



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Inês Lourenço de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS DE DIFERENTES
REGIÕES VITIVINÍCOLAS, ESTUDO DA SUA
OXIDAÇÃO, DO EFEITO DE APLICAÇÃO DE
COLAS APÓS OXIDAÇÃO E DA DINÂMICA
POPULACIONAL DE LEVEDURAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, área de
especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente, orientada pelo
Professor Doutor Artur José Monteiro Valente e pelo Doutor João
Manuel Salvador Simões e apresentada ao Departamento de Química
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

Inês Lourenço de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS DE DIFERENTES REGIÕES
VITIVINÍCOLAS, ESTUDO DA SUA OXIDAÇÃO, DO EFEITO
DA APLICAÇÃO DE COLAS APÓS OXIDAÇÃO E DA
DINÂMICA POPULACIONAL DE LEVEDURAS**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química com área
de especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente

Professor Doutor Artur José Monteiro Valente

Doutor João Manuel Salvador Simões

Setembro de 2019

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, pela oportunidade que me deu, pois não há uma folha que caia sem a Sua vontade.

Ao Senhor Professor Doutor, Artur José Monteiro Valente, por ter aceitado ser meu orientador, pela sua compreensão e receptividade em aceitar um tema em relação ao qual eu tinha demonstrado interesse. Agradeço-lhe ainda todo o apoio prestado.

Ao Senhor Doutor, João Manuel Salvador Simões, por me ter acolhido no seu laboratório de investigação, no Biocant, pela sua disponibilidade, por todas as críticas construtivas e acompanhamento científico.

À Senhora Professora Doutora, Maria João Pedrosa Ferreira Moreno Silvestre, por ter proporcionado o contacto entre mim e o Senhor Doutor João Manuel Salvador Simões, quando lhe manifestei o meu interesse em realizar uma tese de mestrado na área dos vinhos.

À Senhora Professora Doutora, Marta Piñeiro Gomez, pelas correções e sugestões feitas para aperfeiçoamento da tese, enquanto membro do júri, e pela sua acessibilidade no contacto humano.

À DGES, pela bolsa de estudos, concedida ao longo deste mestrado, e aos SASUC, pela oportunidade de trabalho através do PASEP.

À minha avó Laura, por acreditar em mim e por todo o apoio demonstrado.

Ao meu marido, por toda a compreensão e companheirismo que me deu ao longo deste percurso, fazendo-me sempre acreditar que iria ser possível concretizar aquilo que eu almejava.

À minha mãe, por ter estado presente durante todos estes anos e pela sua dedicação.

Aos meus colegas e amigos, Willian Ribeiro, Eloísa Silva e Elisândia pelos conselhos, orações e orientações.

Resumo

O presente trabalho está dividido em quatro partes. Na primeira parte, através da análise de vários parâmetros químicos, realizou-se a caracterização de 25 vinhos de mesa (13 vinhos brancos, 5 vinhos rosados e 7 vinhos tintos) e 6 vinhos licorosos (5 vinhos tintos e 1 vinho branco), de oito regiões diferentes: Alentejo, Vinhos Verdes, Lisboa, Douro, Bairrada, Dão, Península de Setúbal e Tejo. Os parâmetros analisados foram: dióxido de enxofre livre e total, minerais (cobre, cálcio, ferro e potássio), antocianinas, poder antioxidante, índice de Folin, glicose, frutose e as coordenadas colorimétricas a^* , b^* e L^* . A caracterização dos vinhos teve como objetivo aferir possíveis tendências para se formarem agrupamentos, segundo a região vitivinícola ou o tipo de vinho.

Tendo em conta a concentração de minerais (cobre, ferro, potássio e cálcio) nos vinhos, realizou-se uma análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e uma análise de componentes principais (PCA). Mediante a tendência para formação de agrupamentos, segundo região vitivinícola que foi observada, selecionou-se os vinhos de mesa de quatro regiões, para as quais havia maior representatividade: Bairrada, Douro, Vinhos Verdes e Alentejo. Realizou-se também ANOVA, para verificar se, estatisticamente, existia diferença entre estas quatro regiões, e teste de Tukey, para averiguar que regiões diferem, estatisticamente, entre si, ao nível de 95 % de confiança.

Outros parâmetros tidos em conta, para realizar HCA e PCA, foram: glicose, frutose, glicose + frutose e álcool. Os resultados obtidos revelaram também tendência para formação de agrupamentos segundo região vitivinícola, pelo que foi realizada ANOVA e teste de Tukey, considerando-se os vinhos de mesa e os vinhos licorosos das seguintes regiões: Bairrada, Vinhos Verdes, Alentejo e Douro.

Determinou-se a matriz de correlação de Pearson para os parâmetros poder antioxidante, o índice de Folin, antocianinas, o dióxido de enxofre livre e total e as coordenadas colorimétricas a^* , b^* e L^* , de forma a quantificar a sua interligação. Tendo em conta estes parâmetros, realizou-se HCA e PCA, que revelaram tendência para agrupamento consoante o tipo de vinho (quanto à cor e quanto ao processo de produção), pelo que se realizou ANOVA e teste de Tukey, dividindo os vinhos em 5 distribuições: vinhos licorosos brancos, vinhos de mesa brancos, vinhos de mesa rosados, vinhos licorosos tintos e vinhos de mesa tintos.

Do conjunto de vinhos referido inicialmente, escolheram-se 4 vinhos (2 vinhos brancos e 2 vinhos rosados) das regiões Douro e Alentejo para permanecerem nas garrafas, depois de abertas, durante 70 dias, de forma a poderem oxidar. Decorrido esse período, foram aplicadas duas colas diferentes aos vinhos oxidados, uma de origem mineral (a bentonite) e outra de origem proteica (a caseína). As alterações na constituição química dos vinhos oxidados, produzidas pelas colas, foram avaliadas através da medição das coordenadas colorimétricas a^* , b^* e L^* , índice de Folin e poder antioxidante.

Um conjunto de 10 vinhos da Bairrada (5 vinhos brancos e 5 vinhos tintos) foi utilizado para se estudar os efeitos da oxidação ao longo do tempo. Os parâmetros analisados ao longo de 15 dias, após abertura das garrafas, foram: coordenadas colorimétricas a^* , b^* e L^* , índice de Folin, dióxido de enxofre livre e total e poder antioxidante.

Na quarta parte deste trabalho, foi também objeto de estudo, através de um mosto artificial, a dinâmica populacional, durante a fermentação, de 4 monoculturas e 4 combinações das estirpes de leveduras, muito utilizadas em vinificação: a *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*. A fermentação foi levada a cabo sob condições adequadas, de forma a otimizar o desenvolvimento das leveduras.

Palavras chave: caracterização química de vinhos, minerais, cobre, ferro, cálcio, potássio, glicose, frutose, álcool, poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas, coordenadas colorimétricas, dióxido de enxofre livre, dióxido de enxofre total, vinhos de mesa, vinhos licorosos, regiões vitivinícolas de Portugal, Alentejo, Douro, Vinhos Verdes, Bairrada, PCA, HCA, ANOVA, teste de Tukey, coeficiente de correlação de Pearson, aplicação de colas no vinho, bentonite, caseína, oxidação do vinho, leveduras, dinâmica populacional de leveduras, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*

Abstract

The present work is divided in four parts. In the first part, through the analysis of various chemical parameters, it was performed a characterization of 25 table wines (13 white wines, 5 rosé wines and 7 red wines) and 6 liqueur wines (5 red wines and 1 white wine), from eight different regions: Alentejo, Vinhos Verdes, Lisbon, Douro, Bairrada, Dão, Península de Setúbal and Tejo. The parameters analyzed were: free and total sulfur dioxide, minerals (copper, calcium, iron and potassium), anthocyanins, antioxidant power, Folin-Ciocalteu index, glucose, fructose and the colorimetric coordinates a^* , b^* and L^* . The characterization of wines aimed to assess possible trends to form clusters, according to the wine region or the type of wine.

Considering the concentration of minerals (copper, iron, potassium and calcium) in wines, a hierarchical cluster analysis (HCA) and a principal component analysis (PCA) were performed. Upon the tendency towards the formation of clusters, according to the wine region that was observed, table wines from four regions were selected, for which they had the highest representativity: Bairrada, Douro, Vinhos Verdes and Alentejo. ANOVA was also performed to verify, statistically, whether there existed a difference among these four regions, and Tukey test to determine which regions differ from each other, statistically, at a level of 95% confidence level.

Other parameters taking into account, to perform HCA and PCA, were: glucose, fructose, glucose + fructose and alcohol. The obtained results revealed also a tendency for the formation of clusters according to wine region, hence ANOVA and Tukey test were performed, considering the table wines and the liqueur wines from the following regions: Bairrada, Vinhos Verdes, Alentejo and Douro.

The Pearson correlation matrix was determined for the parameters antioxidant power, the Folin index, anthocyanins, the free and total sulfur dioxide and the colorimetric coordinates a^* , b^* and L^* , in order to quantify their interconnection. Considering these parameters, HCA and PCA were performed, which showed tendency for clusters according to the type of wine (regarding the color and the production process), for which ANOVA and Tukey test were performed, dividing the wines into 5 distributions: white liqueur wines, white table wines, rosé table wines, red liqueur wines and red table wines.

From the set of wines initially referred, 4 wines (2 white wines and 2 rosé wines) from the Douro and Alentejo regions were chosen to remain in the bottles, after they were opened, for 70 days, so that they can oxidize. After this period, two different fining agents were applied to the oxidized wines, one of mineral origin (the bentonite) and the other of protein origin (the casein). The alterations in the chemical constitution of the oxidized wines, produced by the fining agents, were evaluated through the measure of the colorimetric coordinates a^* , b^* and L^* , Folin index and antioxidant power.

A set of 10 wines from Bairrada (5 white wines and 5 red wines) was used to study the effects of oxidation over time. The parameters analyzed over 15 days, after the bottles were opened, were: colorimetric coordinates a^* , b^* and L^* , Folin index, free and total sulfur dioxide and antioxidant power. In the fourth part of this work, it was also object of study, through an artificial medium, the population dynamic, during the fermentation, of 4 monocultures and 4 combinations of the yeast strains, widely used in winemaking: *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. The fermentation was carried out under suitable conditions, in order to optimize yeast development.

Key words: chemical characterization of wines, minerals, copper, iron, calcium, potassium, glucose, fructose, alcohol, antioxidant power, Folin-Ciocalteu index, anthocyanins, colorimetric coordinates, free sulfur dioxide, total sulfur dioxide, table wines, liqueur wines, Portugal wine regions, Alentejo, Douro, Vinhos Verdes, Bairrada, PCA, HCA, ANOVA, Tukey test, Pearson correlation coefficient, application of fining agents on wine, bentonite, casein, wine oxidation, yeast, yeast population dynamics, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Índice.....	ix
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xvii
Lista de abreviaturas	xix
Capítulo 1	1
1. Introdução.....	1
1.1 Origem do vinho	1
1.2 A economia do vinho em Portugal e no mundo	2
1.3. Regiões vitivinícolas de Portugal.....	6
1.4. Processo de produção do vinho.....	9
1.5. Colas.....	11
1.6. Micro-organismos e o vinho	12
1.6.1. <i>Lachancea thermotolerans</i>	13
1.6.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	14
1.6.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.6.4. <i>Torulaspora delbrueckii</i>	16
1.7. Química do vinho	17
1.7.1. Água.....	17
1.7.2. Álcoois	17
1.7.3. Ácidos	18
1.7.4. Compostos polifenólicos.....	19
1.7.5. Açúcares.....	24
1.7.6. Minerais	26
1.7.7. Gases dissolvidos.....	27
Capítulo 2	29
2. Materiais e métodos	29
2.1. Determinação de parâmetros químicos no vinho	29
2.1.1. Determinação de minerais.....	29

2.1.2. Determinação de açúcares.....	31
2.1.3. Determinação do índice de Folin.....	31
2.1.4. Determinação de antocianinas.....	32
2.1.5. Determinação do Poder Antioxidante.....	32
2.1.6. Determinação do dióxido de enxofre (livre e total).....	33
2.1.7. Determinação das coordenadas colorimétricas.....	34
2.2. Revitalização de vinhos oxidados.....	36
2.3. Estudo da oxidação do vinho.....	37
2.4. Estudo da dinâmica da população de leveduras na fermentação.....	37
2.5. Análise hierárquica de agrupamentos (HCA – hierarchical Cluster analysis).....	39
2.6. Análise de componentes principais (PCA).....	39
2.7. Análise de variância (ANOVA).....	40
2.8. Teste de Tukey.....	40
2.9. Coeficiente de correlação de Pearson.....	41
Capítulo 3.....	43
3. Resultados e discussão.....	43
3.1. Caracterização de vinhos de diferentes regiões e de diferentes tipos.....	43
3.1.1. Minerais.....	45
3.1.2. Glicose, frutose e álcool.....	59
3.1.3. Poder antioxidante, compostos fenólicos, dióxido de enxofre e cor.....	71
3.2. Estudo de revitalização do vinho por aplicação de colas a vinhos oxidados.....	84
3.3. Estudo da oxidação do vinho ao longo do tempo.....	90
3.3.1. Evolução do poder antioxidante ao longo do tempo.....	92
3.3.2. Evolução do índice de Folin ao longo do tempo.....	93
3.3.3. Evolução do dióxido de enxofre ao longo do tempo.....	95
3.3.4. Evolução dos parâmetros de cor ao longo do tempo.....	97
3.4. Estudo da dinâmica da população de leveduras na fermentação.....	101
Capítulo 4.....	107
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	107
Bibliografia.....	111
Anexos.....	117
A.1 – Tratamento de dados referentes ao capítulo 3.1 (Caracterização de diferentes regiões e de diferentes tipos).....	117
A.1.1 – Determinação da concentração dos minerais, das antocianinas e dos açúcares....	117

A.1.2 - Determinação dos valores do poder antioxidante.....	119
A.2 – Dados utilizados no capítulo 3.2 (Estudo de revitalização do vinho por aplicação de colas a vinhos oxidados).....	126
A.3 – Dados utilizados no capítulo 3.3 (Estudo da oxidação do vinho ao longo do tempo) .	128

Lista de figuras

Figura 1 – Maiores produtores de uva por tipo de produtos (vinho, sultanas e fruto fresco) [adaptado de 2018 World Vitiviniculture Situation – OIV Statistical Report on World Vitiviniculture]	3
Figura 2 - Distribuição global de viticultura na isotérmica 10-20 ° C de acordo com Blij, 1983 (Fonte: adaptada, após Gómez-Miguel, 2009) [in http://www.vinetowinecircle.com/en/terroir-2/viewpoints-concerning-the-dependency-of-viticulture-on-the-environment/]	4
Figura 3 – Regiões vitivinícolas de Portugal continental [https://vinhosemsegredo.wordpress.com/2013/07/29/tintos-de-portugal/]	7
Figura 4 – Etapas da produção do vinho (adaptado de http://flowchart.ghkates.com/wine-making-process-flowchart/).....	9
Figura 5 - Estrutura química básica de alguns flavonoides a) antocianidinas b) flavonóis c) flavonas.	19
Figura 6 - Estrutura química básica de alguns não flavonoides a) fenóis simples b) ácidos fenólicos.	20
Figura 7 - Representação da decomposição de proantocianidinas em antocianidina e flavonol por aquecimento em meio ácido.	20
Figura 8 - Estrutura geral das principais antocianinas na espécie <i>Vitis vinifera</i> (adaptado de [40] página 440).....	21
Figura 9 - Equilíbrio entre as várias formas de antocianinas no vinho. Gl – glicose a) antocianina sulfonada (incolor), b) base quinoidal (azul violeta), c) catião flavílio (vermelho), d) carbinol (incolor), e) chalcona (amarelo claro). (adaptado de [5], página 288).....	22
Figura 10 - Estruturas moleculares do ácido gálico e do ácido elágico (da esquerda para a direita).	24
Figura 11- Estrutura química de alguns açúcares presentes no vinho. a) Glicose, b) Frutose, c) Xilose e d) Ramnose.	25
Figura 12 - Representação esquemática da estrutura molecular do 3-(2-piridil)-5,6-di(2-furil)-1,2,4-triazine-5',5''- sal dissulfónico de sódio	29
Figura 13 – Estrutura molecular do 4-(3,5-dibromo-2-piridilazo)-N-etil-N-(3-sulfopropil)anilina	30
Figura 14 - Espaço CIELAB (adaptado de [56], página 22)	35
Figura 15 – Representação das coordenadas colorimétricas a* e b* (a cor da maçã está localizada no ponto A)	36
Figura 16 – Balões de Erlenmeyer a fermentar com agitação e à temperatura de 30°C.....	38
Figura 17 – Dendrograma dos vinhos baseado nas concentrações de cálcio, potássio, ferro e cobre (DO –Douro, DA – Dão, BA – Bairrada, VV – Vinhos Verdes, TE –Tejo, AL – Alentejo, LI – Lisboa, PS – Península de Setúbal, ND- Não definido)	50
Figura 18 - Representação a duas dimensões das amostras de vinho, do VB1 ao VT25, no sistema de eixos PC1/PC2 com evidência das diferentes regiões vitivinícolas (DO –Douro, DA – Dão, BA – Bairrada, VV – Vinhos Verdes, TE –Tejo, AL – Alentejo, LI – Lisboa, PS – Península de Setúbal, ND- Não definido)	52

Figura 19 – Histograma das concentrações médias de potássio tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.	56
Figura 20 – Histograma das concentrações médias de cálcio tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.	56
Figura 21 – Histograma das concentrações médias de cobre tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.	57
Figura 22 - Histograma das concentrações médias de ferro tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.	57
Figura 23 – Dendrograma dos vinhos do VB1 ao VT31 tendo em conta os valores de concentração de glicose, frutose e álcool. (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes, LI – Lisboa, TE – Tejo, PS – Península de Setúbal, DA – Dão, AL – Alentejo e ND – Não definida).	62
Figura 24 - Representação a duas dimensões das amostras dos vinhos do VB1 ao VT31, sistema de eixos PC1/PC2 , tendo em conta os parâmetros glicose, frutose e álcool) (VV – Vinhos Verdes, AL – Alentejo, DO – Douro, BA – Bairrada, PS – Península de Setúbal, DA – Dão, LI – Lisboa, TE – Tejo, ND – Não definida.	64
Figura 25 – Histograma das concentrações médias de glicose tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)	66
Figura 26 - Histograma das concentrações médias de glicose + frutose tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)	66
Figura 27 - Histograma das concentrações médias de frutose tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)	67
Figura 28 - Histograma das concentrações médias de álcool tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)	68
Figura 29 - Histograma das concentrações médias de álcool tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo), com exclusão dos vinhos licorosos	70
Figura 30 - HCA do vinho VB1 ao VT31 considerando os parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, SO ₂ livre e antocianinas (BM – vinhos brancos de mesa, BL – vinhos brancos licorosos, RM –vinhos rosados de mesa, TM – vinhos tintos de mesa, TL – vinhos tintos licorosos)	76
Figura 31 – Gráfico da PCA do vinho VB1 ao VT31 considerando os parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, SO ₂ livre e antocianinas (BM – vinhos brancos de mesa, BL – vinhos brancos licorosos, RM –vinhos rosados de mesa, TM – vinhos tintos de mesa, TL – vinhos tintos licorosos)	78
Figura 32 – Histograma dos valores médios de poder antioxidante tendo em os conjuntos de vinhos	80
Figura 33 - Histograma dos valores médios do índice de Folin tendo em os conjuntos de vinhos	81
Figura 34 - Histograma das concentrações médias de antocianinas tendo em os conjuntos de vinhos	82
Figura 35 - Histograma das concentrações médias de dióxido de enxofre tendo em os conjuntos de vinhos	83
Figura 36 – Diagrama de cor com zonas assinaladas onde se encontram os vinhos B – vinhos brancos, R – vinhos rosados e T – vinhos tintos	84

Figura 37 - Histograma dos valores do poder antioxidante depois da aplicação das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)	86
Figura 38 - Histograma dos valores do parâmetro a* antes e depois das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)	88
Figura 39 - Histograma dos valores do parâmetro b* depois da aplicação das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)	89
Figura 40 - Histograma dos valores do parâmetro L* após aplicação de colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)	89
Figura 41 - Histograma dos valores do índice de Folin depois da aplicação das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)	90
Figura 42 – Evolução do poder antioxidante ao longo do tempo (em dias) dos vinhos brancos .	92
Figura 43 – Evolução do poder antioxidante ao longo do tempo (em dias) dos vinhos tintos	93
Figura 44 – Evolução do índice de Folin ao longo do tempo (em dias) nos vinhos brancos	93
Figura 45 - Evolução do índice de Folin ao longo do tempo (em dias) nos vinhos tintos	94
Figura 46 – Evolução do dióxido de enxofre livre com o tempo nos vinhos brancos	95
Figura 47 - Evolução do dióxido de enxofre total com o tempo nos vinhos brancos	95
Figura 48 – Evolução do dióxido de enxofre livre com o tempo nos vinhos tintos	96
Figura 49 – Evolução do dióxido de enxofre total com o tempo nos vinhos tintos	96
Figura 50 – Evolução do parâmetro a* dos vinhos brancos ao longo do tempo (em dias)	97
Figura 51 - Evolução do parâmetro a* ao longo do tempo dos vinhos tintos.....	98
Figura 52 - Evolução do parâmetro b* ao longo do tempo dos vinhos brancos	99
Figura 53 - Evolução do parâmetro b* ao longo do tempo dos vinhos tintos	100
Figura 54 - Evolução do parâmetro L* ao longo do tempo dos vinhos brancos.....	100
Figura 55 - Evolução do parâmetro L* ao longo do tempo dos vinhos tintos	101
Figura 56 - Gráfico da percentagem de massa do meio relativamente à massa inicial em função do número de horas de fermentação (A – <i>S. cerevisiae</i> + <i>T. delbrueckii</i> , B – <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. thermotolerans</i> , C – <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. thermotolerans</i> + <i>T. delbrueckii</i> , D – <i>S. cerevisiae</i> + <i>M. pulcherrima</i> , E – <i>M. pulcherrima</i> , F - <i>L. thermotolerans</i> , G – <i>S. cerevisiae</i> , H – <i>T. delbrueckii</i>).....	102
Figura 57 - Gráfico da percentagem de massa do meio relativamente à massa inicial em função do número de horas. (E – <i>M. pulcherrima</i> , F - <i>L. thermotolerans</i> , G – <i>S. cerevisiae</i> , H – <i>T. delbrueckii</i>).....	103
Figura 58 - Gráfico da percentagem de massa do meio relativamente à massa inicial em função do número de horas. Os meios com <i>S.cerevisiae</i> sozinha e misturada com outras leveduras (A – <i>S. cerevisiae</i> + <i>T. delbrueckii</i> , B – <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. thermotolerans</i> , C – <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. thermotolerans</i> + <i>T. delbrueckii</i> , D – <i>S. cerevisiae</i> + <i>M. pulcherrima</i> , G – <i>S. cerevisiae</i>).	104

Lista de tabelas

Tabela 1 - Produção, consumo, exportação e importação de vinho em 2017 para os maiores produtores de vinho em mL (que produzem volume superior a 5 mL) (os valores de volume produzido e consumido são dados provisórios) [valores do PIB retirados do site https://pt.tradingeconomics.com/country-list/gdp consultado a 3 de fevereiro de 2018, para se converter os valores em dólares americanos para euros usou-se a conversão de 2016, 1USD = 0,93447 EUR] [4]	5
Tabela 2 – Importação e exportação de Portugal de 2013 a 2017 [6]	6
Tabela 3 - Estruturas moleculares de alguns ácidos orgânicos presentes no vinho.	18
Tabela 4- Tipos de vinho consoante a concentração de açúcares (glicose + frutose). (https://www.ivv.gov.pt/np4/np4/89).....	26
Tabela 5 - Tipos de vinho consoante concentração de dióxido de carbono segundo o IVV.	28
Tabela 6 - Ensaio de fermentação e correspondentes leveduras, quer isoladas, quer em combinação com outras de diferentes espécies em cada balão de Erlenmeyer. O sinal (+) indica presença e o sinal (-) indica ausência).....	38
Tabela 7 - Vinhos utilizados, a sua cor, nome, região, castas e teores de açúcar e álcool (para os vinhos brancos, rosados e tintos, utilizou-se os códigos VB, VR e VT, respetivamente).....	44
Tabela 8 - Valores dos minerais em mg/L nos vinhos testados(- dados não indicados por falta de amostra, **** abaixo do limite de deteção)	47
Tabela 9 – Conjuntos de vinhos, correspondentes a cada região, utilizados para ANOVA e teste de Tukey tendo em conta a concentração dos minerais.	54
Tabela 10 - Resultados da ANOVA, de uma via, tendo em conta as concentrações de potássio, ferro, cobre e de cálcio, em separado, para os conjuntos Bairrada, Douro, Vinhos Verdes e Alentejo da Tabela 9.	55
Tabela 11 – Resumo do teste de Tukey tendo em conta a concentração de ferro para os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.	58
Tabela 12 – Resultado do teste de Tukey tendo em conta a concentração de cobre para os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.	58
Tabela 13 - Valores de glicose, glicose + frutose e frutose e g/L	60
Tabela 14 – Conjunto de vinhos, correspondentes a cada região, utilizados para ANOVA e teste de Tukey, tendo em conta concentrações de glicose, frutose e álcool.	65
Tabela 15 - Resultados da análise ANOVA, de uma via, tendo em conta as concentrações de glicose, frutose e glicose+frutose, em separado para os conjuntos de regiões apresentados na Tabela 14.....	65
Tabela 16 – Resultados do teste de Tukey, tendo em conta a concentração de álcool para os conjuntos da Tabela 14: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo...88	88
Tabela 17 – Resumo da ANOVA, de uma via, tendo em conta a concentração de álcool para os conjuntos da Tabela 14: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo, com exclusão dos vinhos licorosos, VT26 e VT31.....	69
Tabela 18 – Teste de Tukey, tendo em conta a concentração de álcool, para os conjuntos da Tabela 14: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo, com exclusão dos vinhos licorosos, VT26 e VT31.....	70

Tabela 19 – Valores do poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e SO ₂ livre e total	72
Tabela 20 – Parâmetros da cor em coordenadas CIELAB dos diferentes vinhos de diferentes regiões utilizados neste estudo.....	73
Tabela 21 – Matriz de Correlação (de Pearson), tendo como base os valores apresentados nas tabelas 19 e 20 nas Tabelas Tabela 19 e a Tabela 20.....	74
Tabela 22 – Conjuntos de vinhos, correspondentes a cada tipo de vinho, utilizados para ANOVA e teste de Tukey, tendo em conta os parâmetros: poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e dióxido de enxofre livre.....	79
Tabela 23 – Resultados da ANOVA, de uma via, tendo em conta, separadamente, os parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e dióxido de enxofre livre, para os conjuntos da Tabela 22.....	79
Tabela 24 – Teste de Tukey, tendo em conta o valor do poder antioxidante, para os conjuntos da Tabela 22.....	80
Tabela 25 - Teste de Tukey, tendo em conta o valor do índice de Folin, para os vinhos do VB1 ao VT31 agrupados nas diferentes distribuições: BM – vinhos brancos de mesa, BL – vinhos brancos licorosos, RM – vinhos rosados de mesa, TM – vinhos tintos de mesa, TL – vinhos tintos licorosos.....	81
Tabela 26 - Teste de Tukey, tendo em conta a concentração de antocianinas, para os conjuntos de vinhos da Tabela 22.....	82
Tabela 27 - Teste de Tukey, tendo em conta a concentração de dióxido de enxofre livre, para os conjuntos de vinhos da Tabela 22.....	83
Tabela 28 – Vinhos da Bairrada utilizados para o estudo da oxidação.....	91
Tabela 29 - Valores de densidade dos mostos após fermentação e composição em açúcar (A – <i>S. cerevisiae</i> + <i>T. delbrueckii</i> , B – <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. thermotolerans</i> , C – <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. thermotolerans</i> + <i>T. delbrueckii</i> , D – <i>S. cerevisiae</i> + <i>M. pulcherrima</i> , E – <i>M. pulcherrima</i> , F - <i>L. thermotolerans</i> , G – <i>S. cerevisiae</i> , H – <i>T. delbrueckii</i>).....	106

Lista de abreviaturas

Acetil – CoA – Acetil coenzima A
ADP – Adenosina difosfato
ATP – Adenosina trifosfato
DOP – Denominação de origem protegida
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazil
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
EUR – euros
FA – fermentação alcoólica
FADH₂ – flavina-adenina dinucleotídeo
FML – fermentação malolática
HCA – análise hierárquica de agrupamentos
IGP – Indicação geográfica protegida
IVV – Instituto do Vinho e da Vinha
mhl – milhões de hectolitros
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho
PC – componentes principais
PCA – análise de componentes principais
PVPP – polivinilpolipirrolidona
TDI – Tecnología Difusión Ibérica S. L.
USD – dólares americanos
UV/Vis – ultra-violeta/visível

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 Origem do vinho

O local e época em que o vinho foi produzido pela primeira vez não pode ser apontado precisamente [1]. O primeiro indício de vinicultura vem da Geórgia no Cáucaso do sul e é datado de 6000 – 5800 a.C. [2].

Apenas em 1860 foi descoberto que as leveduras convertiam açúcar em etanol e dióxido de carbono (processo designado por fermentação). Apesar de as pessoas na antiguidade não terem conhecimento deste processo bioquímico, a fermentação foi utilizada por milhares de anos como uma forma efetiva de preservar a qualidade e segurança de bebidas e comida [3]. Arqueólogos encontraram evidências moleculares da produção de bebida fermentada datada de antes de 7000 a.C. numa vila neolítica de Jiahu na China. Na Ásia, bebidas fermentadas eram produzidas principalmente a partir de arroz. No Egito e Mesopotâmia antigos, as bebidas mais utilizadas eram produzidas a partir de frutos (vinho), a partir de mel (hidromel) e a partir de cereais (cerveja) [3]. É expectável que a partir deste período, as tecnologias de fermentação de bebidas se expandissem a partir da Ásia, Mesopotâmia e Egito até ao Velho Mundo.

Dos muitos frutos colhidos pelo Homem antigo, apenas as uvas armazenam hidratos de carbono predominantemente na forma de açúcares solúveis estando, assim, a fonte calórica principal das uvas numa forma facilmente metabolizada pelas leveduras do vinho. A maioria dos outros frutos carnudos armazenam os hidratos de carbono como amido e pectinas, nutrientes que não são fermentáveis pelas leveduras do vinho. A rápida e extensa produção de etanol pela *Saccharomyces cerevisiae* inibe rapidamente o crescimento da maioria das bactérias e outras leveduras no sumo de uva. Outra propriedade única das uvas consiste nos ácidos que estas contêm. O principal ácido encontrado em uvas maduras é o ácido tartárico sendo que este ácido é raramente encontrado em fruta. Como o ácido tartárico é metabolizado por poucos micro-organismos, o vinho permanece suficientemente ácido para limitar o crescimento da

maioria das bactérias e fungos. A ação combinada da acidez da uva e a acumulação de etanol inibe o crescimento e metabolismo da maioria dos organismos que podem provocar a deterioração do vinho. Para o Homem antigo, o resultado da transformação da uva foi a transformação de um fruto perecível e disponível periodicamente numa bebida relativamente estável com propriedades peculiares e potencialmente inebriantes. Por outro lado, as necessidades de minerais e água da videira são reduzidas, permitindo-lhe prosperar em solos e encostas impróprias incompatíveis para outras culturas alimentares, o que também contribuiu para a fácil propagação da cultura do vinho.

Na propagação da cultura da vinificação tiveram importância a expansão da cultura grega, a expansão do império romano e a procura dos povos por novas terras no geral [1].

O vinho era muito importante na cultura grega. Além dos aspetos comercial, medicinal e hedónico o vinho representava para os gregos um elemento místico, expresso no culto do deus do vinho, Dionísio [1].

Depois com a colonização os gregos levaram a vitivinicultura para outros locais.

A expansão do Império Romano teve grande importância na disseminação da vitivinicultura pois os vinhedos eram cultivados nas regiões conquistadas. Os romanos levavam o vinho como uma forma de impor os seus costumes e a sua cultura nas áreas conquistadas.

Finalmente, é imprescindível lembrarmos as descobertas sobre os micro-organismos e a fermentação feitas por Louis de Pasteur e publicadas na sua obra “Études sur le Vin” em 1866. Essas descobertas constituem o marco fundamental para o desenvolvimento da enologia moderna [1].

1.2 A economia do vinho em Portugal e no mundo

A vinha é cultivada para produção de uvas. Essas uvas podem ser vendidas diretamente ou então utilizadas para produzir sumos, passas ou vinho. Aproximadamente 52 % da produção é processada e fermentada para dar origem a vinho, 42 % consumida como fruta fresca e 7 % utilizada para obter passas [4]. A finalidade varia muito de país para país, dependendo muitas vezes dos preceitos/imperativos políticos e religiosos (proibição de vinho) na região [5]. Os países

maiores produtores de uva são a China, Itália, Estados Unidos da América, França, Espanha e Turquia como está ilustrado na Figura 1 [4].

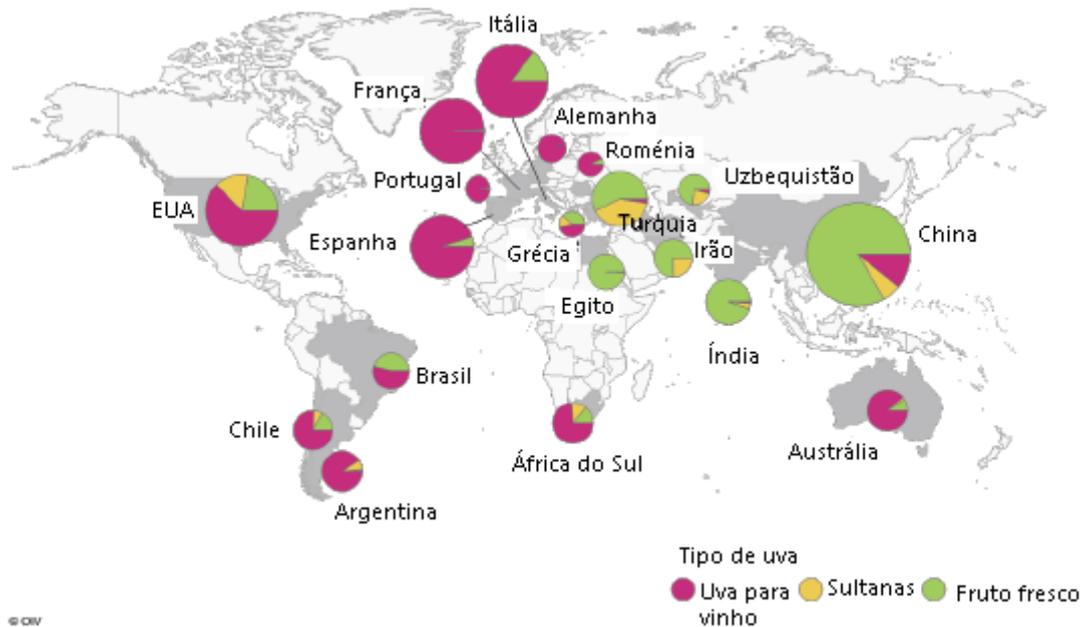


Figura 1 – Maiores produtores de uva por tipo de produtos (vinho, sultanas e fruto fresco) [adaptado de 2018 World Vitiviculture Situation – OIV Statistical Report on World Vitiviculture]

As localizações geográficas onde a viticultura é praticada fornecem um exemplo óbvio de limitação climática. É claro que a distribuição da temperatura ocorre em bandas paralelas ao redor do globo (zonas térmicas). Os limites para a viticultura situam-se nas latitudes 50 ° N e 40 ° S (Figura 2).

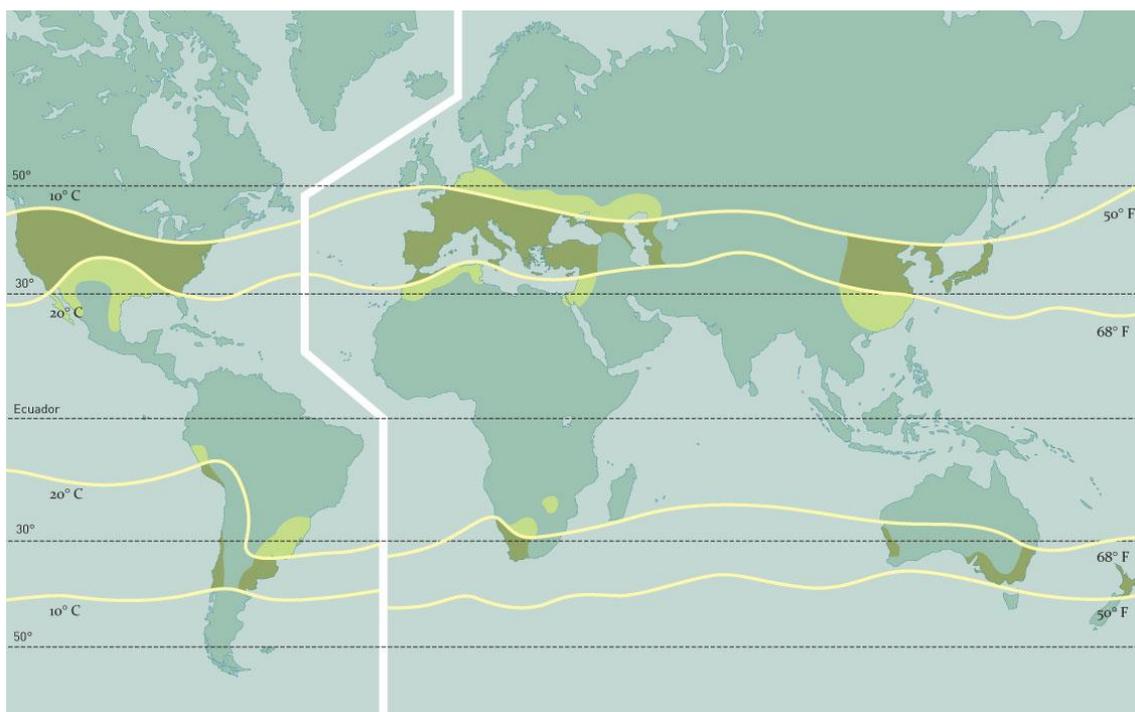


Figura 2 - Distribuição global de viticultura na isotérmica 10-20 ° C de acordo com Blij, 1983 (Fonte: adaptada, após Gómez-Miguel, 2009) [in <http://www.vinetowinecircle.com/en/terroir-2/viewpoints-concerning-the-dependency-of-viticulture-on-the-environment/>]

A produção de uvas é amplamente restrita a regiões climáticas semelhantes às da faixa da indígena de *Vitis vinifera*. Esta zona aproxima-se da área entre as isotérmicas anuais de 10 e 20°C. A cultura da uva é ainda mais restrita a regiões caracterizadas por climas do tipo mediterrânico. A extensão para ambientes mais frios, mais quentes ou mais húmidos é possível quando as condições locais modificam o clima ou a prática vitícola, compensando condições menos que ideais. A produção comercial ocorre mesmo em regiões subtropicais, onde podas severas estimulam o crescimento de videiras quase o ano inteiro [5].

Na Tabela 1 podem observar-se a quantidade de litros de vinho produzidos no ano de 2017 por vários países do mundo. A produção da Itália (maior produtor de vinho) permaneceu relativamente elevada, em 2017, atingindo 42,5 mhl de vinho enquanto Portugal produziu 6,7 mhl de vinho.

Tabela 1 - Produção, consumo, exportação e importação de vinho em 2017 para os maiores produtores de vinho em mhL (que produzem volume superior a 5 mhL) (os valores de volume produzido e consumido são dados provisórios) [valores do PIB retirados do site <https://pt.tradingeconomics.com/country-list/gdp> consultado a 3 de fevereiro de 2018, para se converter os valores em dólares americanos para euros usou-se a conversão de 2016, 1USD = 0,93447 EUR] [4]

Países	Volume produzido (mhL)	Volume consumido (mhL)	Volume exportado (mhL)	Valor exportado (mil milhões de euros)	Valor de cada litro exportado (euros)	Volume importado (mhL)	Valor importado (mil milhões de euros)	PIB em mil milhões de euros (10 ⁹ euros)
Itália	42,5	22,6	21,4	5,9	2,8	7,6		1728,74
França	36,6	27,0	14,9	9,0	6,0	7,6	0,8	2303,89
Espanha	32,5	10,5	23,2	2,8	1,2			1151,35
EUA	23,3	32,6	3,3	1,3	3,9	11,8	5,2	17352,26
Austrália	13,7	5,9	7,8	1,7	2,2			1125,68
China	10,8	17,9				7,5	2,5	
África do Sul	10,8	4,5	4,5	0,6	1,3			275,52
Chile	9,5	2,2	9,8	1,7	1,7			230,81
Argentina	11,8	8,9	2,2	0,7	3,2			510,13
Alemanha	7,5	20,1	3,8	1,0	2,6	15,2	2,5	3239,58
Portugal	6,7	5,2	3,0	0,8	2,7	2,1		191,16
Rússia	6,3	8,9				4,5	0,9	1199
Outros	11,5	40,4	2,5	5,1	4,4	434	12,3	13694,83
Total mundial	248	244,0	108	30,0	-	108	30	

A Itália é o país que maior volume de vinho produz (42,5 mhL), exportando 21,4 mhL (Tabela 1). A Espanha fica à frente da Itália no que se refere a volume exportado (23,2 mhL). O país que tem o litro de vinho mais caro é a França (6,0 euros), sendo a Espanha o país para o qual o litro de vinho é o mais barato, 1,2 euros. Portugal tem o preço do litro de vinho dentro da média relativamente aos outros países (2,7 euros).

Para a França e para a Itália os valores exportados são respetivamente 0,39 % e 0,34 % do PIB. Para Portugal os valores exportados representam 0,42 % do seu PIB. A Espanha apesar de ser o país que exporta maior volume de vinho fica atrás da França e da Itália relativamente à percentagem do PIB correspondente aos valores exportados (0,24 %). A Alemanha é o país que mais gasta dinheiro com a importação de vinho (0,077 % do PIB), exportando um valor que é 0,03 % do PIB, ou seja, inferior àquele que é importado (Tabela 1).

