



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2017 Mestrado em Bioquímica, ramo Alimentar

**Sara Campos de
Almeida**

**Caraterísticas físico-químicas dos vinhos tintos provenientes
das sub-regiões da Região Demarcada do Dão**



**Sara Campos de
Almeida**

**Caraterísticas físico-químicas dos vinhos tintos
provenientes das sub-regiões da Região Demarcada
do Dão**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e a orientação da Engenheira Assunção Agostinho, Chefe do Laboratório da Comissão Vitivinícola Regional do Dão.

Dedico este trabalho à minha família pelo incansável apoio.

o júri

presidente

Prof. Fernando Jorge Andrade Gonçalves

Professor adjunto do Departamento de Indústrias Alimentares da Escola Superior Agrária de Viseu
do Instituto Politécnico de Viseu

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Sílvia Maria Rocha Simões Carriço

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À professora Doutora Sílvia Rocha pela disponibilidade, orientação científica e espírito crítico que foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

Ao Doutor Arlindo Cunha, presidente da Comissão Vitivinícola Regional do Dão, e ao Engenheiro Luís Fialho pela oportunidade dada.

À Engenheira Maria da Assunção Agostinho, pela orientação científica, pela disponibilidade, pela ajuda e por todo o carinho e a alegria.

À Doutora Linda Almeida pela paciência, por todo o conhecimento transmitido, pela sua disponibilidade e incansável apoio para desenvolver este trabalho da melhor maneira possível.

Aos colegas de laboratório, Ângela Ferreira, Miguel Martelo e Susana Messias por me terem recebido tão bem, pela paciência e por estarem sempre disponíveis para ajudar.

À Luísa Ladeira e a Âgueda Henriques pelo constante apoio, alegria e todos os sorrisos.

À Engenheira Vanda Pedroso, do Centro de Estudos Vitivinícolas do Dão, pela ajuda na informação relativa à Região Demarcada do Dão.

À investigadora Doutora Alisa Rudnitskaya por toda a sua disponibilidade, compreensão e ajuda no tratamento estatístico dos meus resultados.

Aos meus amigos de Viseu, da Covilhã e de Aveiro, pela grande amizade, paciência e o imenso apoio que demonstraram para comigo ao longo destes anos.

À minha família, pelo apoio e presença incondicionais, pela ajuda e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis.

palavras-chave

Região Demarcada do Dão, Sub-regiões, Parâmetros físico-químicos, Vinhos tintos, Influência das condições edafoclimáticas

Resumo

A Região Demarcada do Dão é uma das regiões produtoras de vinho mais antigas do país, que se encontra dividida em sete sub-regiões. No entanto, esta divisão parece não refletir a diversidade de características desta região, nem está suportada em dados objetivos. As condições edafoclimáticas de uma região vinícola, como a temperatura, a precipitação, a exposição solar, o tipo de solo e a altitude, podem influenciar vários processos bioquímicos na videira, com potencial impacto na uva, afetando a fotossíntese, a respiração, a acumulação de açúcares e de compostos fenólicos responsáveis pela cor (antocianinas e taninos), entre outros. Tais alterações, podem ser refletidas nos parâmetros físico-químicos do vinho, os quais podem ser avaliados através de um conjunto de metodologias habitualmente utilizadas em laboratórios de enologia. Esta dissertação foi realizada na Comissão Vitivinícola Regional do Dão, cuja principal função é o controlo da qualidade e a certificação dos vinhos produzidos nesta região vinícola. O trabalho foi organizado em duas fases: a primeira teve como objetivo conhecer o laboratório bem como a aprendizagem dos métodos a realizar. Foi possível acompanhar o processo necessário para a certificação de um vinho, o funcionamento interno do laboratório e assistir e participar em provas sensoriais, proporcionando um grande enriquecimento pessoal e profissional. A segunda fase consistiu na avaliação dos parâmetros físico-químicos de vinhos tintos provenientes das sete sub-regiões e de anos de colheita entre 2008 e 2015, através da aplicação de metodologias implementadas nos laboratórios da Comissão Vitivinícola Regional do Dão. Os parâmetros físico-químicos analisados foram a massa volúmica a 20°C, o extrato seco total, a acidez total, a acidez volátil, o pH, os sulfatos, os cloretos, o título alcoométrico volúmico adquirido, o dióxido de enxofre livre, combinado e total, a intensidade da cor, a tonalidade, os fenóis totais, as antocianinas, o ferro, o cobre, o ácido cítrico, os açúcares totais, os álcoois superiores totais e fenóis voláteis. O laboratório encontra-se acreditado na realização de 15 dos métodos e utiliza 11 na certificação de vinhos tintos. De todos os parâmetros analisados, a intensidade da cor, a tonalidade, os fenóis totais, as antocianinas, os álcoois superiores totais e o metanol não são acreditados nem utilizados na certificação de vinhos pela Comissão Vitivinícola Regional do Dão.

Verificou-se que, nas garrafas de vinho tinto analisadas, eram respeitados os parâmetros com limite legal estipulado. Para os parâmetros da acidez total, cloretos e ácido cítrico, verificou-se que as sub-regiões de Alva, Terras de Azurara e Besteiros, respetivamente, apresentavam diferenças significativas para mais do que uma das restantes sub-regiões. No entanto, não foi possível observar estas diferenças em relação às condições edafoclimáticas das sub-regiões, sendo que as diferenças do ácido cítrico se deviam ao processo de vinificação utilizado por um produtor dessa sub-região. Verificou-se uma relação entre os parâmetros da intensidade da cor e dos fenóis totais. Através do parâmetro da tonalidade foi possível distinguir a sub-região com maior número de vinhos velhos (Terras de Senhorim) da sub-região com maior número de vinhos novos (Castendo). De modo a perceber qual dos fatores sub-regiões ou ano tinha maior influência na variabilidade apresentada pelos resultados foi realizada uma Análise Simultânea dos Componentes, concluindo-se que o ano de colheita tem uma maior influência na distinção dos vinhos do que o fator sub-região.

