorili dei Vini-7° Simposio Internazionale di Enologia. 107-112

Capri, C., Ducournau, P., & Lemaire, T. (2003). Correlación entre el etanal percebido en la degustación y el analizado. Disponível em: <<http://www.infowine.com>> - rivista internet di viticultura ed enologia, n. 2. Itália.

Cejudo-Bastante, M. J., Pérez-Coello, M. S., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2011). Effect of micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Food Science and Technology, 44, 866-874.

Da Silva, A. G. C. L., de Medeiros, H. C., & Lopes, R. M. (2010). Escurecimento enzimático por polifenoloxidase. Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Ciências da Saúde Departamento de Nutrição Disciplina de Bioquímica dos Alimentos.

Dallas, C., Ricardo da Silva, J. M., & Laureano, O. (1995). Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation, Vitis, 34, 51–56.

Davies, A., & Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*, 41, 716-720.

Dell'Agli, M.; Buscialà, A.; & Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, 63, 593-602.

Dreosti, I.E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, 16, 692-694.

Du Toit, W. J., Lisjak, K., Marais, J., & du Toit, M. (2006). The effect of microoxygenation on the phenolic composition, quality and aerobic wine-spoilage microorganisms of different South African red wines. *South African Journal and Viticulture*, 27.

Dykes, S. (2007). The effect of oxygen dosage rate on the chemical and sensory changes occurring during micro-oxygenation of New Zealand red wine. Ph.D. Thesis, The University of Auckland, New Zealand.

Ducournau, P., Laplace. (1998). Instrumento da Micro-oxygenation, operating manual, Março.

Fernandes, L. M. A. P. (2007). Impacto da rolha de cortiça na composição polifenólica de vinhos tintos engarrafados. Tese. Departamento de Química Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Flórez, S. M.; Gallego, J. G.; Culebras, J. M.; & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17, 271-278.

Ghiselli, A.; Nardini, M.; Baldi, A.; & Scaccini, C. (1998). Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 361-367.

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges: 2<sup>a</sup> Partie – mesure, origine et interpretation. Conn. Vigne Vin, Vol 18(4): 253-270.

Glories, Y. (1986). La couleur des vins rouges: 1<sup>er</sup> Partie – Les equilibres des anthocyanes et des tanins. Conn. Vigne Vin, Vol 18(3): 195-217.

González-del Pozo, A., Arozarena, A., Noriega, M. J., Navarro, M., & Casp, A. (2010). Short- and long-term effects of micro-oxygenation treatments on the colour and phenolic composition of a Cabernet Sauvignon wine aged in barrels and/or bottles. European Food Research and Technology, 231, 589-601.

Gómez-Plaza, E., & Cano-López, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wines: claims, benefits and the underlying chemistry. Food Chemistry, 125, 1131-1140.

Guerra, C. C. (1997). Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols: application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges. Thèse de Doctorat, University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux.

Guerra, J.; & Abade, E. (2008). Caracterização enológica de castas autóctones da região demarcada do douro. *Drapn*; Dezembro.

Heredia, F., Francia-Aricha, E., Rivas-Gonzalo, J., Vicario, I., Santos & Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. Food Chemistry, 63, 491-498.

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. & Venema, D. P. (1992). Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 1591-1598.

Ho, C. T.; Lee, C. H.; & Huang, M. T. (1992). Phenolic compounds in food and their effects on health, American Chemical Society, Washington.

Iglesias, M. S. (2005). Incidencia de la microoxigenación en la evolución de la dotación antocianica de vinos de crianza. Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas, 1, Valladolid. Anais. Valladolid: Ed. Itacyl, 219-221.

Iniesta Ortiz, J.A. & Ramírez Carrera, E. (2005). Influencia de la microoxigenación en la estabilización del color de los vinos tintos. Enólogos, 39, p. 40-42.

Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Douglas-Kinhorn, A.; Metha, R. G.; Moon, R. C.; & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science, 257, 218-220.

Jordão, A. M. (1999). Estrutura e composição das proantocianidinas da uva. Evolução ao longo da maturação.

Katalinić, V.; Milos, M.; Modun, D.; Musić, I.; & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. Food Chemistry, 86, 593-600.

Kanner, L.; Frankel, E.; Granit, R.; German, B.; & Kinsella, J. E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 64-69.

Kilmartin, P. A.; Zou, H.; & Waterhouse, A. W. (2001). A Cyclic Voltammetry Method for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1957-1965.