Tabela 2 – Importação e exportação de Portugal de 2013 a 2017 [6]

		2013	2014	2015	2016	2017
Exportado	Volume (hL)	3 040 615	2 836 168	2 798 189	2 777 631	2 985 815
	Valor (1000 €)	720 794	726 285	735 534	723 671	777 924
Importado	Volume (hL)	1 599 530	2 330 198	2 161 091	1 795 936	2 091 209
	Valor (1000€)	122 399	125154	116 755	109 964	133 752

De acordo com o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV), o vinho exportado com o qual Portugal obtém maior capital é o licoroso do Porto, representando este 43,4% dos valores exportados (ou seja, 314744 milhares de euros), embora o produto que se exporta em maior volume seja o vinho de mesa (que representa 15,2% dos valores exportados). Os produtos mais importados por Portugal são o vinho de mesa, representando 82,5 % do volume importado e 60,2 % dos valores importados. Os espumantes representam também uma fatia significativa dos valores importados (17,5 %), apesar do volume correspondente ser pequeno (2,3 %) [6]. Na Tabela 2, encontram-se os volumes de vinho exportados e importados (e valores correspondentes) por Portugal.

1.3. Regiões vitivinícolas de Portugal

O cultivo da vinha em Portugal está praticamente espalhado por todo o seu território, estando o mesmo dividido em diversas regiões vitivinícolas (Figura 3): Douro; Vinho Verde; Trás-os-Montes; Távora - Varosa; Dão; Bairrada; Beira Interior; Tejo; Lisboa; Alentejo; Península de Setúbal; Algarve; Madeira e Açores.

A região do Douro situa-se a Nordeste do País, é fortemente montanhosa encontrando-se protegida pela Serra do Marão e o seu clima é habitualmente seco, com invernos frios e verões muito quentes. A vinha está instalada nas encostas íngremes do Douro e seus afluentes. Geologicamente, os solos durienses são constituídos essencialmente por xisto, tendo também granito, mas em muito menor quantidade. Estes solos são pobres, os teores em matéria orgânica e em fósforo assimilável são baixos, podendo os teores de potássio apresentar valores médios ou altos [7]. É na região do

Douro que são cultivadas as uvas para o emblemático vinho do Porto sendo que para a sua produção são selecionadas as variedades tintas: Tinta Cão, Touriga Franca, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Touriga Nacional. Entre as centenas de castas destacam-se também as variedades tintas Sousão e Tinta Amarela (Trincadeira) e as variedades brancas Rabigato, Moscatel, Gouveio, Malvasia Fina e Viosinho [7].

A região dos Vinhos Verdes situa-se a Noroeste de Portugal continental, no Entre-Douro-e-Minho, correspondendo à maior Região Demarcada Portuguesa. Por influência marítima, o clima é temperado, não havendo amplitudes térmicas significativas durante todo o ano, e os níveis de precipitação são elevados. Desta forma, a maturação lenta é favorecida, dando origem a vinho com teor alcoólico entre baixo a médio e acidez elevada. Os solos são maioritariamente graníticos variando entre férteis

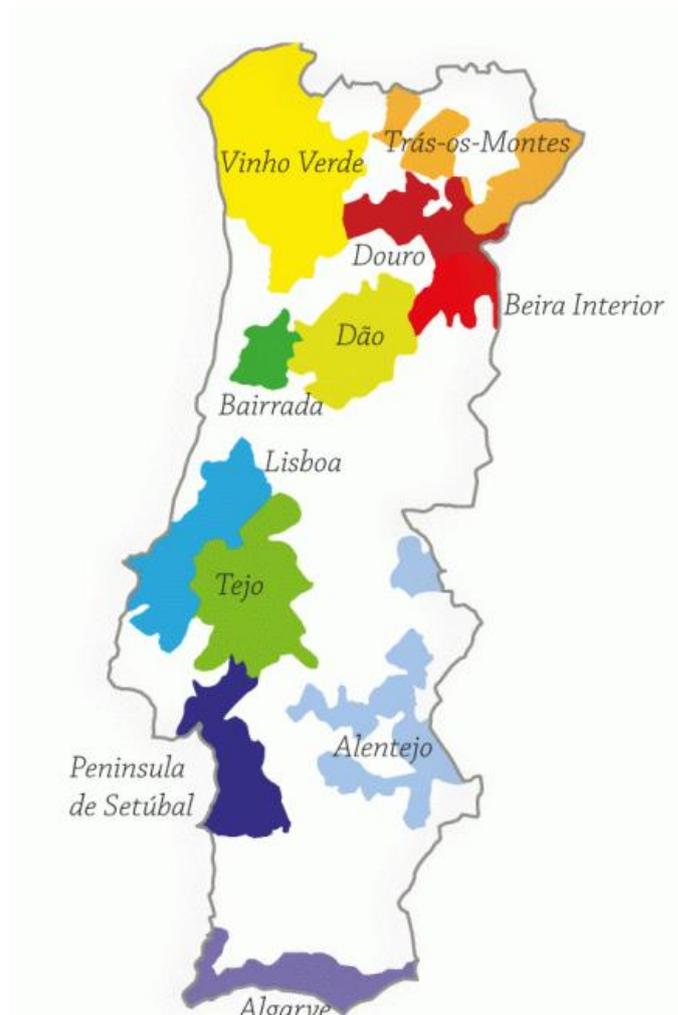


Figura 3 – Regiões vitivinícolas de Portugal continental <https://vinhosemsegredo.wordpress.com/2013/07/29/tintos-de-portugal/>

a muito férteis e de acidez elevada. As castas brancas dominantes são: Avesso, Loureiro, Alvarinho, Arinto, Azal e Trajadura. Assim, esta região tem as condições naturais ideais para produzir excelentes vinhos brancos sendo este tipo de vinhos que está associado a esta região [7], [8].

A Bairrada é uma região plana que se situa no centro-litoral de Portugal continental, entre Águeda e Coimbra, tendo como fronteira leste, as serras do Caramulo e do Buçaco. Como esta região se desenvolve numa faixa litoral marítima, tem marcada influência do ar mais húmido vindo do Atlântico, o que está na origem de chuvas abundantes e o clima relativamente temperado com invernos suaves e verões não excessivamente quentes. Dos solos bairradinos destacam-se os terrenos argilo-calcários e as faixas arenosas, existindo grande diversidade, por vezes numa pequena extensão, não só na composição e textura, mas também relativamente ao pH. Foi na Bairrada que se deu o nascimento dos primeiros espumantes portugueses que hoje em dia constituem a produção mais emblemática da região. O clima fresco e húmido favorece a sua elaboração, proporcionando uvas de acidez elevada e baixa graduação alcoólica [7], [8]. Entre as castas tintas tradicionais predomina a casta Baga, seguida da Camarate, Trincadeira, Bastardo, Moreto e Tinta Pinheira. Das castas brancas tradicionais, destinadas na sua maioria para a produção de espumante, a principal é a casta Maria Gomes (Fernão Pires) seguida de Bical, Arinto, Cerceal, Rabo de Ovelha e Cercealinho. Nas plantações mais recentes, que dão origem aos novos vinhos bairradinos, são utilizadas castas exóticas à região tanto nacionais como internacionais, destacando-se a Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Merlot, Pinot Noir, Syrah, Touriga Nacional e Tinta Roriz [7], [8].

Os fatores que influenciam a composição química das uvas e, consequentemente, do vinho são: a casta; o tipo de solo; a altitude; a humidade; a precipitação; a temperatura; a temperatura noturna; o declive do solo; a exposição solar, entre outros. Por exemplo, uma maior exposição solar vai contribuir para uma maior concentração de polifenóis totais; uma maior temperatura favorece a acumulação de açúcares; uma menor temperatura noturna vai ajudar a que as uvas acumulem maior quantidade de polifenóis (visto que oscilações térmicas favorecem acumulação de polifenóis). Assim, é de esperar que consoante a região vitivinícola, o vinho apresente características químicas distintas [9].

1.4. Processo de produção do vinho

A produção de vinho envolve vários processos, nomeadamente: colheita, desengace e esmagamento, prensagem, fermentação, trasfega, clarificação e estabilização, envelhecimento e engarrafamento, tal como ilustrado na Figura 4 [5].

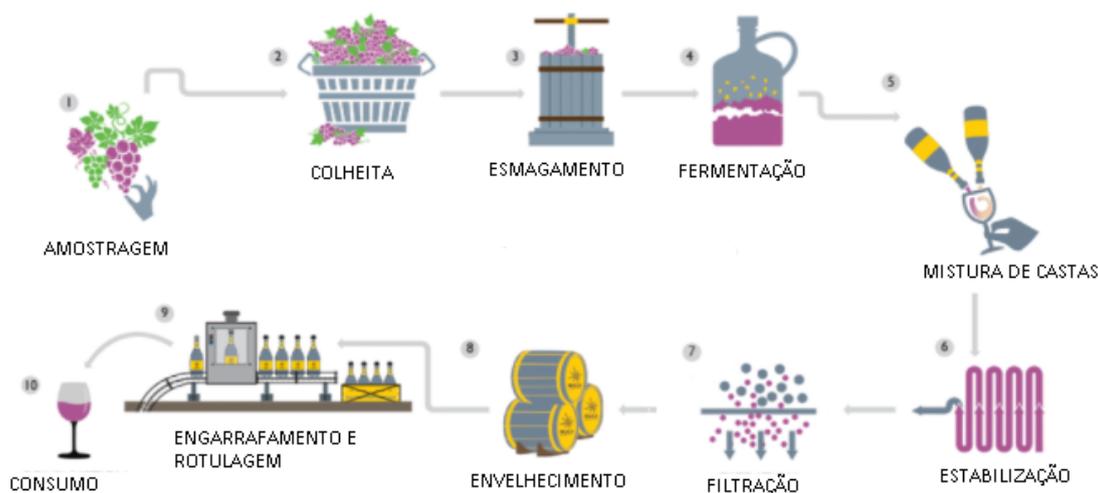


Figura 4 – Etapas da produção do vinho (adaptado de <http://flowchart.ghkates.com/wine-making-process-flowchart/>)

O processo de produção de vinho influenciará muito as características químicas do vinho.

O desengace consiste na remoção de pedúnculos e folhas, antes do esmagamento, e tem a vantagem de minimizar a absorção de compostos fenólicos e lipídicos destas partes da videira. Como os compostos fenólicos que constituem pedúnculos e folhas têm maior adstringência e amargura, relativamente ao sabor dos taninos da película e das sementes, que são menos adstringentes e mais assertivos, a sua extração normalmente não tem interesse [5].

Na etapa do esmagamento, há o rompimento subtil (isto é, sem haver trituração) da película das uvas, havendo, depois, um período de contacto do sumo com as películas [5]. O período de contacto do sumo com as películas das uvas pode ser mais ou menos prolongado, consoante o tipo de vinho que se quer obter. Para vinhos tintos, demora vários dias, para vinhos rosados, entre 12 a 24 horas, enquanto que para vinhos brancos, o contacto é mínimo, demorando ainda menos tempo. Este período de contacto

permite a extração dos constituintes da polpa, películas e sementes. No caso dos vinhos brancos, após o período de contacto com as películas, o mosto é prensado, de forma a separar as películas e sementes do sumo, antes da fermentação. Já nos vinhos tintos e rosados, a prensagem realiza-se apenas depois da fermentação começar pois deixa-se o mosto fermentar algum tempo sem remover as películas. O álcool produzido durante a fermentação melhora a extração de antocianinas e promove extração de taninos das películas e das sementes. Além disso, o etanol aumenta a libertação de compostos aromáticos da polpa e das películas.

A etapa da fermentação é realizada por micro-organismos (leveduras e bactérias), sendo uma forma de metabolismo de libertação de energia na qual tanto o substrato (dador de eletrões inicial) como o subproduto (recetor de eletrões final) são compostos orgânicos. A diferença entre a fermentação e a respiração consiste na fermentação não envolver oxigénio molecular. Apesar de existirem muitas vias fermentativas, a mais comum é a fermentação alcoólica. Nesta o etanol atua como o recetor de eletrões final (subproduto), enquanto que a glicose é o dador de eletrões preferido (substrato) [5].

A fermentação pode iniciar-se espontaneamente devido a leveduras indígenas provenientes das uvas ou, mais frequentemente, a leveduras presentes nos equipamentos utilizados para o esmagamento. No entanto, a prática padrão é inocular o sumo ou mosto com uma estirpe de levedura de características conhecidas. As leveduras não produzem apenas o álcool, mas também dão origem aos atributos gerais de bouquet e sabor que caracterizam os vinhos [5].

A estabilização e clarificação têm como objetivo produzir um vinho brilhante e límpido e sem defeitos no sabor. O vinho é submetido a alguns processos onde são removidos componentes que podem deixá-lo turvo: iões de tartarato, proteínas (responsáveis pela casse proteica), taninos, iões metálicos (ferro e cobre, responsáveis pela casse férrica e casse cúprica, respetivamente), entre outros [5]. Os diferentes tipos de casse formam-se quando os compostos que lhe dão o nome participam na formação de compostos insolúveis que causam turbidez.

O tratamento da turbidez pode fazer-se consoante o tipo de compostos que a causam. Assim, pode usar-se tratamento térmico, arrefecimento ou aquecimento para forçar precipitações e, posteriormente, remover os precipitados ou utilização de agentes coagulantes (colas). A remoção de alguns compostos do vinho, além de tratar a turbidez,

também pode ser importante para a redução da adstringência para se obter uma sensação de maior suavidade na boca como é o caso da remoção do excesso de taninos.

1.5. Colas

A colagem é a adição de substâncias reativas ou adsorventes para remover ou reduzir a concentração de um ou mais constituintes indesejáveis, de forma a melhorar a luminosidade, a cor, o aroma, o sabor e/ou modificar a estabilidade [10].

Os mecanismos de ação das colas podem ser elétricos (interação entre cargas), formação de ligações e/ou absorção e adsorção [10].

As colas são utilizadas durante a produção do vinho, mas também podem ser utilizadas para revitalizar vinhos oxidados. Estes clarificantes podem ser orgânicos (como é o caso, por exemplo, da caseína, da albumina e da polivinilpirrolidona - PVPP - que é um polímero sintético), ou minerais (como as bentonites), sendo a sua atuação diferente [10].

A bentonite é um tipo de argila Montmorillonita composta por silicato de alumínio, magnésio e cálcio hidratado e cuja fórmula química é $(\text{Na,Ca})_{0,3}(\text{Al,Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, sendo muito utilizada para remover proteínas do vinho. A rede de cargas negativas da bentonite atrai proteínas carregadas positivamente. A elevada área de superfície interna entre as placas de alumina-sílica individuais oferecem muitos locais para ligação. Os grupos carregados das proteínas são neutralizados por troca de cátions, originando floculação e sedimentação na forma de um complexo de argila-proteína. Contudo, a bentonite tem baixa capacidade para trocar aniões, sendo, portanto, ineficaz a remover proteínas neutras ou carregadas negativamente [5].

A caseína (proteína do leite) tem carga predominantemente positiva, atraindo taninos carregados negativamente. A sua interação produz grandes complexos de proteína e tanino. Uma vez formados, estes complexos podem ser removidos por filtração ou centrifugação. A caseína ocorre no leite como uma macromolécula carregada. Na forma seca pode encontrar-se disponível como caseinato de potássio ou sódio que é solúvel em água. O caseinato deve ser hidratado em água, antes da sua utilização, nunca em sumo ou vinho. Ao pH do vinho, a caseína flocula e o precipitado

resultante adsorve e remove mecanicamente o material suspenso (preferencialmente, partículas com carga negativa), à medida que se deposita [5], [10], [11].

1.6. Micro-organismos e o vinho

Os micro-organismos são essenciais na produção do vinho, pois para que o sumo de uva se transforme em vinho é necessária a sua ação (através da fermentação). Estes micro-organismos são leveduras e bactérias, sendo a principal levedura envolvida a *S. cerevisiae* e a bactéria principal a *Oenococcus* [12]. Existem duas fermentações, a fermentação alcoólica (FA) e a fermentação malolática (FML). Na FA, os açúcares da uva (a glicose e a frutose) são convertidos em etanol, principalmente, através da ação da *S. cerevisiae* (equação (1)). Na FML, que ocorre no fim da FA, o ácido malolático é transformado em ácido láctico pela ação das bactérias lácticas, sendo a principal a *Oenococcus*.



Assim, a *O. oeni*, tipicamente, cresce lentamente no sumo e, mais comumente, no vinho, depois de a *S. cerevisiae* ter completado a fermentação alcoólica [5]. Do ponto de vista da vinificação, a FML tem interesse na produção de vinhos tintos sendo normalmente evitada nos vinhos brancos. A FML torna vinhos excessivamente acídicos em vinhos mais aceitáveis ao paladar humano e pode melhorar a estabilidade microbiana pela remoção de substratos fermentáveis residuais [5].

Como já foi referido na secção anterior, a FA é um processo anaeróbico no qual os açúcares presentes nas uvas (frutose e glicose) são metabolizados dando origem a etanol e dióxido de carbono através de um processo de catálise enzimática, sendo essas enzimas produzidas por leveduras. Na fermentação, além da *S. cerevisiae*, há outras leveduras envolvidas, as *não Saccharomyces*, que também desempenham o seu papel na produção do vinho. Estas leveduras que não são do género *Saccharomyces* participam essencialmente nos primeiros estágios da FA espontânea, sendo a *S. cerevisiae* aquela que conclui a fermentação [13], [14]. Portanto, na fase inicial da FA espontânea as elípticas *S. cerevisiae* encontram-se em pequena quantidade, dominando as leveduras apiculadas, mas como estas são sensíveis ao álcool e ao dióxido de enxofre, quando se

atinge 3-4% de etanol, dão lugar às *S. cerevisiae*, que são bastante mais resistentes a meios com concentração elevada de etanol [15]–[19]. De facto, é característico deste processo várias populações de diferentes espécies de leveduras serem ativas sequencialmente durante a fermentação, sendo cada uma substituída pela seguinte [15].

1.6.1. *Lachancea thermotolerans*

A *Lachancea thermotolerans* é uma levedura com pouco poder fermentativo e pouca resistência ao etanol. É uma levedura ubiquista que ocupa uma vasta variedade de habitats naturais e antrópicos (incluindo insetos, plantas, solo e culturas hortícolas, particularmente uvas e vinho) que cobre uma ampla extensão geográfica [20], [21].

A *L. thermotolerans* tem a capacidade de produzir ácido láctico durante a fermentação alcoólica o que é uma atividade metabólica pouco comum entre leveduras, mas de grande interesse biotecnológico. De facto, a concentração máxima obtida de ácido láctico através da fermentação com a *L. thermotolerans* que foi registada é 16,6 g/L. Nas mesmas condições, a *S. cerevisiae* produz apenas entre 0,2 a 0,4 g/L de ácido láctico [12], [22]. Por causa desta capacidade, a *L. thermotolerans* tem sido descrita para acidificação de mostos com baixa acidez.

A capacidade da *L. thermotolerans* em atuar como um agente acidificante (produtor de L - ácido láctico) é de interesse cada vez maior, visto que as mudanças climáticas do globo e variações das práticas de viticultura e enologia têm resultado numa tendência para a redução da acidez total dos vinhos[23].

Além de produção de elevadas concentrações de ácido láctico também se observou em alguns estudos produção de elevadas concentrações de 2-feniletanol e glicerol [12].

Além disso, resultado biológico da acidificação pela ação da *L. thermotolerans* afeta de forma positiva as qualidades organoléticas e estabilidade microbiológica dos vinhos resultantes[12]. Outras modulações químicas e sensoriais positivas incluem teores finais de etanol baixos[23] algo cada vez mais procurado no mercado [21] e melhoria no aroma, sabor e sensação de corpo[12], [23], [24].

Também há dados referentes a mostos com *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* a partir dos quais se produziu vinhos com maior acidez e notas de picante mais intensas

do que vinhos produzidos a partir de fermentações de mostos nos quais se usou apenas *S. cerevisiae* [12].

A utilização de *L. thermotolerans* em inoculação simultânea pode levar a um melhoramento dos aromas frutados tropicais e floral nos vinhos brancos e sabores mais complexos e arredondados nos vinhos tintos[12].

Pode utilizar-se a *L. thermotolerans* em conjunto com outras leveduras como uma alternativa à fermentação malolática tradicional (realizada por bactérias lácticas).

A fermentação malolática tradicional pode levar à produção de sabores desagradáveis, perda de qualidade do vinho e problemas para a saúde humana. Particularmente em regiões quentes e/ou quando estão envolvidos mostos de pH elevado a probabilidade de desvios durante a FML é maior. A consequência destes desvios é a obtenção de vinhos com elevada acidez volátil e elevados valores de amins biogénicas[20].

Num estudo realizado onde se combinou o uso de *L. thermotolerans* com a *Schizosaccharomyces pombe* (espécie de levedura não *Saccharomyces*) em alternativa à FML tradicional o resultado foi a produção de vinhos mais frutados como menor teor de ácido acético e amins biogénicas em comparação com controlos nos quais foi realizada FML tradicional [20].

1.6.2. *Metschnikowia pulcherrima*

Algumas estirpes de *M. pulcherrima* demonstram uma forte atividade de biocontrolo contra vários micro-organismos. O seu valor para a indústria do vinho encontra-se no seu comportamento antagónico relativamente a outras espécies de leveduras indesejáveis envolvidas na produção de vinho.

Algumas estirpes de *M. pulcherrima* apresentam atividade antimicrobiana para leveduras do vinho que podem afetar negativamente a qualidade final do vinho enquanto que relativamente *S. cerevisiae* não revelam comportamento antagónico [25].

A atividade antimicrobiana da *M. pulcherrima* não parece dever-se a compostos proteicos como acontece no clássico fenómeno *killer* [25]. Em sentido estrito, o termo *killer* é dado a leveduras capazes de secretar uma toxina proteica ou glicoproteica letal para outras leveduras [26]. Em vinificação a utilização de leveduras *killer* para controlar

a proliferação de micro-organismos contaminantes durante a fase pré-fermentação também é uma aplicação interessante da atividade biológica [27]–[29].

A atividade antimicrobiana observada deve-se ao ácido pulcherriminico, precursor do pigmento pulcherrimino que sequestra o ferro presente no meio, prejudicando o crescimento de outras leveduras para o qual o ferro é um elemento vital [25].

1.6.3. *Saccharomyces cerevisiae*

A principal levedura envolvida na vinificação, a *S. cerevisiae*, tem as propriedades de osmotolerância (alta capacidade de suportar a pressão feita pela água na membrana da célula), relativa insensibilidade a acidez elevada e boa aceitação de concentrações de oxigénio baixas. Desta forma, ela está pré-adaptada para crescer no mosto e excluir outros competidores potenciais no mosto. Além destas propriedades, a *S. cerevisiae* tem também a capacidade de conseguir resistir em meios com concentrações de etanol moderadamente elevadas [5].

Apesar de a *S. cerevisiae* possuir a habilidade de respirar, esta fermenta predominantemente, mesmo na presença de oxigénio (o efeito Crabtree ou repressão do metabolismo respiratório pela glicose) [5]. O efeito de Crabtree consiste no inibição do metabolismo respiratório causado pela presença de quantidades elevadas de glicose. Quando os níveis de glicose são elevados no meio de cultura a levedura consome preferencialmente esse substrato nutricional e só começa a utilizar outras fontes de carbono, como o etanol ou o glicerol, quando a glicose se esgota [30].

O efeito de Crabtree manifesta-se sempre que *S. cerevisiae* se encontra em condições totalmente aeróbicas e utiliza glicose como fonte de carbono. Este fenómeno, que depende da concentração de glicose no meio de cultura, determina o tipo de vias metabólicas que a célula adota para obter o ATP (adenosina trifosfato) que sustenta o seu crescimento e sobrevivência. Em geral, ocorre uma predominância da via fermentativa que inclui a glicólise e a fermentação alcoólica/láctica sobre a via respiratória, onde o piruvato é descarboxilado a acetil-CoA (acetil-coenzima A) que é oxidado pelo ciclo do citrato para gerar equivalentes redutores sob a forma de NADH e FADH₂, utilizáveis pela cadeia respiratória para fosforilar ADP (adenosina difosfato)

em ATP. Este fenómeno não é exclusivo da *S. cerevisiae*, mas também de outras leveduras e bactérias [30].

1.6.4. *Torulaspora delbrueckii*

Esta levedura é utilizada atualmente como “starter” para determinadas aplicações na vinificação, nomeadamente, para reduzir a acidez volátil em fermentações com concentração elevada de açúcar.

A *T. delbrueckii* foi descrita em vários estudos como uma levedura com efeito positivo no aroma e no sabor de bebidas alcoólicas[31]–[34] e com baixa produção de acetaldeído, acetoína, acetato e acetato de etilo[33]–[35]. É conhecida por produzir pouco ácido acético sob condições padrão. Contudo, esta levedura produz pouco etanol e tem rendimento de biomassa reduzido e fermentação lenta [36].

A quantidade de acidez volátil (principalmente acetato) desempenha um papel importante no aroma do vinho e concentrações excessivas deste subproduto de fermentação alcoólica prejudicam muito a qualidade do vinho[37].

Devido à elevada pureza de fermentação (com baixa produção de subprodutos prejudiciais à qualidade do vinho) tem sido proposto o uso desta levedura em culturas mistas ou sequenciais com *S. cerevisiae* para diminuir o conteúdo de ácido acético no vinho [34][32][38].

A *T. delbrueckii* é particularmente útil em fermentações de mostos com concentração elevada de açúcar visto que ao contrário da *S. cerevisiae* esta espécie não responde ao meio hiperosmótico com o aumento da produção de ácido acético. Antes pelo contrário mantém a sua capacidade de ter uma fermentação de elevada pureza com baixa produção de acidez volátil. Contudo, não pode ser utilizada sozinha, tem de ser utilizada juntamente com a *S. cerevisiae* pois como tem fermentação lenta não consegue atingir o teor de álcool requerido nestas fermentações (14%), apesar de conseguir sobreviver a concentrações elevadas de etanol [36].

1.7. Química do vinho

O vinho é uma solução muito complexa, composta por diversas substâncias químicas que possuem características próprias e concentrações variadas. Neste capítulo, irá fazer-se referência a alguns dos seus constituintes principais, nomeadamente, água, álcoois, ácidos, compostos fenólicos, açúcares, minerais e gases dissolvidos. Para além destes constituintes, existem outros tais como aldeídos, cetonas, acetais, ésteres, lactonas e outros compostos heterocíclicos de oxigénio, terpenos, compostos azotados (aminas e aminoácidos), compostos sulfurados e vitaminas [39].

1.7.1. Água

Como constituinte químico predominante no vinho, a água desempenha um papel crítico na estabilização das suas características básicas. Por exemplo, apenas compostos com solubilidade relativamente elevada em água desempenham um papel significativo no vinho. Além disso, a capacidade calorífica elevada do vinho torna o aquecimento do vinho no copo mais lento. A água também é um componente essencial em várias reações químicas envolvidas no envelhecimento do vinho [5].

1.7.2. Álcoois

O álcool mais importante constituinte do vinho é o etanol. Sob condições de fermentação normais, o etanol pode atingir concentrações de até cerca 14-15%. Níveis mais elevados de etanol podem ser atingidos por adição sequencial de açúcar durante a fermentação, isto é, através de um processo denominado fortificação [5].

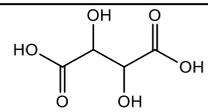
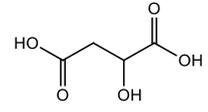
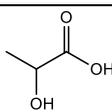
O etanol tem múltiplos efeitos no sabor e sensação na boca. Aumenta diretamente a doçura através do seu próprio sabor e modifica indiretamente a perceção de acidez, fazendo com que vinhos mais ácidos pareçam menos azedos e mais equilibrados. Em elevadas concentrações, o álcool produz uma sensação de queimadura e pode contribuir para a sensação de peso ou corpo, principalmente em vinhos secos. O etanol também diminui a adstringência dos taninos [5].

1.7.3. Ácidos

No geral, os ácidos são quase tão importantes para a qualidade do vinho como os álcoois. Os ácidos não só produzem um sabor refrescante (ou ácido, quando em excesso), como também alteram a percepção de outros sabores e sensações na boca (por exemplo, a acidez reduz o sabor a doce e potencia a adstringência)[5].

Podemos dividir os ácidos existentes no vinho em dois tipos: ácidos orgânicos (Tabela 3) e ácidos inorgânicos (como o ácido sulfuroso, por exemplo) [5]. Por sua vez, a acidez no vinho costuma dividir-se em duas categorias: volátil e fixa. A acidez volátil refere-se aos ácidos que podem ser removidos facilmente através de destilação por arraste de vapor enquanto que a acidez fixa inclui aqueles que são pouco voláteis. A acidez total é a combinação das duas categorias [5].

Tabela 3 - Estruturas moleculares de alguns ácidos orgânicos presentes no vinho.

Ácidos orgânicos	Nome do ácido	Estrutura molecular
	Ácido tartárico	
	Ácido málico	
	Ácido acético	
	Ácido láctico	

Para a maioria dos vinhos de mesa, é desejável uma acidez total ente 5,5 mg/L e 8,5 mg/L. Particularmente, os vinhos brancos devem ter, de preferência, valores mais próximos do limite superior, enquanto que os vinhos tintos devem ter valores de acidez total mais próximo do limite inferior. Os valores de pH adequados para vinhos brancos devem estar entre 3,1 e 3,4 e, para vinhos tintos, entre 3,3 e 3,6 [5].

O ácido acético é o ácido volátil principal, com efeitos desejáveis no aroma em concentrações até 300 mg/L, mas outros ácidos, como o ácido fórmico, o butírico e o propiónico, podem também existir [5].

O ácido tartárico e o ácido málico são os principais constituintes ácidos do vinho e constituem mais do que 90% da acidez fixa. Estes ácidos controlam, assim, o pH do vinho (os ácidos voláteis não afetam significativamente o pH do vinho ou a acidez perceptível).

O ácido málico pode constituir cerca de metade da acidez total do vinho. Na fermentação malolática, o ácido málico é convertido em ácido láctico, tornando-se este o constituinte principal da acidez do vinho.

1.7.4. Compostos polifenólicos

Os compostos fenólicos revestem-se de grande importância em enologia uma vez que estão relacionados, direta ou indiretamente, com a qualidade dos vinhos. Os compostos fenólicos podem afetar a aparência, sabor, sensação de boca, fragrância e propriedades anti-microbianas do vinho sendo de importância primordial na qualidade de vinhos tintos. Também têm significado em vinhos brancos, embora estejam presentes em concentrações muito inferiores. A fonte principal destes compostos são as uvas, podendo ser também extraídos da madeira em quantidades inferiores, enquanto quantidades vestigiais podem ter origem no metabolismo das leveduras.

Os compostos fenólicos podem ser divididos em flavonoides (Figura 5) e não flavonoides (Figura 6). Os flavonoides podem ser subdivididos em antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis e isoflavonas. Os tipos de não flavonoides podem ser fenóis simples, ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas e aldeídos benzóicos. Depois ainda há os taninos que podem ser divididos em hidrolisáveis e condensados.

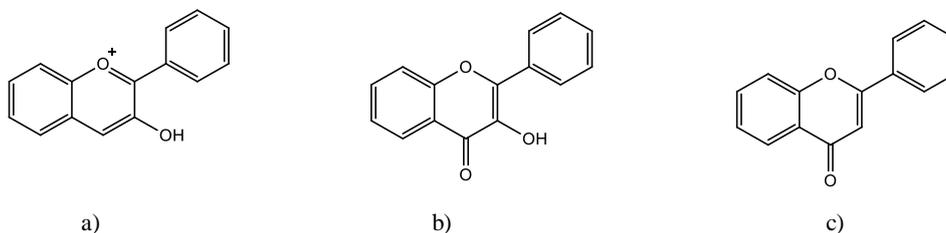


Figura 5 - Estrutura química básica de alguns flavonoides a) antocianidinas b) flavonóis c) flavonas.

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de um açúcar (normalmente a beta-D-glicose) e um número variável de moléculas de ácidos fenólicos. Este grupo de taninos divide-se em dois subgrupos, os galotaninos e os elagitaninos, dependendo se o ácido fenólico é o ácido gálico ou o ácido elágico, respetivamente. Estes compostos, ao contrário dos taninos condensados, não estão presentes nas uvas, sendo a sua origem exógena, pois estão presentes na madeira e, por isso, aparecem em vinhos armazenados ou envelhecidos em barris de madeira. Os taninos hidrolisáveis (baseados em compostos não flavonoides) separam-se rapidamente sob condições acídicas. Por outro lado, taninos condensados (baseados em compostos flavonoides) são mais estáveis sob condições acídicas pois estabelecem ligações covalentes entre si [5].

As antocianinas são responsáveis pela cor dos vinhos tintos e das uvas, estando localizadas na película e na polpa das uvas. As antocianinas existem nas uvas como glicosídeos – a ligação da antocianidina (catião flavílio) com açúcar (tipicamente, a glicose). As principais antocianinas do género *Vitis* são a cianidina, a delfinidina, a peonidina, a petunidina e a malvidina (Figura 8).

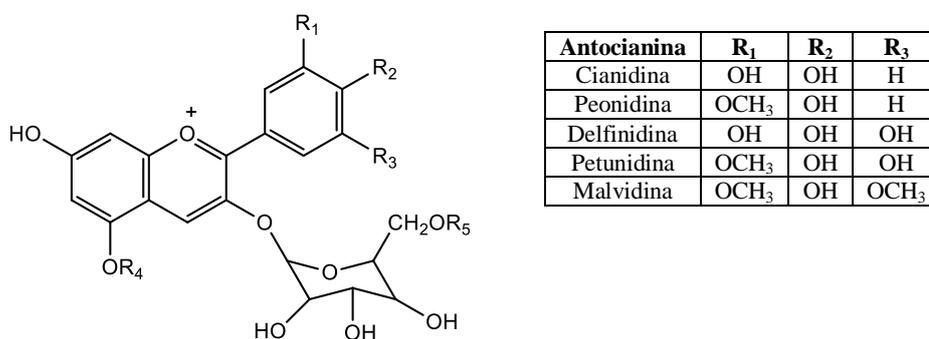


Figura 8 - Estrutura geral das principais antocianinas na espécie *Vitis vinifera* (adaptado de [40] página 440)

Cada antocianidina pode ser adicionalmente complexada (acilada) por uma ligação da porção de açúcar, geralmente no C6, com ácido acético, ácido cumárico ou ácido cafeico.

As antocianinas apresentam-se sobre diferentes formas em equilíbrio que dependem do pH do meio.

Em vinhos tintos jovens, as antocianinas ocorrem predominantemente como um equilíbrio dinâmico entre cinco estados moleculares principais, um ligado a dióxido de enxofre e quatro formas livres (Figura 9) [40].

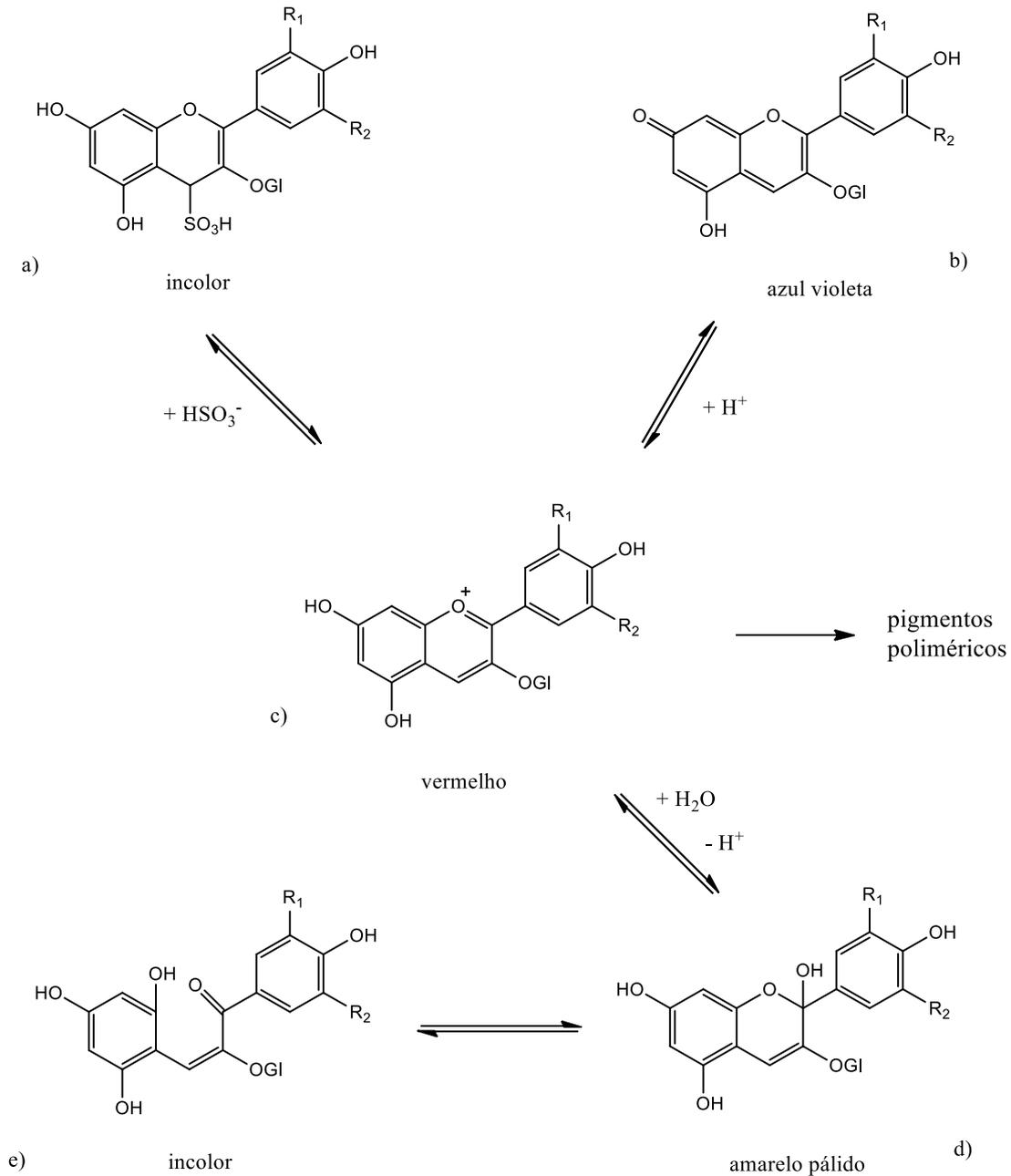


Figura 9 - Equilíbrio entre as várias formas de antocianinas no vinho. GI – glicose a) antocianina sulfonada (incolor), b) base quinoidal (azul violeta), c) catião flavílio (vermelho), d) carbinol (incolor), e) chalcona (amarelo claro). (adaptado de [5], página 288)

A maioria das formas favorecidas são sem cor dentro do intervalo de pH típico do vinho (aproximadamente 3,5). A cor vermelha provém, principalmente, da pequena porção de antocianinas que existem no estado de ião flavílio. A proporção deste ião depende do pH e do teor de dióxido de enxofre livre do vinho. Baixo pH aumenta a concentração do estado flavílio, aumentando a intensidade da cor vermelha. O tom azulado-malva de vinhos de pH elevado deve-se a um ligeiro aumento na proporção de

antocianinas quinoidais. Contudo, o fator mais significativo que afeta a densidade de cor de vinhos tintos jovens não é o pH, mas a quantidade de dióxido de enxofre livre. O dióxido de enxofre é um agente de branqueamento de antocianinas eficaz, embora reversível.

As antocianinas livres não são particularmente estáveis. A estabilidade desenvolve-se através de uma série complexa de mecanismos, incluindo fatores de curta duração tais como co-pigmentação, e fatores de longa duração, tais como polimerização com flavan-3-óis e procianidinas, assim como a formação de novos pigmentos tais como piranoantocianinas. Estas últimas também podem condensar com taninos. A polimerização ajuda a estabilizar a cor do vinho ao proteger a molécula de antocianina da oxidação e outras reações químicas, tais como descoloração por sulfito. A co-pigmentação é um fenómeno no qual há interação de Van der Waals entre a estrutura planar polarizável da antocianina e outro flavonoide incolor conhecido como co-fator ou “co-pigmento”, resultando num empilhamento das moléculas. Pode distinguir-se dois tipos de co-pigmentação: intramolecular e intermolecular. A co-pigmentação intramolecular ocorre quando o pigmento (antocianina) e o copigmento fazem parte da mesma molécula, ou seja, quando o cromóforo da antocianina e o copigmento (resíduo de ácido cinâmico) estão covalentemente ligados ao mesmo resíduo de açúcar. Na copigmentação intermolecular há empilhamento de moléculas de antocianinas e de copigmentos enquanto moléculas independentes. Este empilhamento é resultado de forças de van der Waals e efeitos hidrofóbicos. A auto-associação é um caso particular da copigmentação intermolecular no qual há empilhamento entre moléculas de antocianinas entre si. Os copigmentos principais no vinho são flavonoides e não flavonoides, embora também possam estar envolvidos aminoácidos, ácidos orgânicos, polissacarídeos e purinas. Os catiões metálicos (Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) também formam complexos com as antocianinas contribuindo para a sua estabilização. A proporção destes compostos nos vinhos depende da casta, da região vitivinícola e dos processos de vinificação, o que torna a cor dos vinhos diferente [5], [40]–[42].

As antocianinas e os taninos são os principais constituintes dos vinhos implicados em fenómenos de oxidação, que se traduzem por alterações de cor (acastanhamento) e por uma evolução do gosto (perda ou aumento da adstringência).

Os não flavonoides principais, em vinhos não envelhecidos em madeira, são os derivados dos ácidos fenólicos, dividindo-se em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos e

hidroxicinâmicos. As concentrações destes compostos nos vinhos tintos são de 100 a 200 mg/L e nos vinhos brancos são de 10 a 20 mg/L [41].

Os ácidos fenólicos ocorrem principalmente como ésteres de ácido tartárico, mas também podem estar associados a açúcares, vários álcoois ou outros ácidos orgânicos. Exemplos comuns são os ácidos caftárico, cártaro e ferrânico – os ésteres de ácido tartárico dos ácido cafeico, p-cumárico e ferúlico, respetivamente.

Em vinhos que envelhecem em madeira existem elevados níveis de derivados de ácidos hidroxibenzoicos, nomeadamente ácido elágico (a dilactona formada por associação de duas moléculas de ácido gálico) (Figura 10), visto que, como já foi referido, a hidrólise dos taninos extraídos da madeira produzem ácido gálico e a sua dilactona, o ácido elágico. Ésteres de ácido elágico podem aumentar a intensidade da cor do vinho tinto através da formação de copigmentos com as antocianinas [5].