Em conclusão, com este trabalho, verificou-se que os parâmetros físico-químicos analisados em 106 vinhos tintos da Região Demarcada do Dão, produzidos entre 2008 a 2015, não permitiram definir características diferenciadoras em relação às sete sub-regiões. Por outro lado, observou-se que o ano de colheita tem uma relevância significativa na distinção entre os vinhos analisados.

keywords

Dão Appellation, Sub-Regions, Physical-Chemistry Characterization, Red Wines, Influence of edaphoclimatic conditions

abstract

The Dão Appellation is one of Portuguese oldest wine making regions, and it is divided in seven sub-regions. However, this division does not reflect the diversity of characteristics in the Appellation and it is not supported with objective information. The Appellation's edaphoclimatic conditions, such as temperature, precipitation, sun exposure, soil and altitude, can influence several biochemical processes in the vine, with potential impact on the grape characteristics, affecting photosynthesis, respiration, accumulation of sugars and phenolic compounds responsible for the chromatic characteristics (i.e. anthocyanins and tannins). These changes can be reflected in the physical-chemical parameters of the wine, which can be evaluated through a set of methodologies commonly used in oenology laboratories. This dissertation was carried out at the Regional Wine Commission of Dão, whose main function is the quality control and certification of the wines produced in this Appellation. The work was organized in two phases: the first one had the purpose to know the laboratory, as well as the learning of the methods to be performed. It was possible to follow the process necessary for the certification of a wine, the internal workings of the laboratory and attend and participate in sensory tests, providing a great personal and professional enrichment. The second phase consisted in the evaluation of the physical-chemical parameters of red wines from the seven sub-regions and of harvest years between 2008 and 2015, through the application of methodologies implemented in the laboratories of the Dão Regional Wine Commission. The physical-chemical parameters used were density at 20°C, total dry extract, total acidity, volatile acidity, pH, sulfates, chloride, alcoholic strength by volume, free, combined and total sulfur dioxide, color intensity, color hue, total phenol, anthocyanins, iron, copper, citric acid, total sugars, total higher alcohols, methanol and volatile phenols. The laboratory is accredited in the realization of 15 of the methods, and uses 11 in the certification of red wines. Of all the parameters analyzed, color intensity, hue, total phenols, anthocyanins, total higher alcohols and methanol are not accredited nor used for the certification of wines by the Comissão Vitivinícola Regional do Dão.

It was verified that, in the bottles of red wine analyzed, the parameters with legal limit stipulated were respected. For the parameters of total acidity, chlorides and citric acid, it was found that the sub-regions of Alva, Terras de Azurara and Besteiros, respectively, presented significant differences for more than one of the sub-regions. However, it was not possible to observe these differences in relation to the edaphoclimatic conditions of the sub-regions, the differences in citric acid were due to the vinification process used by a producer in that sub-region. There was a relationship between the parameters of color intensity and total phenols. Through the parameter of the color hue it was possible to distinguish the sub-region with the highest number of old wines (Terras de Senhorim) from the sub-region with the highest number of new wines (Castendo). In order to understand which of the factors, sub-regions or year had greater influence on the variability presented by the results, a ANOVA-Simultaneous Component Analysis was carried out, concluding that the harvest year has a greater influence on the wine distinction than the sub-region.

In conclusion, with this work, it was verified that the physical-chemical parameters analyzed in 106 red wines from the Dão Appellation, produced between 2008 and 2015, did not allow to define differentiating characteristics in relation to the seven sub-regions. On the other hand, it was observed that the year of harvest has a significant relevance in the distinction between the wines analyzed.

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xi
1.Enquadramento e objetivos do trabalho	1
2. Introdução	1
2.1. Região Demarcada do Dão	1
2.2. Sub-regiões	2
2.3. Condições edafo climáticas da Região Demarcada do Dão.....	6
2.4. Processo de vinificação de vinhos tintos	13
2.4.1. Aditivos utilizados no processo de vinificação.....	15
2.4.1.1. Dióxido de enxofre.....	15
2.4.1.1.1. Propriedades antissépticas.....	16
2.4.1.1.2. Propriedades antioxidantes	17
2.4.2. Ácido Cítrico.....	17
2.5. Parâmetros físico-químicos dos vinhos.....	18
2.5.1. Compostos no processo de vinificação	19
2.5.2. Ácidos orgânicos.....	19
2.5.3. Compostos fenólicos – Características cromáticas e Fenóis voláteis	21
2.5.3.1. Mecanismo de formação de fenóis voláteis	24
2.5.4. Etanol, álcoois superiores e metanol.....	25
2.5.5. Açúcares totais	27
2.5.6. Compostos inorgânicos	28
1.4.1. Temperatura	30
1.4.2. Exposição solar	31
1.4.3. Precipitação.....	31
1.4.4. Solo	32
1.4.5. Altitude e declive	32
2. Parte experimental	35
2.1. Amostragem.....	35
2.2. Parâmetros físico-químicos.....	37
2.2.1. Determinação da massa volúmica a 20°C	38
2.2.2. Determinação do extrato seco total.....	39

2.2.3. Determinação da acidez volátil.....	40
2.2.4. Determinação da acidez total.....	41
2.2.5. Determinação do pH.....	42
2.2.6. Determinação do dióxido de enxofre livre, combinado e total.....	43
2.2.7. Determinação da intensidade e da tonalidade da cor.....	44
2.2.8. Determinação das antocianinas.....	44
2.2.9. Determinação dos fenóis totais.....	45
2.2.10. Determinação do Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA).....	45
2.2.11. Determinação dos açúcares totais.....	46
2.2.12. Determinação do ferro.....	48
2.2.13. Determinação do cobre.....	49
2.2.14. Determinação dos sulfatos.....	50
2.2.15. Determinação dos cloretos.....	51
2.2.16. Determinação dos álcoois superiores e metanol.....	53
2.2.17. Determinação do ácido cítrico.....	54
2.3. Tratamento de resultados.....	57
3. Resultados e discussão.....	59
3.1 Parâmetros físico-químicos dos vinhos.....	61
3.2 Influência do fator sub-região e ano de colheita.....	80
4. Conclusões.....	85
5. Bibliografia.....	87
ANEXOS.....	94
Anexo I.....	95
Anexo II.....	97
Anexo III.....	99
Anexo IV.....	101
Anexo V.....	103
Anexo VI.....	111
Anexo VII.....	119
Anexo VIII.....	127
Anexo IX.....	131