Kova, V.; Bourzeix, M.; Heredia, N.; & Ramos, T. (1995). Études des catéchines et proantocyanidols de raisins et vins blancs. *Revue Française d'Oenologie*, 125, 7-15.

Landrault, N.; Larronde, F.; Delaunay, J. C.; Castagnino, C.; Vercauteren, J.; Mérillon, J.; Gasc, F., Cros, G.; & Teissedre, P. L. (2002). Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2046-2052.

Laurrari, J. A.; Moreno, C. S.; Rupérez, P.; & Calixto, F. S. (1999). Free Radical Scavenging Capacity in the Aging of Select Red Spanish Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1603-1606.

Lemaire, T. (1995). La micro-oxygenation vins de des`Relatório para as exigências do Diploma d`Oenologie Nacional, Ecole Nationale Superieure Agronomique, Montpellier, França.

Lesica, M., & Kosmerl, T. (2009). Microoxygenation of red wines. *Acta agriculture Slovenica*, 93-3, str.327-336.

Lopes, T. J.; Xavier, M. F.; Gabriela, M.; & Bastos, M. (2007). Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *R. Bras. Agrociência*, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set.

Lyon, D.H.; Francombe, M.A.; Hasdell, T.A.; & Lawson, K. (1992). Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control. Chapman & Hall, London.

Lu, Y.; Foo, & L. Y. (1999). The polyphenol of grape pomace: Rapid communication. *Food Chemistry*, 65, 1-8.

Lule, S. U.; & Xia, W. (2005). Food Phenolics, Pros and Cons: A Review, *Food Reviews International*, 21:367-388.

Macheix, J. J.; Sapis, J. C.; & Fleuriot, A. (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30, 441-486.

Magalhães, N. (2008). *Tratado de Viticultura – A videira, a vinha e o terroir*. Chaves Ferreira – Publicações.

Malacrida, C. R., & da Motta, S. (2006). Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *B. Ceppa, Curitiba*, v. 24, nº 1, jan./jun.

Mamede, M. E. O. & Pastore, G. M. (2004). Compostos Fenólicos do Vinho: Estrutura e Acção Antioxidante, *B. Ceppa* (2004) v. 22, nº 2, p. 233-252.

Manfroi, L.; Miele, A., Rizzon, L. A.; Barradas, C. I. N.; & de Sousa, P. V. D. (2004). Evolução da maturação da uva cabernet franc conduzida no sistema lira aberta. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 28, n. 2, p. 306-313, mar./abr.

McCloskey, L. P., & Yengoyan, L. S. (1981). Análisis of anthocyanins in *Vitis Vinifera* wines and red color versus aging by HPLC and spectrophotometry. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol 32(2): 257-261.

Merken, H. M. & Beecher, G. R. (2000). Measurements of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005). Evolution of phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95, 405-412.

Mudnic, I.; Modun, D.; Rastija, V.; Vukovic, J.; Brizic, I.; Katalinic, V.; Kozina, B.; Saric, M. M.; & Boban, M. (2010). Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*, 119, 1205-1210.

Naczk, M.; & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

Navarre, C. (1997). *Enologia - Técnicas de produção do vinho*. Publicações Europa-América.

Nevarés, I., del Alamo, M., Cárcel, L. M., Crespo, R., Martín, C., & Gallego, L. (2009). Measure the dissolved oxygen consumed by red wines in aging tanks. *Springer Science*, 2, 328-336.

Noble, A. C.; Arnold, R. A.; Buechsenstein, J.; Leach, E. J.; Schmidt, J. O.; & Stern, P.M. (1987). Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology *Am. J. Enol. Vitic* vol. 38 no. 2 143-146.

Ortega-Heras, M., Rivero-Pérez, M. D., Pérez-Magariño, S., González-Huerta, C., & González-Sanjosé, M. L. (2008). Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation. *European Food Research and Technology*, 226, 1485-1493.

Pieatta, G. P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035–1042.

Penna, N. G.; Daudt, C. E.; & Henriques, J. A. P. (2001). Comportamento de ésteres hidrocínamicos durante a vinificação de vinhos brancos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36, 983-989.

Pérez-Magarinõ, S., Sánchez-Iglesias, M., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., & González-Sanjosé, M. L. (2007). Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chemistry*, 101, 881-893

Póvoas, M. J. C. (2006). Estudo dos fenómenos físico-químicos que estão associados ao sabor dos alimentos. *Interação das proteínas com os polifenóis*, Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Quirós, A. R. B.; Yusty, M.A. L.; & Hernández, J. L. (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42, 1018-1022.