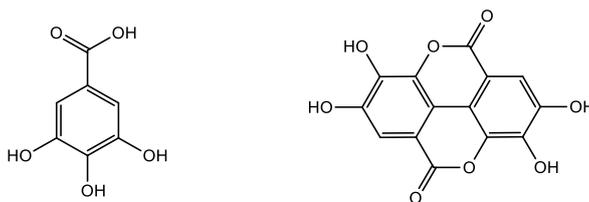


Figura 10 - Estruturas moleculares do ácido gálico e do ácido elágico (da esquerda para a direita).

1.7.5. Açúcares

A concentração de açúcares nas uvas varia consoante a espécie, a casta, a maturidade e o estado sanitário do fruto [5]. Os principais açúcares nas uvas são as hexoses D-glicose e D-frutose, estando a sua concentração em sumo de uva madura compreendida entre 150 e 250 g/L. Outros açúcares além da frutose e da glicose também estão presentes (Figura 11), tais como pentoses, por exemplo, a D- xilose e a L – arabinose que são as mais abundantes (presentes no vinho e nas uvas em concentrações de algumas centenas de mg/L) e a D-ribose e a L-ramnose (que estão presentes em concentrações inferiores a 100 mg/L). As pentoses são mais comuns em vinhos tintos do que brancos [41]. A levedura principal do vinho, a *S. cerevisiae*, obtém a maior parte da sua energia a partir do metabolismo da glicose e da frutose, tendo

capacidade limitada de fermentar outras substâncias [5]. De facto, as pentoses não são fermentáveis pelas leveduras.

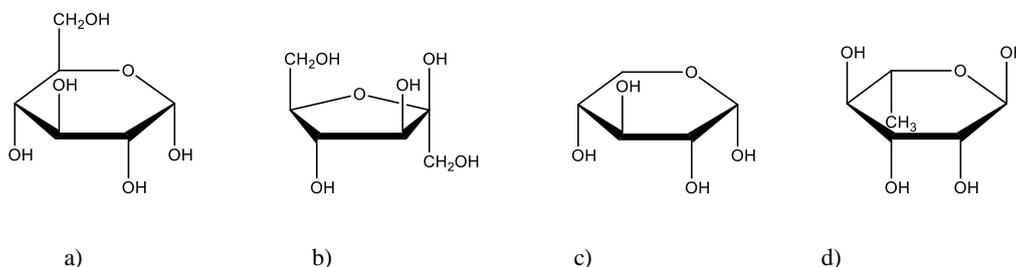


Figura 11- Estrutura química de alguns açúcares presentes no vinho. a) Glicose, b) Frutose, c) Xilose e d) Rannose.

Durante a fermentação alcoólica, a glicose e a frutose originam etanol e vários subprodutos, sendo necessário 16,5 a 18,0 g/L de açúcar para produzir um grau (% volume) de etanol. Nas uvas e no vinho também existem dissacarídeos, geralmente em pequenas quantidades, como por exemplo, lactose, maltose, rafinose entre outros. Assim, vinhos secos nos quais os açúcares foram completamente fermentados contêm quantidades pequenas de hexoses (na ordem dos 1 g/L). Estas hexoses são principalmente frutose porque a maioria das leveduras fermenta preferencialmente glicose. Por este motivo, a razão Glicose/Frutose, que é cerca de 1 no mosto, vai diminuindo ao longo da fermentação. De facto, em vinhos doces contendo várias dezenas de gramas de açúcar por litro, pode haver duas a quatro vezes mais frutose do que glicose. Nas uvas, a razão glicose/frutose é da ordem dos 1,5 durante o pintor e diminui para valores inferiores a 1 durante a maturação. Durante o amadurecimento, a razão glicose/frutose varia devido à ação de uma epimerase havendo uma aumento significativo na quantidade relativa de frutose. Estes dois açúcares também são distinguidos pela sua doçura e o seu efeito no sabor do vinho. Se a sacarose tiver uma classificação de 1 numa escala de doçura, a frutose tem 1,73 e a glicose 0,74 (já as pentoses têm 0,40, contribuindo menos para o sabor a doce do que as hexoses). Consequentemente, se a concentração de açúcar residual for a mesma, a doçura aparente de um vinho depende da razão glicose/frutose [41].

Na Tabela 4 podemos ver os tipos de vinho consoante a concentração de açúcares (segundo o Instituto da Vinha e do Vinho).

Tabela 4- Tipos de vinho consoante a concentração de açúcares (glicose + frutose).
(<https://www.ivv.gov.pt/np4/np4/89>)

Tipo de vinho	Concentração de açúcares em g/L (glicose + frutose)
Seco	< 4
Meio seco	4 - 12
Meio doce	12 - 45
Doce	≥ 45

1.7.6. Minerais

As substâncias minerais encontradas no vinho são provenientes principalmente da absorção radicular. Na maioria das situações, a concentração de minerais reflete as características de absorção do porta-enxerto, acumulação na copa e influência climática na taxa de transpiração. Por exemplo, as uvas em climas quentes tipicamente têm teores de potássio mais elevados do que aquelas cultivadas em regiões temperadas ou frias [5].

Os elementos maioritários, que se encontram geralmente em concentrações de 10 mg/L a 1 g/L, incluem o potássio, o cálcio, o sódio e o magnésio. Também estão incluídos neste conjunto o silício (sob a forma de ácido silícico), o fósforo (presente essencialmente sob a forma mineral mas também orgânica, sendo que o teor de fosfatos varia de 20 a 160 mg/L, para os vinhos brancos e de 50 a 300 mg/L para os tintos), o enxofre (sob a forma de sulfatos, sulfitos e outras espécies, sendo que os sulfatos encontram-se em quantidades que vão de 150 a 300 mg/L) e o cloro (sob a forma de cloretos cuja concentração é da ordem dos 50 mg/L e apresenta valores superiores em vinhos produzidos com uvas originárias de solos salgados). Dos catiões presentes nas cinzas, o potássio é o mais abundante (0,5 a 2 g/L), sendo a sua concentração mais elevada no vinho tinto do que no vinho branco. A seguir ao potássio, os mais abundantes são o cálcio e o magnésio (50 a 150 mg/L). Apesar de o cálcio ser mais abundante do que o magnésio na uva, no vinho esta relação inverte-se devido à precipitação do tartarato de cálcio durante a conservação, principalmente quando as temperaturas são baixas. No vinho branco a concentração de cálcio está entre 80 e 140 mg/L, sendo inferior no vinho tinto. O sódio no vinho é pouco abundante e a sua concentração situa-se entre 10 e 40 mg/L. Vinhos provenientes de uvas de solos salgados (próximos do mar) têm concentração de sódio superior [41], [43], [44].

Para um intervalo de concentrações entre 0,1 mg/L e 10 mg/L, podem referir-se o boro (sob a forma de ácido bórico), alumínio, manganésio, ferro, cobre, zinco,

estrôncio e molibdénio elementos minoritários, e na sua grande maioria oligoelementos (indispensáveis aos seres vivos, em pequenas quantidades) [44]. O cobre presente no vinho provém da própria constituição da uva, podendo também o contacto com materiais que contenham cobre, durante a conservação do vinho, a utilização de sulfato de cobre aplicado ao vinho e a adição de aguardente (no caso dos vinhos licorosos) levar a um aumento da sua concentração. A OIV (Organização Internacional do Vinho) estabelece como limite máximo admissível 1 mg/L para o cobre nos vinhos [44]. Normalmente, o vinho contém concentrações de ferro entre 2 e 20 mg/L, em parte resultante do ferro existente nas uvas e sendo o restante veiculado pelo solo que acompanha os bagos, equipamentos e materiais utilizados na vindima e nos processos de vinificação, estabilização e conservação. O ferro desempenha um papel importante nos fenómenos de oxidação, como catalisador, e nos fenómenos de envelhecimento [44].

1.7.7. Gases dissolvidos

Os gases dissolvidos que existem no vinho são o oxigénio, o dióxido de carbono e o dióxido de enxofre. Também há azoto, apesar de não ter importância pois é um composto inerte. O dióxido de carbono existente no vinho provém maioritariamente do metabolismo das leveduras. Normalmente, o vinho permanece sobressaturado com dióxido de carbono até ao final da fermentação. Durante o envelhecimento, grande parte da quantidade do dióxido de carbono é libertada para fora do vinho e assim a sua concentração no vinho diminui para cerca de 2 g/L (ficando o vinho saturado) ao longo do engarrafamento. A esta concentração, o dióxido de carbono não tem efeito sensorial. Acima de 5 g/L, o dióxido de carbono começa a produzir uma sensação de picar na língua. Para se obter vinhos com concentração de dióxido de carbono elevada (ao ponto de esta produzir efeitos sensoriais) é necessário haver refermentação [5]. Segundo o IVV (Instituto da Vinha e do Vinho), consoante a concentração de dióxido de carbono, o vinho tem uma designação diferente (Tabela 5).

Tabela 5 - Tipos de vinho consoante concentração de dióxido de carbono segundo o IVV.

Tipo de vinho	Sobrepresão a 20 °C (bar)	Concentração de Dióxido de Carbono (g/L)
Tranquilo	< 1	≤ 3
Frisante	1 – 2.5	
Espumante	≥ 3	

O oxigénio é facilmente consumido em várias reações de oxidação, muitas delas envolvendo fenóis. No início do envelhecimento pode ser benéfica a incorporação de pequenas quantidades de oxigénio aos vinhos tintos visto que o oxigénio ajuda a estabilizar a cor e reduz o amargor e adstringência dos taninos. Já no caso dos vinhos brancos é necessário ter mais cuidado pois o oxigénio pode ter um papel mais nefasto [5].

O dióxido de enxofre é um constituinte natural do vinho pois a maioria das leveduras são capazes de produzir uma concentração de dióxido de enxofre até 10 mg/L. Contudo, normalmente, concentrações de dióxido de enxofre superiores a 30 mg/L resultam de adição durante ou depois da vinificação. O dióxido de enxofre é usado pela sua ação antioxidante e antimicrobiana, podendo encontrar-se no vinho na forma livre ou combinada, numa grande variedade de estados. Das formas livres, uma pequena porção existe como gás dissolvido (de 7,5% a 1% consoante o valor do pH), outra pequena fração existe como iões sulfito (SO_3^{2-}) (de 0.04 a 0.004% dependendo do valor do pH do vinho), ocorrendo a grande maioria como iões bissulfito (HSO_3^-). O dióxido de enxofre também se combina com uma diversidade de constituintes do vinho de forma reversível ou irreversível. A forma combinada mais comum são os hidroxissulfonatos envolvendo principalmente compostos carbonílicos, nomeadamente o acetaldeído (equação (2)). As antocianinas são outro substrato relevante na combinação com o dióxido de enxofre em vinhos tintos jovens [5].



Quando a concentração de dióxido de enxofre total de um vinho é calculada não está incluído o dióxido de enxofre que tenha formado complexos estáveis ou tenha sido envolvido em outras reações irreversíveis. Determinar a concentração de dióxido de enxofre livre é essencial para fazer estimativa do dióxido de enxofre que pode efetivamente desempenhar o seu papel de agente antimicrobiano e antioxidante [5].

Capítulo 2

2. Materiais e métodos

2.1. Determinação de parâmetros químicos no vinho

Para se analisarem os parâmetros minerais, açúcares e antocianinas nos vinhos utilizou-se um espectrofotômetro de UV/Vis dedicado, Miura 200. Este espectrofotômetro funciona como um analisador enzimático que mede a absorvância a 8 diferentes comprimentos de onda, nomeadamente, 340, 420, 505, 520, 546, 578, 620 e 700nm.

Na determinação do índice de Folin e do poder antioxidante, utilizou-se um leitor de placas (Power Wave XS da BIO-TEK).

Para determinar os parâmetros de cor a^* , b^* e L^* , com o objetivo de caracterizar os vinhos, utilizou-se um espectrofotômetro Cary 100 UV/Vis da marca Agilent, contudo, para o estudo da oxidação e o efeito da aplicação de colas, utilizou-se o leitor de placas (Power Wave XS da BIO-TEK).

A análise de dióxido de enxofre dos vinhos foi realizada recorrendo-se ao equipamento SO_2 – Matic da CRISON.

Todos os reagentes utilizados são da marca Sigma-Aldrich.

2.1.1. Determinação de minerais

A determinação do ferro no vinho utilizando espectrofotometria de UV/Vis baseia-se num método colorimétrico, tal como descrito no protocolo (kit de referência 2422 do Tecnología Difusion Ibérica, S. L.). Este método baseia-se na reação da 3-(2-piridil)-5,6-di(2-furil)-1,2,4-triazine-5',5''- sal dissulfónico de sódio (Figura 12) com o ferro presente na amostra em meio ácido e na presença de um agente redutor [45].

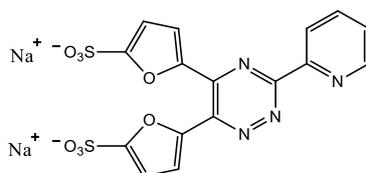


Figura 12 - Representação esquemática da estrutura molecular do 3-(2-piridil)-5,6-di(2-furil)-1,2,4-triazine-5',5''- sal dissulfónico de sódio

O método para determinação do cobre também é colorimétrico. Este método baseia-se na reação do cromogénio 4-(3,5-dibromo-2-piridilazo)-*N*-etil-*N*-(3-sulfopropil)anilina (3,5-diBr-PAESA), cuja estrutura molecular está representada na Figura 13, com o cobre presente na amostra, na presença de dodecil sulfato de sódio, para formar um cromóforo. Os reagentes utilizados pertencem ao kit de referência 2418 da TDI. A quantidade do cromóforo é diretamente proporcional à quantidade de cobre na amostra. O complexo colorido formado entre o cobre e o cromogénio absorve radiação de comprimento de onda de 582 nm [45].

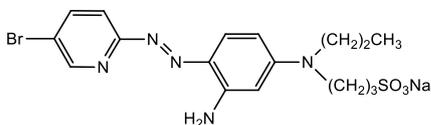


Figura 13 – Estrutura molecular do 4-(3,5-dibromo-2-piridilazo)-*N*-etil-*N*-(3-sulfopropil)anilina

A determinação de potássio nos vinhos é realizada através dum método turbidimétrico (descrito no protocolo de referência 2225 da TDI) e baseia-se na formação de um precipitado estável que ocorre quando o ião K^+ reage com o tetrafenilborato. Este precipitado estável é mantido em solução homogénea por adição de agentes estabilizantes adequados. A absorvância (ou a transmitância) medida entre 530 nm e 550 nm, pode ser usada como uma medida da turbidez (dispersão de luz) e é proporcional à concentração de potássio na amostra [45].

A determinação do cálcio é realizada por método colorimétrico (descrito no protocolo de referência 2215 da TDI), baseia-se na formação de um complexo violeta entre o cálcio e a orto-cresolftaleína em meio alcalino. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de cálcio na amostra. Este complexo tem absorvância máxima a 570 nm (560 – 600 nm) [45].

2.1.2. Determinação de açúcares

Para se determinar a concentração de glicose e frutose no vinho, utilizou-se um método enzimático com detecção de radiação UV, sendo os reagentes pertencentes ao kit de referência 2428 da TDI.

A enzima hexoquinase catalisa a fosforilação da D-frutose e da D-glicose pela molécula de ATP (adenosina-5'-trifosfato), havendo formação de ADP.

Em seguida, a frutose-6-fosfato é convertida a glicose-6-fosfato na presença de fosfoglicose isomerase.

Na presença da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, a glicose-6-fosfato é oxidada pelo dinucleotídio nicotinamida-adenina fosfato (NADP). O NADPH originado absorve radiação eletromagnética de comprimento de onda 340 nm. A absorvância é diretamente proporcional à concentração de D-glicose e D-frutose na amostra de vinho [45].

2.1.3. Determinação do índice de Folin

O método de Folin-Ciocalteu é utilizado para medir polifenóis em produtos naturais. Este reagente é muito estável se protegido de redutores e, mesmo quando diluído, se protegido da luz. O mecanismo básico é uma reação de redução/oxidação na qual os grupos fenólicos são oxidados e o íon do metal é reduzido [46].

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste numa mistura de heteropoliácidos, ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), nos quais o molibdénio e o tungsténio estão no estado de oxidação +6. Na reação com um agente redutor, os ácidos são reduzido a óxidos de tungsténio e molibdénio (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}), que exibem uma coloração azul, na região dos 750 nm, sendo a reação lenta a pH ácido e rápida quando o pH é básico [46], [47].

Numa placa de 96 poços de fundo plano adicionou-se 50 μ L de água destilada em cada poço, 12,5 μ L de vinho e esperou-se 5 minutos (os vinhos tintos foram diluídos 20 vezes e os vinhos brancos e rosados não foram diluídos). Após o tempo de reação, adicionou-se 125 μ L de Na_2CO_3 (a 7% m/v) e incubou-se, durante 60 minutos, a 30°C. Para se obter a curva de calibração, procedeu-se como anteriormente, substituindo o

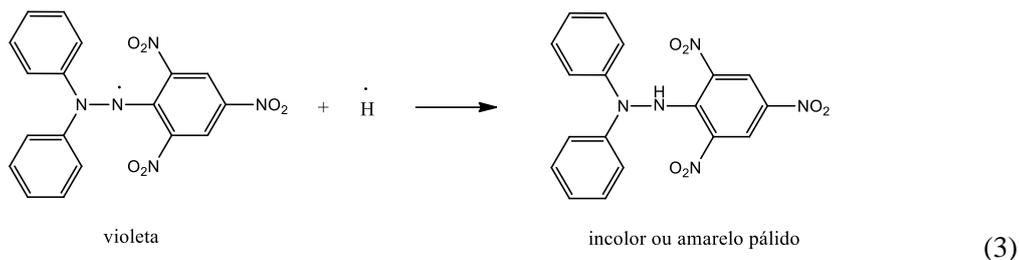
vinho por soluções padrão de ácido gálico de 1g/L, 0,750 g/L, 0,625 g/L, 0,500 g/L, 0,375 g/L, 0,250 g/L e 0,125 g/L. Também se preparou um branco, substituindo a solução de ácido gálico por água destilada. A leitura da absorvância foi realizada a 750 nm.

2.1.4. Determinação de antocianinas

A pH baixo, as antocianinas estão ionizadas. O reagente utilizado (referência 2414 da TDI - solução tampão, estabilizantes e conservantes) foi otimizado pelo fornecedor para completar a ionização e eliminar a turbidez causada pelos compostos proteicos. O reagente utilizado solubiliza e ioniza as antocianinas e reage com estas produzindo um complexo que absorve na região visível do espectro eletromagnético, podendo ser detetado com um espectrofotômetro. Tanto as antocianinas ionizadas como as ionizáveis são detetadas, embora as antocianinas polimerizadas com taninos não sejam detetadas com este método [45].

2.1.5. Determinação do Poder Antioxidante

O 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) é um radical de azoto orgânico, estável, de cor violeta, com uma banda de forte absorção centrada a um comprimento de onda na faixa de 515-520 nm. Este radical tem a capacidade de sequestrar radicais livres. Na presença de compostos anti-oxidantes, o elétron desemparelhado do átomo de azoto no DPPH recebe um átomo de H proveniente desses compostos. Assim, o radical DPPH é neutralizado dando origem à forma molecular reduzida (equação 3). O composto formado não absorve significativamente na faixa centrada em 520 nm e, assim, a solução perde a cor violeta. A intensidade de absorção diminui de forma proporcional ao número de elétrons capturados, ou seja, de forma proporcional à concentração de compostos anti-oxidantes presentes na solução. Portanto, quanto maior a concentração de compostos anti-oxidantes, menor será a absorvância [48].

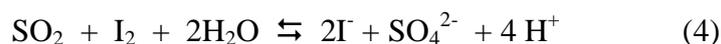


Assim, em cada poço da placa, adicionou-se 10 μL de amostra previamente diluída em água destilada (amostras brancas e rosadas diluídas de 1:2, amostras tintas diluídas de 1:20), 200 μL da solução de DDPH em etanol 96% (200mg/L), incubou-se durante 40 min no escuro e leu-se a absorvância a 517 nm no leitor de placas [49].

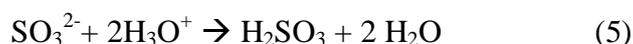
Para construir a reta de calibração, realiza-se o ensaio da mesma forma, substituindo a amostra por concentrações de solução quercetina em etanol de 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L e 400 mg/L.

2.1.6. Determinação do dióxido de enxofre (livre e total)

O método de Ripper, baseado numa titulação iodométrica, foi aplicado [50], [51]. A reação oxidação/redução global correspondente à titulação pode ser representada pela equação (4).



Para se determinar o dióxido de enxofre livre, adiciona-se 0.2g de iodeto de potássio a 10 mL de vinho e coloca-se em agitação, recorrendo a um magnete. Adiciona-se ácido sulfúrico (25%), na proporção 1:3 (em volume), de forma a ocorrer a reação representada pela equação (5). Este passo é importante para evitar perdas por volatilização, visto que o dióxido de enxofre é volátil a pH elevado [52].



Por outro lado, é importante acidificar a amostra pois, assim, diminui-se a oxidação dos polifenóis da amostra pelo iodo. Além disso, o pH baixo desloca o equilíbrio entre a

antocianina sulfonada e o catião flavílio no sentido da hidrólise da ligação entre a antocianina e o bissulfito, libertando o dióxido de enxofre [52]. O iodeto de potássio é utilizado para solubilizar o iodo molecular, que tem baixa solubilidade em solução aquosa, através da formação do ião triiodeto (equação 6).



A determinação do dióxido de enxofre total difere da determinação do dióxido de enxofre livre no seguinte: depois da adição do iodeto de potássio, adiciona-se hidróxido de sódio (4 M) com agitação, que permanece durante 3 segundos, e, após 5 minutos sem agitação (tempo de reação), é adicionado o ácido. A adição de base tem a função de promover a hidrólise dos complexos carbonil-bissulfito, libertando o dióxido de enxofre, conforme representado na equação (7) [51].



Assim que é detetado o ponto final, eletroquimicamente, a adição de iodo é interrompida, automaticamente.

2.1.7. Determinação das coordenadas colorimétricas

A avaliação e definição objetiva da cor dos vinhos nem sempre é fácil. A “Commission Internationale de L’Eclairage” (CIE) estabeleceu um método para medir a cor do vinho (e não só) com base na determinação dos valores das características cromáticas dos vinhos (coordenadas colorimétricas e as suas magnitudes) que são calculadas a partir dos componentes tricromáticos X, Y e Z (estes, por sua vez, calculados a partir dos valores de absorvância ao longo do espectro visível). As coordenadas colorimétricas, nas quais se baseia o espaço de cor tridimensional designado de espaço CIELAB (Figura 14) são: a luminosidade (L^*), a componente verde/vermelha (a^*) e a componente azul/amarela (b^*) [53]–[55].

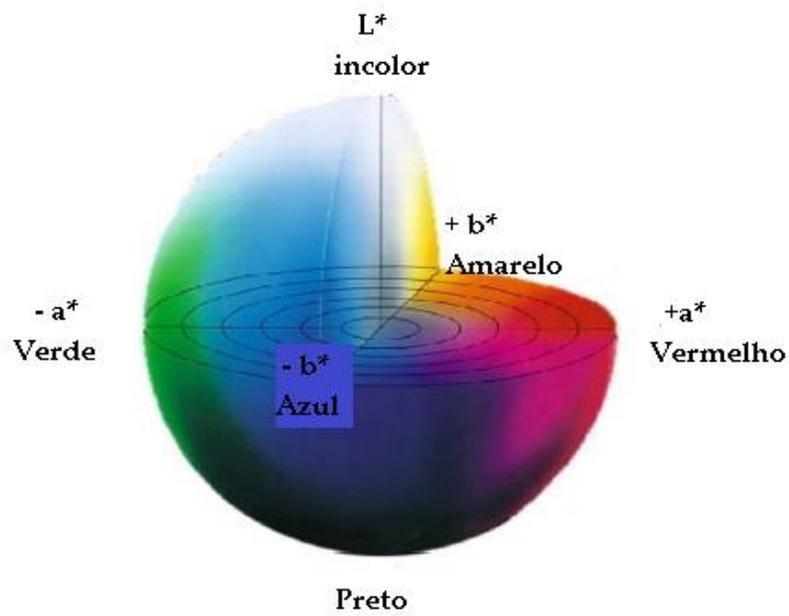


Figura 14 - Espaço CIELAB (adaptado de [56], página 22)

O parâmetro a^* representa a coloração vermelha ($a^* > 0$) e verde ($a^* < 0$), b^* representa o amarelo quando b^* é maior do que 0 e azul quando b^* menor do que 0 (Figura 15) e o parâmetro L^* é a luminosidade e pode variar de 0 (opaco) a 100 (transparente) [53]–[55].

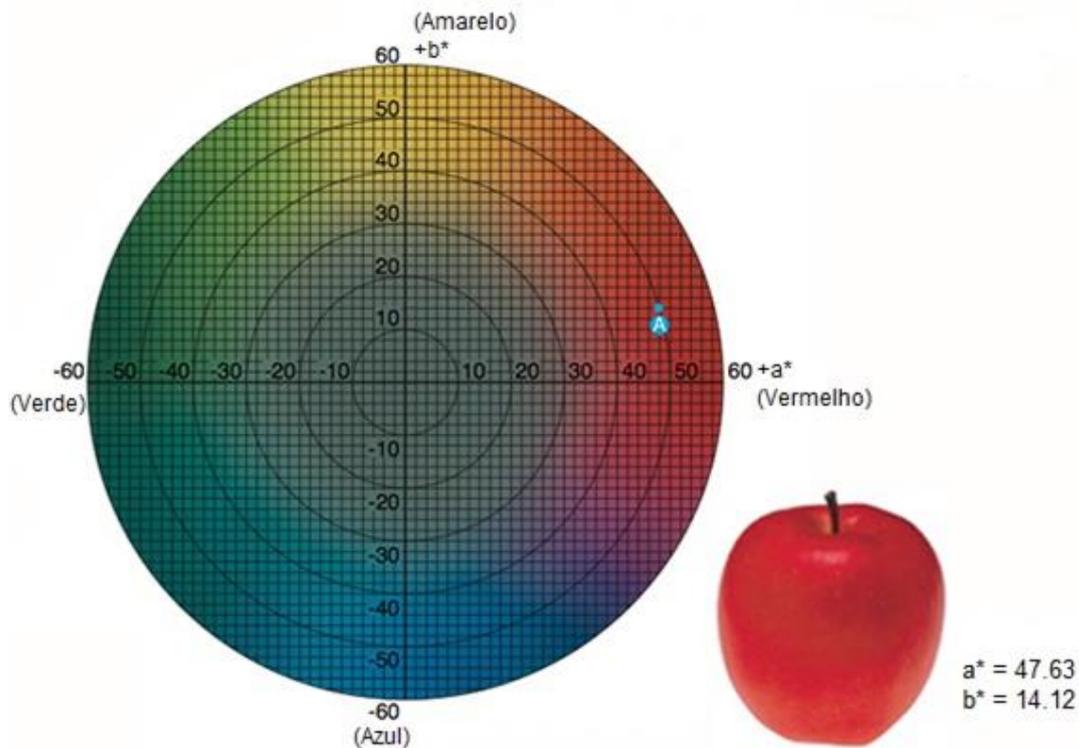


Figura 15 – Representação das coordenadas colorimétricas a^* e b^* (a cor da maçã está localizada no ponto A)

Para se calcular os parâmetros CIELAB dos vinhos, utilizou-se o programa “MSCV-Coordinates” no qual se introduzem os valores de absorvância correspondentes aos comprimentos de onda 450, 520, 570 e 630 nm e obtêm-se as coordenadas colorimétricas a^* , b^* e L^* .

2.2. Revitalização de vinhos oxidados

Os vinhos foram tratados com uma cola mineral, a bentonite, e uma cola proteica, a caseína. Este estudo foi executado em tubos de ensaio com 80 mL de vinho a tratar. Para cada vinho fizeram-se cinco ensaios, um controle (sem qualquer tipo de cola adicionada) e uma dose máxima e uma mínima para cada cola, em quantidades recomendadas pelo Instituto Australiano de Investigação do Vinho [57]. A dose mínima para a bentonite foi de 0,2 g/L e a dose máxima foi de 1g/L. A dose máxima de caseína foi de 0,25 g/L e a dose mínima foi de 0,05 g/L. As colas foram dissolvidas em água

destilada (0,5 g de bentonite em 10 mL e 1 g de caseína em 10 mL) e deixou-se homogeneizar durante 3 horas com agitador magnético. Em seguida, adicionou-se, a cada tubo de ensaio, a cola e tapou-se o tubo de ensaio com parafilme e agitou-se suavemente. Os tubos de ensaio foram deixados sem qualquer agitação e protegidos da luz durante 48 horas. Após esse período, recolheu-se cuidadosamente, com uma pipeta, da superfície um pequeno volume para se proceder à determinação dos parâmetros de cor, ao índice de Folin ao poder antioxidante.

2.3. Estudo da oxidação do vinho

Para o estudo de oxidação, imediatamente após a abertura das garrafas, cada vinho foi distribuído por três tubos de Falcon de 50 mL protegidos da luz. As medições foram feitas no primeiro dia, e nos terceiro, sétimo, décimo e décimo quinto dias. Para cada análise, foram recolhidos cerca de 22 mL com uma pipeta e analisados os valores de poder antioxidante, SO₂ livre e total, índice de Folin e parâmetros de cor.

2.4. Estudo da dinâmica da população de leveduras na fermentação

Neste estudo, foram usadas quatro leveduras disponíveis comercialmente: *Lachancea thermotolerans* (previamente *Kluyveromyces thermotolerans*) da Viniflora (CHR Hansen, Concerto), *Metschnikowia pulcherrima* da Excellence (Bio-naturae, Bioprotection, Amothe-abiet), *Saccharomyces cerevisiae* da Viniflora (CHR Hansen, Merit) e *Torulasporea delbrueckii* da Viniflora (CHR Hansen, Prelude).

Estas espécies de leveduras foram cultivadas em placas de Petri com meio YEPD (extrato de levedura 10 g/L, glicose 20 g/L, peptona 20 g/L e agar 20 g/L). Com o auxílio de uma ança efetuou-se um espalhamento das leveduras previamente hidratadas e depois incubou-se as placas invertidas na estufa a 30°C durante pelo menos 48 horas para que se pudessem formar colónias. Na câmara de fluxo laminar selecionou-se uma colónia e inoculou-se para tubos de 50 mL previamente cheios com 10 mL de meio YEDP líquido (composição igual ao anterior, mas sem agar); em seguida, transferiu-se um total 1.2×10^8 células de leveduras (1 unidade de densidade ótica = 3×10^7 células /mL) segundo as combinações das referidas leveduras (Tabela 6) para

balões de Erlenmeyer de 500 mL contendo 400 mL de meio YEDP com açúcar em concentrações semelhantes ao mosto de uvas (extrato de levedura 10 g/L, glicose 100 g/L, frutose 100 g/L e peptona 20 g/L).

Tabela 6 - Ensaio de fermentação e correspondentes leveduras, quer isoladas, quer em combinação com outras de diferentes espécies em cada balão de Erlenmeyer. O sinal (+) indica presença e o sinal (-) indica ausência).

Balão de Erlenmeyer	Espécie da levedura			
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
A	-	-	+	+
B	+	-	+	-
C	+	-	+	+
D	-	+	+	-
E	-	+	-	-
F	+	-	-	-
G	-	-	+	-
H	-	-	-	+

Para se colocar o mesmo número inicial de células mediu-se a densidade ótica em cada meio e, assim, foi possível determinar o volume correto a transferir de cada levedura, por forma a que a quantidade total fosse sempre constante e estivessem na proporção correspondente, ou seja, no ensaio de duas culturas, houvesse metade de cada, e no ensaio de três culturas houvesse um terço de cada uma delas. A fermentação foi realizada a 30°C e com agitação (Figura 16), tendo sido acompanhada pela medição de massa ao longo de vários ao longo do tempo até as 50h.



Figura 16 – Balões de Erlenmeyer a fermentar com agitação e à temperatura de 30°C

2.5. Análise hierárquica de agrupamentos (HCA – hierarchical Cluster analysis)

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) consiste num método quimiométrico que tem por finalidade reunir, através dum critério de classificação, os objetos em grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Assim, ocorrem sucessivas divisões do conjunto de dados e o resultado final é uma sequência de agrupamentos, que pode ser representado num dendrograma. Ao interligar os objetos pelas suas associações, no dendrograma produzido, os objetos semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupados entre si, sendo que, quanto menor for a distância entre os objetos, maior a semelhança entre eles. Este processo de associação ocorre até que todos os objetos pertençam apenas a um grupo. Há três métodos de agrupamento: classical, k – means e neighbour joining, neste trabalho o método seguido foi o clássico [58].

2.6. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta quimiométrica cuja ideia principal é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados com um grande número de variáveis inter-relacionadas, mantendo tanto quanto possível a variabilidade presente no conjunto de dados, o que permite extrair as informações mais relevantes para a sua interpretação.

Esta redução é possível com a transformação num novo conjunto de variáveis, as componentes principais, não correlacionadas. Assim, as variáveis originais são reescritas em novas variáveis, através de uma transformação de coordenadas. Esta transformação de coordenadas é um processo trivial quando efetuado através de matrizes, envolvendo a redução da dimensionalidade de grandes matrizes ou dados. As componentes principais, que são expressas como combinações lineares das variáveis originais, são ortogonais entre si e podem ser usadas para uma representação mais eficiente do sistema em estudo, com um número menor de variáveis do que na situação original. As coordenadas das amostras do novo sistema de referência, caracterizado pelas novas variáveis, são designadas por *scores*, enquanto que o coeficiente de

combinação linear que descreve cada componente principal (PC), isto é, os pesos das variáveis originais em cada PC, são denominadas por *loadings* (expressos pelos vetores próprios). Entre todas as possíveis combinações lineares, escolhem-se aquelas que apresentam a variância máxima, dado que as PC devem refletir, tanto quanto possível, as características dos dados.

Teoricamente, é possível determinar as PC, por ordem decrescente de contribuição para a variância total, sendo que normalmente é suficiente considerar as principais componentes e ainda manter a maior parte da variância. Existem vários critérios que podem ser usados para a escolha do número de PC: regra dos 80%, critério de Kaiser ($\lambda > 1$) e scree plot [59], [60].

2.7. Análise de variância (ANOVA)

A ANOVA é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada. Ou seja, dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais, permite uma distinção entre as contribuições puramente aleatória e sistemática.

Os pressupostos são que as distribuições em causa são normais e independentes e que há homogeneidade de variância (variabilidade interna).

Embora a ANOVA seja insensível à falta de homogeneidade interna, recomenda-se sempre um teste prévio de homogeneidade (teste de Cochran).

2.8. Teste de Tukey

O teste de Tukey compara diferenças entre as médias, testando toda e qualquer diferença entre duas médias. Este teste tem como base a diferença mínima significativa e é aplicado quando o teste de Fisher para tratamentos de ANOVA é significativo. O programa utilizado para realizar este teste foi o Graph Pad.

2.9. Coeficiente de correlação de Pearson

A medida de uso mais frequente para se estabelecer a associação entre duas variáveis quantitativas, X e Y, é o coeficiente de correlação, também chamado de coeficiente de correlação linear ou coeficiente de correlação de Pearson. Algumas das propriedades do coeficiente de correlação são: adimensionalidade, ou seja, o seu valor não é afetado pelas unidades de medida nas quais são expressas as variáveis X e Y (ao contrário da covariância); o seu valor está sempre compreendido entre -1 e 1; medida de um tipo específico de interdependência, designadamente, interdependência linear (o que significa que, havendo uma forte dependência entre duas variáveis quantitativas) [61].

Capítulo 3

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização de vinhos de diferentes regiões e de diferentes tipos

Efetuuou-se a caracterização de 31 vinhos de diferentes tipos, de oito regiões diferentes (Vinhos Verdes, Douro, Dão, Bairrada, Alentejo, Tejo, Lisboa e Península de Setúbal) e de diferentes tipos: quanto à cor (vinhos brancos, vinhos rosados e vinhos tintos) e quanto à concentração de açúcares (vinhos de mesa e licorosos) – ver

Tabela 7 - com o objetivo de concluir sobre as tendências e/ou agrupamentos de diferentes vinhos segundo região ou tipo e também, a partir do momento em que há tendências, tentar caracterizar cada região ou tipo de vinho. Para este fim, recorreu-se a análise multivariada, nomeadamente, HCA, PCA, ANOVA e teste de Tukey, tendo em conta três conjuntos de parâmetros: minerais (cálcio, potássio, cobre e ferro); glicose, frutose e álcool; poder antioxidante, compostos fenólicos, dióxido de enxofre e parâmetros de cor. Também se utilizou o coeficiente de correlação de Pearson para averiguar possíveis correlações entre os diferentes parâmetros.

Para todos os testes estatísticos, ajustaram-se alguns valores, aqueles que se verificou serem inferiores ao limite de deteção foram substituídos pela metade do valor do limite de deteção para cada parâmetro, sendo que os limites de deteção para o ferro, o cobre e a glicose são, respetivamente, 0,4 mg/L, 0,1 mg/L e 0,03 g/L.

Tabela 7 - Vinhos utilizados, a sua cor, nome, região, castas e teores de açúcar e álcool (para os vinhos brancos, rosados e tintos, utilizou-se os códigos VB, VR e VT, respetivamente).

Código	Cor	Açúcar	Álcool (%)	Nome	Região	Ano	Castas
VB1	branco	Seco	11	Casal da Eira Desperta sabores	Não definido	-	-
VB2	branco	Seco	13	Herdade do Peso	Alentejo	2016	Arinto, Roupeiro, Antão Vaz
VB3	branco	Meio seco	10	Urbe Augusta	Vinho Verde	-	-
VB4	branco	Meio seco	9	Gazela	Vinho Verde	-	-
VB5	branco	Meio doce	9,5	Contemporal	Lisboa	2016	Fernão Pires, Seara Nova, Malvasia
VB6	branco	Meio doce	11	Cacho Fresco	Tejo (Almeirim)	-	-
VB7	branco	Seco	13	Vinha Grande	Douro	2016	-
VB8	branco	Seco	12,5	Marquês de Marialva	Bairrada	2016	Arinto, Bical, Maria Gomes
VB9	branco	Seco	12,5	Grão Vasco	Dão	2016	Encruzado, Bical, Malvasia Fina
VB10	branco	Seco	12,5	Fontanário de Pegões	Península de Setúbal (Palmela)	2017	Fernão Pires, Arinto
VB11	branco	Meio doce	12	Contemporal	Bairrada	-	-
VB12	branco	Seco	12	Contemporal	Bairrada	-	-
VB13	branco	Meio doce	12	Contemporal	Bairrada	-	-
VR14	Rosado	Meio doce	11	Cacho Fresco	Tejo (Almeirim)	-	-
VR15	Rosado	Seco	12,5	Herdade do Peso	Alentejo	2016	Touriga Nacional
VR16	Rosado	Meio doce	9,5	Contemporal	Lisboa	2016	Castelão, Aragonez
VR17	Rosado	Meio doce	9,5	Gazela	Vinho Verde	-	-
VR18	Rosado	Seco	11,5	Vinha Grande	Douro	2016	-
VT19	Tinto	Seco	13,5	Fontanário de Pegões	Península de Setúbal (Palmela)	2016	Castelão, Touriga Nacional, Cabernet Sauvignon
VT20	Tinto	Seco	13	Marquês de Marialva	Bairrada	2014	Baga, Touriga Nacional, Aragonez
VT21	Tinto	Seco	14	Vinha Grande	Douro	2015	-
VT22	Tinto	Seco	10	Urbe Augusta	Vinho Verde	-	-
VT23	Tinto	Seco	13,5	Herdade do Peso	Alentejo	2015	Touriga Nacional, Aragonez, Syrah
VT24	Tinto	Meio seco	13	Grão Vasco	Dão	2016	Touriga Nacional, Tinta Roriz, Alfrocheiro
VT25	Tinto	seco	11,5	Casal da Eira	Não definido	-	-

Tabela 7 – (continuação)

Código	Cor	Açúcar	Álcool (%)	Nome	Região	Ano	Castas
VT26	Tinto	Licoroso	15	Jeropiga Paciência	Tejo (Alpiarça)	-	-
VB27	Branco	Licoroso (seco)	19,5	Porto, Quinta do Infantado	Douro	-	Gouveio, Rabigato, Viosinho, Moscatel Galego
VT28	Tinto	Licoroso (meio seco)	19,5	Porto, Quinta do Infantado, Ruby	Douro	-	-
VT29	Tinto	Licoroso (meio seco)	19,5	Porto, Quinta do Infantado, Tawny	Douro	-	-
VT30	tinto	Licoroso	19,5	Porto, Quinta do Infantado, João Lopes Roseira, reserva	Douro	-	-
VT31	tinto	Licoroso	19,5	Porto, Quinta do Infantado, Dona Margarida, reserva	Douro	-	-

3.1.1. Minerais

Os vários estudos que têm sido realizadas revelam que é possível, e de forma eficaz, diferenciar geograficamente vinhos através da sua composição em metais [62]–[64]. De facto, os minerais são o melhor parâmetro a considerar quando queremos diferenciar vinhos de acordo a origem geográfica devido à sua relação direta com a composição do solo [63], [64]. Da mesma forma, os minerais são considerados bons indicadores da origem do vinho visto que não são metabolizados nem modificados durante o processo de vinificação, à exceção do ferro e do cobre que costumam ser removidos [65]. Os metais mais frequentemente quantificados são: K, Na, Fe, Zn, Ca, Mg, Mn, Cu, Cr, Co, Sb, Cs, Br, Al, Ba, As, Li e Ag [65]. Também se tem observado que determinados metais são mais importantes do que outros consoante o caso em estudo [63], [64]. Por exemplo, um determinado estudo já foi possível diferenciar geograficamente vinhos espanhóis de vinhos das Ilhas Canárias apenas através da medição das concentrações de magnésio e sódio (tendo sido determinadas concentrações de 11 metais entre os quais cobre, ferro e cálcio) [63]. Por outro lado, por vezes, as informações que se obtêm através da medição de alguns metais

complementam informações que se obtêm da medição de outros metais; numa pesquisa realizada com vinhos brasileiros de três regiões diferentes, verificou-se que dentro de um conjunto de metais, o Rb e o Li revelaram ser os parâmetros mais eficazes para diferenciar os vinhos de uma determinada região em relação às outras, mas que o Mn era o melhor para diferenciar uma outra em relação às outras duas [62]. Assim, neste ensaio, o que se fez foi analisar a concentração de ferro, cobre, potássio e cálcio, metais que costumam ser medidos em análises de rotina no controle de qualidade para controlar turbidez, pois sabe-se que estes metais têm um papel importante na formação de casses, mas que neste trabalho foram utilizados não com esse intuito, mas com o intuito de tentar discriminar diferentes regiões vitivinícolas. Estes metais, não obstante a importância da sua medição durante o processo de produção, devido ao controle das casses, também têm sido bastante utilizados para discriminação de vinhos [63], [66]. Conhecer a origem geográfica do vinho é importante pois fornece-nos garantia de autenticidade, qualidade e tipicidade dos produtos. A autenticidade do vinho é uma questão cada vez mais importante no contexto atual de mercado de vinho globalizado [67] e a sua determinação por métodos analíticos tem como objetivo confirmar informações dos rótulos, sendo de grande interesse para a indústria e para o consumidor.