Índice de figuras

Figura 1- Localização da Região Demarcada do Dão [9].....	1
Figura 2- Representação geográfica das sete sub-regiões do Dão [11]	3
Figura 3- Localização das plantações vitícolas na Região Demarcada do Dão, sendo que a linha verde indica as plantações localizadas a norte do Mondego, e a vermelho as localizadas a sul do Mondego.[13].....	4
Figura 4- Mapa das formações geológicas da Região Demarcada do Dão	7
Figura 5- Mapa representativo da rede hidrográfica e da localização vitivinícola da Região Demarcada do Dão. [13]	8
Figura 6- Mapa da representação da altitude média da Região Demarcada do Dão e da localização vitícola. [13]	9
Figura 7- Mapas representativos das condições climáticas da Região Demarcada do Dão em que a) Temperatura média diária, b) Exposição solar e c) Precipitação média anual.[13].....	11
Figura 8- Processo de vinificação para vinhos tintos.	15
Figura 9- Reações de equilíbrio durante a solubilização do SO ₂	16
Figura 10- Via de degradação do ácido cítrico por bactérias lácticas. Adaptado de [21]	18
Figura 11- Estrutura das antocianidinas e os seus respectivos derivados (14).....	22
Figura 12- Representação dos vários estados de antocianinas presentes nos vinhos [18]....	24
Figura 13- Mecanismo enzimático para a produção de etil-fenóis pela <i>Brettanomyces</i> sp. (13)	25
Figura 14- Mecanismo de formação de álcoois superiores através de aminoácidos. Reação de Ehrlich. [15].....	26
Figura 15- Representação da amostragem descrevendo o número de agentes económicos, a os anos, o número de garrafas por ano e dos vinhos monocasta por cada sub-região da Região Demarcada do Dão em que * corresponde ao número de vinhos monocasta/número de vinhos totais e ** corresponde ao número de produtores por sub-região.	36
Figura 16- Reações enzimáticas nas quais se baseia a determinação da sacarose, D-glucose e D-frutose através de métodos enzimáticos.....	47

Figura 17- Degradação enzimática do ácido cítrico nas quais se baseiam a sua determinação por métodos enzimáticos.	54
Figura 18- Diagrama de trabalho realizado no laboratório da ¹ Comissão Vitivinícola Regional do Dão e lista de análises concretizadas em cada garrafa em estudo.	60
Figura 19- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão e indicação das gamas de variação (Δ) esperada para os parâmetros da a) massa volúmica e b) do extrato seco total.	66
Figura 20- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão e indicação das gamas de variação (Δ) esperada para os parâmetros da a) acidez total, b) acidez volátil. c) do pH e d) do dióxido de enxofre (SO ₂) livre.	69
Figura 21- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os parâmetros das a) antocianinas, b) tonalidade c) fenóis voláteis e d) da intensidade.	72
Figura 22- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os parâmetros do a) Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA) e b) Açúcares totais.	74
Figura 23- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os parâmetros do a) ferro, b) cobre, c) sulfatos e d) cloretos.	76
Figura 24- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os parâmetros do a) álcoois superiores totais, b) Metanol, c) ácido cítrico e d) fenóis voláteis.	79
Figura 25- Análise simultânea de componentes (ASCA) realizado com p-value <0,01, para os anos de colheita entre 2008 e 2014 sendo que a) coordenadas fatoriais e b) contribuições fatoriais	82
Figura 26- Análise Simultânea de Componentes (ASCA) realizado com p-value de <0,01 para os vinhos provenientes das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão entre 2008 e 2014 em que a) coordenadas fatoriais e b) as contribuições fatoriais. Encontra-se sinalizadas as amostras com maior concentração de ácido cítrico.	84

Índice de tabelas

Tabela 1- Sub-regiões da Região Demarcada do Dão e os concelhos que as constituem. ...	2
Tabela 2- Castas utilizadas na elaboração de vinhos tintos da Região Demarcada do Dão [9]	4
Tabela 3- Distribuição das formações rochosas presentes na Região Demarcada do Dão entre as sete sub-regiões, baseadas no mapa geológico de Grácio, A.	8
Tabela 4- Descrição das características edafoclimáticas relativas à temperatura média diária, exposição solar, altitude média de produção e precipitação média anual das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão.[13].....	12
Tabela 5- Classificação Climática de Thornwaite para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão. [12]	13
Tabela 6- Gama de variação (Δ) esperada e limite legal estipulado para a massa volúmica a 20°C, extrato seco total, dióxido de enxofre total e ácido cítrico	19
Tabela 7- Gama de variação (Δ) e limite legais estipulados para os parâmetros da acidez total, acidez volátil e pH.	21
Tabela 8- Limite legal estipulado para o parâmetro TAVA que equivale ao número de litros de etanol contidos em 100 litros de vinho.	27
Tabela 9- Gama de variação (Δ) e limite legal estipulado para os parâmetros do cobre, sulfatos e cloretos.....	29
Tabela 10- Efeito da temperatura na fotossíntese, nos compostos fenólicos responsáveis pela cor e na respiração.....	30
Tabela 11- Distribuição das amostras de vinhos tintos monovarietais pelas sete sub-regiões e identificação das castas monovarietais existentes na amostragem.....	36
Tabela 12- Identificação dos métodos utilizados para a certificação de vinhos tintos e para acreditados pelo IPAC	38
Tabela 13- Representação dos valores de repetibilidade (r), variabilidade intralaboratorial (VI) e incerteza relativa para o parâmetro da massa volúmica a 20°C	39
Tabela 14- Representação do valor de incerteza relativa para o parâmetro do extrato seco total	40
Tabela 15- Representação da repetibilidade (r), da variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro da acidez volátil.....	41

Tabela 16- Representação da repetibilidade (r), variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro da acidez total.....	42
Tabela 17- Representação da repetibilidade (r), variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro do pH.	43
Tabela 18 - Representação da repetibilidade (r), da variabilidade intralaboratorial (VI), do limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ) e da incerteza relativa (i. relativa) para os parâmetros do dióxido de enxofre livre, combinado e total.....	43
Tabela 19- Representação da repetibilidade (r), da variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro do Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA).....	46
Tabela 20- Representação da repetibilidade (r), do limite de precisão intermédia (LPI), da percentagem de recuperação (%R), do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) e a incerteza relativa para o parâmetro dos açúcares totais.....	48
Tabela 21- Representação da repetibilidade (r), do limite de precisão intermédia (LPI), da percentagem de recuperação (%R), do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) o intervalo da ordenada da origem (Δa) e do declive (Δb), desvio padrão (σ) e a incerteza relativa para o parâmetro do ferro.....	49
Tabela 22- Representação da repetibilidade (r), do limite de precisão intermédia (LPI), da percentagem de recuperação (%R), do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), o intervalo da ordenada da origem (Δa) e do declive (Δb), desvio padrão (σ) e a incerteza relativa para o parâmetro do cobre.....	50
Tabela 23- Representação da repetibilidade (r), variabilidade interna (VI), percentagem de recuperação (% recuperação) e incerteza relativa para o parâmetro dos sulfatos.	51
Tabela 24- Representação da repetibilidade (r), da variabilidade interna (VI), da percentagem de recuperação (% recuperação) e da incerteza relativa para o parâmetro dos cloretos.	52
Tabela 25 - Condições do cromatógrafo para a determinação dos álcoois superiores totais e metanol.....	54
Tabela 26- Representação da repetibilidade (r), do limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), percentagem de recuperação (% R), o intervalo da ordenada	