Radovanović, A.; Radovanović, B.; & Jovančićević, B. (2009). Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*, 117, 326–331.

Rastija, V.; & Šarić, M. M. (2009) QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 400-408.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y.; Maujean, A.; & Dubourdieu, D. (2003). *Tratado de Enología – Estabilización y tratamientos*. 1º. Ed. - Buenos Aires: Hemisfério Sur.

Ribéreau-Gayon, P. (2000). Les explosions de poussières dans le stockage agroalimentaire: Les risques d'accident catastrophique et leurs conséquences médicales, *Medicine de Catastropheurgences collectives* 3, 13-20.

Ribéreau-Gayon, P. & Stonestreet, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. Bull. Soc. Chim. 9: 2649-2652

Ribéreau-Gayon, P.; Pontallier, P.; & Glories, Y. (1983). Some interpretation of colour changes in young red wines during their conservation. J. Sci. Food Agric., 34: 505-516

Ribéreau-Gayon, P. (1973). Intepretation chimique da la couleur des vins rouges, Vitis, Vol 12 : 119-142.

Ricardo da Silva, J. M. (1995). Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho. Efeitos potenciais na saúde. 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo. Évora, Portugal Vol. 2: 343-355

Robards, K. & Antolovich, M. (1997) Analitical Chemistry of Fruit Bioflavonoids: A Review. Analyst, 122,11R-34R.

Romero, C., & Bakker, J. (1999). Interaction between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanins composition and color in model solutions. J. Agric. Food Chem., 47, 3130-3139.

Romero, C., & Bakker, J. (2000). Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution. Int. J. Food Sci. Techn., 35, 129–140.

Ruiz, F. A.; Falcón, M. S. G.; Lamela, M. C. P.; Carballo, E. M.; & Gándara, J. S. (2009). Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. Food Chemistry, 113, 53-60.

Segade, S.R., Vázquez, E. S., Rodríguez, E. I. V., & Martínez, J. F. P. (2009). Influence of training system on characteristics and phenolic composition in red wines. *Springer*, 229, 763-770.

Singleton, V. L. (1987). Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 69-77.

Singleton, V. L. (2000). A survey of wine aging reactions, especially with oxygen. In *Proceedings of the ASEV 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting*. American Society for Enology and Viticulture, Davis, California.

Strack, D.; & Wray, V. (1994). The Anthocyanins. In *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Harborne, J. B., Ed., Chapman and Hall: London, chap.1 .

Strack, D. (1997) Phenolic Metabolism. *Plant Biochemistry*, Academic Press, San Diego, California, pp 387-416.

Soleas, G. J.; Grassc, L.; Josephy, P. D.; Golberg, D. M.; & Diamandis, E. P. (2002). A compararison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35, 119-124.

Somers, T. C., & Evans, M. E. (1986). Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis*, 25, 31–39.

Sun, B.; & Spranger, M. I. (2005). Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes: review. *Ciência Técnica Vitivinícola.*, 20, 59-89.

Sudraud, P. (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. Agric.*, 7, p.203-208.

Tao, J., Dykes, S. I., & Kilmartin, P. A. (2007). Effect of SO<sub>2</sub> concentration on polyphenol development during red wine micro-oxygenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6104-6109.

Timberlake, C. F. & Bridle, P. (1966). Spectral studies of anthocyanins and anthocyanidin equilibrium in aqueous solution. *Nature* 212: 158-162.

Timberlake, C. F. & Bridle, P. (1976). The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines. *Vitis* 15: 37-49.

Usseglio-Tomasset, L., (1998). *Química enológica*. 1ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p. 400.

Virgili, M.; & Contestabile, A. (2000). Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neuroscience Letters*, 281, 123-126.

Vinovation, Inc, Objectivos da micro-oxigenação, [www.vinovation.com](http://www.vinovation.com) © 2000, França.

Watherhouse, A. (2002). Wine Phenolics, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 957, 21-36.

Wildenradt, H., & Singleton, V. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine ageing. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25, 119–126.

Yang, J.; Martinson, T. E.; & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.

Yilmaz, Y.; Toledo, R. T. (2004). Trends in Food Science & Technology, 15, 422-433.

Zoecklein, B., Fugelsang, C., Gump, B., & Nury, S. (1995). Wine analysis and production. The Chapman & Hall Enology Library. International Thompson Publishing.