A Tabela 8 resume os valores obtidos para a concentração dos diferentes metais (potássio, ferro, cobre e cálcio) existente nos diferentes vinhos testados (Tabela 7).

Tabela 8 - Valores dos minerais em mg/L nos vinhos testados(- dados não indicados por falta de amostra, ** abaixo do limite de detecção)**

Código	Potássio (mg/L)	Ferro (mg/L)	Cobre (mg/L)	Cálcio (mg/L)
VB1	1268	4,212	0,06	41,4
VB2	924	0,578	0,08	55,2
VB3	1010	0,936	0,18	34,0
VB4	1095	4,668	0,06	51,9
VB5	838	2,848	0,09	51,6
VB6	920	6,063	0,07	42,8
VB7	677	0,072	0,09	46,3
VB8	1103	0,856	0,22	58,8
VB9	965	0,251	0,08	57,8
VB10	1309	0,935	0,08	37,6
VB11	1131	2,458	0,28	53,9
VB12	1107	2,531	0,25	51,6
VB13	1141	2,489	0,27	51,9
VR14	1057	3,404	0,08	50,4
VR15	747	0,189	0,07	47,1
VR16	841	2,801	0,32	52,1
VR17	1150	3,593	0,07	53,4
VR18	830	****	0,05	41,7
VT19	1682	3,260	0,04	51,4
VT20	1395	2,019	0,05	53,3
VT21	1568	0,149	****	41,7
VT22	1513	5,489	0,03	47,0
VT23	1492	1,736	0,06	47,1
VT24	1500	0,542	0,04	44,5
VT25	1464	5,150	0,06	43,5
VT26	1089	2,564	0,49	42,5
VT27	1188	0,473	0,19	43,0
VT28	1324	****	-	45,0
VT29	1372	****	-	39,3
VT30	1258	****	-	42,7
VT31	1285	0,221	-	40,0

O método pelo qual foram determinadas as concentrações encontra-se apresentada nos Anexos.

Duma forma geral, os vinhos tintos têm tendência para apresentar uma maior concentração de potássio (entre 1089 e 1682 mg/L) do que os vinhos brancos (entre 677 e 1309 mg/L) e os vinhos rosados têm concentrações intermédias (entre 747 e 1150 mg/L) (Tabela 8). A maior concentração de potássio no vinho tinto deve-se à maior participação da polpa no processo de produção, pois são geralmente utilizadas macerações mais longas. Isto é consequência dos catiões se encontrarem localizados,

principalmente, na parte sólida da uva, ou seja, na película, semente e polpa [68]. Por outro lado, a maior concentração de potássio em vinhos tintos relativamente aos vinhos brancos e vinhos rosados, deve-se à capacidade dos fenóis, que estão presentes em maiores quantidades nos vinhos tintos, inibirem a precipitação de bitartrato de potássio, dificultando a sua remoção durante a etapa de clarificação do vinho [41].

As concentrações de ferro são bastante inferiores às de potássio: entre 0,072 e 0,063 mg/L para os vinhos brancos, entre 0,189 e 3,593 mg/L para vinhos rosados e entre 0,149 e 5,489 para vinhos tintos (Tabela 8). Portanto, não há tanta diferença entre vinhos brancos e vinhos tintos como no que se refere à concentração de potássio. No caso das concentrações do cálcio e do cobre não há muita diferença entre os vinhos de diferentes cores. Para a concentração de cálcio os valores variam da seguinte forma: entre 34,0 e 58,8 mg/L para vinhos brancos, entre 41,7 e 53,4 mg/L para vinhos rosados e entre 39,30 e 53,3 mg/L para vinhos tintos (Tabela 8). Por outro lado, para o cobre tem-se para os vinhos brancos gama de 0,06 a 0,28 mg/L, para os vinhos rosados de 0,05 a 0,32 mg/L e para os vinhos tintos de 0,03 a 0,49 mg/L. Estes resultados vão ao encontro daquilo que é descrito na literatura, quantidades abundantes de potássio e de cálcio (de 10 mg/L a 1g/L) e concentrações baixas (de 0,1 mg/L a 10 mg/L) de cobre e ferro [44]

Para se observar possíveis tendências dos vinhos para agrupar consoante a região, procedeu-se a uma HCA, tendo como objeto de estudo apenas os vinhos de mesa do VB1 ao VT25 (ou seja, excluindo os vinhos licorosos). Para se obter o dendrograma da Figura 17, utilizou-se o programa Past tendo sido utilizado o método clássico de agrupamento. O algoritmo utilizado foi o “Paired Group (UPGMA)” e o índice de semelhança foi a distância euclidiana

Numa distância de 0,75, obtêm-se 3 agrupamentos e, quando se iminui para uma distancia de 0,45, obtêm-se 5 agrupamentos. Ao se reduzir ainda mais a distância para 0,35, obtêm-se 6 agrupamentos.

Numa distância de 0,75, num dado agrupamento, ficaram todos os vinhos do Douro (VB7, VR18 e VT21), os vinhos do Dão (VB9, VT24) e os vinhos do Alentejo, exceção do vinho tinto, (VB2 e VR15). Em outro agrupamento, ficaram todos os brancos da Bairrada (VB8, VB11, VB12 e VB13), sendo que o vinho tinto da Bairrada ficou de fora, ficando num terceiro agrupamento. Neste terceiro agrupamento, ficaram os vinhos verdes (VB4, VR17 e VT22), embora o vinho VB3 tenha ficado de fora (no agrupamento no qual ficaram os vinhos brancos da Bairrada), os vinhos do Tejo (VB6, VR14) e o vinho tinto VT23 do Alentejo. Portanto, da análise do dendrograma da Figura 17, retiram-se as seguintes ilações: é possível discriminar a Bairrada em relação às regiões Dão e Douro; a região do Douro apresenta-se diferenciada das regiões Tejo, Bairrada e Vinhos Verdes, não podendo ser distinguida do Alentejo nem do Dão; a região do Dão diferencia-se de Vinhos Verdes, do Tejo e da Bairrada, sendo que não é possível distingui-la do Douro ou Alentejo.

Quando se diminui a distância do corte, sendo o corte efetuado a 0.45, o agrupamento que continha os vinhos do Dão e do Douro divide-se em dois agrupamentos, ficando um dos agrupamentos constituído por três vinhos do Douro (VB7, VR18 e VT21), o vinho VB9 do Dão e o vinho VB2 do Alentejo, e outro agrupamento constituído pelo vinho VT24 do Dão, o VB2 do Alentejo e o VB10 da Península de Setúbal. Portanto, esta subdivisão resultante da diminuição da distância de corte não permitiu fazer discriminação entre a região do Douro e a região do Dão, havendo separação de vinhos da mesma região (Alentejo e Dão).

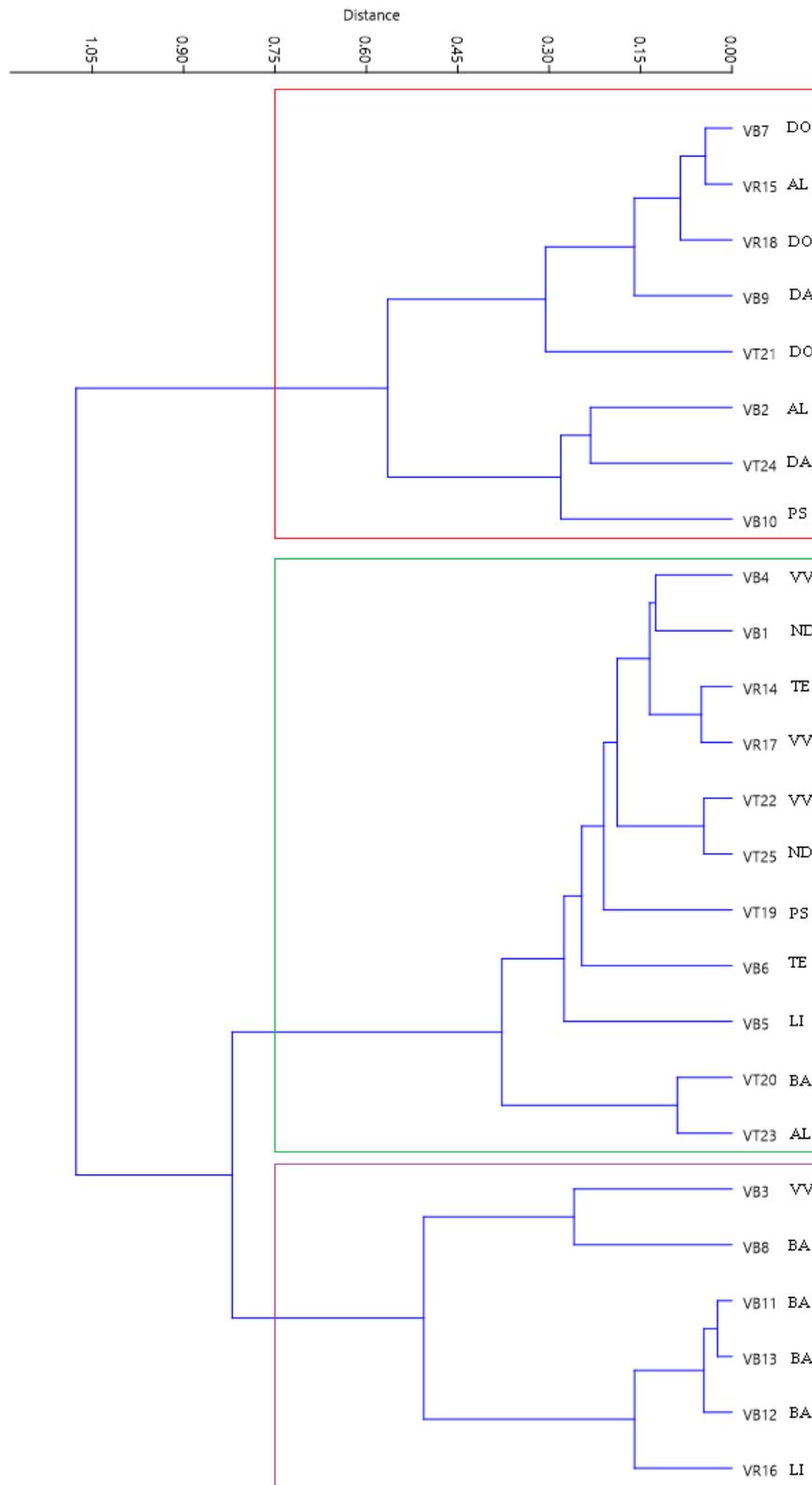


Figura 17 – Dendrograma dos vinhos baseado nas concentrações de cálcio, potássio, ferro e cobre (DO – Douro, DA – Dão, BA – Bairrada, VV – Vinhos Verdes, TE – Tejo, AL – Alentejo, LI – Lisboa, PS – Península de Setúbal, ND- Não definido)

Para se poder tirar mais ilações acerca da semelhança das amostras (proximidade umas das outras), realizou-se uma ordenação dos dados por PCA (Figura 18), utilizando-se o programa estatístico Past, de forma a visualizar mais facilmente possíveis semelhanças entre amostras, obtendo, assim, uma mais fácil interpretação dos resultados. Mais uma vez, consideraram-se apenas os vinhos de mesa (do VB1 ao VT25). Como os valores apresentavam diferentes ordens de grandeza, realizou-se uma transformação dos dados, através da logaritmização dos dados, para se obter dados normalizados. Antes dessa logaritmização, para as amostras para as quais os minerais não foram detetados, por estarem em concentrações abaixo do limite de deteção, considerou-se metade do valor do limite de deteção.

Na representação gráfica da Figura 18, podemos observar no eixo horizontal a componente 1 (PC1), ou seja, aquela cuja contribuição maior é do ferro e, no eixo vertical, a componente 2 (PC2), ou seja, aquela cuja contribuição maior é do cobre. Pelas direções dos vetores correspondentes ao ferro e ao cobre, conclui-se que estes dois parâmetros variam de forma praticamente independente pois são quase perpendiculares.

Ao analisar o gráfico da Figura 18, verifica-se que os vinhos de mesa do Douro, VT21, VR18 e VB7, são muito semelhantes, independentemente do seu tipo quanto à cor, pois têm composição tanto de ferro como de cobre muito similar (concentrações de ferro e de cobre mais baixas relativamente aos restantes vinhos). Os vinhos verdes (VT22, VB4, VR17 e VB3), independentemente da cor e da marca, também se revelaram muito semelhantes em relação à concentração de cobre e de ferro, à exceção do vinho VB3. O vinho VB3 destaca-se dos restantes vinhos verdes por ter maior concentração de cobre e menor concentração de ferro. De notar que o vinho branco VB3 é da marca Urbe Augusta, enquanto que o vinho branco VB4 e o vinho rosado VR17 são da marca Gazela, o que poderá justificar o afastamento no gráfico do vinho VB3 relativamente aos vinhos VB4 e VR17. O ferro presente no vinho tem origem nas uvas e nos solos, equipamento para vinificação, manuseio e transporte. Por sua vez, o cobre tem também origem na uva e nos solos, mas a maioria da sua concentração tem origem nos sprays de cobre utilizados para tratar as videiras com míldio. Por outro lado, o cobre é eliminado por redução, durante a fermentação e envelhecimento. Ou seja, as concentrações de cobre e de ferro no vinho são dependentes das uvas e dos solo,

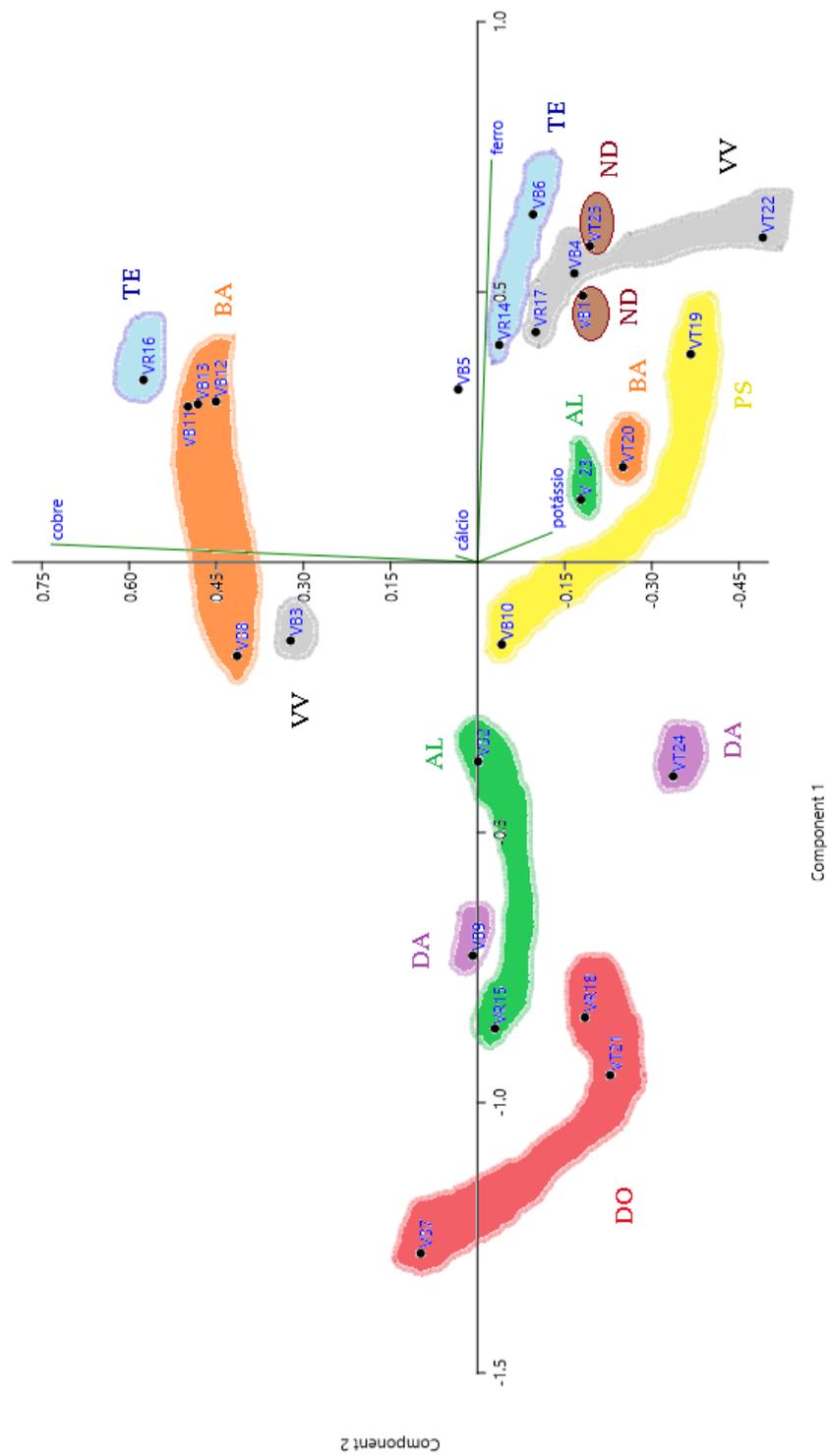


Figura 18 - Representação a duas dimensões das amostras de vinho, do VB1 ao VT25, no sistema de eixos PC1/PC2 com evidência das diferentes regiões vitivinícolas (DO –Douro, DA – Dão, BA – Bairrada, VV – Vinhos Verdes, TE –Tejo, AL – Alentejo, LI – Lisboa, PS – Península de Setúbal, ND- Não definido)

práticas fitossanitárias e ainda as condições de fermentação. Portanto, as quantidades de ferro e cobre devem ser mais semelhantes em vinhos da mesma região e produzidos de modo semelhante. Os vinhos que são produzidos de forma semelhante são: vinhos brancos e rosados (tempo de contacto com a película das uvas relativamente curto e fermentações curtas); vinhos tintos (tempo de contacto com as películas da uva longo e fermentações longas); vinhos da mesma marca [41]. Os vinhos brancos da Bairrada (VB8, VB11, VB12 e VB13) têm composição de cobre e de ferro muito semelhante e, portanto, são bem discriminados. O vinho tinto VT20 da Bairrada, embora tenha concentração de ferro e de cálcio muito semelhantes aos vinhos brancos da mesma região, ficou separado no gráfico dos restantes por apresentar uma concentração de cobre muito menor. Como já foi referido, o facto de o cobre ser eliminado por redução durante a fermentação pode ser a justificação para esta diferença visto que vinhos tintos têm tempo de fermentação mais prolongado do que vinhos brancos e rosados. De notar também que os dois vinhos de região vitivinícola não definida (um branco e outro tinto), que são da mesma marca (Casal da Eira), revelaram ser semelhantes, tanto na composição de ferro como de cobre, o que se justifica, mais uma vez, pelo facto de a mesma marca corresponder a práticas semelhantes de vinificação. Os vinhos do Alentejo, VB2, VR15 e VT23, com concentrações de cobre muito semelhantes, ficaram próximos uns dos outros no gráfico, o que indica que a região do Alentejo pode ser relativamente bem discriminada.

Como a contribuição de cada metal difere na discriminação das diferentes regiões e há metais que poderão influenciar mais do que outros para determinada região, procedeu-se a uma ANOVA (análise de variância) de um fator para os conjuntos da Tabela 9 (cada conjunto correspondente a uma região vitivinícola diferente) e teste de Tukey para cada metal, isoladamente, para compreender qual ou quais metais são melhores para diferenciar cada região.

Tabela 9 – Conjuntos de vinhos, correspondentes a cada região, utilizados para ANOVA e teste de Tukey tendo em conta a concentração dos minerais.

Regiões	Código dos vinhos
Bairrada	VB8, VB11, VB12, VB13, VT20
Douro	VB7, VR18, VT21
Vinhos Verdes	VB3, VB4, VR17, VT22
Alentejo	VB2, VR15, VT23

Assim, iremos reduzir o problema a 4 regiões: Bairrada, Douro, Vinhos Verdes e Alentejo. Estas regiões foram aquelas que revelaram ter mais tendência para serem discriminadas e também para as quais temos maior representatividade dos três tipos de vinho de mesa: vinhos brancos, vinhos rosados e vinhos tintos. Para este tratamento de dados utilizou-se programa Graph Pad. Os parâmetros considerados foram a concentração dos iões cálcio, potássio, ferro e cobre presente nos diferentes vinhos analisados. A análise da ANOVA permitir-nos-á concluir se existe, ou não, diferença entre conjuntos de vinhos de regiões diferentes; no entanto, tal análise não nos permitirá concluir sobre qual ou quais conjuntos diferem entre si. Por isso, usou-se o teste de Tukey para complementar a análise e, assim, saber qual (ou quais) os conjuntos que diferem. Os testes foram realizados a um nível de confiança de 95 %.

O potássio e o cálcio revelaram ser os metais menos eficientes para discriminar os vinhos por regiões, pois ao fazer ANOVA (ver Tabela 10), verificamos que a probabilidade de a hipótese nula ser aceite é superior a 0,05 (p-value = 0,8337 e 0,0918, respetivamente). Assim sendo, a hipótese nula é aceite. Isto significa que as variações existentes são aleatórias, ou, por outras palavras, o fator região não tem efeito nas amostras. A falta de diferença na concentração de cálcio dos vinhos entre regiões distintas está de acordo com aquilo que é descrito na literatura, por exemplo, Cabello-Pasini e colegas estudaram as concentrações de cálcio, potássio, sódio e magnésio em vários vinhos do mundo, observando que o cálcio apresentava os resultados mais semelhantes [69].

Ao considerar-se a concentração de ferro e de cobre em separado, verificou-se que a probabilidade de a hipótese nula ser aceite é inferior a 0,05 (p-value = 0,0096 e 0,0197, respetivamente); conseqüentemente, a hipótese nula é rejeitada e, portanto, há diferença significativa entre os conjuntos quando se consideram estes dois metais (Tabela 10). Ou seja, considerando a concentração de ferro e de cobre, consegue-se obter discriminação dos vinhos por regiões. De todos os minerais quantificados, aqueles

cuja concentração depende mais das práticas enológicas são o ferro e o cobre. As práticas que afetam a concentração do ferro são o equipamento utilizado e o envelhecimento do vinho. Por sua vez, a concentração de cobre depende da sua aplicação nas uvas como medida de tratamento do míldio, apesar de grande parte ser perdida na fermentação [41]. Os vinhos usados neste estudo têm origem em regiões geográficas diferentes e, simultaneamente, foram agrupados em tipos de vinhos semelhantes (vinhos de mesa), o que justifica ter sido possível alguma discriminação por regiões geográficas.

Tabela 10 - Resultados da ANOVA, de uma via, tendo em conta as concentrações de potássio, ferro, cobre e de cálcio, em separado, para os conjuntos Bairrada, Douro, Vinhos Verdes e Alentejo da Tabela 9.

Metal	potássio	ferro	cobre	cálcio
F	0,2872	6,288	5,02	2,769
p-value	0,8337	0,0096	0,0197	0,0918
p-value summary	ns	**	*	ns
Diferença significativa entre médias (p < 0.05)?	Não	Sim	Sim	Não
R²	0,07264	0,6317	0,5779	0,4303

(F- F de Fisher, ns – não tem significado, * - pouco significativo, ** - significativo, *** - muito significativo)

Quando comparamos as médias de concentração de potássio das diferentes regiões (

Figura 19), verificamos que há diferenças, mas essas diferenças, quando comparadas com a variabilidade dentro de cada conjunto (traduzida pelo desvio padrão), não têm significado, ou seja, os valores de um conjunto poderiam pertencer a outro conjunto (pois as distribuições estão muito sobrepostas).

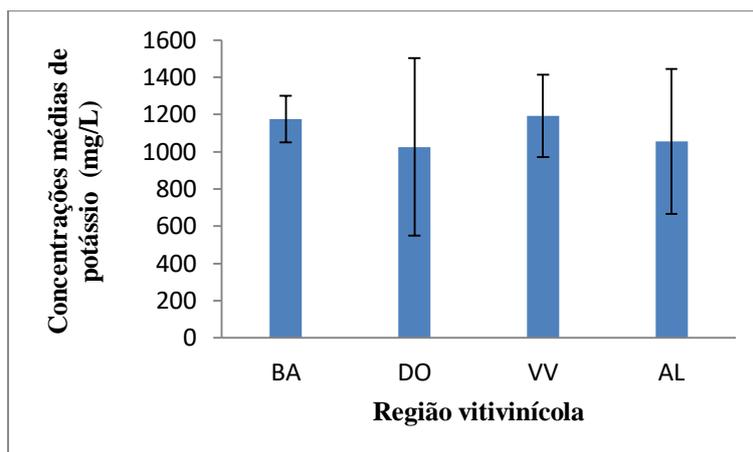


Figura 19 – Histograma das concentrações médias de potássio tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.

Relativamente às concentrações de cálcio, apesar de se observar pouca variabilidade dentro de cada conjunto (valores do desvio padrão são pequenos), os valores das médias das diferentes distribuições são próximos (Figura 20).

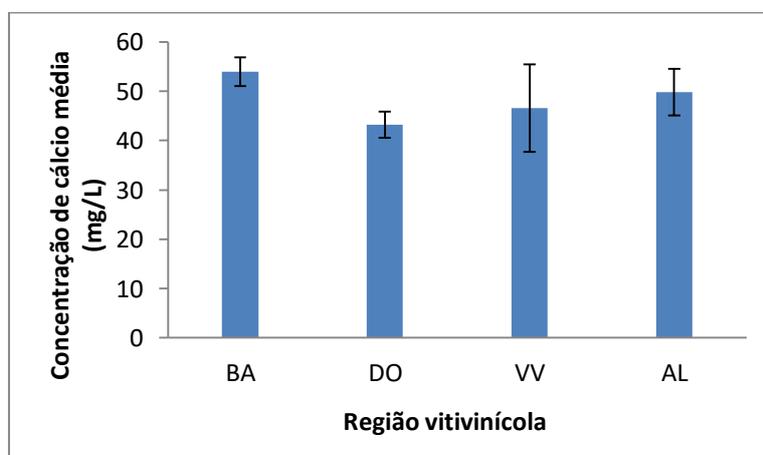


Figura 20 – Histograma das concentrações médias de cálcio tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.

Ao observarmos o histograma relativo às concentrações médias de cobre, verificamos que a região da Bairrada se destaca por ter uma concentração média maior do que as restantes regiões, embora o seu desvio padrão seja grande (Figura 21).

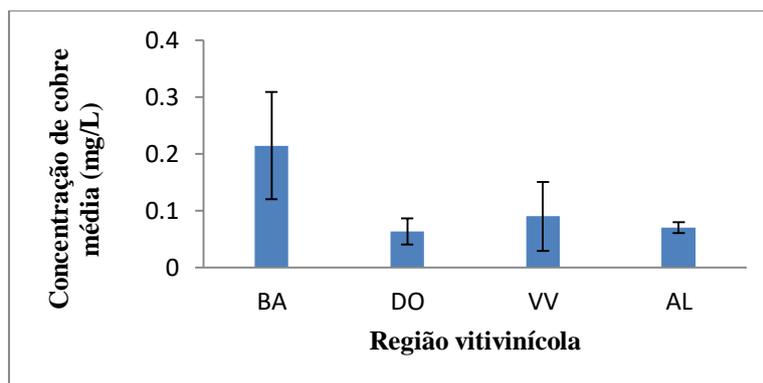


Figura 21 – Histograma das concentrações médias de cobre tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.

Ao compararmos as distribuições relativas às concentrações de ferro, verificamos que aquelas que estão mais afastadas entre si são as correspondentes ao Douro e a Vinhos Verdes (Figura 22).

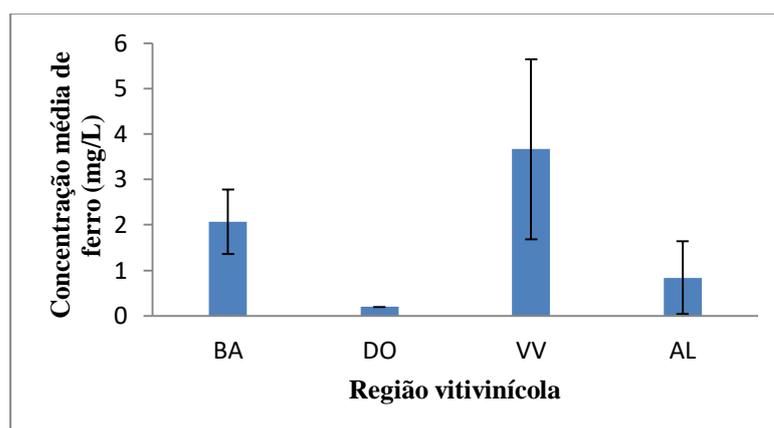


Figura 22 - Histograma das concentrações médias de ferro tendo em conta os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.

Os testes de Tukey realizados, tendo em conta os minerais potássio e cálcio, revelaram que os vinhos de diferentes regiões não diferem entre si. Entretanto, quando levamos em conta a concentração de ferro (Tabela 11), tanto os vinhos do Douro como os do Alentejo são distintos do conjunto de Vinhos Verdes, mas não se distinguem entre si.

Tabela 11 – Resumo do teste de Tukey tendo em conta a concentração de ferro para os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Estatisticamente significativo?	Sumário	p-value
BA vs DO	1,980	-0,5949 a 4,555	Não	ns	0,1537
BA vs VV	-1,601	-3,966 a 0,7646	Não	ns	0,2328
BA vs AL	1,236	-1,339 a 3,811	Não	ns	0,4996
DO vs VV	-3,581	-6,274 a -0,888	Sim	**	0,0096
DO vs AL	-0,744	-3,623 a 2,135	Não	ns	0,8629
VV vs AL	2,837	0,144 a 5,53	Sim	*	0,0382

(ns - não significativo, * - significativo e ** - muito significativo)

Ao fazer-se o teste de Tukey, quando levamos em conta a concentração de cobre, verifica-se que o conjunto de amostras do Douro é diferente do conjunto de amostras da Bairrada. No entanto, tanto o conjunto da Bairrada como o conjunto do Douro não diferem dos restantes conjuntos (Tabela 12).

Tabela 12 – Resultado do teste de Tukey tendo em conta a concentração de cobre para os conjuntos de vinhos da Tabela 9: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Estatisticamente significativo?	Sumário	p-value
BA vs DO	0,164	0,01286 a 0,3151	Sim	*	0,0326
BA vs VV	0,129	-0,009834 a 0,2678	Não	ns	0,0711
BA vs AL	0,144	-0,007143 a 0,2951	Não	ns	0,0633
DO vs VV	-0,035	-0,1931 a 0,1231	Não	ns	0,9075
DO vs AL	-0,020	-0,189 a 0,149	Não	ns	0,9837
VV vs AL	0,015	-0,1431 a 0,1731	Não	ns	0,9914

(ns - não significativo, * - significativo e ** - muito significativo)

3.1.2. Glicose, frutose e álcool

A quantidade de glicose e frutose no vinho depende das castas, do clima, do estado de maturação da uva e da vinificação, se ocorreu a fermentação completa ou se foram tomadas medidas para a evitar. O clima é muito importante, pois temperaturas elevadas permitem maior acumulação de açúcares na uva, assim como grandes amplitudes térmicas (baixas temperaturas à noite e elevadas de dia) e humidade. Antes do pintor, a razão glicose/frutose na uva é próxima de 4; no pintor é perto de 2, sendo que na maturidade se aproxima da unidade e, na sobrematuração, pode ter valores inferiores a um. Assim, vinhos com elevadas quantidades de frutose foram produzidos com uvas muito maduras, o que se observa no caso dos vinhos licorosos que têm quantidade de frutose muito superior à quantidade de glicose (além disso, as leveduras fermentam, preferencialmente, glicose) [70]. A quantidade de álcool no vinho tem a ver com a quantidade de glicose e frutose que a uva tinha, quanto maior quantidade de glicose e frutose na uva, maior quantidade de álcool provável terá o vinho [5].

Para este estudo utilizaram-se os vinhos do VB1 ao VT31 (Tabela 7). Os parâmetros glicose e glicose + frutose foram medidos através de um método enzimático, descrito no capítulo 2 . O parâmetro frutose foi determinado por diferença entre os dois parâmetros acima referidos. A Tabela 13 resume os resultados obtidos.

Tabela 13 - Valores de glicose, glicose + frutose e frutose e g/L

Código	Glicose (g/L)	Glicose + frutose (g/L)	Frutose (g/L)	Álcool (%)
VB1	****	0,20	0,20	11
VB2	****	0,50	0,50	13
VB3	7,10	10,62	3,53	10
VB4	4,16	5,87	1,71	9
VB5	8,38	13,28	4,90	9,5
VB6	9,85	14,92	5,07	11
VB7	****	0,51	0,51	13
VB8	****	1,54	1,54	12,5
VB9	0,19	2,04	1,85	12,5
VB10	1,16	3,27	2,11	12,5
VB11	14,49	24,43	9,93	12
VB12	0,95	3,01	2,06	12
VB13	19,06	36,13	17,08	12
VR14	10,26	16,56	6,29	11
VR15	****	0,50	0,50	12,5
VR16	9,19	14,37	5,18	9,5
VR17	6,54	13,55	7,01	9,5
VR18	****	0,33	0,33	11,5
VT19	0,25	2,00	1,74	13,5
VT20	0,92	3,16	2,24	13
VT21	****	0,86	0,86	14
VT22	****	0,10	0,10	10
VT23	****	0,91	0,91	13,5
VT24	2,45	4,61	2,17	13
VT25	****	0,94	0,94	11,5
VT26	17,69	81,75	64,05	15
VB27	13,46	44,70	31,24	19,5
VT28	14,37	64,93	50,57	19,5
VT29	17,54	82,76	65,22	19,5
VT30	14,22	64,58	50,35	19,5
VT31	16,20	80,41	64,21	19,5

(**** - abaixo do limite de detecção)

Para facilitar a interpretação dos dados realizou-se uma HCA, tendo em conta todos os vinhos da Tabela 13 (Figura 23). Numa distância de 2,5, obtêm-se dois agrupamentos, um deles composto pelos vinhos do Alentejo (VB2, VR15 e VT23), pelos vinhos de mesa do Douro (VB7, VR18 e VT21), o vinho VB8 da Bairrada, o vinho VT22 de Vinhos Verdes e o vinho VB1 de região não definida. O outro agrupamento contém os restantes vinhos de mesa e os vinhos licorosos. Portanto, os vinhos de mesa do Alentejo e do Douro parecem destacar-se da maioria dos restantes vinhos. Dadas as características especiais dos vinhos licorosos (glicose, frutose e álcool muito elevados relativamente aos restantes vinhos analisados), seria expectável que fossem esses a destacar-se dos restantes vinhos, o que não se verificou. Numa distância de 1,4 obtêm-se três agrupamentos. Ao reduzirmos a distância de 2,5 para 1,4, o agrupamento que englobava os licorosos divide-se em dois agrupamentos diferentes, sendo um deles constituído pelos vinhos licorosos, os vinhos de Lisboa (VB5 e VR16), os vinhos do Tejo (VB6 e VR 14), dois vinhos verdes (VB3 e VR17) e dois vinhos da Bairrada (VB11 e VB13). Portanto, ao diminuir a distância, os vinhos licorosos ainda não se conseguem discriminar. Numa distância de 0,6, obtêm-se seis agrupamentos, sendo um composto apenas pelos vinhos licorosos, outro pelos vinhos de mesa do Alentejo e do Douro e um vinho da Bairrada (VB8) e ainda um outro no qual ficaram os vinhos de Lisboa e do Tejo, o vinho branco e o vinho rosado de Vinhos Verdes (VB3 e VR17) e dois vinhos brancos da Bairrada (VB11 e VB13). Portanto, o Alentejo e o Douro distinguem-se de todas as outras regiões à exceção da Bairrada, embora não se consigam diferenciar entre si. Estas elevadas concentrações são justificadas pelo modo de produção de vinhos licorosos/fortificados em que a fermentação da levedura é interrompida por fortificação com álcool, aquando o metabolismo de cerca de 50% do açúcar total da uva, resultando em um produto com 18 a 20% v / v de álcool e cerca de 40 g/L de glicose e 70 g/L de frutose. O valor da concentração de frutose ser muito superior ao da concentração de glicose deve-se ao facto de as leveduras preferirem fermentar glicose em vez de frutose. Também é possível distinguir tanto Lisboa como o Tejo das regiões Dão e Península de Setúbal, pois os vinhos de Lisboa e do Tejo ficaram num mesmo agrupamento e separados dos vinhos do Dão e Península de Setúbal. O facto de não ser possível distinguir vinhos da região do Alentejo da região do Douro pode ser explicada pela semelhança do clima nestas regiões, que se

caracteriza por regimes de precipitação baixos, o que leva as videiras a estarem sujeitas a um elevado défice hídrico potencial e a verões de temperaturas elevadas [71].

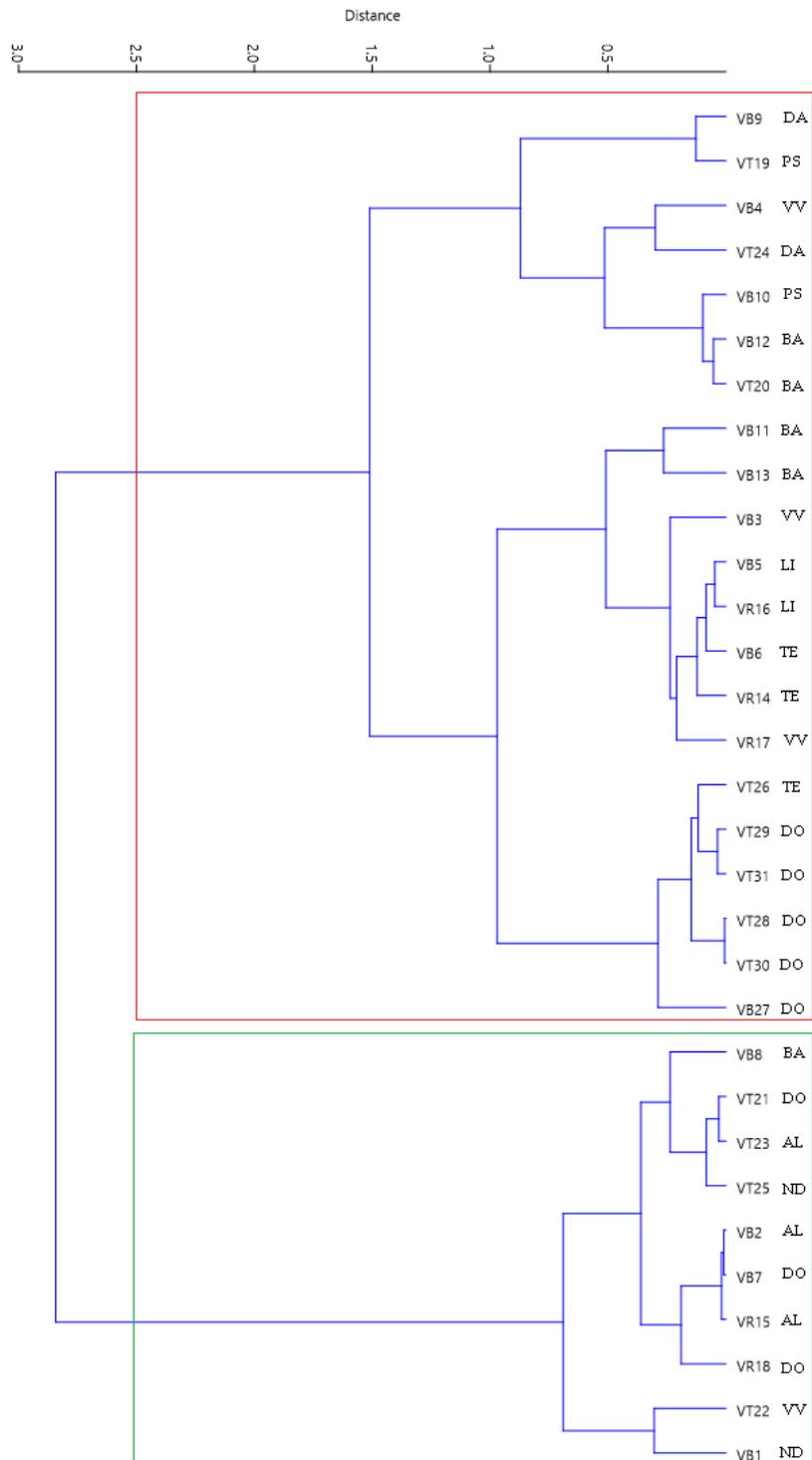


Figura 23 – Dendrograma dos vinhos do VB1 ao VT31 tendo em conta os valores de concentração de glicose, frutose e álcool. (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes, LI – Lisboa, TE – Tejo, PS – Península de Setúbal, DA – Dão, AL – Alentejo e ND – Não definida).