da origem (Δa) e do declive (Δb) e incerteza relativa do parâmetro do ácido cítrico.	55
Tabela 27- Concentração de 2-metoxi-4-etil-fenol e de 4-etil-fenol em L dos três padrões necessários para a calibração do método.	56
Tabela 28- Condições do cromatógrafo para a determinação do parâmetro dos fenóis voláteis.	57
Tabela 29 - Representação da gama de variação (Δ) e dos valores de mediana (MED) dos 22 parâmetros físico-químicos estudados para cada uma das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os vinhos entre os anos de 2008 e de 2015.	62
Tabela 30- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2014 em relação ao parâmetro da acidez total, obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.	70
Tabela 31- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2012 em relação ao parâmetro dos fenóis totais, obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.	73
Tabela 32- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2013 em relação ao parâmetro da intensidade da cor, obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.	73
Tabela 33- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015, 2012, 2013 e 2014 em relação ao parâmetro dos cloretos obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.	77
Tabela 34- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2014 em relação ao parâmetro do ácido cítrico obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.	80
Tabela 35- Teste de significância para os fatores anos e sub-regiões para os vinhos provenientes das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão e para os anos entre 2008 e 2015, sendo significativa quando $p < 0,01$	80
Tabela 36- Codificação das 22 variáveis em estudo para a realização da análise estatística.	82

Lista de abreviaturas e siglas

Sigla/abreviatura	Português	Inglês
Ag/AgCl	Prata/ Cloreto de Prata	Silver/Silver Chloride
CL	Citrato liase	Citrate lyase
CEET	Índice da Concentração Estival da Eficiência Térmica	Summer Concentration of Thermal Efficiency Index
DOP	Denominação de Origem Protegida	Denomination of Protected Origin
ET	Índice de Eficiência Térmica	Thermal Efficiency Index
FID	Detetor de ionização de chama	Flame ionisation detector
G6P-DH	Glucose-6-fosfato desidrogenase	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HK	Hexocinase	Hexokinase
IG	Indicação Geográfica	Geographic Indication
LQ	Limite de Quantificação	Limit of Quantifications
L-MDH	L-Malato desidrogenase	L-Malate dehydrogenase
L-LDH	L-Lactato desidrogenase	L-Lactate dehydrogenase
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina	Nicotinamide adenine dinucleotide
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho	International Organisation of Wine and Vine
OMS	Organização Mundial de Saúde	Health World Organisation
PGI	Fosfoglucose isomerase	Phosphoglucose isomerase
rpm	Rotações por minuto	Rotations per minute
TAVA	Título Alcoométrico Volúmico Adquirido	Alcoholic Strenght by Volume

1. Enquadramento e objetivos do trabalho

O vinho define-se como um produto obtido exclusivamente por fermentação alcoólica, total ou parcial de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mostos de uvas, cujo produção e consumo é elevado mundialmente (1). Para o ano de 2016, a estimativa da produção e consumo de vinho a nível mundial situou-se nos 267 mhl e 241 mhl de vinho, respetivamente. Em Portugal, esta estimativa de produção e consumo situou-se nos 6 mhl e 4,6 mhl de vinho respetivamente (2).

Uma das mais antigas e principais regiões produtoras em Portugal é a Região Demarcada do Dão, tendo contribuído com uma produção de 342,316 hl de vinho em 2016, segundo dados estatísticos do Instituto da Vinha e do Vinho (3). O vinho contém vários componentes químicos que podem variar na sua composição e na sua proporção conforme vários fatores externos, como as condições geológicas (diferentes tipos de solo e a altitude de plantação das vinhas), o clima (precipitação, temperatura e exposição solar), as castas utilizadas, as práticas de cultivo exercidas pelos agricultores e o seu processo de vinificação. Considerando que estes fatores externos são distintos entre as diversas regiões, e originam vinhos com características organolépticas diferentes, foram criadas várias regiões demarcadas.

Estas regiões foram criadas por decretos-lei e definem-se por serem uma área ou conjunto de áreas vitícolas que traduzem vinhos com características qualitativas particulares, cujo nome é utilizado na designação dos próprios vinhos com Denominação de Origem Protegida (DOP) e Indicação Geográfica (IG) (4). A Região Demarcada do Dão foi criada em 1907, mas apenas com o decreto-lei de 1912 foi estabelecida a demarcação definitiva da região, que ainda se encontra em vigor (5). Para uma melhor diferenciação desta região demarcada, surge um estatuto legal no decreto-lei nº 376/93 (6) dividindo-a em sete sub-regiões, ainda existentes atualmente.

O estatuto da região demarcada providencia à criação e organização de uma comissão vitivinícola regional (4). As comissões vitivinícolas regionais representam os interesses económicos envolvidos na produção e comercialização dos vinhos com indicações DOP e IG. É da sua competência garantir a autenticidade e a qualidade dos vinhos produzidos na região onde atua, submetendo-os a rigorosos métodos de controlo, que envolvem todo o circuito de produção e comercialização dos vinhos, com presença exclusiva dos Agentes de Verificação Técnica do Organismo em todo o processo (7). Dentro das suas diversas responsabilidades encontram-se a execução de análises físico-químicas em laboratório

próprio ou laboratórios oficiais e ainda análises organoléticas pela câmara de provadores, para garantir a genuinidade dos produtos víquicos, a emissão de certificados de origem e selos de garantia e promover a divulgação de produtos víquicos (6).