ISO 3591, 1977. Sensory analysis-apparatus — wine-tasting glass  
(<http://www.iso.org/iso/rss.xml?csnumber=9002&rss=detail>)

ISO 4121, 2003. Sensory analysis — Guidelines for the use of quantitative response scales  
([http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?))

ISO 8589, 2007. Sensory analysis — General guidance for the design of test rooms  
([http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_ics/](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/))

ISO 4120:2004. Sensory analysis -- Methodology -- Triangle test  
([http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=33495](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=33495))



---

*Capítulo VI – Anexos*

---

## Anexo 1

Tabela Teste triangular

Número de Provedores	Nível de Significância		
	5%	1%	0.1%
5	4	5	-
6	5	6	-
7	5	6	7
8	6	7	8
9	6	7	8
10	7	8	9
11	7	8	10
12	8	9	10
13	8	9	11
14	9	10	11
15	9	10	12
16	9	11	12
17	10	11	13
18	10	12	13
19	11	12	14
20	11	13	14
21	12	13	15
22	12	14	15
23	12	14	16
24	13	15	16
25	13	15	17
26	14	15	17
27	14	16	18
28	15	16	18
29	15	17	19
30	15	17	19
31	16	18	20
32	16	18	20

33	17	18	21
34	17	19	21
35	17	19	22
36	18	20	22
37	18	20	22
38	19	21	23
39	19	21	23
40	19	21	24
41	20	22	24
42	20	22	25
43	20	23	25
44	21	23	26
45	21	24	26
46	22	24	27
47	22	24	27
48	22	25	27
49	23	25	28
50	23	26	28

Adaptado de Lyon, D.H *et al.*, 1992. Guidelines for sensory analysis in food development and quality control, Chapman & Hall, London.

## Anexo 2

Valores da densidade e temperatura do Sousão durante a fermentação alcoólica.

Hora	Data	Densidade	Temperatura
08:00	16-Out	1098	17
08:00	17-Out	1073	23
08:00	18-Out	1046	23
08:00	19-Out	1024	23
08:00	20-Out	1009	23
08:00	21-Out	1001	22
08:00	22-Out	998	21
08:00	23-Out	998	20
08:00	24-Out	998	20
08:00	25-Out	998	20
08:00	26-Out	998	19
08:00	27-Out	998	19
08:00	28-Out	998	19
08:00	29-Out	998	18
08:00	30-Out	998	18
08:00	31-Out	998	18
08:00	01-Nov	998	17
08:00	02-Nov	998	17
08:00	03-Nov	998	17
08:00	04-Nov	998	16
08:00	05-Nov	998	16
08:00	06-Nov	998	16
08:00	07-Nov	998	15

### Anexo 3

Valores da densidade e temperatura do Touriga Nacional durante a fermentação alcoólica.

Hora	Data	Densidade	Temperatura
08:00	08-Out	1095	16
08:00	09-Out	1085	19
08:00	10-Out	1073	21
08:00	11-Out	1053	23
08:00	12-Out	1035	24
08:00	13-Out	1018	25
08:00	14-Out	1003	25
08:00	15-Out	998	24
08:00	16-Out	998	22
08:00	17-Out	998	20
08:00	18-Out	998	20
08:00	19-Out	998	20
08:00	20-Out	997	19
08:00	21-Out	997	18
08:00	22-Out	998	18
08:00	23-Out	998	18
08:00	24-Out	998	18
08:00	25-Out	998	18
08:00	26-Out	998	17
08:00	27-Out	998	17
08:00	28-Out	998	17
08:00	29-Out	998	17
08:00	30-Out	998	17
08:00	31-Out	998	16
08:00	01-Nov	998	16
08:00	02-Nov	998	16
08:00	03-Nov	998	15

# A n e x o 4



Data: \_\_\_\_\_

Provedor: \_\_\_\_\_

## Qual o copo com vinho diferente?

**A**

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

Considere a diferença:

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

**B**

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

Considere a diferença:

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

**C**

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

Considere a diferença:

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

**D**

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

1	2	3
---	---	---

Considere a diferença:

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

Grande			
Média			
Pequena			

# A n e x o 5

## FICHA DE PROVA

Tipo de Vinho \_\_\_\_\_

Prorador \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Vinho	Aspecto (0 a 3)	Aroma (0 a 7)	Sabor (0 a 10)	Pontuação	Comentário
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