Realizou-se análise PCA para as características, glicose, frutose e álcool (Figura 24). Os vinhos brancos e rosados de Vinhos Verdes (VB3, VB4 e VR17), Lisboa (VB5 e VR16) e Tejo (VB6 e VR14) destacam-se pela sua menor quantidade de glicose (sendo classificados alguns como meio secos e outros como meio doces) relativamente aos vinhos das demais regiões. Também os vinhos do Alentejo (VB2, VR15 e VT23) e do Douro (VB7 e VT21), independentemente da sua cor, puderam ser bem discriminados relativamente às outras regiões. Portanto, os vinhos do Alentejo e do Douro distinguem-se muito bem dos vinhos de Lisboa e do Tejo e dos vinhos brancos e rosados de Vinhos Verdes. Os vinhos licorosos (VB27, VT28, VT29, VT30, VT31 e VT26), sendo provenientes da região do Douro (à exceção do VT26 que é proveniente do Tejo), caracterizam-se por ter um elevado grau de álcool, de glicose e, particularmente, de frutose, devendo ser analisados em separado, devido às suas características muito próprias. O menor teor alcoólico no caso dos vinhos verdes explica-se facilmente porque o clima na região Vinho Verde, as castas usadas e as práticas de viticultura com videiras extremamente vigorosas, resultam em uvas com ácido málico extraordinariamente alto e níveis de açúcar relativamente baixos, levando à produção de vinhos com baixo teor de álcool e baixa concentração de glicose e frutose [7]. Os vinhos da Península de Setúbal (VB10 e VT19) e do Dão (VB9) apresentam valores intermédios dos três parâmetros. Estas observações vão ao encontro das observações feitas na HCA: vinhos do Alentejo e do Douro não se distinguem entre si, mas distinguem-se dos restantes vinhos; os vinhos de Lisboa e Tejo são semelhantes; os vinhos licorosos distinguem-se bem dos restantes vinhos; a Bairrada não se distingue de nenhuma das outras regiões, tendo vinhos espalhados perto de todas as regiões. Quando olhamos para a Figura 24, vemos que vinhos do Alentejo e do Douro não se distinguem e, por outro lado, os vinhos de Lisboa e Tejo estão muito próximos, entre si, e também de Vinhos Verdes. Ao observarmos o mapa da Figura 3, conseguimos compreender melhor esta associação, através da posição das regiões vitivinícolas do mapa. Vinhos Verdes, Lisboa e Tejo estão mais próximos do litoral, enquanto que Douro e Alentejo estão mais localizados no interior. Assim, os climas do Alentejo e Douro vão ser semelhantes, verões quentes, que favorecem a acumulação de açúcares e clima seco, que faz com que a absorção de água pela videira seja menor e, conseqüentemente, a concentração de açúcares na uva seja maior. Por outro lado, o clima moderado e a maior

humidade de Lisboa, Tejo e Vinhos Verdes proporciona acumulação de açúcares reduzida. O facto de os vinhos de Vinhos Verdes apresentarem maior quantidade de açúcar significa que durante a sua produção a fermentação não foi completa, o que se poder dever aos próprios produtores recorrerem a essa prática de forma a mascarar a maior acidez característica das uvas dessa região [7], [71]–[73].

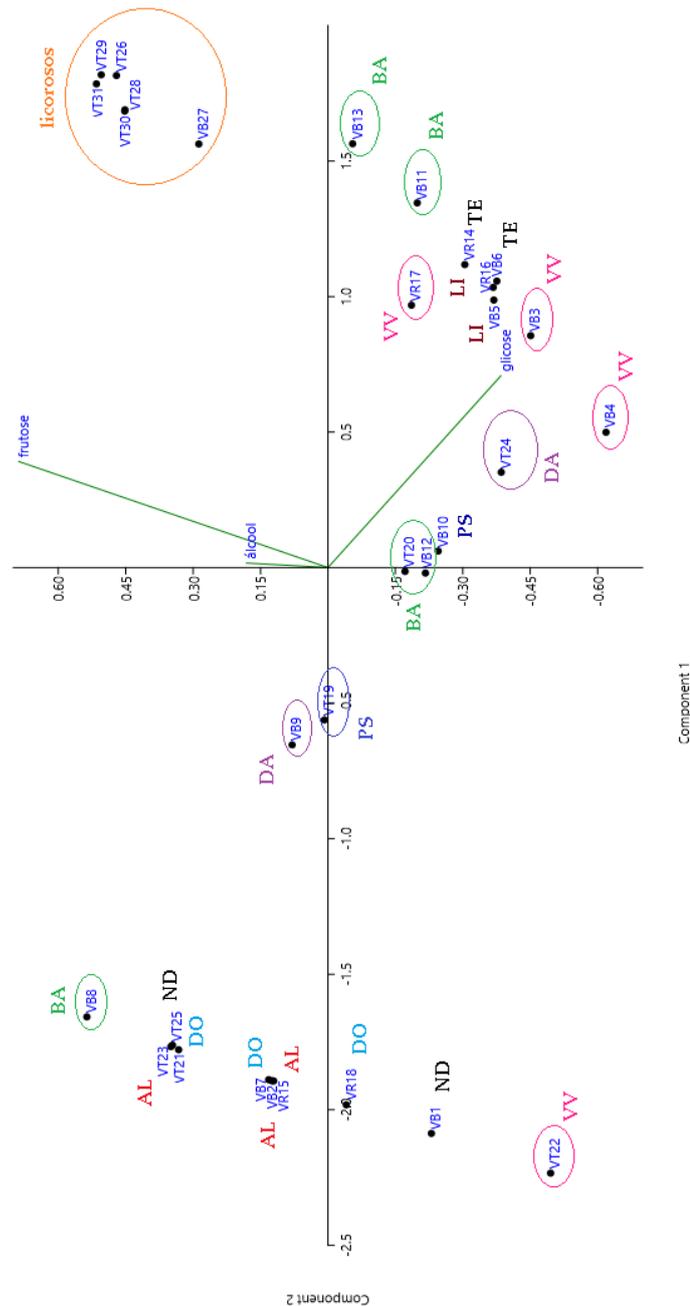


Figura 24 - Representação a duas dimensões das amostras dos vinhos do VB1 ao VT31, sistema de eixos PC1/PC2, tendo em conta os parâmetros glicose, frutose e álcool (VV – Vinhos Verdes, AL – Alentejo, DO – Douro, BA – Bairrada, PS – Península de Setúbal, DA – Dão, LI – Lisboa, TE – Tejo, ND – Não definida).

Mais uma vez, por uma questão de representatividade, irá realizar-se ANOVA tendo em conta as regiões vitivinícolas: Bairrada, Douro, Vinhos Verdes e Alentejo. Os vinhos utilizados para esta análise estão na Tabela 14.

Tabela 14 – Conjunto de vinhos, correspondentes a cada região, utilizados para ANOVA e teste de Tukey, tendo em conta concentrações de glicose, frutose e álcool.

Regiões	Código dos vinhos
Bairrada	VB8, VB11, VB12, VB13, VT20
Douro	VB7, VR18, VT21, VB27, VT28, VT29, VT30, VT31
Vinhos Verdes	VB3, VB4, VR17, VT22
Alentejo	VB2, VR15, VT23

Ao considerar-se a concentração de glicose, frutose e glicose+frutose, isoladamente, através da análise de variância ANOVA, verifica-se que não há diferença significativa entre os conjuntos de diferentes regiões (Tabela 15). Esta informação, à primeira vista, não vai ao encontro com as ilações tiradas por observação da Figura 24, pois os vinhos parecem estar separados, mas, de facto, ao visualizarmos a projeção dos vinhos tanto no vetor glicose como no vetor frutose, verificamos que as amostras de diferentes regiões se espalham de forma homogénea ao longo desses vetores. Então, os resultados da ANOVA não estão a contradizer os resultados do PCA .

Por outro lado, ao considerar-se o teor de álcool, observa-se que há diferença entre os conjuntos.

Tabela 15 - Resultados da análise ANOVA, de uma via, tendo em conta as concentrações de glicose, frutose e glicose+frutose, em separado para os conjuntos de regiões apresentados na Tabela 14.

Parâmetros	Glicose	Frutose	Glicose+Frutose	Álcool
F	1,444	2,16	3,009	9,931
p-value	0,2670	0,1282	0,0611	0,0006
p-value summary	ns	ns	ns	***
Diferença significativa entre médias (p< 0.05)?	Não	Não	Não	Sim
R ²	0,2131	0,2647	0,3607	0,6506

(F- F de Fisher, ns – não significativo e *** - muito significativo)

Apesar das médias dos conjuntos serem um pouco diferentes, os desvios padrão das distribuições das concentrações de glicose são grandes (Figura 25), o que significa que as distribuições se sobrepõem, não sendo possível diferenciá-las entre si.

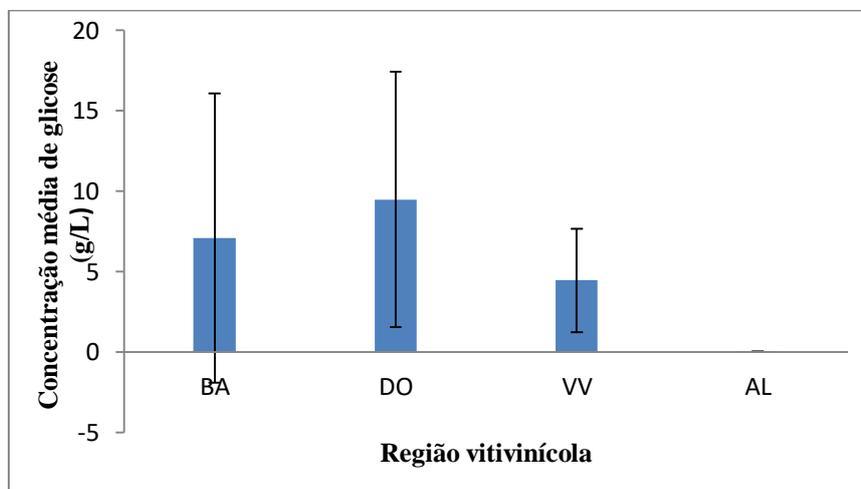


Figura 25 – Histograma das concentrações médias de glicose tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)

Os vinhos do Douro apresentam valores de glicose + frutose muito superiores aos restantes vinhos (Figura 26). No entanto, o desvio padrão correspondente à distribuição dos vinhos do Douro é muito grande, o que faz com que não seja possível discriminar os vinhos do Douro quando consideramos as concentrações de glicose + frutose.

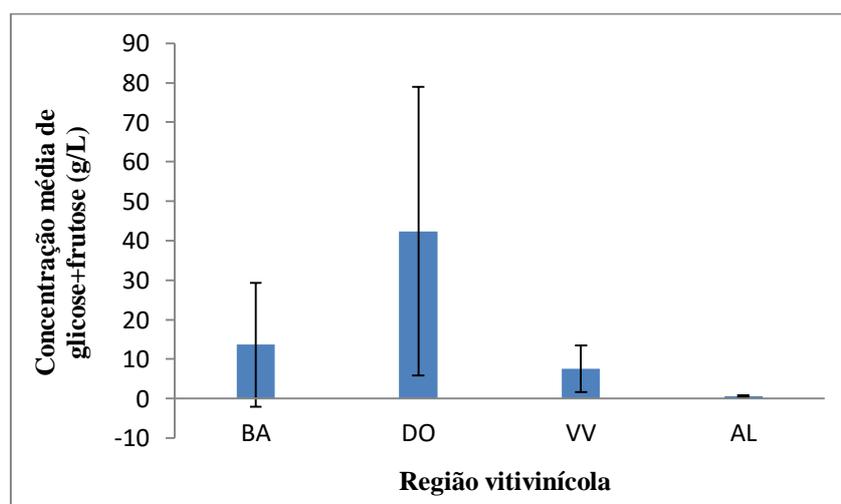


Figura 26 - Histograma das concentrações médias de glicose + frutose tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)

Na Figura 27, observa-se que também para a distribuição de concentrações de frutose dos vinhos do Douro o desvio padrão é muito grande.

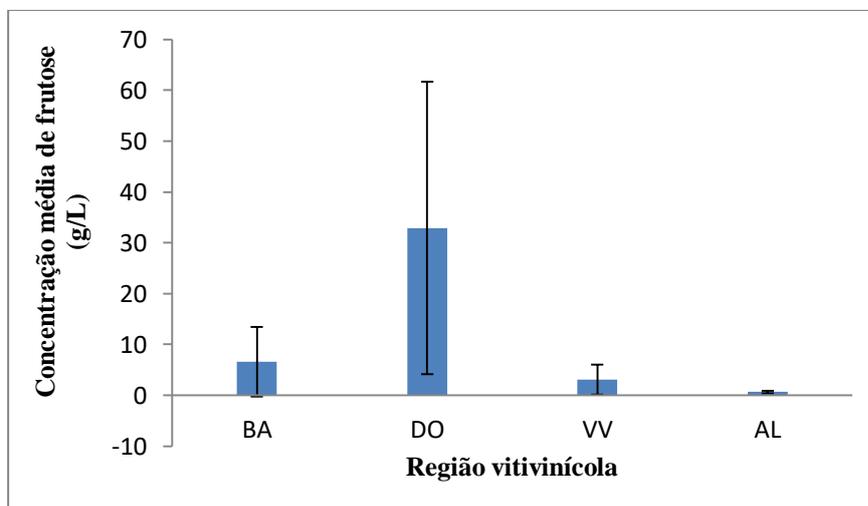


Figura 27 - Histograma das concentrações médias de frutose tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)

Quando consideramos as distribuições das concentrações de álcool para cada região, verificamos que os desvios padrão correspondentes à Bairrada, Vinhos Verdes e Alentejo, são muito pequenos (Figura 28). O desvio padrão correspondente à distribuição dos vinhos do Douro é um pouco maior, mas a média correspondente também é bastante superior, daí já seja possível uma distinção entre regiões.

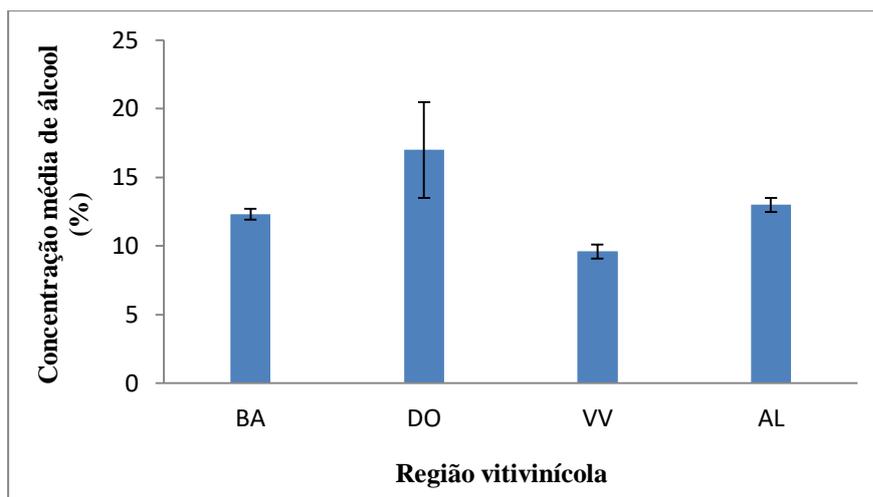


Figura 28 - Histograma das concentrações médias de álcool tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo)

Através do teste de Tukey (Tabela 16), tendo em conta a concentração de álcool, conclui-se que o conjunto de vinhos do Douro é diferente do conjunto de vinhos de Vinhos Verdes e do conjunto de vinhos da Bairrada, não sendo distinguível do Alentejo, o que confirma as ilações anteriores.

Tabela 16 – Resultados do teste de Tukey, tendo em conta a concentração de álcool para os conjuntos da Tabela 14: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo.

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Estatisticamente significativo?	Sumário	p-value
BA vs DO	- 4,7	-8,536 a -0,8643	Sim	*	0,0140
BA vs VV	2,675	-1,838 a 7,188	Não	ns	0,3578
BA vs AL	-0,7	-5,614 a 4,214	Não	ns	0,9764
DO vs VV	7,375	3,255 a 11,5	Sim	***	0,0005
DO vs AL	4	-0,555 a 8,555	Não	ns	0,0959
VV vs AL	-3,375	-8,514 a 1,764	Não	ns	0,2753

(F- F de Fisher, ns – não significativo, * - significativo e *** - muito significativo)

Isto pode ser justificado pelo facto de no conjunto de vinhos do Douro estarem incluídos os licorosos que têm teor de álcool muito elevado, fazendo, desta forma, o que faz aumentar a média do conjunto. Por outro lado, os Vinhos Verdes têm tipicamente

teores mais baixos de álcool porque as uvas não atingem um estado de maturação avançado, devido ao clima, o que dá origem a vinhos com pouco álcool. Portanto, seria expectável esta diferença significativa entre o conjunto dos Vinhos Verdes e o conjunto de vinhos do Douro.

Para se confirmar que esta diferença não se deve apenas à presença dos vinhos licorosos no nosso universo, repetiu-se o teste ANOVA, considerando a concentração de álcool, desta vez, retirando os vinhos licorosos. Ao se retirar os licorosos do conjunto dos vinhos do Douro, verifica-se que continua a haver diferença entre os conjuntos (ver Tabela 17).

Tabela 17 – Resumo da ANOVA, de uma via, tendo em conta a concentração de álcool para os conjuntos da Tabela 14: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo, com exclusão dos vinhos licorosos, VT26 e VT31.

Parâmetros	Álcool
F	19,69
p-value	<0,0001
p-value summary	****
Diferença significativa entre médias ($p < 0.05$)?	Sim
R ²	0,843

(F- F de Fisher e **** - bastante significativo)

Através do teste de Tukey, que está resumido na Tabela 18, verifica-se que ao excluir os vinhos licorosos, o Douro não é discriminado, mas sim Vinhos Verdes, ou seja, Vinhos Verdes destaca-se da Bairrada, do Douro e do Alentejo. De facto, tendo em conta o teor de álcool, observando a

Tabela 7 e o gráfico PCA da Figura 24, verificamos que os vinhos verdes são aqueles que apresentam menores concentrações de álcool relativamente aos restantes vinhos de outras regiões.

Tabela 18 – Teste de Tukey, tendo em conta a concentração de álcool, para os conjuntos da Tabela 14: BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo, com exclusão dos vinhos licorosos, VT26 e VT31.

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Tem significado?	Sumário	p-value
BA vs DO	-0,5333	-2,038 a 0,9711	Não	ns	0,7156
BA vs VV	2,675	1,293 a 4,057	Sim	***	0,0006
BA vs AL	-0,7	-2,204 a 0,8045	Não	ns	0,5244
DO vs VV	3,208	1,635 a 4,782	Sim	***	0,0004
DO vs AL	-0,1667	-1,849 a 1,515	Não	ns	0,9903
VV vs AL	-3,375	-4,948 a -1,802	Sim	***	0,0002

(F- F de Fisher, ns – não significativo, * - significativo e *** - muito significativo)

Ao retirarmos os vinhos licorosos do estudo, verificamos que a que mais se afasta das outra é a correspondente aos vinhos verdes (Figura 29).

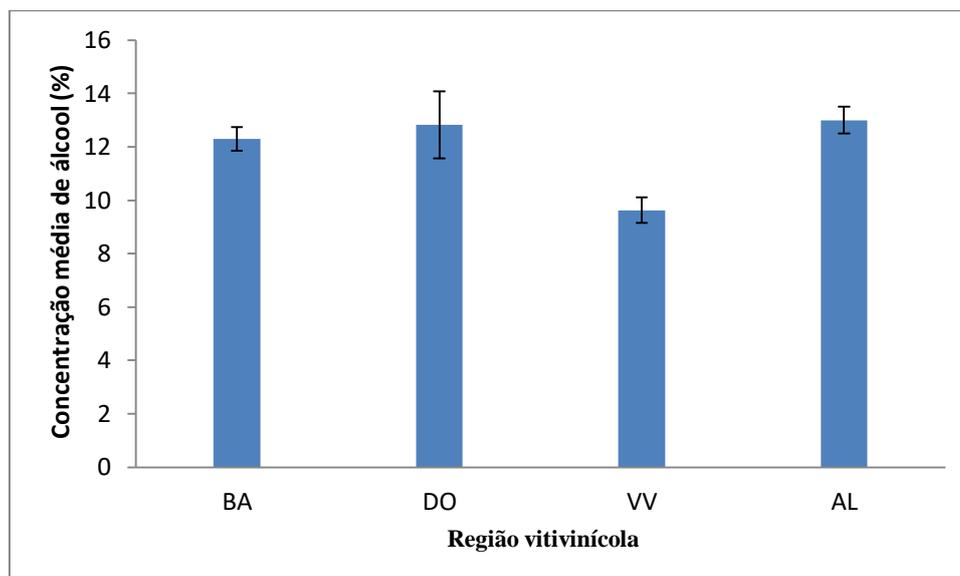


Figura 29 - Histograma das concentrações médias de álcool tendo em conta os conjuntos de vinhos (BA – Bairrada, DO – Douro, VV – Vinhos Verdes e AL – Alentejo), com exclusão dos vinhos licorosos

3.1.3. Poder antioxidante, compostos fenólicos, dióxido de enxofre e cor

O vinho possui uma elevada quantidade de compostos com características antioxidantes, sendo que a maior parte é proveniente da uva, como, por exemplo compostos fenólicos (nomeadamente, estilbenos, como licopeno e β - caroteno), vitamina A e vitamina E, ácido lipóico, entre outros. Fontes adicionais destes compostos são os barris de carvalho, utilizados para envelhecimento do vinho; os micro-organismos, responsáveis pela produção de compostos fenólicos de tamanho pequeno, como o tirosol e o 4-etilfenol; adição de conservantes no vinho como dióxido de enxofre e ácido ascórbico (vitamina C) [74]. Os compostos que mais contribuem para o poder antioxidante são os compostos fenólicos. Por outro lado, as propriedades cromáticas, traduzidas pelos parâmetros a^* , b^* e L^* , são um reflexo dos constituintes do vinho. Quanto mais negativos forem os valores do parâmetro a^* , maior a intensidade da coloração verde no vinho e, quanto mais positivos forem, maior a intensidade da coloração vermelha. Os mostos de vinho branco contêm traços de clorofila, caroteno e xantofila. Por vezes, determinadas castas de uva branca, quando se desenvolvem em climas frios, retêm alguns derivados de clorofila. Assim, os vinhos brancos podem apresentar, além da gama mais comum que varia do praticamente incolor ao âmbar, coloração verde. A extração de coloração vermelha no vinho depende da casta, da região, da maturidade e da condição física do fruto (maciez do bago, presença de fungos e tratamento físico que lhe é aplicado). Há castas que têm a maioria das antocianinas presentes na forma de glicosídeo e, assim, é mais fácil a sua extração. Por outro lado, as castas tintureiras têm os seus pigmentos presentes na polpa, estando estes, assim, facilmente acessíveis [10]. A coloração vermelha, no vinho, está diretamente relacionada com a sua concentração de antocininas.

Neste capítulo, o nosso estudo debruçou-se sobre parâmetros que estão ligados entre si, portanto, é de se esperar que ao considerarmos estes parâmetros, os vinhos sejam discriminados consoante o seu tipo quanto à cor e consoante o processo de vinificação.

Para este estudo, utilizaram-se os vinhos do VB1 ao VT31 (

Tabela 7). Os parâmetros índice de Folin, antocianinas, poder antioxidante, SO_2 livre e total e propriedades cromáticas foram medidos. A Tabela 19 e a Tabela 20 resumem os resultados obtidos.

Tabela 19 – Valores do poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e SO₂ livre e total

Código do vinho	Poder antioxidante (mg de quercetina/L)	Índice de Folin (g de ácido gálico/L)	Antocianinas (mg/L)	SO₂ livre	SO₂ total
VB1	373,2	0,227	2	34	161
VB2	283,2	0,240	1	50	139
VB3	232,5	0,251	1	43	261
VB4	273,8	0,255	1	41	235
VB5	282,3	0,218	2	48	160
VB6	308,2	0,268	1	46	190
VB7	388,0	0,289	2	54	148
VB8	264,7	0,191	0,1	14	146
VB9	331,7	0,232	1	46	129
VB10	333,2	0,255	2	55	148
VB11	295,7	0,239	3	5	96
VB12	331,8	0,253	4	27	157
VB13	275,0	0,260	3	5	110
VR14	520,3	0,462	81	28	100
VR15	301,0	0,321	15	45	135
VR16	346,0	0,329	20	37	112
VR17	472,0	0,501	47	65	166
VR18	380,7	0,347	21	46	105
VT19	3761,7	2,388	382	34	148
VT20	2761,7	1,412	443	37	121
VT21	3565,0	2,761	527	19	62
VT22	3150,0	2,264	485	20	110
VT23	2916,7	2,246	376	21	85
VT24	3593,3	2,202	451	24	70
VT25	2528,3	1,353	145	3	88
VT26	560,0	0,017	42	4	14
VB27	381,5	0,548	14	232	*
VT28	1991,7	1,755	354	134	*
VT29	911,7	0,603	120	396	*
VT30	2250,0	1,939	429	271	*
VT31	611,7	0,398	74	379	*

* - não há dados por falta de amostra

Tabela 20 – Parâmetros da cor em coordenadas CIELAB dos diferentes vinhos de diferentes regiões utilizados neste estudo.

Código do vinho	L*	a*	b*
VB1	88,5	2,30	14,93
VB2	96,0	-3,28	24,17
VB3	97,0	-1,90	10,24
VB4	98,2	-2,37	13,23
VB5	96,0	-2,17	12,76
VB6	97,1	-3,03	18,11
VB7	96,1	-2,73	21,31
VB8	97,0	-1,84	13,56
VB9	96,6	-1,98	15,31
VB10	94,5	-2,27	24,12
VB11	88,8	-1,11	33,70
VB12	94,0	-2,16	26,22
VB13	90,9	-1,60	30,27
VR14	83,7	16,12	13,70
VR15	93,5	6,21	6,98
VR16	91,9	7,48	7,91
VR17	89,7	10,05	8,92
VR18	93,4	6,93	7,44
VT19	23,5	48,02	26,94
VT20	26,0	51,75	30,53
VT21	-2,6	10,32	-15,36
VT22	7,9	42,45	3,99
VT23	15,4	45,10	16,43
VT24	14,4	44,56	14,69
VT25	19,6	41,29	20,53
VT26	62,8	29,59	27,34
VB27	61,7	31,85	79,74
VT28	5,7	40,97	0,53
VT29	33,7	49,13	43,27
VT30	1,9	32,70	-6,51
VT31	42,1	45,39	51,15

Da observação da Tabela 21, pelos valores do coeficiente de correlação de Pearson conclui-se, por exemplo, que, de acordo com o valor 0.9708 do coeficiente de correlação de Pearson entre o poder antioxidante e o índice de folin que, existe um grau de associação positiva, muito elevado, entre eles. Entre o parâmetro L* e o poder antioxidante também há uma associação negativa forte, ou seja, quando um aumenta, o outro diminui (coeficiente de Pearson de - 0.8971). Já o dióxido de enxofre livre e o poder antioxidante quase não têm correlação (coeficiente de Pearson de - 0.0638).

Tabela 21 – Matriz de Correlação (de Pearson), tendo como base os valores apresentados nas tabelas 19 e 20 nas Tabelas Tabela 19 e a Tabela 20.

	Poder antioxidante	Índice de Folin	Antocianinas	SO₂ livre	L*	a*	b*
Poder antioxidante	1,0000	0,9708	0,9516	-0,0638	-0,8971	0,7204	-0,2706
Índice de Folin	0,9708	1,0000	0,9623	-0,0038	-0,9015	0,6643	-0,3379
Antocianinas	0,9516	0,9623	1,0000	0,0416	-0,9149	0,7061	-0,3419
SO₂ livre	-0,0638	-0,0038	0,0416	1,0000	-0,2873	0,4230	0,4261
L*	-0,8971	-0,9015	-0,9149	-0,2873	1,0000	-0,8553	0,1276
a*	0,7204	0,6643	0,7061	0,4230	-0,8553	1,0000	0,2197
b*	-0,2706	-0,3379	-0,3419	0,4261	0,1276	0,2197	1,0000

Com o recurso ao programa Past, realizou-se uma HCA com os vinhos de mesa, do VB1 ao VT25, considerando os seguintes parâmetros: índice de Folin, poder antioxidante, antocianinas e SO₂ livre e total (Figura 30). A ausência na análise dos vinhos do VT25 ao VT31 ficou a dever-se à ausência de dados para o SO₂ total.

A uma distância de 1.5 há quatro agrupamentos: vinhos tintos, vinhos rosados, vinhos brancos e vinho VB8 isolado (Figura 30).

No que se refere ao índice de Folin, os vinhos com maior valor são os vinhos tintos (VT19, VT20, VT21, VT22, VT23, VT24 e VT25). Com valores intermédios são os vinhos rosados (VR14, VR15, VR16, VR17, VR18). Com valores mais baixos são os vinhos brancos (VB1, VB2, VB3, VB4, VB5, VB6, VB7, VB8, VB9, VB10, VB11 e VB13) e também o vinho tinto licoroso VT26 (jeropiga) que tem valor de índice de Folin na gama dos valores dos vinhos brancos. O vinho branco VB8 destaca-se por ter um valor de índice de Folin muito menor do que os restantes vinhos brancos. A maior parte da quantidade de compostos fenólicos encontra-se na película da uva, apesar de as uvas de castas tintureiras, usadas para produção de vinhos tintos, também terem quantidade de compostos fenólicos significativa. Na produção de vinhos tintos, as películas estão presentes no mosto durante a fermentação, sendo o período de contacto entre estas e o mosto de vários dias. Este longo período de contacto, associado à presença do álcool, produto da fermentação, que permite maior solubilização das antocianinas e outros compostos fenólicos, leva a uma extração mais eficiente. Por outro lado, na produção de vinhos rosados, deixa-se o mosto fermentar durante pouco tempo (entre 12 a 24 horas) antes de remover as películas, o que permite uma extração de compostos fenólicos, e também de outros constituintes da película, um pouco maior do que no caso dos vinhos brancos (cuja produção envolve a remoção das películas antes da fermentação). Um dos compostos muito importantes que é extraído das películas das uvas e tem capacidade antioxidante é o resveratrol (estilbeno) [56].

Relativamente às antocianinas, os vinhos tintos são aqueles que apresentam valores mais elevados (à exceção do vinho VT26 que apresenta um valor intermédio).

Os vinhos rosados apresentam valores intermédios e os vinhos brancos apresentam valores mais baixos, sendo que o vinho VB8 se destaca por ter mesmo muito pouca quantidade de antocianinas.

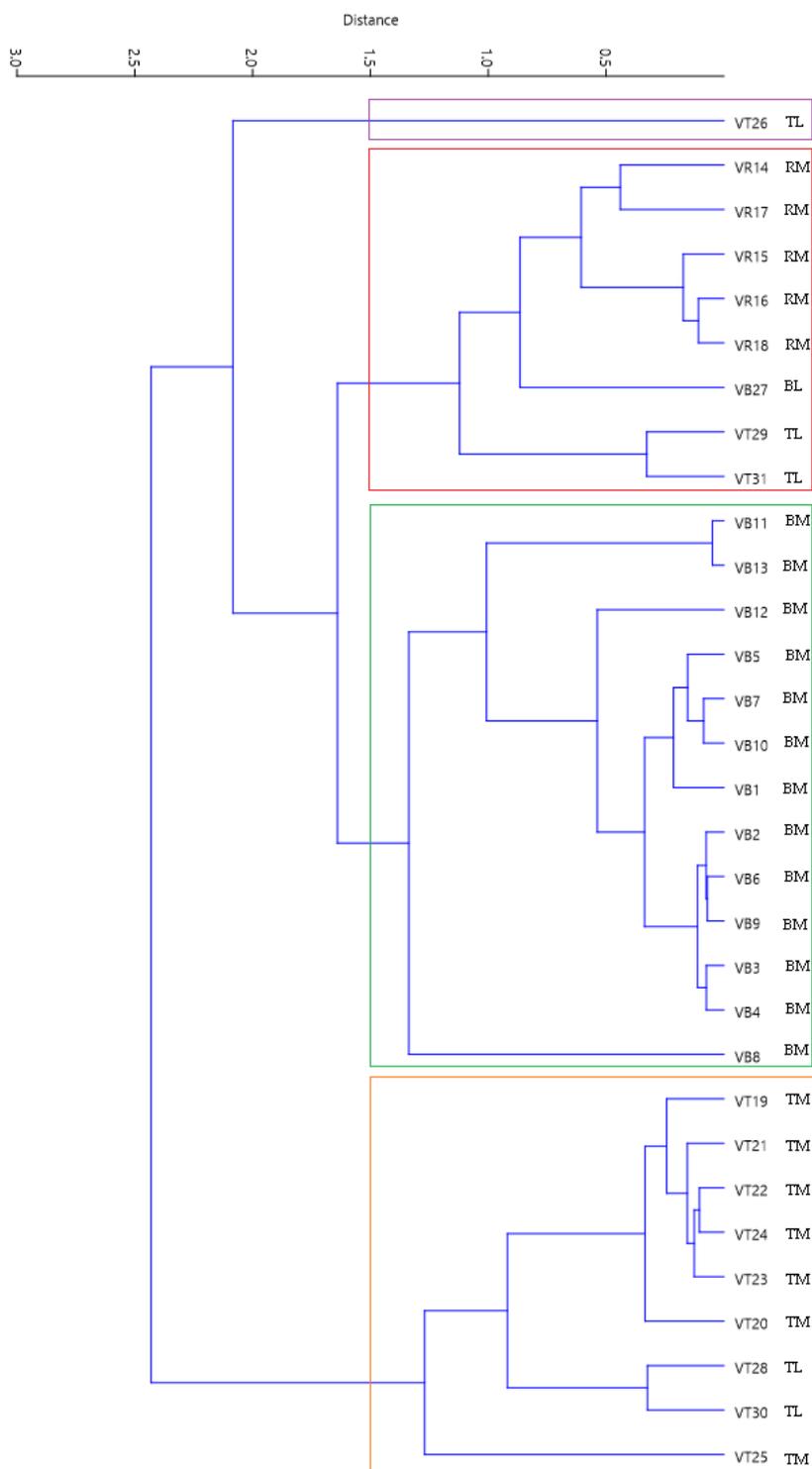


Figura 30 - HCA do vinho VB1 ao VT31 considerando os parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, SO₂ livre e antocianinas (BM – vinhos brancos de mesa, BL – vinhos brancos licorosos, RM – vinhos rosados de mesa, TM – vinhos tintos de mesa, TL – vinhos tintos licorosos)

Quanto ao SO₂ livre e total, os vinhos com maior quantidade são a maior parte dos vinhos brancos (VB1, VB2, VB3, VB4, VB5, VB6, VB7, VB8, VB9 e VB10). Os

vinhos rosados (VR15, VR16, VR17, VR18) e o vinho branco VB12 também têm concentração SO_2 elevada, mas ligeiramente menor do que aqueles referidos anteriormente. Os vinhos com menor concentração de SO_2 são os vinhos tintos (VT19, VT20, VT21, VT22, VT23 e VT24, VT25 e VT26) e os vinhos brancos VB11 e VB13 sendo que a quantidade de SO_2 do vinho rosado VR14 também se encontra na mesma gama de valores. Os vinhos VT25 e VT26 destacam-se por ter um teor de SO_2 mais baixo do que os restantes vinhos tintos, sendo que o vinho VT26 apresenta uma concentração de SO_2 muito mais baixa.

Observou-se que os vinhos tintos são aqueles que apresentam valores mais elevados de poder antioxidante (à exceção do VT26 que apresenta um valor de poder antioxidante na ordem dos valores para os vinhos rosados), sendo que os vinhos rosados apresentam valores intermédios e os vinhos com menores valores são os vinhos brancos.

Com recurso ao programa Past, realizou-se uma PCA com os parâmetros SO_2 livre, índice de Folin, antocianinas e poder antioxidante tendo-se obtido o gráfico da Figura 31. Verificou-se uma boa discriminação entre vinhos brancos, rosados e tintos, sendo que no caso dos vinhos licorosos já existe uma maior variância. Pode observar-se também que os parâmetros poder antioxidante e antocianinas são diretamente proporcionais.

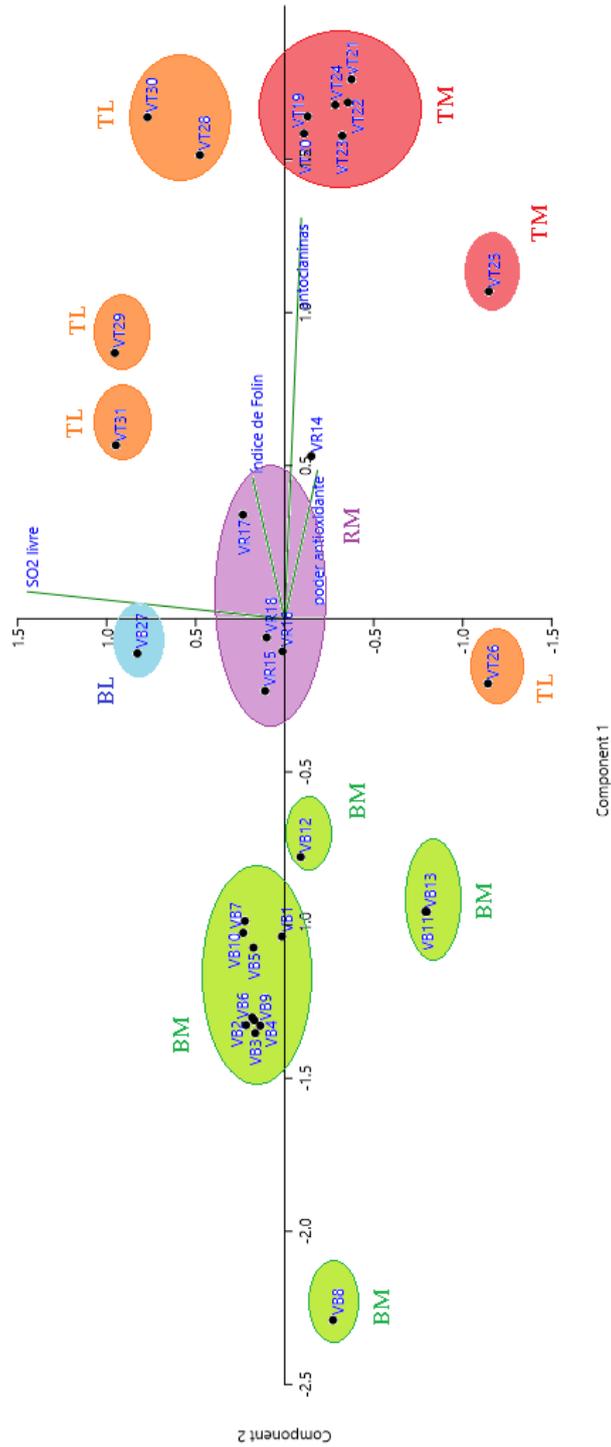


Figura 31 – Gráfico da PCA do vinho VB1 ao VT31 considerando os parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, SO₂ livre e antocianinas (BM – vinhos brancos de mesa, BL – vinhos brancos licorosos, RM – vinhos rosados de mesa, TM – vinhos tintos de mesa, TL – vinhos tintos licorosos)

Considerando os conjuntos da Tabela 22, realizou-se uma ANOVA.

Tabela 22 – Conjuntos de vinhos, correspondentes a cada tipo de vinho, utilizados para ANOVA e teste de Tukey, tendo em conta os parâmetros: poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e dióxido de enxofre livre.

Tipo de vinho	Código do vinho
Branco de mesa	VB1,VB2,VB3,VB4,VB5,VB6,VB7,VB8,VB9,VB10,VB11, VB12, VB13
Branco licoroso	VB27
Rosado de mesa	VR14, VR15, VR16, VR17, VR18
Tinto de mesa	VT19, VT20, VT21, VT22, VT23, VT24, VT25
Tinto licoroso	VT26, VT28, VT29, VT30, VT31

Confirmou-se que há diferença entre os conjuntos da Tabela 22, quando consideramos qualquer um dos parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e SO₂ livre.

Tabela 23 – Resultados da ANOVA, de uma via, tendo em conta, separadamente, os parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e dióxido de enxofre livre, para os conjuntos da Tabela 22

Parâmetros	Poder antioxidante	Índice de Folin	Antocianinas	SO₂ livre
F	68,81	23,7	24,01	11,09
p-value	< 0,0001	< 0,0001	<0,0001	<0,0001
p-value summary	****	****	****	****
Diferença significativa entre médias (p< 0,05)?	Sim	Sim	Sim	Sim
R ²	0,9137	0,7848	0,7869	0,6304

Nos vinhos tintos licorosos, existe grande variabilidade nos valores do poder antioxidante, como se pode verificar pela observação da Figura 32 (o desvio padrão é grande).

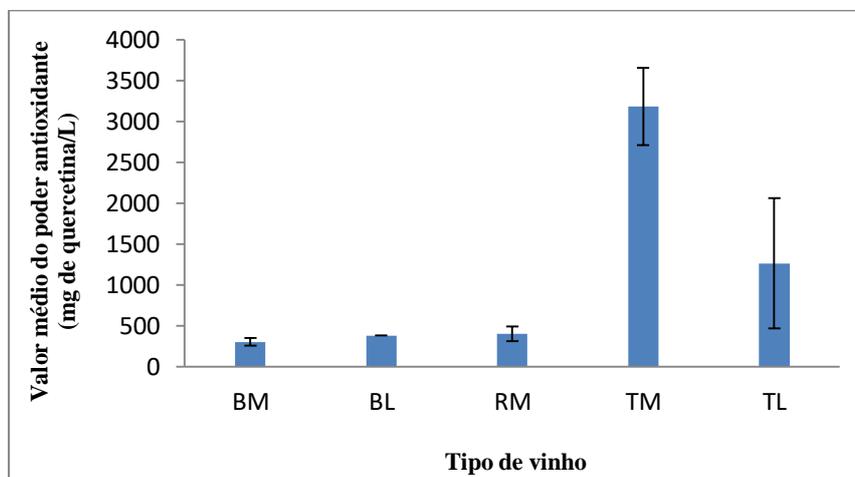


Figura 32 – Histograma dos valores médios de poder antioxidante tendo em os conjuntos de vinhos

Através do teste de Tukey verificamos que os vinhos tintos de mesa se distinguem de todos os outros e que os vinhos tintos licorosos se distinguem dos vinhos brancos e rosados de mesa (Tabela 24).

Tabela 24 – Teste de Tukey, tendo em conta o valor do poder antioxidante, para os conjuntos da Tabela 22

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Tem significado?	Sumário	p - value
BM vs. BL	-75,86	-1257 a 1106	Não	ns	0,9997
BM vs. RM	-98,36	-697,5 a 500,8	Não	ns	0,9885
BM vs. TM	-2877	-3411 a -2343	Sim	****	<0,0001
BM vs. TL	-959,4	-1559 a -360,2	Sim	***	0,0007
BL vs. RM	-22,5	-1270 a 1225	Não	ns	>0,9999
BL vs. TM	-2801	-4018 a -1584	Sim	****	<0,0001
BL vs. TL	-883,5	-2131 a 363,8	Não	ns	0,261
RM vs. TM	-2778	-3445 a -2112	Sim	****	<0,0001
RM vs. TL	-861	-1581 a -140,9	Sim	*	0,0134
TM vs. TL	1917	1251 a 2584	Sim	****	<0,0001

ns – sem significado, * - pouco significativo, *** - significativo, **** - muito significativo

O que se verifica para o poder antioxidante dos diferentes conjuntos (valores elevados para os vinhos de mesa tintos e desvio padrão grande no conjunto dos vinhos tintos licorosos), verifica-se também para o índice de Folin como se pode constatar na Figura 33, o que seria de esperar dada a forte associação entre estes dois parâmetros.