Este trabalho de estágio foi realizado na Comissão Vitivinícola Regional do Dão, localizada no distrito de Viseu. Nas suas instalações encontra-se um laboratório acreditado desde 1999 de acordo com NP EN 45001, com uma consequente renovação em 2002 de acordo com a NP EN ISSO/IEC 17025. O laboratório tem como objetivos o controlo de produtos víquicos com o rigor técnico exigido e com a precisão adequada, enquanto garante a confidencialidade das amostras, e a integridade e imparcialidade aquando da realização das análises. Devido ao seu reconhecimento como laboratório certificado, foi desenvolvido um sistema de gestão que envolve vários departamentos da Comissão Vitivinícola Regional do Dão de modo a que o controlo da qualidade dos vinhos seja realizado de forma rápida e eficaz. O esquema representativo deste sistema encontra-se no Anexo I (7).

Este estágio desenvolveu-se em fases, sendo que a primeira se focou na aprendizagem do funcionamento e da gestão da empresa, nas regras de trabalho e na realização dos métodos a serem aplicados para a concretização deste trabalho. Na segunda fase, procedeu-se à aplicação dos métodos aprendidos na determinação dos parâmetros físico-químicos dos vinhos tintos da Região Demarcada do Dão, com o intuito de se confirmar a possibilidade de as sete sub-regiões se distinguírem entre si. Os parâmetros analisados foram: a massa volúmica, extrato seco, acidez volátil, acidez total, pH, dióxido de enxofre livre, combinado e total, a intensidade, tonalidade, fenóis totais, antocianinas, título alcoométrico volúmico adquirido (TAVA), açúcares totais, cobre, ferro, sulfatos, cloretos, metanol, álcoois superiores, ácido cítrico e fenóis voláteis.

2. Introdução

2.1. Região Demarcada do Dão

A Região Demarcada do Dão localiza-se na região da Beira Alta, no Centro-Norte de Portugal. Situada num enclave montanhoso, encontra-se rodeada pela serra do Caramulo a poente, pela serra do Buçaco a sudoeste, pela serra da Nave a norte, pela serra da Estrela a nascente pela serra do Açor a sul. Estas serras constituem uma importante barreira a vários fatores climáticos que poderiam influenciar a região: a serra do Buçaco protege a região das massas húmidas do litoral, diminuindo a influência marítima; a serra da Estrela abriga a região de influências continentais e, por fim, a serra do Açor protege a região dos ventos húmidos do Sul (8). Os principais rios que atravessam a região são o Mondego, o Dão (que correm quase em paralelo no sentido Nordeste- Sudoeste), o Alva (que corre no sentido Este-Oeste) e o rio Criz (que corre no sentido Norte-Sul). Esta região vinícola abrange 3 distritos (Viseu, Coimbra e Guarda) num total de 16 concelhos que se encontram divididos por sete sub-regiões (8). Na Figura 1 é possível observar a localização geográfica desta região demarcada em Portugal, a localização das serras que a rodeiam, os dois rios principais e os concelhos que lhe pertencem.

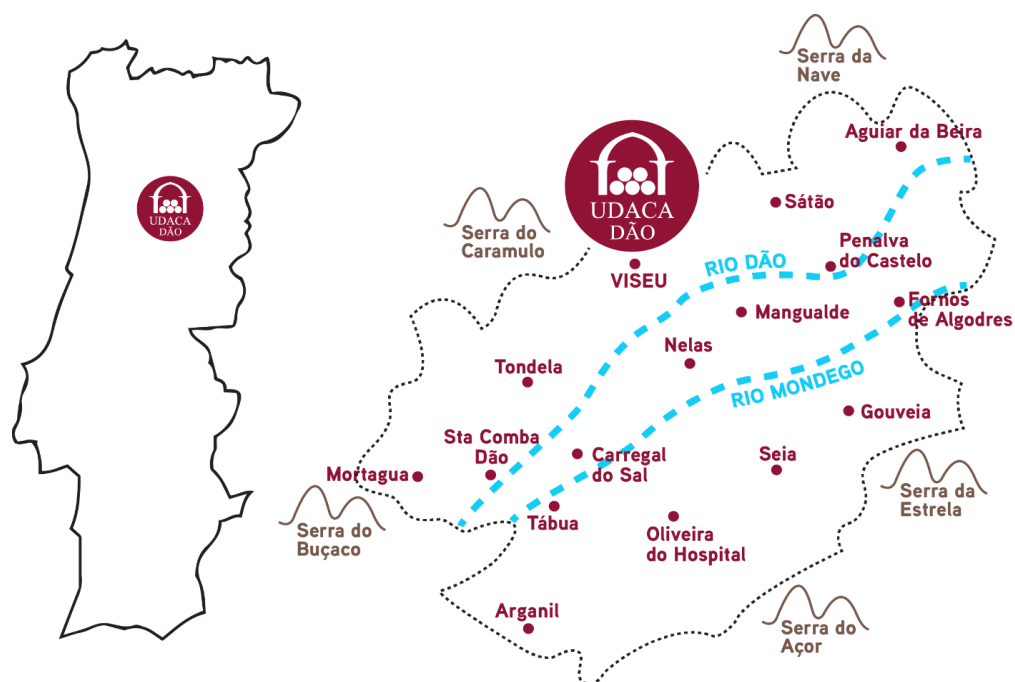


Figura 1- Localização da Região Demarcada do Dão (9).

2.2. Sub-regiões

A distinção desta região vinícola deve-se, em grande parte, à natureza e acidentado do seu relevo que vão determinar a existência de variações microclimáticas de grande importância para a cultura da vinha e para a qualidade dos vinhos (8). Para uma melhor diferenciação da Região Demarcada do Dão surge, em 1993, um estatuto legal definido pelo decreto-lei nº 376/93 de 5 de novembro (6) que a dividiu em sete sub-regiões. Em 2014, com a portaria nº 246/14 de 25 de novembro houve uma atualização das sub-regiões, adicionando-se o concelho de Arganil à sub-região de Alva (10). Cada sub-região terá características distintas, em termos de solo, valores de temperatura, pluviosidade e as castas plantadas que poderão influenciar as características químicas organolépticas dos vinhos da Região Demarcada do Dão. As sete sub-regiões e os concelhos que as constituem estão representados na Tabela 1. No entanto, algumas sub-regiões não são constituídas pela área total dos concelhos mencionados na Tabela 1 e apenas por algumas freguesias. Encontra-se, assim, descrita no Anexo II, a descrição das freguesias de cada concelho que pertencem à Região Demarcada do Dão. Na Figura 2 é possível observar a localização das diferentes sub-regiões da Região Demarcada do Dão e as suas delimitações.

Tabela 1- Sub-regiões da Região Demarcada do Dão e os concelhos que as constituem.