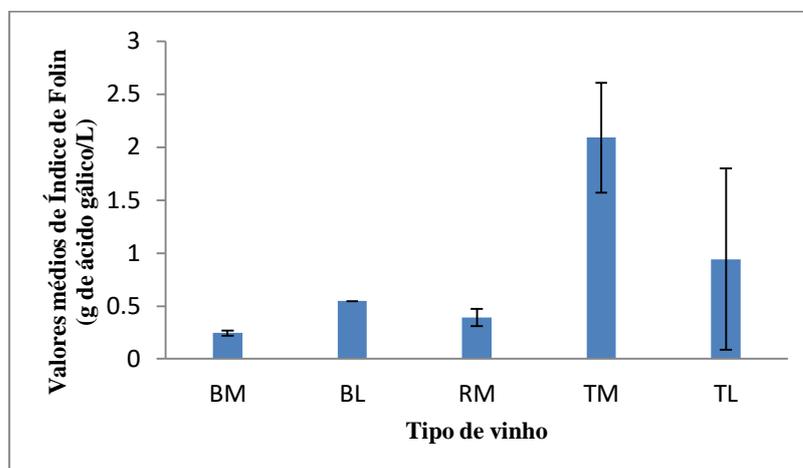


Figura 33 - Histograma dos valores médios do índice de Folin tendo em os conjuntos de vinhos

Dos resultados do teste de Tukey conclui-se que os vinhos tintos de mesa se distinguem dos vinhos rosados de mesa e dos vinhos brancos. Os vinhos tintos licorosos e os vinhos de mesa brancos também são diferentes entre si (Tabela 25).

Tabela 25 - Teste de Tukey, tendo em conta o valor do índice de Folin, para os vinhos do VB1 ao VT31 agrupados nas diferentes distribuições: BM – vinhos brancos de mesa, BL – vinhos brancos licorosos, RM – vinhos rosados de mesa, TM – vinhos tintos de mesa, TL – vinhos tintos licorosos

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Tem significado?	Sumário	p - value
BM vs. BL	-0,3035	-1,577 a 0,9699	Não	ns	0,9551
BM vs. RM	-0,1475	-0,7933 a 0,4982	Não	ns	0,9613
BM vs. TM	-1,845	-2,42 a -1,27	Sim	****	<0,0001
BM vs. TL	-0,6979	-1,344 a -0,05217	Sim	*	0,0294
BL vs. RM	0,156	-1,188 a 1,5	Não	ns	0,9969
BL vs. TM	-1,541	-2,853 a -0,2296	Sim	*	0,0154
BL vs. TL	-0,3944	-1,739 a 0,9499	Não	ns	0,909
RM vs. TM	-1,697	-2,416 a -0,9789	Sim	****	<0,0001
RM vs. TL	-0,5504	-1,327 a 0,2257	Não	ns	0,2600
TM vs. TL	1,147	0,4285 a 1,866	Sim	***	0,0007

ns – sem significado, * - pouco significativo, *** - significativo, **** - muito significativo

A Figura 34 confirma aquilo que é descrito na literatura, os vinhos brancos possuem concentrações muito reduzidas de antocianinas, os vinhos rosados têm uma quantidade um pouco maior e os vinhos tintos são aqueles que apresentam maiores concentrações.

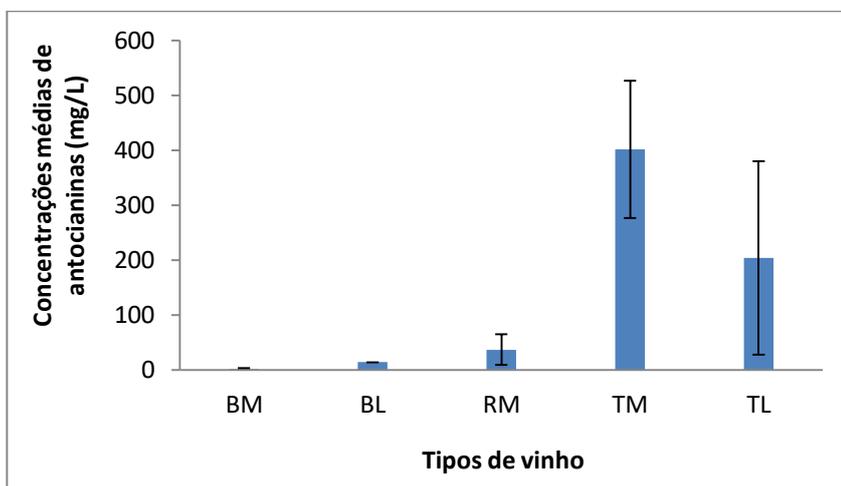


Figura 34 - Histograma das concentrações médias de antocianinas tendo em os conjuntos de vinhos

Os resultados do teste de Tukey, que se encontram resumidos na Tabela 26, estão de acordo com os resultados para a índice de Folin, os vinhos tintos de mesa são estatisticamente diferentes dos vinhos rosados e brancos. Os vinhos brancos de mesa também são diferentes estatisticamente dos vinhos tintos licorosos.

Tabela 26 - Teste de Tukey, tendo em conta a concentração de antocianinas, para os conjuntos de vinhos da Tabela 22

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Tem significado?	Sumário	p - value
BM vs. BL	-12,22	-291,8 a 267,4	Não	ns	>0,9999
BM vs. RM	-35,02	-176,8 a 106,8	Não	ns	0,9492
BM vs. TM	-399,5	-525,8 a -273,2	Sim	****	<0,0001
BM vs. TL	-202	-343,8 a -60,23	Sim	**	0,0025
BL vs. RM	-22,8	-318 a 272,4	Não	ns	0,9994
BL vs. TM	-387,3	-675,3 a -99,23	Sim	**	0,0046
BL vs. TL	-189,8	-485 a 105,4	Não	ns	0,3509
RM vs. TM	-364,5	-522,3 a -206,7	Sim	****	<0,0001
RM vs. TL	-167	-337,4 a 3,417	Não	ns	0,0568
TM vs. TL	197,5	39,71 a 355,3	Sim	**	0,0090

ns – sem significado, * - pouco significativo, *** - significativo, **** - muito significativo

Os vinhos licorosos são aqueles que apresentam maiores concentrações de dióxido de enxofre livre, pois, como possuem elevadas concentrações de açúcares, os produtores colocam grandes quantidades de dióxido de enxofre, para garantir que não há proliferação de micro-organismos (Figura 35).

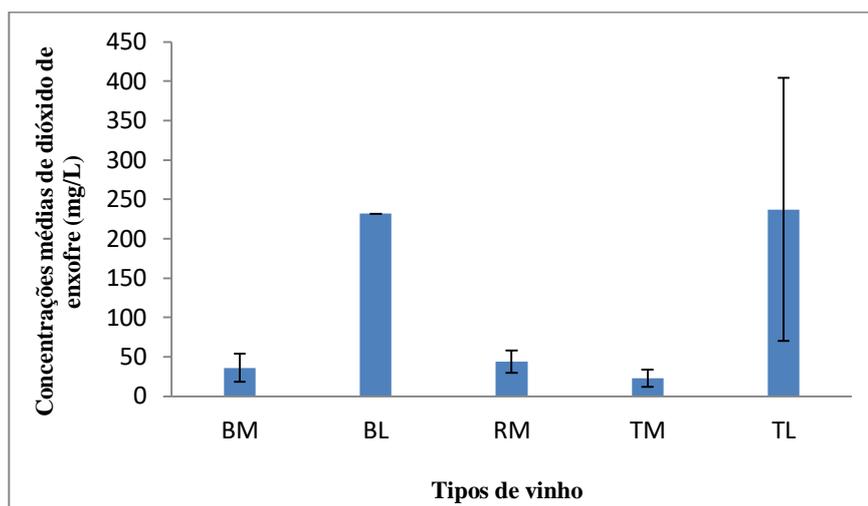


Figura 35 - Histograma das concentrações médias de dióxido de enxofre tendo em os conjuntos de vinhos

Tabela 27 - Teste de Tukey, tendo em conta a concentração de dióxido de enxofre livre, para os conjuntos de vinhos da Tabela 22

Múltiplas comparações de Tukey	Significado da diferença	Intervalo de confiança 95%	Tem significado?	Sumário	p - value
BM vs. BL	-196	-399,7 a 7,675	Não	ns	0,0635
BM vs. RM	-8,2	-111,5 a 95,08	Não	ns	0,9993
BM vs. TM	13,43	-78,58 a 105,4	Não	ns	0,9926
BM vs. TL	-200,8	-304,1 a -97,52	Sim	****	<0,0001
BL vs. RM	187,8	-27,2 a 402,8	Não	ns	0,1084
BL vs. TM	209,4	-0,3888 a 419,2	Não	ns	0,0506
BL vs. TL	-4,8	-219,8 a 210,2	Não	ns	>0,9999
RM vs. TM	21,63	-93,29 a 136,6	Não	ns	0,9808
RM vs. TL	-192,6	-316,7 a -68,47	Sim	***	0,001
TM vs. TL	-214,2	-329,2 a -99,31	Sim	****	<0,0001

ns – sem significado, * - pouco significativo, *** - significativo, **** - muito significativo

Observando as representações dos vinhos no círculo colorimétrico (a^* vs b^*) (Figura 36), verifica-se que os vinhos brancos, rosados e tintos se encontram circunscritos numa zona bem definida, sendo os vinhos tintos aqueles que apresentam maiores valores de a^* (entre 30 e 55).

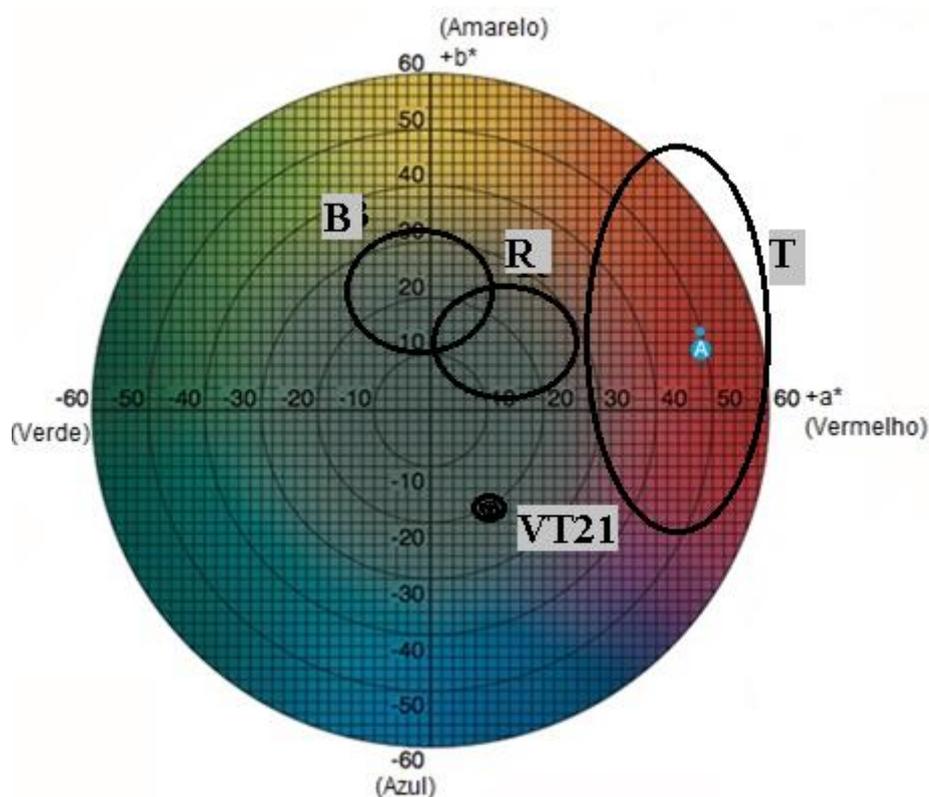


Figura 36 – Diagrama de cor com zonas assinaladas onde se encontram os vinhos B – vinhos brancos, R – vinhos rosados e T – vinhos tintos

3.2. Estudo de revitalização do vinho por aplicação de colas a vinhos oxidados

Os efeitos pretendidos da aplicação de colas podem ser os mais variados e, esses efeitos, vão variar também consoante o tipo de vinho ao qual as colas são aplicadas. Além de servirem para clarificar, as colas servem, nos vinhos tintos, para amaciar um vinho adstringente (através da remoção de taninos), eliminar leveduras e bactérias e estabilizar a matéria corante; nos vinhos brancos, para facilitar a filtração e eliminar riscos de casse proteica. Todos estes efeitos mencionados são para ter em conta durante o processo da produção do vinho. Contudo, as colas podem ser utilizadas em vinhos

finalizados, nomeadamente, permitem refrescar vinhos oxidados. Foi com esse intuito que as colas bentonite e caseína foram utilizadas neste estudo [10].

As doses utilizadas também são muito importantes pois quanto maior a dose, mais expressivo é o efeito [75].

Do conjunto de vinhos caracterizados no capítulo 3.1, foram escolhidos quatro vinhos, 2 brancos (VB2 e VB7) e 2 rosados (VR15 e VR18) para permanecerem nas garrafas, depois de abertas, durante 70 dias de forma a poderem oxidar. Após decorrido esse período, foram aplicadas duas colas, uma de origem mineral (a bentonite) e outra de origem proteica (a caseína). As alterações na constituição química dos vinhos, produzidas pelas colas, foram, posteriormente, avaliadas através da medição dos parâmetros de cor a^* , b^* e L^* , tendo-se medido também o índice de Folin e o poder antioxidante. Um dos objetivos desta análise foi verificar se, através da aplicação de colas, seria possível o vinho oxidado recuperar a sua cor inicial (antes de sofrer oxidação).

A caseína é um agente de colagem proteico e age sobre os polifenóis, eliminando preferencialmente os polifenóis flavonóides, como as catequinas e procianidinas; também atua adsorvendo a fração oxidada e instável do polifenol. Por outro lado, a bentonite é um tipo de argila composta por silicato de alumínio, magnésio e cálcio, cujo principal alvo são as proteínas, levando à sua precipitação. Quando utilizada em excesso, pode remover compostos aromáticos do vinho.

Uma vez que as colas podem interagir com partículas com capacidades antioxidantes, precipitando-as, faria sentido uma diminuição do poder antioxidante dos vinhos resultante da adição das colas. No entanto, esta diminuição nem sempre se verificou (ver Figura 37). Também faria sentido que a diminuição do poder antioxidante fosse mais expressiva quando se utiliza quantidade maior de cola. No vinho VB7, com dose mínima de bentonite, atingiu-se um valor de poder antioxidante de 45 mg/L e, com dose mínima de caseína, atingiu-se 66 mg/L, sendo que o controlo tinha 80 mg/L. Este resultado é facilmente justificável pois a diminuição correspondente à bentonite foi mais expressiva. Para este mesmo vinho, ao utilizar-se dose máxima de caseína, obteve-se um valor de poder antioxidante maior do que o do controlo (85 mg/L) e, para dose máxima de bentonite, o valor obtido (78 mg/L) também foi maior. Ou seja, ao usar-se dose mínima de bentonite, obteve-se uma maior redução do poder antioxidante do que ao usar-se dose máxima. Este resultado não tem justificação, sendo a única explicação

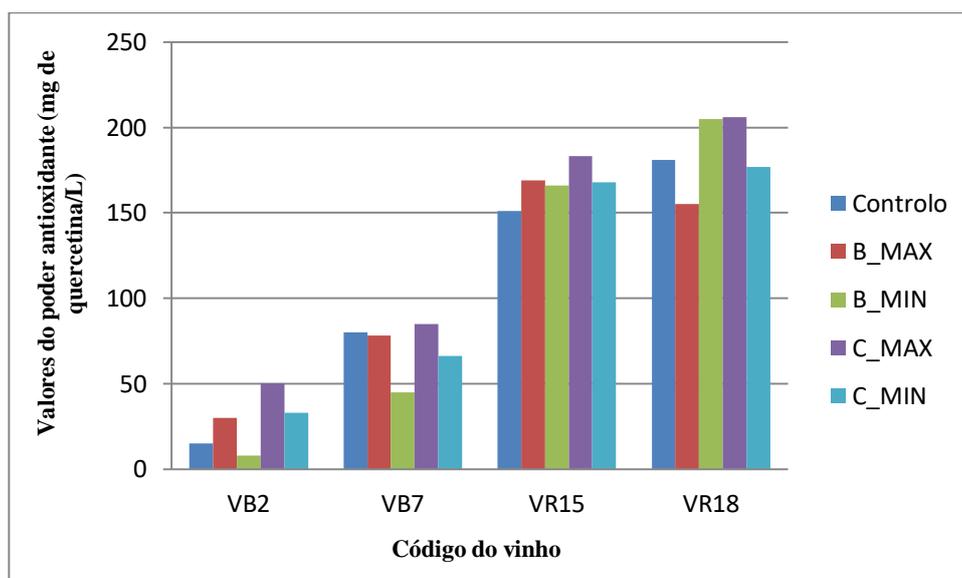


Figura 37 - Histograma dos valores do poder antioxidante depois da aplicação das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)

plausível que alguma cola esteja ainda em suspensão, interferindo com a leitura de absorvância por efeito de dispersão de luz. Desta forma, os valores obtidos com a aplicação das doses mínimas podem estar inflacionados e, portanto, a redução do poder antioxidante pode ter sido maior do que aparenta. De igual modo, para o vinho VB2, os valores do poder antioxidante, depois de aplicação das colas, são superiores (entre 30 mg/L e 50 mg/L) àquele correspondente ao controlo (15 mg/L), à exceção do valor correspondente à aplicação de dose mínima de bentonite (8mg/L). No caso do vinho VR15, todos os valores após aplicação de colas são superiores ao valor do controlo (entre 183 mg/L e 166 mg/L), sendo o controlo 151 mg/L. Os valores mais elevados que foram obtidos correspondem à utilização de doses máximas (169 mg/L para a bentonite e 183 mg/L para a caseína), o que acentua a hipótese da existência de cola em suspensão, o que está a sobreavaliar (por efeito de dispersão de luz) os valores de absorvância. Para o vinho VR18, quando se utilizou a dose máxima de bentonite e a dose mínima de caseína, houve a redução do valor de poder antioxidante (obtendo-se 155 mg/L e 177 mg/L, respetivamente). A maior redução foi obtida quando se utilizou a dose máxima de bentonite (155 mg/L). Porém, quando se utilizou a dose mínima de bentonite e a dose máxima de caseína, houve um aumento no valor (205 mg/L e 206

mg/L, respetivamente). Portanto, o que se verificou é que não existe um efeito consistente nos valores do poder antioxidante, não se observando tendências. Uma vez que o procedimento aplicado na aquisição destes valores não englobava o uso de filtração, num estudo futuro será interessante aplicar um passo de filtração para minimizar o efeito de colóides não precipitados.

Os valores do parâmetro a^* dos vinhos poderiam ter diminuído após aplicação de colas porque o que confere cor vermelha são principalmente as antocianinas e a sua cor é estabilizada por catiões e outros compostos fenólicos que são ambos removidos pelas colas o que, conseqüentemente, levaria à perda da cor vermelha. Contudo, os vinhos utilizados eram comerciais, pelo que já tinham sido sujeitos a um processo de estabilização e colagem, desta forma não é surpreendente que os dados não apresentem variações de cor significativas. No vinho VB2 a tendência foi a diminuição do valor do parâmetro a^* após a aplicação das colas (Figura 38), não se verificando diferença entre colas nem entre quantidades aplicadas (controlo tinha um valor de a^* de $-1,04$, obtendo-se valores entre $-1,28$ e $-1,12$ depois da aplicação das colas). No vinho VB7 a tendência também foi diminuir o valor de a^* de $-0,68$ para valores entre $-0,93$ e $-0,85$. Como esperado para dose máxima de caseína a diminuição foi maior ($a^* = -0,92$) relativamente ao valor obtido para dose mínima ($a^* = -0,85$). Quando se utilizou dose mínima de bentonite obteve-se um valor de a^* de $-0,93$ o que seria de esperar pois a bentonite é mais eficaz do que a caseína. Contudo, quando se utilizou bentonite dose máxima o valor obtido não foi o esperado ($a^* = -0,69$). Para os vinhos VR15 e VR18 (valor de a^* do controlo $1,81$ e $1,97$, respetivamente), os valores permaneceram praticamente iguais (entre $1,76$ e $1,86$ para o vinho VR15 e entre $1,93$ e $2,03$ para o vinho VR18).

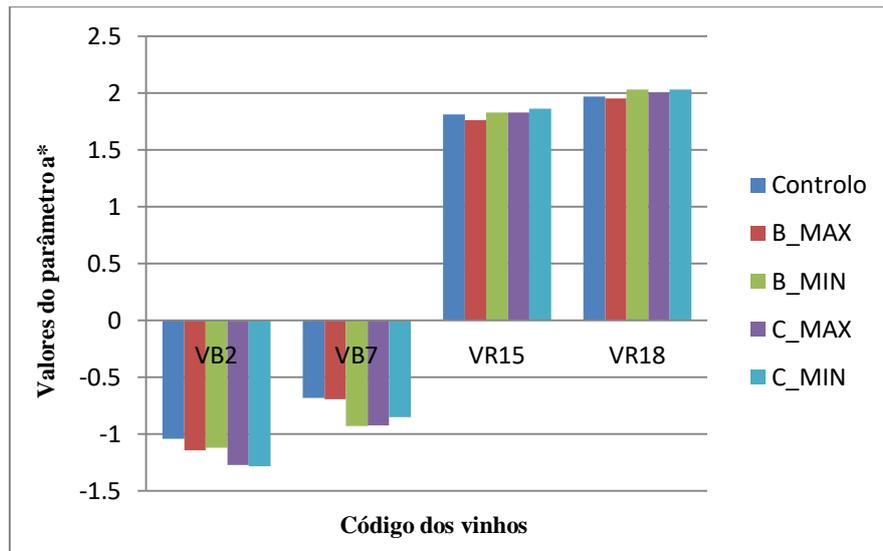


Figura 38 - Histograma dos valores do parâmetro a^* antes e depois das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)

Relativamente ao valor de b^* não houve variações significativas (Figura 39). No vinho VB2 o controlo apresentava um valor de b^* de 8,47 e, depois das colas, os valores variam entre 8,56 e 8,75. O controlo do vinho VB7 tinha um valor de b^* de 7,47 sendo os valores obtidos depois da aplicação das colas compreendidos entre 7,29 e 7,64. Para os vinhos rosados os resultados foram os seguintes: o vinho VR15 apresentou b^* de 2,76 para o controlo e valores entre 2,68 e 2,74 depois da aplicação de colas enquanto que o vinho VR18 apresentou 3,02 para o controlo e valores entre 3,05 e 3,09 depois das colas.

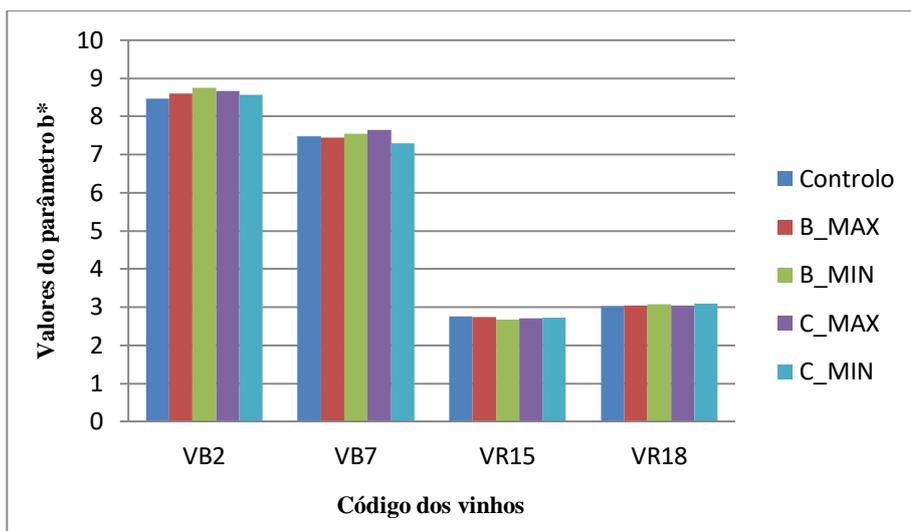


Figura 39 - Histograma dos valores do parâmetro b^* depois da aplicação das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)

Quanto ao parâmetro L^* (Figura 40), os valores apresentados nos controlos (98,2, 98,6, 98,0 e 97,9 para os vinhos VB2, VB7, VR15 e VR18, respetivamente) são muito semelhantes aos intervalos de valores obtidos após aplicação de colas (98,1 – 98,3, 98,2 – 98,5, 98,1 – 98,0 e 97,8 – 97,9 para os vinhos VB2, VB7, VR15 e VR18, respetivamente).

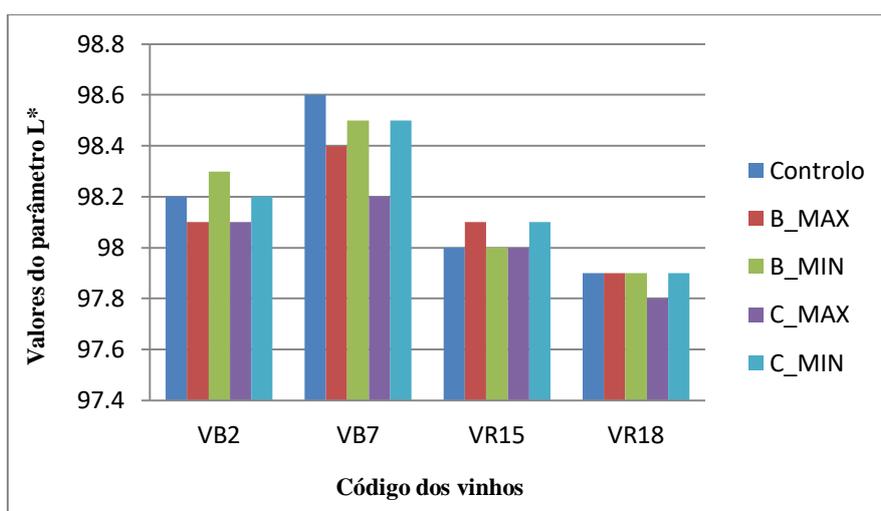


Figura 40 - Histograma dos valores do parâmetro L^* após aplicação de colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)

Relativamente aos compostos fenólicos não se verificou alterações significativas pois o índice de Folin já estava muito baixo antes da aplicação das colas (Figura 41).

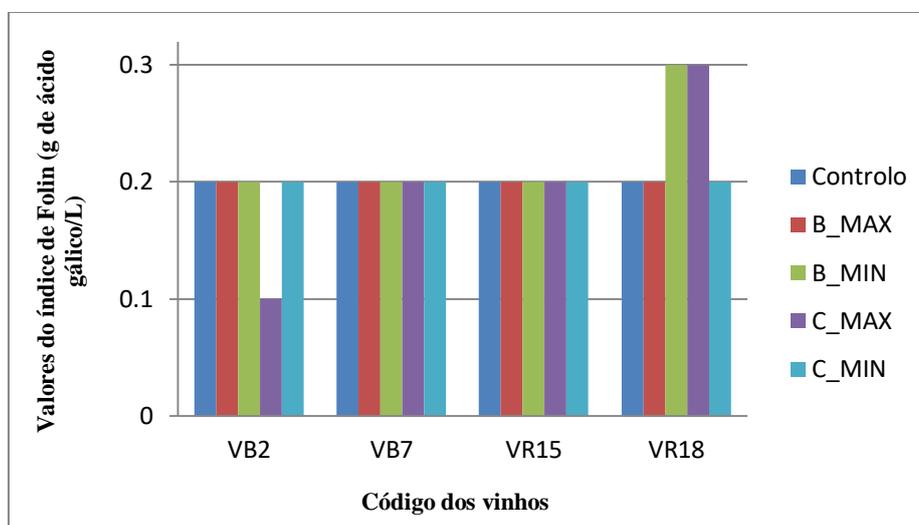


Figura 41 - Histograma dos valores do índice de Folin depois da aplicação das colas (B_MAX – bentonite dose máxima, B_MIN – bentonite dose mínima, C_MAX – caseína dose máxima, C_MIN – caseína dose mínima)

3.3. Estudo da oxidação do vinho ao longo do tempo

Com o objetivo de se estudar a oxidação do vinho ao longo do tempo, utilizaram-se dez amostras de vinhos da Bairrada, diferentes daquelas que foram objeto de estudo no capítulo 3.1 e 3.2, cujas características estão descritas na Tabela 28. Os parâmetros estudados foram: poder antioxidante, SO₂ livre e total, polifenóis totais e a evolução de cor.

Os fenómenos de oxidação, nos vinhos, estão relacionados com a presença de oxigénio, sulfitos ou enzimas, podendo, assim, a oxidação ser química ou enzimática [76]. O oxigénio oxida os compostos do vinho, sendo que o dióxido de enxofre, ao reagir com o oxigénio, provoca a diminuição da quantidade de oxigénio que reage com os restantes constituintes do vinho.

Embora o estudo realizado neste trabalho não seja estudo de envelhecimento, que se trata de um fenómeno de longa duração, tendo sido, antes, realizado um estudo de fenómenos de curto prazo (duas semanas), podemos fazer uma analogia, pois o que

se trata nos dois casos são de fenómenos de oxidação. Assim, por analogia ao que ocorre durante o envelhecimento, durante os 15 dias em que analisámos os vinhos, houve evolução da sua composição química, evolução essa que está relacionada com a presença de oxigénio, a natureza e concentração dos compostos fenólicos, da temperatura, da concentração de bissulfito e, também, do pH, teor em polissacarídeos, proteínas, iões metálicos, etc [77]. Os compostos fenólicos são muito facilmente oxidáveis pelo oxigénio e, como são também compostos com um papel muito importante na cor do vinho, faz sentido que haja alteração da cor do vinho.

Tabela 28 – Vinhos da Bairrada utilizados para o estudo da oxidação

Código	Cor	Álcool (%)	Nome	Região	Ano	Castas
VB32	branco	12	QMF (Quinta da Mata Fidalga)	Bairrada (DOC)	2016	Arinto, Bical
VB33	Branco	12	Seleção de Enófilos (Comissão Vitivinícola da Bairrada)	Bairrada (DOC)	2016	Bical, Maria Gomes
VB34	Branco	12,5	Marquês de Marialva – Adega de Cantanhede (colheita selecionada)	Bairrada (DOC)	2017	Arinto, Bical, Maria Gomes
VB35	Branco	11	Est. 1926 – Messias (selection)	Bairrada (DOC)		Arinto, Bical, Maria Gomes
VB36	branco	12,5	Quinta do Encontro	Bairrada (DOC)	2016	Bical
VT37	tinto	13	QMF (Quinta da Mata Fidalga)	Bairrada (DOC)	Colheita 2013	Baga (30%), Touriga-Nacional (50%), Syrah (20%)
VT38	Tinto	12,5	Seleção de Enófilos	Bairrada (DOC)	2014	Baga, Touriga-Nacional, Tinta-Roriz
VT39	Tinto	13	Marquês de Marialva – Adega de Cantanhede	Bairrada (DOC)	Colheita selecionada 2014	Baga, Aragonez, Touriga-Nacional
VT40	Tinto	12	Est. 1926 – Messias Selection	Bairrada (DOC)	2014	Baga, Touriga Nacional
VT41	tinto	13,5	Quinta do Encontro (Merlot – Baga)	Bairrada	2014	Baga, Merlot

3.3.1. Evolução do poder antioxidante ao longo do tempo

Da análise dos resultados podemos concluir que os vinhos brancos demonstraram um poder antioxidante entre 187-367 mg/L (VB32 e VB33) no primeiro dia, diminuindo para 40-195 mg/L (VB32 e VB33) após 15 dias (Tabela 28).

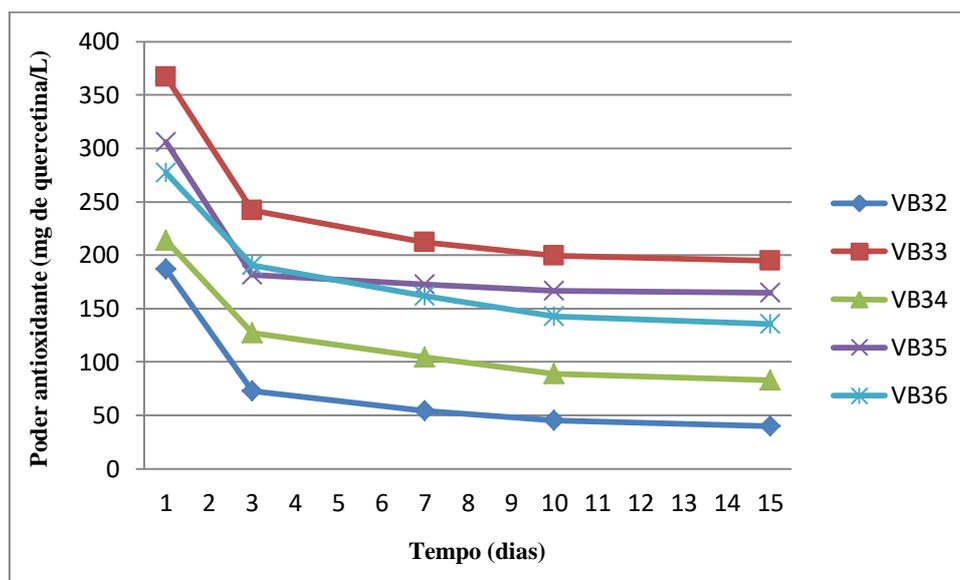


Figura 42 – Evolução do poder antioxidante ao longo do tempo (em dias) dos vinhos brancos

Relativamente aos vinhos tintos, estes apresentaram um poder antioxidante bastante superior aos vinhos brancos. No dia 1 os vinhos tintos apresentaram valores entre 3390-3966 mg/L (VT38 e VT41), diminuindo para 2047-2728 mg/L (VT37 e VT40) no dia 15. Todos os vinhos apresentaram um decréscimo do poder antioxidante, com um maior decréscimo do dia 1 para o dia 3 (Figura 42 e Figura 43).

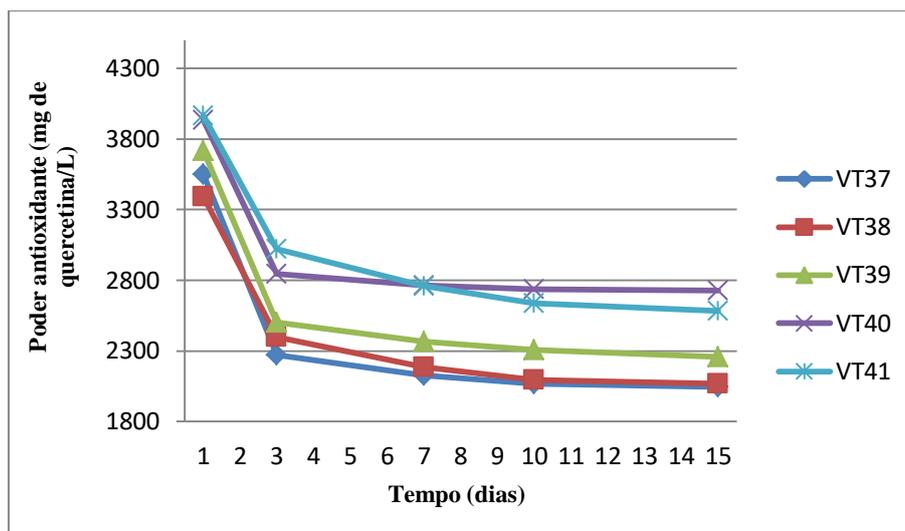


Figura 43 – Evolução do poder antioxidante ao longo do tempo (em dias) dos vinhos tintos

3.3.2. Evolução do índice de Folin ao longo do tempo

Os vinhos brancos demonstraram valores de índice de Folin entre 0,2 g/L (VB32, VB34 e VB35) e 0,3 g/L (VB33 e VB36). Ocorreu uma diminuição do índice de Folin até ao dia 3, atingindo-se valores entre 0,1 g/L (VB32, VB34 e VB35) e 0,2 g/L (VB33 e VB36), mas depois o valor de índice de Folin manteve-se constante (Figura 44).

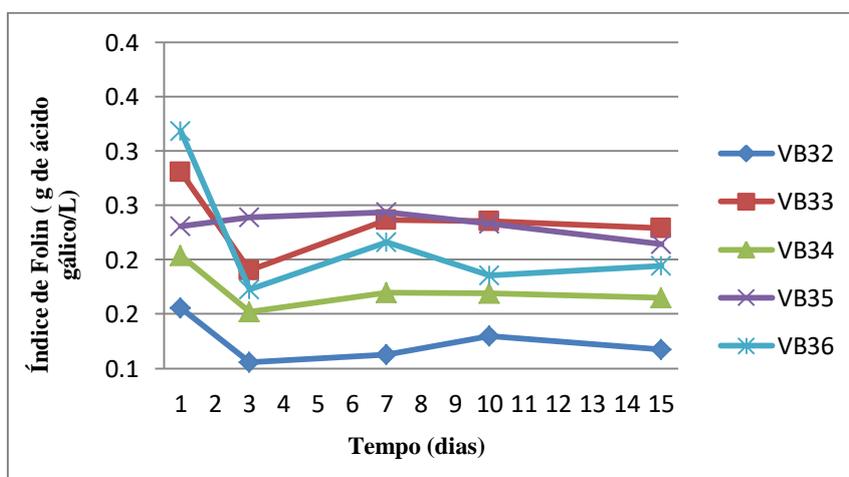


Figura 44 – Evolução do índice de Folin ao longo do tempo (em dias) nos vinhos brancos

Os vinhos tintos apresentaram valores de índice de Folin superior ao dos vinhos brancos, variando entre 1,5 g/L (VT38) e 3,1 g/L (VT40). Por outro lado, o índice de Folin dos vinhos tintos diminuiu ao longo dos 15 dias (Figura 45) atingindo, no dia 15, valores entre 1,1 g/L (VT38) e 1,5 g/L (VT40) sendo que o maior decréscimo ocorreu até ao dia 3, no qual os vinhos apresentavam valores de índice de Folin entre 1,2 g/L (VT38) e 1,7 g/L (VT40).

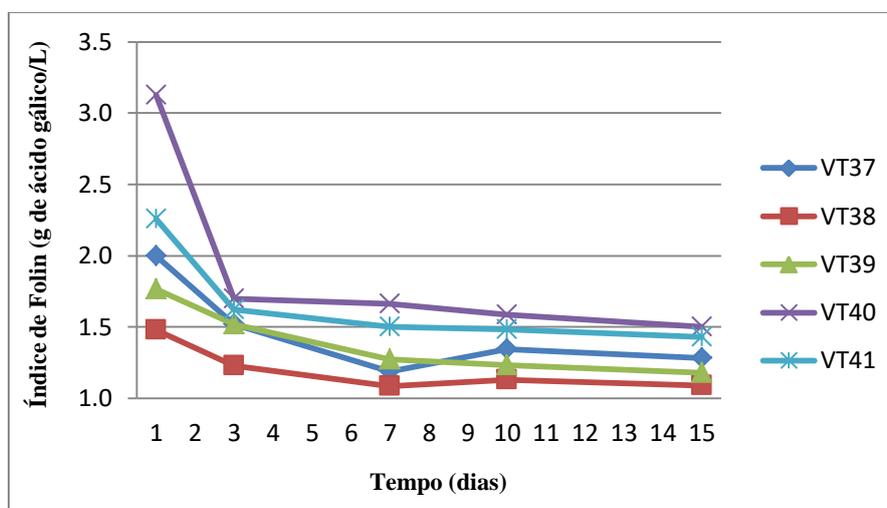


Figura 45 - Evolução do índice de Folin ao longo do tempo (em dias) nos vinhos tintos

3.3.3. Evolução do dióxido de enxofre ao longo do tempo

Os vinhos brancos apresentaram concentrações de dióxido de enxofre livre entre 19 mg/L (VB32) e 52 mg/L (VB36), diminuindo até ao dia 15 no qual apresentaram concentrações de dióxido de enxofre entre 9 mg/L (VB32) e 20 mg/L (VB36) (Figura 46).

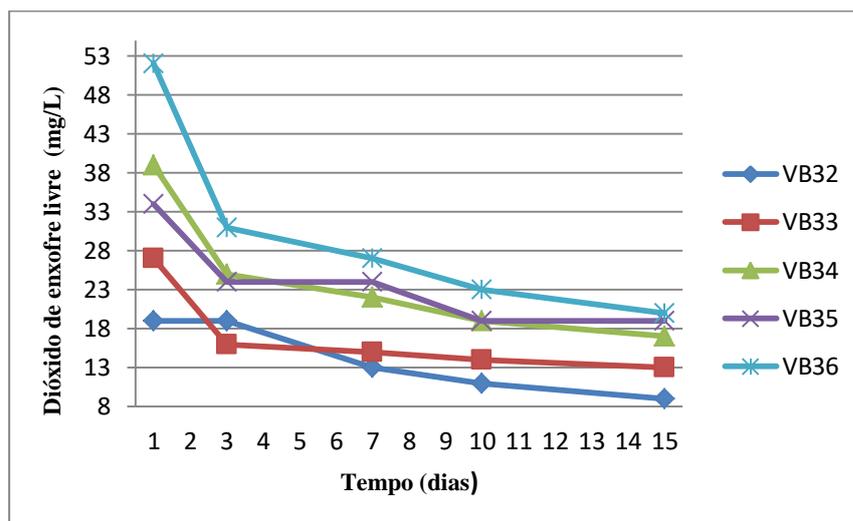


Figura 46 – Evolução do dióxido de enxofre livre com o tempo nos vinhos brancos

Quanto ao dióxido de enxofre total as concentrações apresentadas aquando da abertura da garrafa variaram entre 90 mg/L (VB32) e 167 mg/L (VB34), diminuindo até atingir valores entre 81mg/L (VB32) e 126 mg/L (VB34 e VB36) no dia 15 (Figura 47).

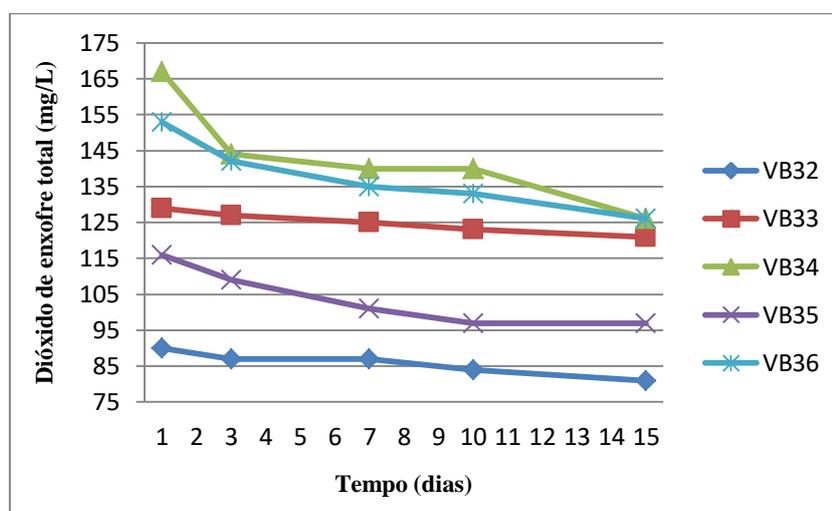


Figura 47 - Evolução do dióxido de enxofre total com o tempo nos vinhos brancos

No que se refere aos vinhos tintos, as concentrações de dióxido de enxofre livre apresentadas inicialmente situavam-se numa gama entre 9 mg/L (VT37) e 40 mg/L (VT39), que diminuiram até ao dia 15 no qual se registou concentrações entre 2 mg/L (VT37) e 8 mg/L (VT39) (Figura 48).

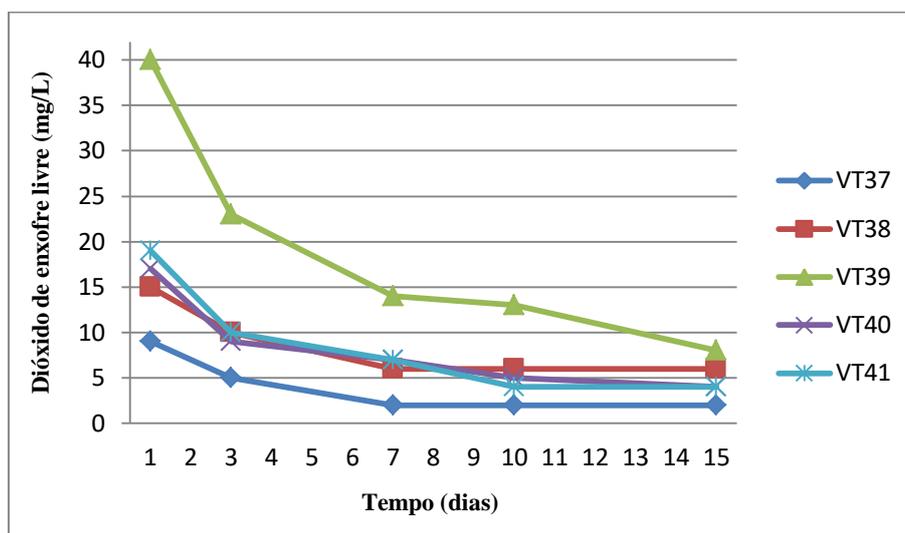


Figura 48 – Evolução do dióxido de enxofre livre com o tempo nos vinhos tintos

A concentração de dióxido de enxofre total diminuiu igualmente até dia 15, partindo de concentrações entre 79 mg/L (VT41) e 163 mg/L (VT40) até concentrações entre 35 mg/L (VT41) e 134 mg/L (VT40) (Figura 49).

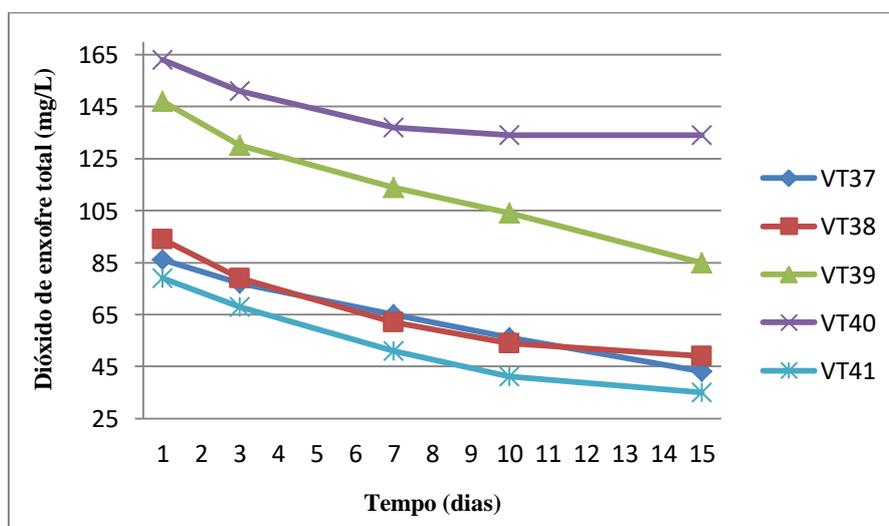


Figura 49 – Evolução do dióxido de enxofre total com o tempo nos vinhos tintos

3.3.4. Evolução dos parâmetros de cor ao longo do tempo

Na literatura estão descritas alterações na cor dos vinhos associadas à sua oxidação [10]. Durante o envelhecimento do vinhos, tintos há mudança na cor, havendo um desvio do vermelho-violeta para um vermelho acobreado. Estas mudanças de cor estão associadas à ocorrência de oxidação e fenómenos de condensação de moléculas [77].

Relativamente ao parâmetro a^* , verifica-se um aumento ligeiro entre o dia 1 e o dia 15 nos vinhos brancos, sendo que estes vinhos apresentam inicialmente valores de a^* entre -1,22 (VB35) e -0,66 (VB33) e no dia 15 apresentam valores entre -1,00 (VB35) e -0,55 (VB32) (Figura 50).

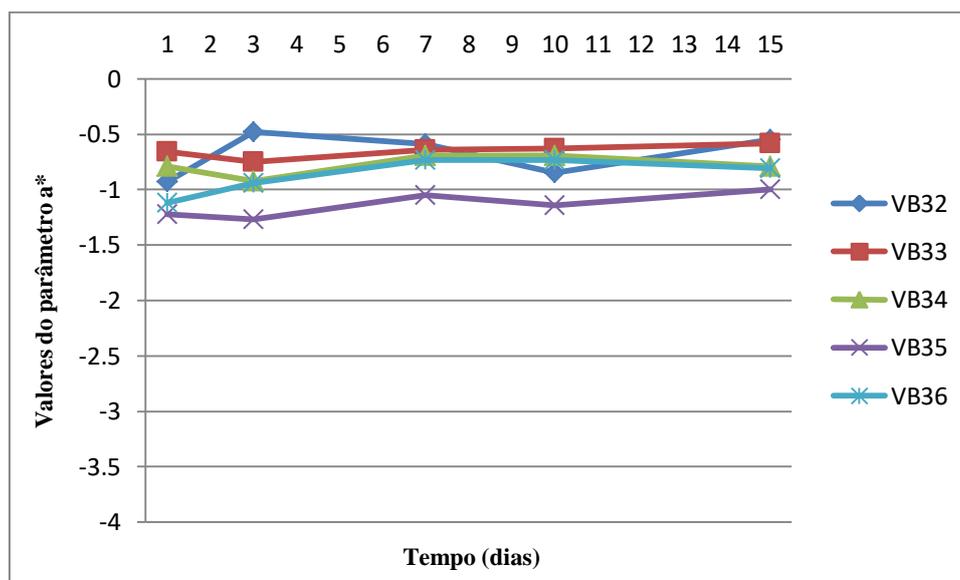


Figura 50 – Evolução do parâmetro a^* dos vinhos brancos ao longo do tempo (em dias)

Nos vinhos tintos os valores de a^* apresentados foram bastante superiores aos dos vinhos brancos, entre 29,26 (VT37) e 37,73 (VT41). À semelhança do que aconteceu com os vinhos brancos, nos vinhos tintos observou-se um ligeiro aumento nos valores do parâmetro a^* , atingindo-se valores entre 29,58 (VT37) e 40,94 (VT39) no dia 15 (Figura 51). Os compostos que mais contribuem para a cor vermelha são as antocianinas, porém, nem todas as suas formas apresentam cor vermelha. O aumento do parâmetro a^* nos vinhos tintos pode dever-se ao facto de estar a ser consumido dióxido

de enxofre. Como a concentração de dióxido de enxofre livre diminui na solução, o equilíbrio químico entre a forma da antocianina com bissulfito adicionado (incolores) e a não ligada (vermelhas) desloca-se no sentido da formação do catião flavílio(vermelho) [5].

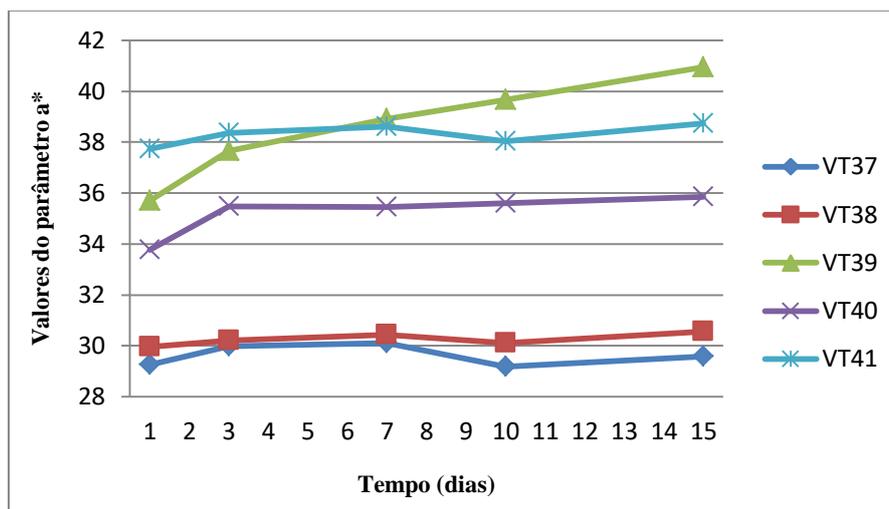


Figura 51 - Evolução do parâmetro a* ao longo do tempo dos vinhos tintos

O valor do parâmetro b* não apresenta diferenças nos vinhos brancos, apresentando um aumento ligeiro nos vinhos tintos, aumentando de valores entre 14,16 (VT39) e 20,75 (VT40) no dia 1 até valores entre 16,90 (VT39) e 22,74 (VT41) no dia 15 (Figura 52 e Figura 53). Isto pode dever-se à formação de compostos (produtos da oxidação) com cor amarela, e ao aumento de antocianinas na forma de catião flavílio que acaba por compensar a diminuição de antocianinas por oxidação com espécies oxidantes, pois pela diminuição do índice de Folin sabe-se que os compostos fenólicos (entre os quais as antocianinas) estão a ser oxidados. Ou seja, por outro lado, as antocianinas na forma de catião flavílio estão a ser oxidadas para dar origem à base carbinol incolor e a chalconas (de cor amarela). A formação de chalconas também contribui para o aumento do parâmetro b*[5].

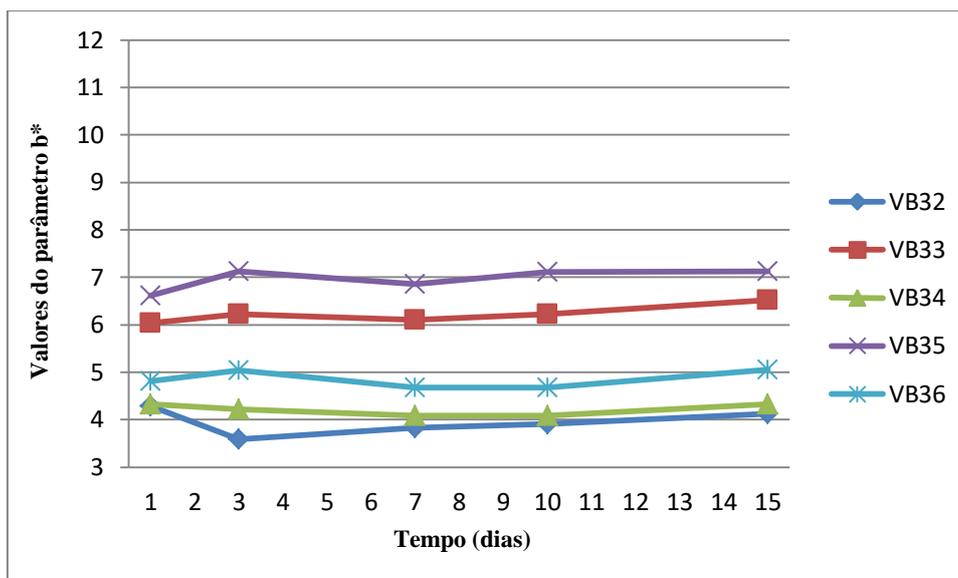


Figura 52 - Evolução do parâmetro b^* ao longo do tempo dos vinhos brancos

As uvas degradadas por fungos tais como *Botrytis*, *Penicillium* e *Aspergillus* são ricas em enzimas oxidativas que a menos que sejam inativadas ou removidas podem catalisar a oxidação de compostos fenólicos. O resultado é o aparecimento de cor castanha ou cor tawny em vinhos vermelhos e um desvio de amarelo para âmbar em vinhos brancos [10].

Com a diminuição de dióxido de enxofre, é possível que os micro-organismos que produzem as polifenoloxidasas possam ser reativados (o que faz sentido porque o índice de Folin decresce da mesma forma que decresce o dióxido de enxofre) e, essas enzimas, o que fazem é oxidar os complexos de ácido hidroxinâmico glutaciona, que são incolores, dando origem a polímeros ou pigmentos de cor castanha, o que justifica o facto de a oxidação provocar a diminuição do parâmetro L^* dos vinhos [5], [77].

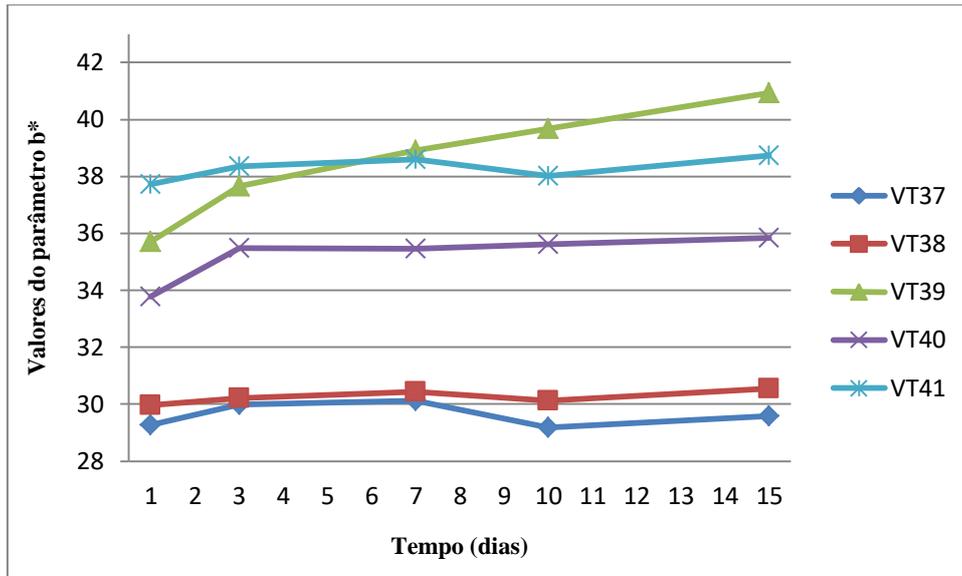


Figura 53 - Evolução do parâmetro b* ao longo do tempo dos vinhos tintos

Relativamente à luminosidade (L^*), os vinhos brancos apresentaram uma luminosidade de 98,2 (VB33) a 99,1 (VB32), que até ao dia 3 aumentou atingindo valores entre 99,7 (VB35) e 100 (VB32), vindo depois, nos restantes dias, a diminuir atingindo, no dia 15, valores entre 98,7 (VB33 e VB35) e 99,2 (VB36) (Figura 54).

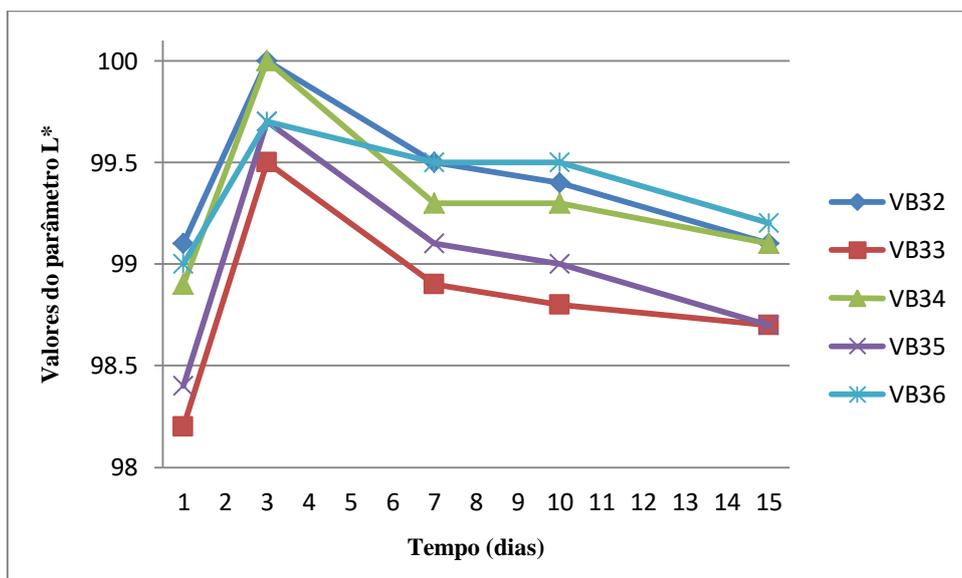


Figura 54 - Evolução do parâmetro L^* ao longo do tempo dos vinhos brancos

Todos os vinhos brancos e tintos apresentam o mesmo comportamento, com um aumento até ao terceiro dia, seguido de uma diminuição até dia 15 (Figura 54 e Figura 55). Isto pode estar relacionado com o facto de o dióxido de enxofre diminuir muito até dia 3 e, depois, estabilizar um pouco (continua a diminuir mas essa diminuição é pouco acentuada). Como o dióxido de enxofre inibe as leveduras, a sua diminuição poderá reativá-las e estas poderão participar na formação de novos compostos com cor (através da produção de enzimas), daí o escurecimento (ou seja, diminuição do parâmetro L*). O ponto de inversão na curva do parâmetro L* pode corresponder ao momento em que se atingiu a concentração de dióxido de enxofre mínima e as leveduras foram reativadas.

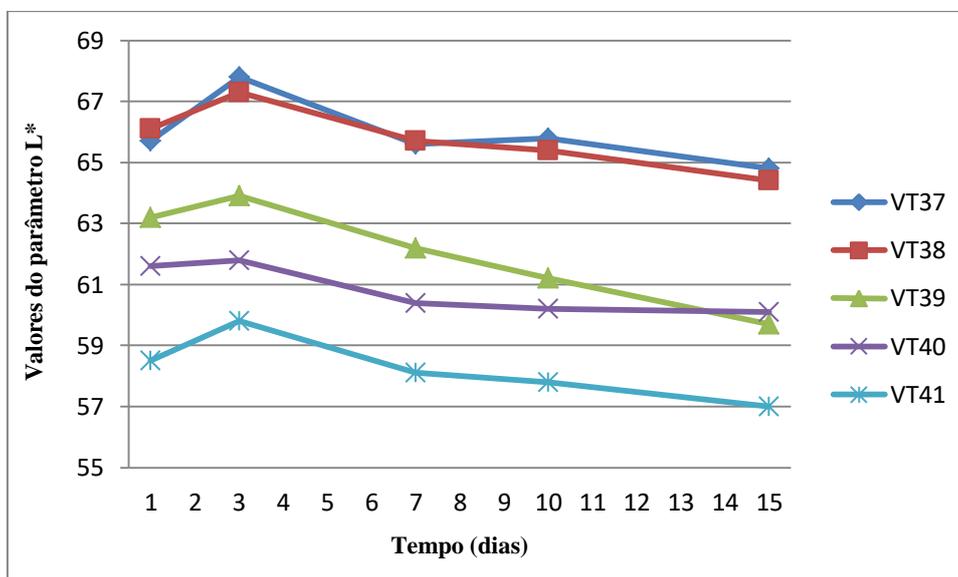


Figura 55 - Evolução do parâmetro L* ao longo do tempo dos vinhos tintos

3.4. Estudo da dinâmica da população de leveduras na fermentação

O estudo da dinâmica da fermentação, através de um mosto artificial, foi feito de acordo com os seguintes moldes: os ensaios E, F, G e H consistem em monoculturas, os ensaios A, B e D correspondem a combinações de duas culturas e o ensaio C é uma mistura de três leveduras. A fermentação foi levada a cabo sob condições adequadas, de forma a otimizar o desenvolvimento das leveduras: nutrientes adequados (relativamente à quantidade e razão C/N adequada), durante 50 horas, sob agitação e a 30 °C.

Mediu-se a massa do meio que continha as leveduras ao longo de 50 horas de fermentação, e calculou-se a correspondente variação relativamente à massa inicial, tendo-se obtido os resultados do gráfico apresentado na Figura 56.

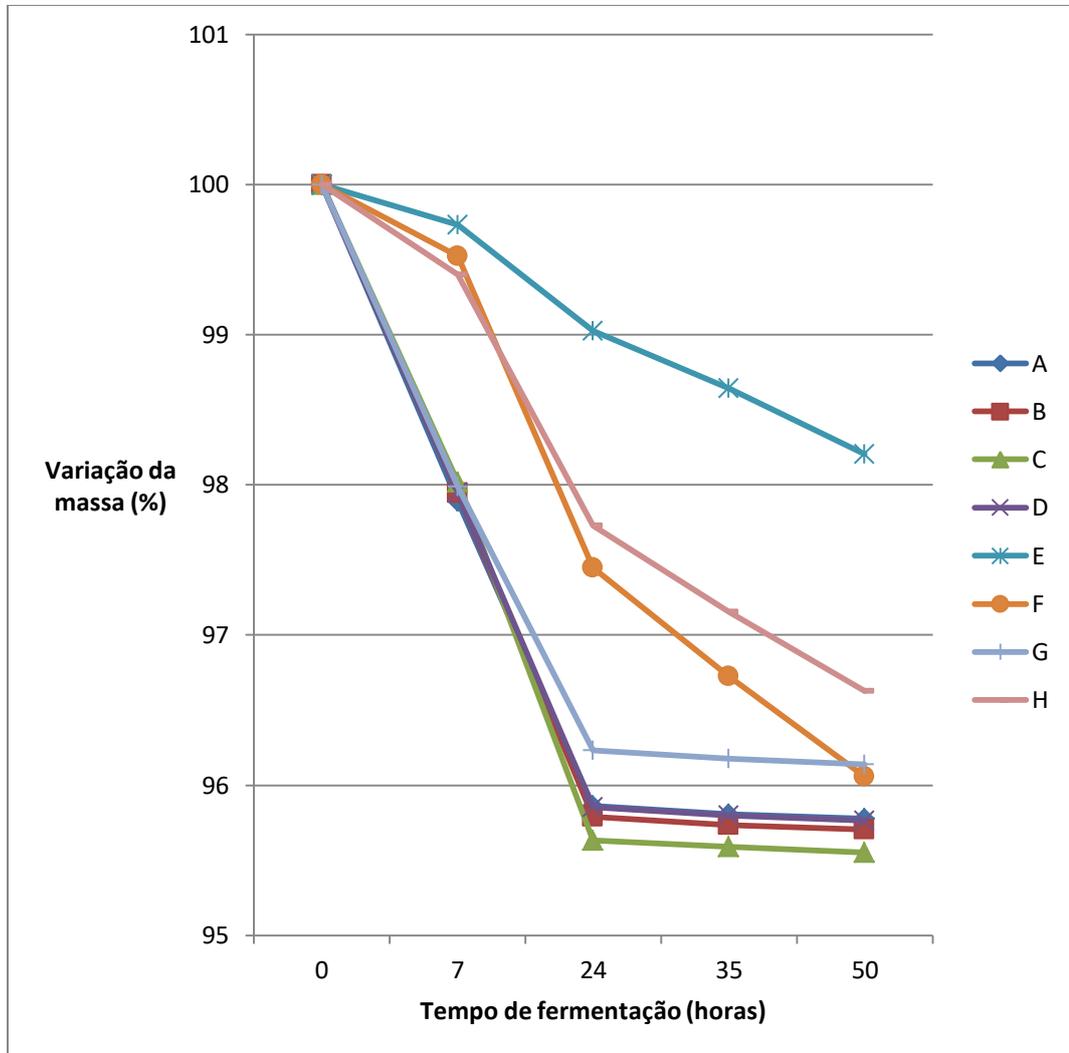


Figura 56 - Gráfico da percentagem de massa do meio relativamente à massa inicial em função do número de horas de fermentação (A – *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*, B – *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans*, C – *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans* + *T. delbrueckii*, D – *S. cerevisiae* + *M. pulcherrima*, E – *M. pulcherrima*, F – *L. thermotolerans*, G – *S. cerevisiae*, H – *T. delbrueckii*).

Para todos os meios a massa diminui porque a glicose e a frutose foram convertidos em dióxido de carbono e etanol, havendo perda de massa por evaporação.

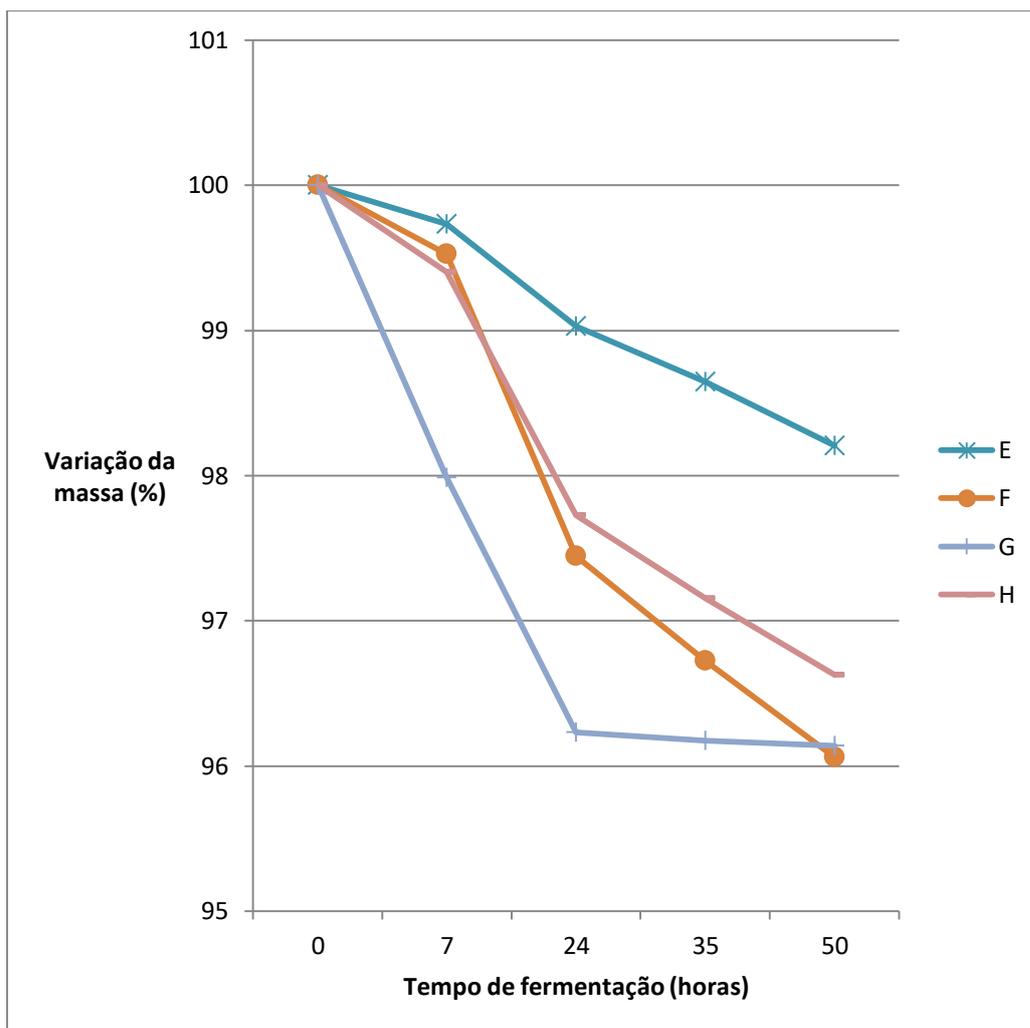


Figura 57 - Gráfico da percentagem de massa do meio relativamente à massa inicial em função do número de horas. (E – *M. pulcherrima*, F - *L. thermotolerans*, G – *S. cerevisiae*, H – *T. delbrueckii*).

Nos meios em que se colocaram as diferentes espécies de leveduras isoladas, verificou-se que o decréscimo mais acentuado na massa corresponde à *S. cerevisiae*, ou seja, esta levedura é a que tem consumo de açúcar mais rápido e, portanto, fermentação mais rápida (Figura 57). Este facto vai ao encontro da literatura onde a *S. cerevisiae* é descrita como uma levedura de grande poder fermentativo ao contrário das leveduras não *Saccharomyces* que têm pouco poder fermentativo. Após apenas 7 horas o meio com a *S. cerevisiae* apresenta um decréscimo de 2% da sua massa enquanto que os restantes meios permaneciam com aproximadamente 100% da sua massa inicial (Figura 57). Após 24 horas, o meio que continha a *S. cerevisiae* apresentou um decréscimo de 4% da massa inicial; ou seja, a *S. cerevisiae* tinha já consumido todo o açúcar presente enquanto que a *M. pulcherrima* permanecia com 99% da massa inicial. A

levedura *L. thermotolerans* só após 50 horas converteu todo o açúcar em etanol e a *M. pulcherrima* mesmo após 50 horas ainda apresenta cerca de metade do açúcar inicial. Portanto, a *M. pulcherrima* é a levedura que apresenta menor poder fermentativo.

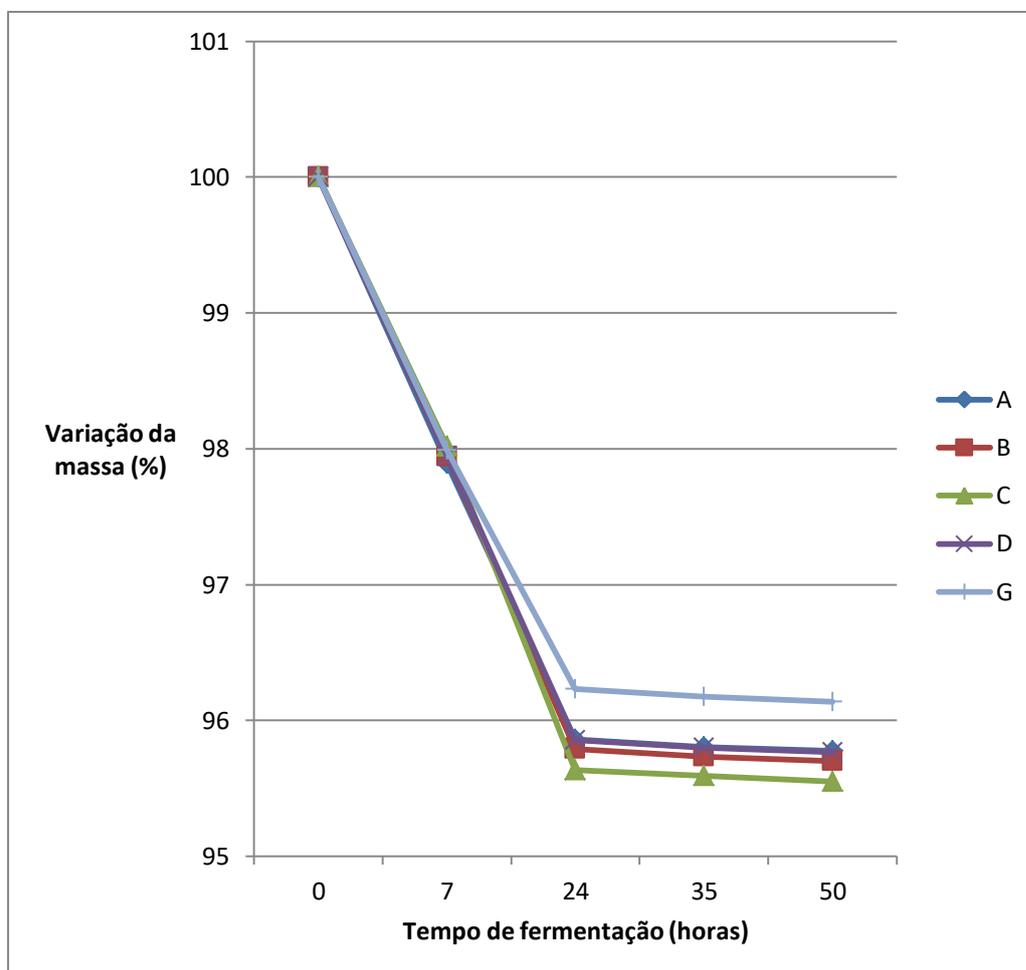


Figura 58 - Gráfico da percentagem de massa do meio relativamente à massa inicial em função do número de horas. Os meios com *S.cerevisiae* sozinha e misturada com outras leveduras (A – *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*, B – *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans*, C – *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans* + *T. delbrueckii*, D – *S. cerevisiae* + *M. pulcherrima*, G – *S. cerevisiae*).

Nos meios em que existe *S. cerevisiae* em conjunto com outras espécies de leveduras, o consumo de açúcar foi mais rápido (pois houve um decaimento mais acentuado em 24 horas) e maior (uma vez que a redução da massa foi maior), indicando que a fermentação foi mais rápida e mais eficiente, relativamente ao meio que tem *S. cerevisiae* sozinha (Figura 58). No meio que tem duas espécies diferentes misturadas com a *S. cerevisiae* o consumo de açúcar foi ainda maior do que nos meios onde há apenas uma espécie de levedura misturada com a *S. cerevisiae*. Quando ocorre

fermentação espontânea num mosto real, as leveduras não *Saccharomyces*, em determinado ponto, deixam de fermentar, sendo a *S. cerevisiae* a levedura que leva a fermentação até ao fim. Uma das razões para isto acontecer é a suscetibilidade das leveduras não *Saccharomyces* a concentrações relativamente elevadas de etanol. Porém, neste trabalho experimental, considera-se que o etanol evaporou e, portanto, não exerceu influência negativa sobre as espécies a ele suscetíveis, o que permitiu que estas se pudessem desenvolver e fermentar. Como leveduras de diferentes espécies utilizam os recursos de forma diferente, o consumo de açúcar foi maior, sendo o único recurso limitante o açúcar visto que os aminoácidos estavam presentes de forma abundante no meio.

As populações e interações entre leveduras são condicionadas por vários fatores, como: teor de etanol, temperatura, *killer factors*, disponibilidade de oxigénio e nutrientes (vitaminas e compostos azotados). Em condições anaeróbicas a *S. cerevisiae* cresce mais rapidamente que as leveduras do género *Hanseniaspora*, *Kloeckera* e do que as espécies *T. delbrueckii* e *L. thermotolerans*.

Os nutrientes (vitaminas e compostos azotados) são outros fatores limitantes, e, em geral as espécies não-*Saccharomyces* crescem a uma velocidade superior no início da fermentação do vinho, consumindo os nutrientes e limitando o crescimento das *S. cerevisiae*. Porém, no nosso caso, o meio utilizado é rico em nutrientes não sendo este um fator limitante. Na perspetiva de interações benéficas, algumas leveduras têm capacidades proteolíticas, nomeadamente, espécies pertencentes aos géneros *Hanseniaspora* e *Metschnikowia* que podem contribuir para o enriquecimento da cultura, promovendo a utilização de proteínas e aminoácidos pelas outras leveduras.

O efeito antagonista de *S. cerevisiae* é em grande parte dependente da temperatura e da quantidade de álcool, no entanto, como o meio era arejado, a concentração de etanol não atingiu níveis para inibir o crescimento das outras leveduras. Adicionalmente, a *S. cerevisiae* com o seu efeito *crabtree* positivo muito acentuado vai favorecer a fermentação independentemente do nível de oxigénio presente, produzindo etanol em todas as fermentações em que está presente, e levando a diminuição de mais massa nestas fermentações. As leveduras *T. delbrueckii* e *L. thermotolerans* também apresentam efeito *crabtree* positivo sendo, no entanto, menos expressivo do que a *S. cerevisiae*, o que também é visível na diminuição da massa nos frascos. A única levedura que apresenta efeito *crabtree* negativo é a *M. pucherrima* sendo a única que

apresenta menos decréscimo de massa pois favorece a respiração em vez da fermentação. Ou seja, em termos gerais, o principal fator limitante no crescimento e no meio era a disponibilidade de açúcares.

O meio no balão de Erlenmeyer G (contendo apenas a *S. cerevisiae*) apresentou sempre massa inferior àquela do meio no balão de Erlenmeyer D (contendo *S. cerevisiae* e *M. pulcherrima*).

Ao fim de 50 horas com o auxílio de um mustímetro mediu-se a densidade de cada meio com as diferentes combinações de leveduras obtendo-se os valores descritos na Tabela 29.

Tabela 29 - Valores de densidade dos mostos após fermentação e composição em açúcar (A – *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*, B – *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans*, C – *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans* + *T. delbrueckii*, D – *S. cerevisiae* + *M. pulcherrima*, E – *M. pulcherrima*, F – *L. thermotolerans*, G – *S. cerevisiae*, H – *T. delbrueckii*).

Balão de Erlenmeyer	Densidade (g/dm ³)	Açúcar (g/L)
A	1001	-
B	1000	-
C	1000	-
D	1000	-
E	1045	98,1
F	1005	-
G	1000	-
H	1016	-

O meio, que foi uma simulação de um mosto, tinha potencial (no caso de ocorrer uma fermentação completa) para dar origem a uma solução com 10,99% de teor em álcool visto que apresentava uma densidade de 1079 g/dm³ o que corresponde a 185,0 g/L de açúcar (de acordo com as tabelas dos mustímetros). Para os meios dos balões Erlenmeyer A, B, C e D a fermentação foi praticamente completa porque a densidade do meio está próxima da densidade da água o que significa que quase todo o açúcar presente foi convertido pelas leveduras (Tabela 29). O mosto artificial que terminou a fermentação com maior densidade, ou seja, maior quantidade de açúcar por fermentar, foi o mosto que continha a *M. pulcherrima*, o que está concordante com os resultados anteriores (Tabela 29). A segunda maior densidade corresponde ao mosto que continha a *T. delbrueckii* o que também está de acordo com os resultados anteriores. Não se contabiliza para a densidade o etanol produzido pois admite-se que este evaporou devido à grande área de superfície.

Capítulo 4

4. Conclusões e perspectivas futuras

Os parâmetros químicos de 31 vinhos portugueses de 8 regiões diferentes (Vinho Verde, Douro, Dão, Bairrada, Alentejo, Tejo, Lisboa e Península de Setúbal) foram determinados. Uma vez que a composição química de um vinho depende de múltiplos fatores como região vitivinícola, castas utilizadas na sua produção, processo de produção, entre outras, tentou-se caracterizar os diferentes vinhos e procurar tendências para formação de agrupamentos consoante a região vitivinícola ou o tipo de vinho quanto à cor (visto que vinhos da mesma cor foram submetidos a uma produção semelhante) ou quanto à concentração de açúcares e álcool (visto que vinhos licorosos têm processo de produção diferente de vinhos de mesa). O que se verificou através da HCA e PCA é que, se considerarmos apenas a composição relativamente aos minerais, consegue-se observar alguma tendência para se formarem agrupamentos, sendo esta tendência independente do tipo de vinho quanto à cor (ou seja, conseguiu-se colocar nos mesmos agrupamentos, vinhos tintos, brancos e rosados de uma mesma região). A ANOVA e teste de Tukey, considerando as regiões Alentejo, Douro, Vinhos Verdes e Bairrada, mostraram que os minerais que discriminam os vinhos consoante a região são o ferro e o cobre. Tendo em conta a concentração de ferro, os vinhos do Douro e do Alentejo são diferentes dos Vinhos Verdes embora as duas primeiras não se distingam entre si. O cobre permite distinção entre a Bairrada e o Douro. O potássio e o cálcio não permitiram discriminação conforme a região vitivinícola. Considerando os parâmetros glicose e frutose, não foi possível distinguir vinhos de diferentes regiões. Já o parâmetro álcool revelou ter alguma capacidade de distinguir a região de Vinhos Verdes das regiões Bairrada, Douro e Alentejo. Quando tivemos em conta os parâmetros poder antioxidante, índice de Folin, antocianinas e dióxido de enxofre (cujas correlações foram analisadas através da determinação dos coeficientes de correlação de Pearson, verificando-se uma forte interligação entre os parâmetros índice de Folin, antocianinas, parâmetro a^* e poder antioxidante), conseguimos diferenciar os vinhos consoante o tipo (processo de produção): vinho de mesa branco, vinho de mesa rosado, vinho de mesa tinto, vinho licoroso branco ou vinho licoroso tinto.

Também se estudou o efeito da aplicação de colas (nomeadamente, a bentonite e a caseína) na cor de alguns destes vinhos (vinhos brancos e rosados, por serem aqueles mais suscetíveis a mudanças na cor devido a oxidação) após 70 dias de abertura das garrafas. Neste estudo de revitalização do vinho por aplicação de colas, os resultados obtidos não permitiram tirar ilações significativas pois não houve resultados consistentes, possivelmente, pela presença de alguma cola em suspensão que tenha interferido com a leitura da absorvância.