Sub-região	Concelhos Constituintes
Alva	Arganil, Tábua e Oliveira do Hospital
Besteiros	Tondela, Mortágua e Santa Comba Dão
Castendo	Penalva do Castelo e Sátão
Serra da Estrela	Gouveia e Seia
Silgueiros	Viseu
Terras de Azurara	Mangualde
Terras de Senhorim	Nelas e Carregal do Sal



Figura 2- Representação geográfica das sete sub-regiões do Dão (11)

As condições do cultivo da vinha são dos fatores mais importantes na qualidade e das características de um vinho. Na Região Demarcada do Dão a plantação de vinha ocupa uma área de 2000 hectares e pode ser encontrada entre os 100 e os 800 metros, sendo que é entre os 200 e os 500 metros que o seu cultivo tem mais expressão (12). As castas a utilizar na produção de vinho tinto desta região vinícola encontram-se na Tabela 2 e são regulamentadas pela portaria nº 246/2014 de 25 de Novembro (10). A maior parte dos vinhos tintos produzidos na região é constituída por uma mistura de diferentes castas em vez da utilização maioritária de apenas uma. No entanto, destaca-se a utilização da casta Touriga Nacional para vinhos tintos desta região vinícola. A plantação da vinha é mais expressiva nas sub-regiões localizadas a norte (correspondendo às sub-regiões de Silgueiros, Terras de Senhorim, Castendo e Terras de Azurara) e a sul do rio Mondego (correspondendo à sub-região da Serra da Estrela). O mapa com a localização da vinha na Região Demarcada do Dão encontra-se na Figura 3.

Tabela 2- Castas utilizadas na elaboração de vinhos tintos da Região Demarcada do Dão (9)(13)

Castas utilizadas na produção de vinhos tintos na Região Demarcada do Dão			
Água-Santa	Alfrocheiro	Alicante-Bouscet	Alvarelhão
Amaral	Aragonez	Azal	Baga
Bastardo	Cabernet-Franc	Cabernet-Sauvignon	Camarate
Campanário	Castelão	Campanário	Castelão
Cidreiro	Coração-de-Galo	Cornifesto	Gran-Noir
Jaen	Malvasia-Preto	Marufo	Merlot
Monvedro	Moreto	Mourisco	Pilongo
Pinot-Noir	Português Azul	Rabo-de-Ovelha-Tinto	Rufete
Syrah	Tinta-Carvalha	Tinto-Cão	Touriga-Fêmea
Touriga Nacional	Trincadeira		

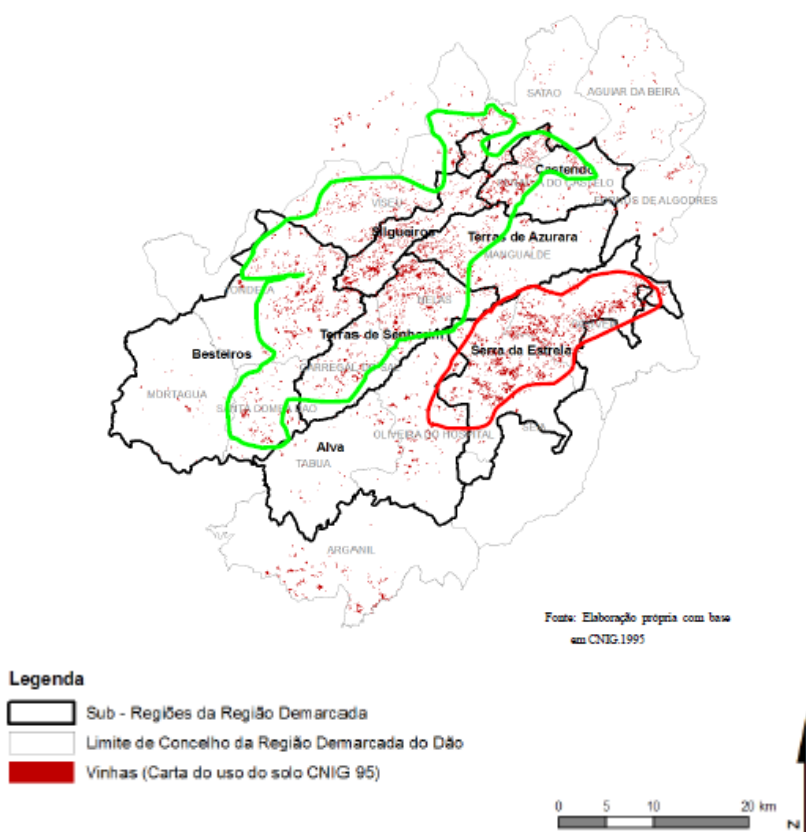


Figura 3- Localização das plantações vitícolas na Região Demarcada do Dão, sendo que a linha verde indica as plantações localizadas a norte do Mondego, e a vermelho as localizadas a sul do Mondego (14)

A diversidade das condições da região do Dão, promove a existência de vinhos diferenciados. Em 1915, António Vitorino a divisão da Região Demarcada do Dão em duas zonas: uma acima e outra abaixo do rio Mondego (14). Em 1956, Loureiro, V. e Miguel A.

referem uma divisão da Região Demarcada do Dão em três zonas: uma Zona Central Norte, a Zona Central Sul e a Zona Periférica. Destas zonas propostas, as mais importantes para a produção vinícola seriam a Zona Central Norte e a Zona Central Sul, visto que a Zona Periférica não seria considerada uma zona de tipicidade, devido à sua grande extensão e heterogeneidade (8). De realçar que os autores deste estudo consideram que a qualidade dos vinhos desta região vinícola se encontra mais associada a locais restritos dispersos pela região (como quintas de produção vinícola) do que propriamente à vasta área que constitui a sua sub-região. Loureiro V, e Homem Cardoso, A. referem no seu livro - “Os Vinhos do Dão” - que a divisão das três zonas mencionadas anteriormente (para as sete sub-regiões atuais), se deve a uma ação exagerada cujas bases científicas, geográficas, vitícolas e enológicas se desconhecem (8). As respetivas divisões destas três zonas e a sua correspondência aos concelhos que as constituem, bem como as sub-regiões atuais encontram-se no Anexo III.

O trabalho de Curvelo-Garcia, realizado em 1978, tinha como principal objetivo a obtenção de informação enológica que permitisse definir os parâmetros físico-químicos dos vinhos produzidos em cada uma das três zonas consideradas pelos autores mencionados anteriormente (15). Tinha também o objetivo de verificar se determinada sub-região deveria ser incluída ou rejeitada da zona. Esta definição foi obtida através da apresentação dos valores médios dos parâmetros físico-químicos apurados e pelos respetivos intervalos de variação. Curvelo-Garcia concluiu que, em relação aos vinhos tintos, foi possível verificar diferenças nos parâmetros entre os vinhos da Zona Central Norte e da Zona Central Sul, embora não tão sensíveis como as que distinguem os vinhos destas zonas com o da Zona Periférica. Os vinhos da Zona Periférica caracterizavam-se por terem maiores valores de densidade e ferro, e menores valores de álcool e extrato seco (15).

Silva, C. realizou um trabalho cujo principal objetivo consistia em desenvolver uma ferramenta que permitisse compreender a realidade regional e o potencial produtivo dos vinhos DOP da Região Demarcada do Dão. Para tal, analisou a base de dados analíticos e sensoriais dos vinhos entregues para certificação DOP na Comissão Vitivinícola Regional do Dão entre 1998 e 2004, tendo como variáveis o concelho, o tipo de operador, o ano de colheita e os vinhos. Através da determinação dos valores médios e dos respetivos intervalos de variação dos parâmetros estudados, realizou uma tentativa de circunscrição das áreas com potencial para a produção de vinhos DOP. O estudo concluiu que os concelhos centrais da

Região Demarcada do Dão tinham melhores resultados de aptidão e produção, relativamente aos concelhos periféricos (realçando que são os concelhos centrais onde se encontram os produtores com maior capacidade técnica). Considerou, também, ser necessário proceder a um ajustamento da área geográfica da região à realidade vitivinícola da produção de vinhos DOP (14).

Apesar da escassez de estudos que comparem os parâmetros físico-químicos desta região demarcada apenas entre as sete sub-regiões (Curvelo-Garcia realizou o estudo com a divisão da região em três zonas e Silva, C. por concelhos), as conclusões dos estudos efetuados indicam que não é possível realizar uma distinção entre cada uma das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão através de análises dos parâmetros físico-químicos.

2.3. Condições edafoclimáticas da Região Demarcada do Dão

As condições edafoclimáticas de uma região consistem na sua geologia, no solo, na rede hidrográfica, na temperatura e na precipitação. Para este capítulo foram utilizados mapas da região elaborados por Grácio A. no seu trabalho – “Estudo de adaptação e afinidade em viticultura – Anteprojecto de um delineamento experimental para a região demarcada dos Vinhos do Dão” – e por Silva, C. no seu trabalho – “A base de dados da CVR Dão relativos à atribuição da denominação de origem no período de 1998 a 2008 como ferramenta de conhecimento da região e do sector”-. Estes mapas não se encontram divididos por sub-regiões, mas em concelhos, tendo sido realizada, posteriormente, uma adaptação da informação para as sub-regiões.

A geologia da região pertence na sua maioria ao maciço ibérico formado por rochas eruptivas, metamórficas e sedimentares, sendo que as rochas graníticas dominam em cerca de 70% da superfície total e os xistos argilosos, pertencentes ao Complexo Xisto-Grauváquico ocupam cerca de 20 a 25%, encontrando-se mais representados a sul e a poente. Têm ainda alguma representação as formações xistosas do Complexo Cristalofílico (Paleozóico) e do Silúrico Inferior (8,12). As formações sedimentares mais modernas vão desde o Cretácico Superior ao Pleistocénico, cuja presença se encontra exclusivamente a sul (entre Tábua e Arganil) e a poente, originando as baixas férteis da região de Mortágua. É ainda possível encontrar formações rochosas de diferentes períodos como do Mesozoico, Cenozoico e Antropozoico, mas com uma representação pouco significativa (12).

O solo desta região é essencialmente de origem granítica, e a facilidade de meteorização por ação dos agentes naturais (como a água das chuvas), é um dos principais fatores que contribuiu para a adequação destes solos à cultura da vinha. No entanto, a elevada precipitação que ocorre na região, diminui a fertilidade dos solos pois provoca o arrastamento de potássio, magnésio, cálcio e sódio das camadas aráveis, aumentando a sua acidez (8). Os solos provenientes de formações xistenas são mais compactos, argilosos e profundos, apresentando maior capacidade de retenção da água e, como tal, são mais férteis, dominando nas zonas marginais da região (8). Os solos aluvionais localizados junto às linhas de água, são os menos indicados para a cultura da vinha por serem demasiado compactos, frios e húmidos. Este tipo de solo localiza-se maioritariamente no concelho de Mortágua, pertencente à sub-região de Besteiros (8). A distribuição destas formações rochosas, pelas sete sub-regiões, pode ser observada na Figura 4 e na Tabela 3.

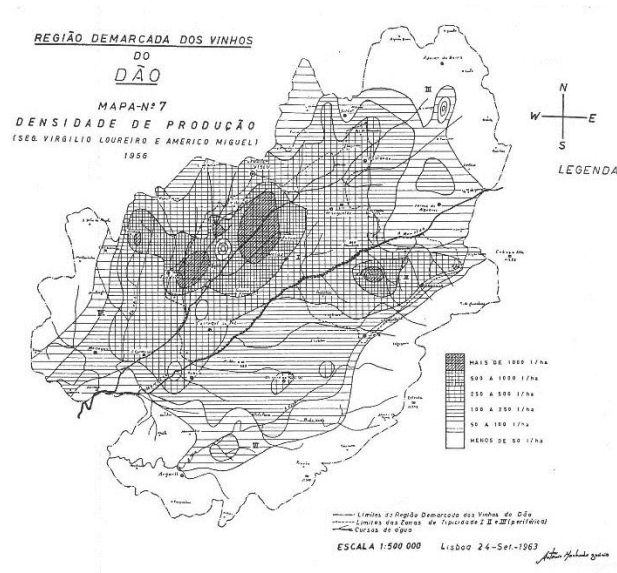


Figura 4- Mapa das formações geológicas da Região Demarcada do Dão (12)

Tabela 3- Distribuição das formações rochosas presentes na Região Demarcada do Dão entre as sete sub-regiões, baseadas no mapa geológico de Grácio, A.