Em terceiro lugar, utilizou-se 10 vinhos da Bairrada (5 brancos e 5 tintos) para se observar a evolução dos parâmetros químicos, dióxido de enxofre, índice de Folin, poder antioxidante e parâmetros de cor, ao longo de 15 dias, desde a abertura das garrafas. Este estudo de oxidação do vinho ao longo do tempo mostrou que a alteração nas propriedades químicas do vinho é rápida, ocorrendo, essencialmente, nos primeiros três dias. Nos três primeiros dias, houve diminuição abrupta do poder antioxidante e do índice de Folin, dada a perda também acentuada de dióxido de enxofre, que deixou os compostos fenólicos (agentes primários da oxidação do vinho) desprotegidos. Ao longo da oxidação, não houve alteração significativa do parâmetro a* quer nos vinhos brancos quer nos vinhos tintos. O parâmetro b* dos vinhos aumentou ligeiramente, o que poderá indicar formação de polímeros com cor amarela. Tanto os vinhos brancos como os vinhos tintos tiveram diminuição da luminosidade.

O estudo, através de um mosto artificial, da dinâmica populacional de 4 monoculturas e 4 combinações das estirpes de leveduras (*Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbrueckii*) revelou que a levedura *M. pulcherrima* é aquela que apresenta menor poder fermentativo, sendo a *S. cerevisiae* aquela que possui maior poder fermentativo, apresentando consumo de açúcar mais rápido quando se encontra na presença de outras leveduras. Este facto dá a entender a existência de uma sinergia entre a *S. cerevisiae* e outras leveduras de estirpe diferente.

Em termos de perspetivas futuras, seria interessante tornar o estudo mais específico, por exemplo, numa caracterização de vinhos para tentar observar tendências de formação de agrupamentos, consoante a região, considerar apenas vinhos tintos, de um número menor de regiões (por exemplo, apenas Alentejo, Vinho Verde, Douro e Tejo) e investir numa amostragem mais abrangente (maior número de vinhos para cada região e de marcas diferentes) para cada região, de forma a ter uma maior

representatividade de cada região. Por outro lado, num futuro estudo, para averiguar formação de agrupamentos consoante a região, poder-se-ia excluir os metais cálcio e potássio e considerar apenas os metais cobre e ferro.

A nível de estudo de efeitos da aplicação de colas a vinhos oxidados seria interessante averiguar efeitos não só na cor, mas também no índice de Folin e teor em antocianinas.

Bibliografia

- [1] H. Johnson, *The Story of Wine*. Mitchell-Beazley, 1989.
- [2] P. McGovern *et al.*, “Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, p. 201714728, 2017.
- [3] D. Legras, Jean-Luc; Sicard, “Bread, veer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex,” 2011.
- [4] International Organisation of vine and wine - Intergovernmental Organisation, “OIV Statistical Report on World Vitiviniculture - 2018 World Vitiviniculture Situation,” 2018.
- [5] R. S. Jackson, *Wine Science: Principles and Applications*, Third Edit. Elsevier, 2008.
- [6] I. da V. e do Vinho, “Vinhos e Aguardentes de Portugal 2017 - Anuário.”
- [7] N. Magalhães, *Tratado de viticultura - A videira, a vinha e o terroir*. .
- [8] “Regiões vitivinícolas.” [Online]. Available: <http://winesofportugal.info/pagina.php?codNode=18012>.
- [9] J. Carvalheira, “Vinificação em Tinto,” *Laboratório Química Enológica da DRAPC - EVB*.
- [10] B. W. Zoecklein, K. C. Fugelsang, B. H. Gump, and F. S. Nury, *Wine analysis and production*. 1999.
- [11] R. Marchal and E. J. Waters, *Managing wine quality - volume 2 (Oenology and wine quality)*. Woodhead Publishing Limited, 2010.
- [12] N. P. Jolly, C. Varela, and I. S. Pretorius, “Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 215–237, 2014.
- [13] G. H. Fleet, S. Lafon-Lafourcade, and P. Ribereau-Gayon, “Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1034–1038, 1984.
- [14] T. Henick-Kling, W. Edinger, P. Daniel, and P. Monk, “Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 84, no. 5, pp. 865–

876, 1998.

- [15] E. Muñoz-Bernal, M. E. Rodríguez, P. Benítez, F. J. Fernández-Acero, L. Rebordinos, and J. M. Cantoral, “Molecular analysis of red wine yeast diversity in the Ribera del Duero D.O. (Spain) area,” *Arch. Microbiol.*, vol. 195, no. 5, pp. 297–302, 2013.
- [16] M. J. Torija, N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamón, and A. Mas, “Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years,” *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 79, no. 3–4, pp. 345–352, 2001.
- [17] J. Carvalheira, “Fermentações: alcoólica e maloláctica,” *Laboratório Química Enológica da DRAPC - EVB*, 2017.
- [18] G. Heard and G. H. Fleet, “The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice,” *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 65, no. 1983, pp. 23–28, 1988.
- [19] M. Combina, A. Elía, L. Mercado, C. Catania, A. Ganga, and C. Martinez, “Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 99, no. 3, pp. 237–243, 2005.
- [20] Á. Benito, F. Calderón, F. Palomero, and S. Benito, “Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production,” *Molecules*, vol. 20, no. 6, pp. 9510–9523, 2015.
- [21] A. Hranilovic, M. Bely, I. Masneuf-Pomarede, V. Jiranek, and W. Albertin, “The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems,” *PLoS One*, vol. 12, no. 9, pp. 1–17, 2017.
- [22] M. Sauer, D. Porro, D. Mattanovich, and P. Branduardi, “16 Years Research on Lactic Acid Production With Yeast—Ready for the Market?,” *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 27, no. 1, pp. 229–256, 2010.
- [23] M. Gobbi *et al.*, “*Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine,” *Food Microbiol.*, vol. 33, no. 2, pp. 271–281, 2013.
- [24] Á. Benito, F. Calderón, F. Palomero, and S. Benito, “Quality and composition of airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 2, pp. 135–144, 2016.
- [25] L. Oro, M. Ciani, and F. Comitini, “Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 116, no. 5, pp. 1209–1217, 2014.
- [26] G. A. Farris, I. Mannazzu, and M. Budroni, “Identification of killer factor in the

- yeast genus *Metschnikowia*,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 13, no. 4, pp. 297–298, 1991.
- [27] F. Comitini, N. Di Pietro, L. Zacchi, I. Mannazzu, and M. Ciani, “*Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: Purification and characterization,” *Microbiology*, vol. 150, no. 8, pp. 2535–2541, 2004.
- [28] F. Comitini and M. Ciani, “The zymocidal activity of *Tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking,” *Let. Appl. Microbiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 50–56, 2010.
- [29] A. Santos, M. San Mauro, E. Bravo, and D. Marquina, “PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*,” *Microbiology*, vol. 155, no. 2, pp. 624–634, 2009.
- [30] J. Manuela and C. Pires, “Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio,” 2017.
- [31] J. J. Moreno, C. Millán, J. M. Ortega, and M. Medina, “Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures,” *J. Ind. Microbiol.*, vol. 7, no. 3, pp. 181–189, 1991.
- [32] M. Ciani and G. Picciotti, “The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 17, no. 11, pp. 1247–1250, 1995.
- [33] M. Ciani and F. Maccarelli, “Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 199–203, 1998.
- [34] T. Herraiz, G. Reglero, M. Herraiz, P. J. Martin-Alvarez, and M. D. Cabezudo, “The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 41, no. 4, pp. 313–318, 1990.
- [35] J. Martinez, F. Toledano, C. Millán, and J. M. Ortega, “Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from ‘Pedro Ximenez’ grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts,” *Food Microbiol.*, vol. 7, no. 3, pp. 217–225, 1990.
- [36] M. Bely, P. Stoeckle, I. Masneuf-Pomarède, and D. Dubourdieu, “Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 122, no. 3, pp. 312–320, 2008.
- [37] A. Blomberg and L. Adler, “Physiology of Osmotolerance in Fungi,” *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 33, pp. 145–212, 1992.
- [38] M. Ciani, L. Beco, and F. Comitini, “Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 108, no. 2, pp. 239–245, 2006.
- [39] C. Locatelli and V. de Moraes, “Vinho : uma revisão sobre a composição química

- e benefícios à saúde,” no. February 2012, 2017.
- [40] M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry*. .
- [41] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, and B. Donèche, *Handbook of Enology, volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, Second. Chichester, 2006.
- [42] L. D. Falcão, D. M. Barros, and M. T. B. Luiz, “Copigmentação Intra e Intermolecular de Antocianinas: Uma Revisão,” pp. 351–366, 2003.
- [43] J. P. Alpuim, “Aprendendo a Química do Vinho,” *Bol. da Soc. Port. Química*, vol. 65, pp. 13–27, 1997.
- [44] S. Catarino and R. B. De Sousa, “Revisão: Elementos Contaminantes nos Vinhos,” vol. 23, no. 1, pp. 3–19, 2008.
- [45] I. organization of vine and wine (OIV), *Compendium of international methods of wine and must analysis*. 2008.
- [46] G. A. Agbor, J. A. Vinson, and P. E. Donnelly, “Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay,” *Int. J. Food Sci. , Nutr. Diet.*, vol. 3, pp. 147–156, 2014.
- [47] M. Grossi, G. Di Lecce, M. Arru, T. G. Toschi, and B. Riccò, “An opto-electronic system for in-situ determination of peroxide value and total phenol content in olive oil,” *J. Food Eng.*, vol. 146, no. 29, pp. 1–7, 2015.
- [48] A. M. Pisoschi and G. P. Negulescu, “Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review,” *Biochem. Anal. Biochem.*, vol. 01, no. 01, pp. 1–10, 2012.
- [49] J. A. Rodrigues, “Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor,” 2011.
- [50] A. C. R. Moreira, “Validação de métodos na análise química em vinhos,” Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2017.
- [51] A. J. F. Jackson, E. H. F. Linskens, and N. H. F. Linskens, *Modern Methods of Plant Analysis*, vol. 6 (Wine An. Springer -Verlag, 1988.
- [52] F. Demoliner and E. Giovanni, “Avaliação de dois métodos analíticos de determinação de dióxido de enxofre livre,” p. 25, 2008.
- [53] F. Ayala, J. F. Echávarri, and I. L. Negueruela, “A New Simplified Method for Measuring the Color of Wines. III. All Wines and Brandies,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 50, no. January, pp. 1–5, 1999.
- [54] S. Pérez-Magariño and M. L. González-Sanjosé, “Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines,” *Food Chem.*, vol. 81, no. 2, pp. 301–306, 2003.
- [55] International Organisation of vine and wine - Intergovernmental Organisation, *Compendium of international analysis of methods*. 2017.

- [56] J. Coutinho Brás, “Estudo do Efeito da Aplicação de Diferentes Colas Comerciais na Composição Polifenólica de Vinhos do Porto,” 2016.
- [57] “Fining agents.” [Online]. Available: https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/frequently_asked_questions/fining_agents/.
- [58] A. Giacomino, O. Abollino, M. Malandrino, and E. Mentasti, “Analytica Chimica Acta The role of chemometrics in single and sequential extraction assays : A Review . Part II . Cluster analysis , multiple linear regression , mixture resolution , experimental design and other techniques,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 688, no. 2, pp. 122–139, 2011.
- [59] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte, and L. Kaufman, *Chemometrics: a textbook*, First edit. 1988.
- [60] C. B. Y. Cordella, *PCA: The Basic Building Block of Chemometrics*. Intech Open, 2012.
- [61] J. I. D. Pinheiro, S. S. R. Carvajal, S. B. da Cunha, and G. C. Gomes, *Probabilidade e estatística, quantificando a incerteza*. Elsevier Editora, 2012.
- [62] S. V. Dutra *et al.*, “Characterization of wines according the geographical origin by analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values,” *Food Chem.*, vol. 141, no. 3, pp. 2148–2153, 2013.
- [63] S. Frías, J. E. Conde, J. J. Rodríguez-Bencomo, F. García-Montelongo, and J. P. Pérez-Trujillo, “Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents,” *Talanta*, vol. 59, no. 2, pp. 335–344, 2003.
- [64] D. Kruzlicova, Ž. Fiket, and G. Kniewald, “Classification of Croatian wine varieties using multivariate analysis of data obtained by high resolution ICP-MS analysis,” vol. 54, pp. 621–626, 2013.
- [65] S. Kallithraka, I. S. Arvanitoyannis, P. Kefalas, A. El-Zajouli, E. Soufleros, and E. Psarra, “Instrumental and sensory analysis of Greek wines; Implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin,” *Food Chem.*, vol. 73, no. 4, pp. 501–514, 2001.
- [66] A. G. B. Medina, “Les ions métalliques dans la différenciation des vins rouges des trois régions d’appellation d’origine Rioja,” no. 1979, 1987.
- [67] K. Schlesier *et al.*, “Characterisation and determination of the geographical origin of wines. part i: Overview,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 230, no. 1, pp. 1–13, 2009.
- [68] L. A. Rizzon, M. B. G. Salvador, and A. Miele, “Teores de cations dos vinhos da Serra Gaúcha,” *Ciência e Tecnol. Aliment.*, vol. 28 (3), pp. 635–641, 2008.
- [69] A. Cabello-pasini, V. Macías-carranza, A. Siqueiros-valencia, and M. Á. Huerta-díaz, “Concentrations of Calcium , Magnesium , Potassium , and Sodium in Wines from Mexico,” no. June, 2013.

- [70] B. Don, *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition Pascal Rib* ', vol. 1. 2006.
- [71] G. Jones, *Uma Avaliação do Clima para a Região Demarcada do Douro : Uma análise das condições climáticas do passado , presente e futuro para a produção de vinho*. 2013.
- [72] M. Tareco Lança, "Desalcoolização Parcial de vinhos por Nanofiltração e Osmose Inversa Efeito do nível de desalcoolização," 2011.
- [73] L. C. Corrêa, A. C. Poloni Rybka, A. Camarão Telles Biasoto, and G. E. Pereira, "Determinação de açúcares em mosto, sucos de uva e vinho por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)," 2013.
- [74] E. Cadenas and L. Packer, *Handbook of Antioxidants*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002.
- [75] I. M. Pereira and R. H. Moretti, "Caracterização física, química e sensorial do vinho branco seco Sauvignon Blanc tratado com polivinilpirrolidona (PVPP)," *Cienc. Tecnol. Aliment*, 17 (2), pp. 192–195, 1997.
- [76] C. Maria Oliveira, A. C. S. Ferreira, V. De Freitas, and A. M. S. Silva, "Oxidation mechanisms occurring in wines," *Food Res. Int.*, vol. 44, pp. 1115–1126, 2011.
- [77] P. Taylor *et al.*, "Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, no. July 2013, pp. 37–41.

Anexos

A.1 – Tratamento de dados referentes ao capítulo 3.1 (Caracterização de diferentes regiões e de diferentes tipos)

A.1.1 – Determinação da concentração dos minerais, das antocianinas e dos açúcares

As concentrações dos parâmetros cobre, ferro, cálcio, potássio, glicose, glicose + frutose e antocianinas foram determinadas por um equipamento automatizado (Miura) no qual se colocam as amostras de vinho e os reagentes apropriados e é o próprio equipamento que prepara as soluções padrão, determina a curva de calibração e calcula as concentrações, fornecendo ao utilizador três valores de concentração com os quais se faz a média. As antocianinas não são determinadas com soluções padrão porque é algo complexo que não pode ser representado por uma solução padrão. As equações das retas de calibração e os valores de R^2 estão na Tabela A. 1.

Tabela A. 1 – Equações das curvas de calibração e valores de R^2 correspondentes à determinação dos minerais e dos açúcares realizada no capítulo 3.1 (Caracterização de vinhos de diferentes regiões e de diferentes tipos)

Parâmetro analisado	Equação da curva de calibração	R^2
Cobre	$y = 0,1677 x - 0,0115$	0,9999
Ferro	$y = 0,0476 x + 0,0243$	0,9982
Cálcio	$y = 0,0195 x - 0,0057$	0,9986
Potássio	$y = 0,0073 x + 0,3799$	0,9891
Glicose	$y = 0,2683 x + 0,1761$	0,9973
Glicose + frutose	$y = 0,2912 x - 0,0008$	0,9997

Tabela A. 2 -Parâmetros relativos à determinação de cálcio (N- número de leituras, Xm – média da concentração, Sx – desvio padrão, %RSE – erro padrão relativo)

Código do vinho	Leitura 1 da concentração de cálcio	Leitura 2 da concentração de cálcio	Leitura 3 da concentração de cálcio	N	Xm	Sx	%RSE
VB1	40,4	42,3	41,5	3	41,4	1,0	2,3
VB2	55,8	55,1	54,6	3	55,2	0,6	1,1
VB3	34,4	33,9	33,6	3	34,0	0,4	1,2
VB4	51,4	52,0	52,3	3	51,9	0,5	0,9
VB5	50,3	52,6	51,9	3	51,6	1,2	2,3
VB6	43	42,8	42,5	3	42,8	0,3	0,6
VB7	45,9	46,6	46,5	3	46,3	0,4	0,8
VB8	58,8	59,2	58,3	3	58,8	0,5	0,8
VB9	57,8	57,7	57,8	3	57,8	0,1	0,1
VB10	37,8	37,4	37,7	3	37,6	0,2	0,6
VB11	53,9	53,8	54,0	3	53,9	0,1	0,2
VB12	52,3	51,3	51,1	3	51,6	0,6	1,2
VB13	53,3	50,6	51,7	3	51,9	1,4	2,6
VR14	50,1	50,3	50,9	3	50,4	0,4	0,8
VR15	47,5	46,7	47,0	3	47,1	0,4	0,9
VR16	52,1	51,9	52,3	3	52,1	0,2	0,4
VR17	53,5	53,4	53,3	3	53,4	0,1	0,2
VR18	41,4	41,7	42,0	3	41,7	0,3	0,7
VT19	51,3	51,3	51,6	3	51,4	0,2	0,3
VT20	53,1	54,6	52,3	3	53,3	1,2	2,2
VT21	42,3	41,2	41,5	3	41,7	0,6	1,4
VT22	62,2	15,9	62,9	3	47,0	26,9	57,3
VT23	47,3	46,6	47,4	3	47,1	0,4	0,9
VT24	44,8	44,7	43,9	3	44,5	0,5	1,1
VT25	43,4	43,0	44,0	3	43,5	0,5	1,2
VT26	43	42,3	42,1	3	42,5	0,5	1,1
VB27	43,1	43,4	42,5	3	43,0	0,5	1,1
VT28	45,4	45,7	44,0	3	45,0	0,9	2,0
VT29	39,5	40,2	38,2	3	39,3	1,0	2,6
VT30	41,5	44,7	41,8	3	42,7	1,8	4,1
VT31	38,6	42,2	39,3	3	40,0	1,9	4,8

A.1.2 - Determinação dos valores do poder antioxidante

Tabela A. 3 - Valores de absorvância obtidos, respetiva média e desvio padrão referentes à análise do poder antioxidante nos vinhos utilizados no capítulo 3.1 (do VB1 ao VT25)

Código do vinho	valores de absorvância			N	Xm	Sx
VB1	2,228	2,285	2,218	3	2,244	0,036
VB2	2,358	2,411	2,502	3	2,424	0,073
VB3	2,467	2,531	2,577	3	2,525	0,055
VB4	2,454	2,434	2,439	3	2,442	0,010
VB5	2,404	2,540	2,332	3	2,425	0,106
VB6	2,375	2,387	2,359	3	2,374	0,014
VB7	2,184	2,158	2,300	3	2,214	0,076
VB8	2,438	2,425	2,519	3	2,461	0,051
VB9	2,377	2,308	2,295	3	2,327	0,044
VB10	2,319	2,265	2,387	3	2,324	0,061
VB11	2,395	2,292	2,509	3	2,399	0,109
VB12	2,250	2,355	2,374	3	2,326	0,067
VB13	2,494	2,560	2,266	3	2,440	0,154
VR14	1,975	1,940	1,933	3	1,949	0,023
VR15	2,395	2,273	2,496	3	2,388	0,112
VR16	2,346	2,299	2,249	3	2,298	0,049
VR17	2,106	1,970	2,062	3	2,046	0,069
VR18	2,248	2,218	2,220	3	2,229	0,017
VT19	2,147	2,307	2,259	3	2,238	0,082
VT20	2,415	2,498	2,400	3	2,438	0,053
VT21	2,224	2,165	2,442	3	2,277	0,146
VT22	2,346	2,396	2,338	3	2,360	0,031
VT23	2,442	2,405	2,373	3	2,407	0,035
VT24	2,359	2,296	2,159	3	2,271	0,102
VT25	2,421	2,565	2,467	3	2,484	0,074

(N – número de leituras, Xm – absorvância média, Sx – desvio padrão)

Tabela A. 4 - Curva de calibração referente à determinação do poder antioxidante dos vinhos utilizados no capítulo 3.1 (do VB1 ao VT25)

C (mg/L)	Valores de absorvância			N	Xm	Sx
0	2,911	3,021	3,106	3	3,013	0,098
50	2,840	2,823	2,708	3	2,790	0,072
100	2,553	2,570	2,514	3	2,546	0,029
200	2,254	1,941	2,275	3	2,157	0,187
300	1,672	1,653	1,659	3	1,661	0,010
400	1,269	1,350	1,475	3	1,365	0,104

(C – concentração da solução padrão, N - número de réplicas, Xm – média da absorvância, Sx – desvio padrão)

Tabela A. 5 - Valores dos parâmetros da curva de calibração (ndf - número de graus de liberdade)

b1	b0	
-0,004	2,990	valor
0,0001	0,031	SE
0,996	0,047	StdFit

Com recurso ao programa Excel, procedeu-se a um teste de homogeneidade de variância (Tabela A. 6) para se perceber se se deveria utilizar um modelo com pesos (WLS), no caso de os pontos terem variâncias diferentes, ou sem pesos (OLS), no caso de as variâncias serem estatisticamente iguais. No Excel, a fórmula utilizada para o valor de teste (TV) foi o quadrado do quociente entre o desvio padrão do ponto 1 e o desvio padrão do ponto 6. A fórmula para o F de Fisher foi “=FINV(0,005;2;2)”. Verificou-se que existe homogeneidade de variância pois a probabilidade de aceitar a hipótese nula (pH0) é superior a 0,03 (pH0 = 0,94) e, assim, pode utilizar-se o modelo OLS.

Para escolher o modelo (P01 ou P012), procedeu-se a uma avaliação do significado estatístico dos parâmetros para cada modelo (Tabela A. 7 e Tabela A. 8), verificando-se um RSE de 64,3 % para o parâmetro b2 do modelo P012 o que faz suspeitar que este parâmetro não tenha significado estatístico.

Tabela A. 6 - Teste de homogeneidade de variância

TV	F^b_0.01	pH0
1.13	199	0,940

Tabela A. 7 - Avaliação do significado estatístico dos parâmetros do modelo P01

Parâmetro	Valor	StdErr	%RSE
b0	- 0,004	0,000	3,3
b1	2,990	0,031	1,0

Tabela A. 8 - Avaliação do significado estatístico dos parâmetros do modelo P012

Parâmetro	Valor	StdErr	%RSE
b0	3,022	0,034	1,1
b1	- 0,005	0,0004	9,2
b2	0,000	0,000001	64,3

Também se realizou um teste de Mandel (Tabela A. 10), utilizando-se os valores da Tabela A. 9, verificando-se que os modelos ajustam de modo similar visto que a hipótese nula é aceite e, assim, opta-se pelo modelo com maior número de graus de liberdade, ou seja, P01.

Tabela A. 9 - Dados utilizados para realizar teste de Mandel

Modelo	SS	ndf	VarFit
P01	0,008959	4	0,00224
P012	0,004959814	3	0,001653271

Tabela A. 10 - Teste de Mandel

TV	F ^u 0.001	pH0
2,42	34,12	0,247

Para se proceder a um diagnóstico de outliers na curva de calibração, realizou-se uma avaliação através de regressão robusta (Figura A. 1). O valor do parâmetro b1 foi obtido fazendo-se a mediana dos valores das cinco colunas à direita e o valor do parâmetro b0 fazendo-se mediana dos valores da sexta coluna a contar da direita.

X	Ym	Y*	Ym-Y*	Ym - b1C = b0						
1	0	3,013	3,009	0,004	3,013					
2	50	2,790	2,795	0,004	3,004	-0,00445				
3	100	2,546	2,581	0,035	2,974	-0,00489	-0,00467			
4	200	2,157	2,153	0,004	3,013	-0,00389	-0,004224	-0,00428		
5	300	1,661	1,725	0,063	2,945	-0,00495	-0,004422	-0,00452	-0,0045	
6	400	1,365	1,297	0,068	3,077	-0,00297	-0,00396	-0,00394	-0,00407	-0,00412
				b1	-0,0043					
				b0	3,0085					

Figura A. 1 - Regressão robusta (Ym – valor médio experimental de absorvância, Y* - valor de absorvância previsto pelo modelo)

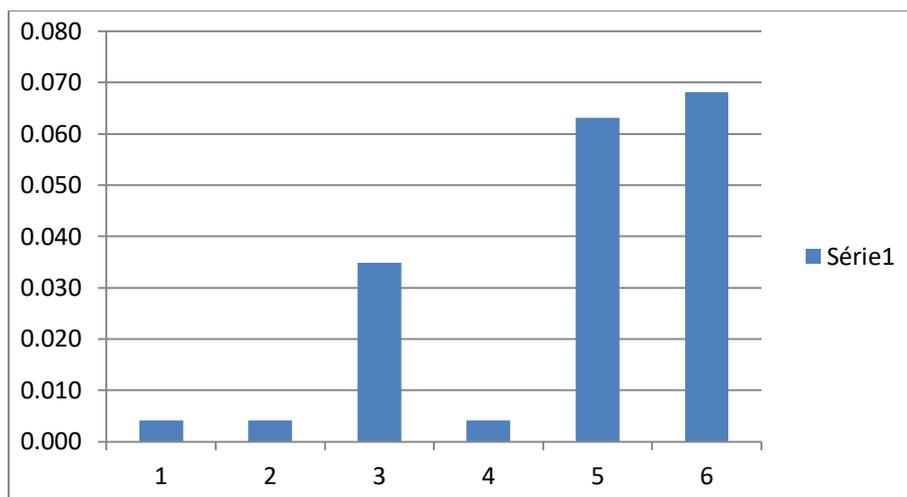


Figura A. 2 - Histograma das diferenças em valor absoluto entre o valor de absorvância experimental e o valor de absorvância previsto pelo modelo P01 para cada ponto da curva de calibração

Através da observação do histograma da Figura A. 2, fez-se uma lista de eventuais outliers, tendo por base o tamanho das barras. Neste caso, a hipótese nula é o quadrado da variação na variância por se retirar o ponto suspeito ($\Delta\sigma_{fit}^2$) ser menor ou igual à variância puramente aleatória ($\Delta\sigma_{fit}^2 \leq \sigma_{pe}^2$). Ao eliminar-se o ponto 6 (para o qual a barra é maior), verificou-se que a qualidade do ajuste não é prejudicada por ter o ponto 6, pois como a probabilidade de aceitar a hipótese nula é superior a 0,03 ($pH0 = 0,263$) como se pode ver na tabela 29. Desta forma, o ponto 6 não é outlier. Portanto, não existem outliers na curva de calibração. A fórmula utilizada para calcular o valor de F de Fisher foi “= FINV(0,01;1;3)” e para calcular o valor de pH0 foi

“= FDIST(TV;1;3)”, sendo o valor de TV dado por $\frac{\frac{\Delta SS}{\Delta ndf}}{VarFit_{menor}}$.

Tabela A. 11 - Dados utilizados para calcular os valores de TV, F e pH0 para a avaliação de outliers a curva de calibração

Ponto eliminado	-	P6
N	6	5
SS	0,008959	0,006087
ndf	4	3
VarFit	0,00224	0,001522

Tabela A. 12 - Avaliação de outliers na curva de calibração (TV - valor de teste, F – F de Fisher, pH0 – probabilidade de a hipótese nula ser aceite)

TV	F ^u _0.001	pH0
1,89	34,12	0,263

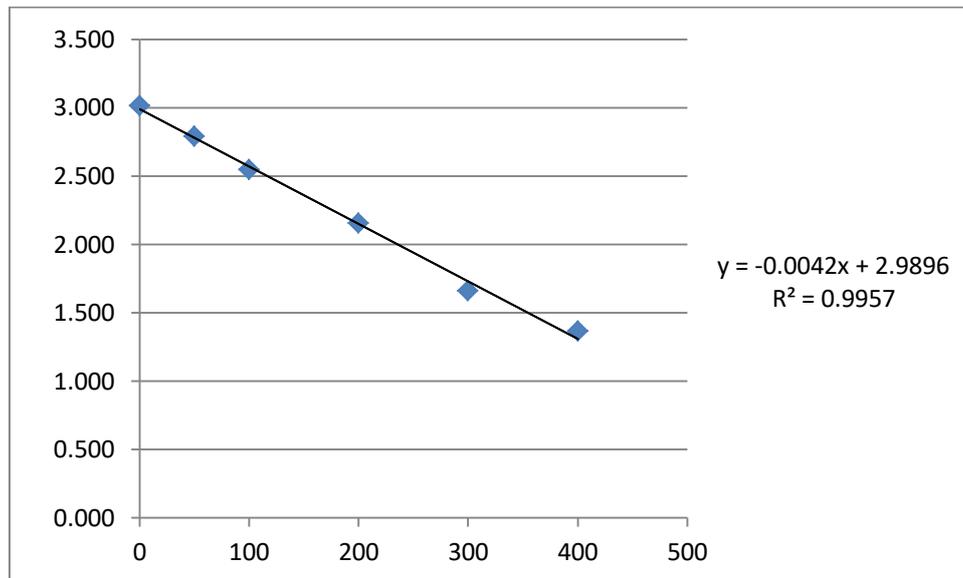


Figura A. 3 - Curva de calibração (poder antioxidante em função da concentração de quercetina)

Para se validar a curva de calibração, realizou-se avaliação do significado estatístico dos parâmetros b0 e b1 do modelo P01 (Tabela A. 13). Verificou-se que, no modelo P01, ambos os parâmetros têm significado estatístico, pois a hipótese nula é aceite.

Tabela A. 13 - Avaliação do significado estatístico dos parâmetros para validação da curva de calibração

Parâmetros	Valor	StdErr	%RSE	TV	pH0
b0	- 0,004	0,0001	3,3	30,56	0,000
b1	2,990	0,031	1,0	96,95	0,000

Para calcular a concentração da amostra utilizou-se a fórmula $(Abs - 2,990)/0,004$ e, em seguida, multiplicou-se pelo fator de diluição (2 no caso dos brancos e rosados e 20 no caso dos tintos). Na Tabela A. 14 estão os valores de absorvância média, os valores de concentração para a amostra diluída (C_diluída) e a concentração para a amostra (C_amostra).

Tabela A. 14 - Valores de poder oxidante dos vinhos do VB1 ao VT25 em mg de quercetina por litro

Código do vinho	Absorvância média	C_diluída	C_amostra
VB1	2,244	186,6	373,2
VB2	2,424	141,6	283,2
VB3	2,525	116,3	232,5
VB4	2,442	136,9	273,8
VB5	2,425	141,2	282,3
VB6	2,374	154,1	308,2
VB7	2,214	194,0	388,0
VB8	2,461	132,3	264,7
VB9	2,327	165,8	331,7
VB10	2,324	166,6	333,2
VB11	2,399	147,8	295,7
VB12	2,326	165,9	331,8
VB13	2,440	137,5	275,0
VR14	1,949	260,2	520,3
VR15	2,388	150,5	301,0
VR16	2,298	173,0	346,0
VR17	2,046	236,0	472,0
VR18	2,229	190,3	380,7
VT19	2,238	188,1	3761,7
VT20	2,438	138,1	2761,7
VT21	2,277	178,3	3565,0
VT22	2,360	157,5	3150,0
VT23	2,407	145,8	2916,7
VT24	2,271	179,7	3593,3
VT25	2,484	126,4	2528,3

Para determinar o poder antioxidante dos vinhos do VT26 ao VT31, utilizou-se uma placa diferente. Portanto, a curva de calibração utilizada também foi diferente. Na Tabela A. 15 estão os valores de absorvância obtidos, a média (Y_m) e o desvio padrão (S_y).

Tabela A. 15 - Valores de absorvância referentes aos vinhos do VT26 ao VT31

Código do vinho	Valores de absorvância			N	Y_m	S_y
VT26	2,613	2,771	2,683	3	2,689	0,079
VB27	2,097	2,061	1,956	3	2,038	0,073
VT28	2,402	2,391	2,415	3	2,403	0,012
VT29	2,693	2,572	2,591	3	2,619	0,065
VT30	2,329	2,338	2,386	3	2,351	0,031
VT31	2,731	2,658	2,647	3	2,679	0,046

Tabela A. 16 – Valores de absorvância obtidos para as soluções padrão utilizadas para traçar a curva de calibração para determinação do poder antioxidante dos vinhos do VT26 ao VT31 no capítulo 3.1

C (mg/L)	valores de absorvância			N	Ym	Sy
0	2,824	2,812	2,821	3	2,819	0,006
50	2,614	2,59	2,6	3	2,601	0,012
100	2,452	2,398	2,483	3	2,444	0,043
200	2,189	2,075	2,035	3	2,100	0,080
300	1,61	1,642	1,61	3	1,621	0,018
400	1,437	1,396	1,349	3	1,394	0,044

(N – número de réplicas, Ym – absorvância média, Sy – desvio padrão)

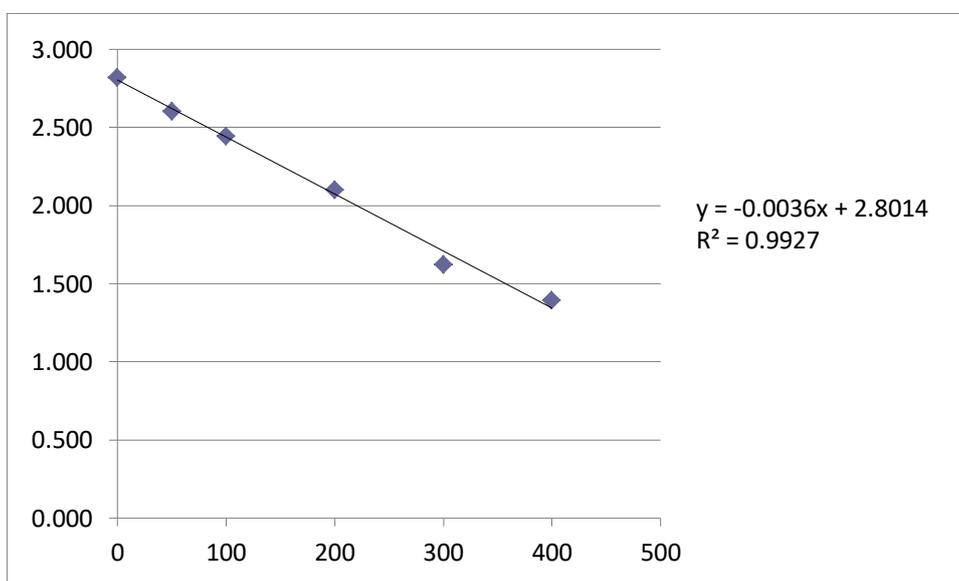


Figura A. 4 - Curva de calibração para determinação do poder antioxidante dos vinhos do VT26 ao VT31 utilizados no capítulo 3.1

Tabela A. 17 – Valores de poder antioxidante, em mg de quercetina por litro, dos vinhos do VT26 ao VT31, utilizados no capítulo 3.1

Código do vinho	C_diluída	C_amostra
VT26	28,0	560,0
VB27	190,8	381,5
VT28	99,6	1991,7
VT29	45,6	911,7
VT30	112,5	2250,0
VT31	30,6	611,7

A.2 – Dados utilizados no capítulo 3.2 (Estudo de revitalização do vinho por aplicação de colas a vinhos oxidados)

Tabela A. 18 - Valores de poder antioxidante (mg/L de quercetina) antes e depois da aplicação de colas

Código do vinho	No dia da abertura da garrafa	70 dias após abertura da garrafa	Controlo (não tem cola)	Após aplicação de colas			
				Bentonite		Caseína	
				Dose máxima	Dose mínima	Dose máxima	Dose mínima
VB2	283	58	15	30	8	50	33
VB7	388	128	80	78	45	85	66
VR15	301	137	151	169	166	183	168
VR18	381	173	181	155	205	206	177

Tabela A. 19 - Valores de a* antes e após aplicação das diferentes colas

Código do vinho	No dia da abertura da garrafa	70 dias após abertura da garrafa	Controlo (não tem cola)	Após aplicação de colas			
				Bentonite		Caseína	
				Dose máxima	Dose mínima	Dose máxima	Dose mínima
VB2	-0,54	-1,12	-1,04	-1,14	-1,12	-1,27	-1,28
VB7	-0,52	-0,71	-0,68	-0,69	-0,93	-0,92	-0,85
VR15	0,52	1,81	1,81	1,76	1,83	1,83	1,86
VR18	0,61	1,99	1,97	1,95	2,03	2,00	2,03

Tabela A. 20 - Valores de b* antes e após aplicação das diferentes colas

Código do vinho	No dia da abertura da garrafa	70 dias após abertura da garrafa	Controlo	Após aplicação de colas			
				Bentonite		Caseína	
				Dose máxima	Dose mínima	Dose máxima	Dose mínima
VB2	2,82	8,75	8,47	8,60	8,75	8,67	8,56
VB7	2,53	7,32	7,47	7,45	7,55	7,64	7,29
VR15	0,99	2,71	2,76	2,74	2,68	2,71	2,72
VR18	1,02	3,14	3,02	3,05	3,07	3,05	3,09

Tabela A. 21 - Valores do parâmetro L* antes e após aplicação de colas

Código do vinho	No dia da abertura da garrafa	70 dias após abertura da garrafa	Controlo (não tem cola)	Após aplicação de colas			
				Bentonite		Caseína	
				Dose máxima	Dose mínima	Dose máxima	Dose mínima
VB2	99,6	98,3	98,2	98,1	98,3	98,1	98,2
VB7	99,6	98,3	98,6	98,4	98,5	98,2	98,5
VR15	99,3	98,2	98,0	98,1	98,0	98,0	98,1
VR18	99,3	98,0	97,9	97,9	97,9	97,8	97,9

Tabela A. 22 - Valores de índice de Folin antes e depois da aplicação de colas

Código do vinho	No dia da abertura da garrafa	70 dias após abertura da garrafa	Controlo (não tem cola)	Após aplicação de colas			
				Bentonite		Caseína	
				Dose máxima	Dose mínima	Dose máxima	Dose mínima
VB2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
VB7	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
VR15	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
VR18	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2

A.3 – Dados utilizados no capítulo 3.3 (Estudo da oxidação do vinho ao longo do tempo)

O tratamento dos dados para determinação do poder antioxidante foi análogo ao ilustrado no anexo A.1.

Tabela A. 23 - Valores de poder antioxidante (em mg de quercetina por litro) dos vinhos, utilizados no capítulo 3.3, em diferentes dias

Código do vinho	Poder antioxidante (mg/L)				
	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 15
VB32	187	72	54	45	40
VB33	367	242	212	199	195
VB34	214	127	104	89	83
VB35	306	182	173	167	165
VB36	277	191	162	143	135
VT37	3548	2270	2126	2069	2047
VT38	3390	2398	2184	2094	2066
VT39	3718	2501	2365	2306	2259
VT40	3936	2846	2765	2738	2728
VT41	3966	3022	2758	2638	2584

Tabela A. 24 - Valores do índice de Folin em g/L ao longo do tempo

Código do vinho	Índice de Folin (g/L)				
	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 15
VB32	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
VB33	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
VB34	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
VB35	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
VB36	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
VT37	2,0	1,5	1,2	1,3	1,3
VT38	1,5	1,2	1,1	1,1	1,1
VT39	1,8	1,5	1,3	1,2	1,2
VT40	3,1	1,7	1,7	1,6	1,5
VT41	2,3	1,6	1,5	1,5	1,4

Tabela A. 25 - Evolução do dióxido de enxofre livre e total ao longo do tempo nos vinhos

Código do vinho	Dióxido de enxofre (mg/L)									
	livre					total				
	Dia 1	Dia 3	Dia 7	dia 10	Dia 15	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 15
VB32	19	19	13	11	9	90	87	87	84	81
VB33	27	16	15	14	13	129	127	125	123	121
VB34	39	25	22	19	17	167	144	140	140	126
VB35	34	24	24	19	19	116	109	101	97	97
VB36	52	31	27	23	20	153	142	135	133	126
VT37	9	5	2	2	2	86	77	65	56	43
VT38	15	10	6	6	6	94	79	62	54	49
VT39	40	23	14	13	8	147	130	114	104	85
VT40	17	9	7	5	4	163	151	137	134	134
VT41	19	10	7	4	4	79	68	51	41	35

Tabela A. 26 - Evolução dos parâmetros de cor dos vinhos ao longo do tempo

Código do vinho	Parâmetros de cor														
	a*					b*					L*				
	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 15	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 15	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 15
VB32	-0,93	-0,48	-0,59	-0,85	-0,55	4,28	3,59	3,83	3,91	4,12	99,1	100	99,5	99,4	99,1
VB33	-0,66	-0,75	-0,64	-0,63	-0,58	6,04	6,23	6,10	6,22	6,52	98,2	99,5	98,9	98,8	98,7
VB34	-0,79	-0,92	-0,69	-0,69	-0,79	4,32	4,22	4,08	4,08	4,33	98,9	100	99,3	99,3	99,1
VB35	-1,22	-1,27	-1,05	-1,14	-1,00	6,62	7,13	6,85	7,11	7,13	98,4	99,7	99,1	99,0	98,7
VB36	-1,12	-0,94	-0,73	-0,73	-0,81	4,81	5,04	4,68	4,68	5,05	99,0	99,7	99,5	99,5	99,2
VT37	29,26	29,99	30,12	29,17	29,58	15,69	16,23	17,91	19,80	21,21	65,7	67,8	65,6	65,8	64,8
VT38	29,96	30,21	30,43	30,11	30,55	16,69	16,68	17,77	19,74	20,96	66,1	67,3	65,7	65,4	64,4
VT39	35,71	37,65	38,92	39,67	40,94	14,16	14,53	15,14	16,10	16,90	63,2	63,9	62,2	61,2	59,7
VT40	33,78	35,47	35,46	35,61	35,84	20,75	21,30	21,93	22,83	22,49	61,6	61,8	60,4	30,2	60,1
VT41	37,73	38,35	38,60	38,02	38,74	16,37	16,93	19,23	20,86	22,74	58,5	59,8	58,1	57,8	57,0