Sub-Região	Formação Rochosa Presentes
Alva	Complexo xisto-greoso, Rochas graníticas Cenozoico, Mesozoico
Besteiros	Rochas graníticas, Complexo xisto-greoso, Antropozóico
Castendo	Rochas graníticas e Complexo cristalofílico
Serra da Estrela	Rochas graníticas e Complexo xisto-greoso
Silgueiros	Rochas graníticas
Terras de Azurara	Rochas graníticas e Complexo cristalofílico
Terras de Senhorim	Rochas graníticas

A rede hidrográfica da Região Demarcada do Dão caracteriza-se por ser densa, sendo os principais rios o Mondego e o Dão, que correm paralelamente no sentido Nordeste-Sudoeste, através da depressão entre as serras do Buçaco e da Lousã (8,12). O rio Alva, o terceiro mais importante da região, corre também paralelamente a estes rios, numa direção Este-Oeste. A rede hidrográfica e os relevos que a originaram tornam evidente uma multiplicidade de exposições que geram variações microclimáticas. A maior densidade de cultivo da vinha, desta região, localiza-se ao longo do vale do rio Mondego e do seu afluente a norte, o rio Dão, como é possível observar na Figura 5.

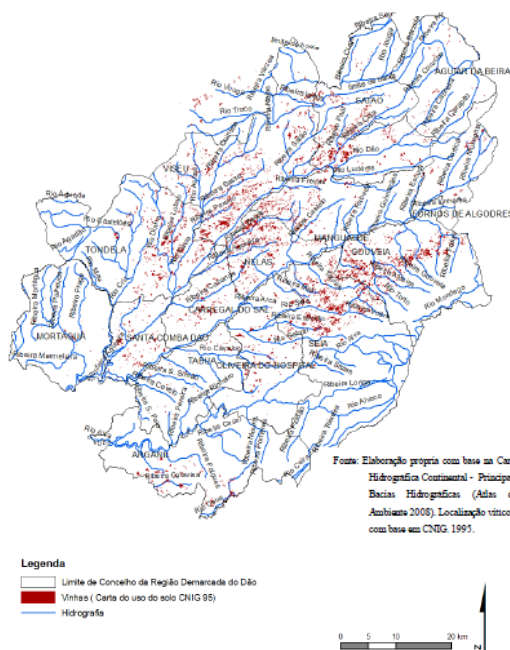


Figura 5- Mapa representativo da rede hidrográfica e da localização vitivinícola da Região Demarcada do Dão (14)

A altitude média de cultura da vinha na Região Demarcada do Dão vai decrescendo desde dos 700 metros (nas sub-regiões de Castendo e Serra da Estrela) até menos de 300 metros (nas sub-regiões de Alva, Besteiros e Terras de Senhorim). A cota mínima na região é 100 metros e localiza-se na sub-região de Besteiros, no concelho de Mortágua. Embora a plantação da vinha se localize entre os 100 e os 700 metros, a maior parte encontra-se plantada entre os 300 e os 700 metros. (8,12). Apesar de na sub-região de Terras de Azurara também se encontrarem plantações em altitudes entre os 500 e os 700 metros, são menos expressivas do que na altitude de 300 a 500 metros. O mapa representativo das diferentes altitudes na Região Demarcada do Dão encontra-se na Figura 6 e seus valores, por sub-região, na Tabela 4.

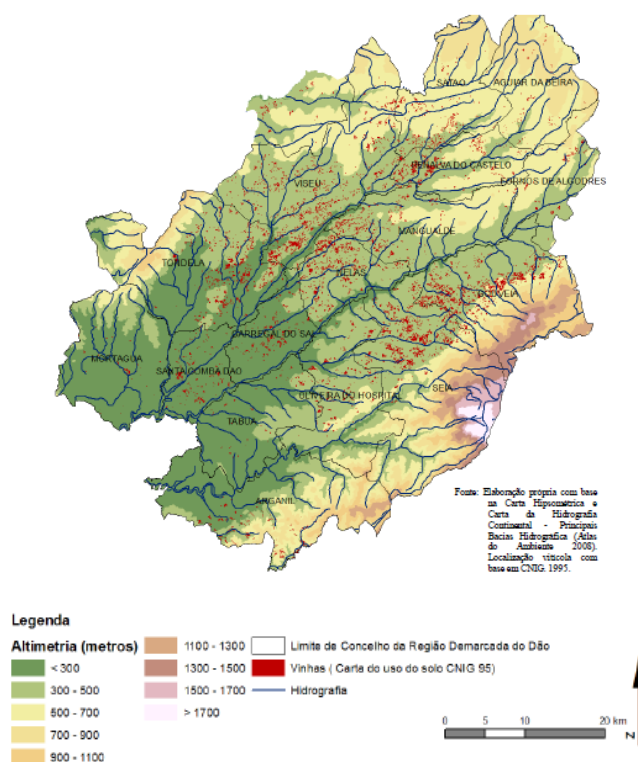


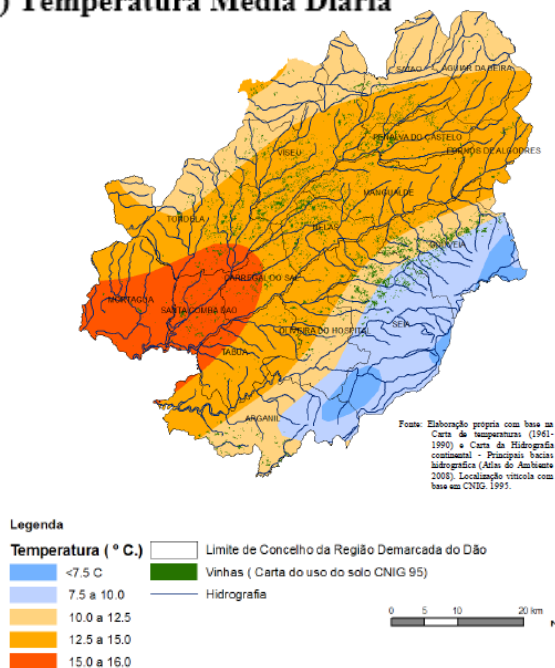
Figura 6- Mapa da representação da altitude média da Região Demarcada do Dão e da localização vitícola (14)

O clima desta região vinícola é temperado, com verões quentes e secos e com invernos pluviosos e moderadamente frios. Durante o verão verificam-se temperaturas mínimas mensais que oscilam entre 18 e os 20°C e as temperaturas máximas entre os 28 e os 30°C, nos meses de julho e agosto. Neste período, as chuvas também são raras não chegando aos 20 litros por metro quadrado, ocorrendo, por vezes, períodos de seca

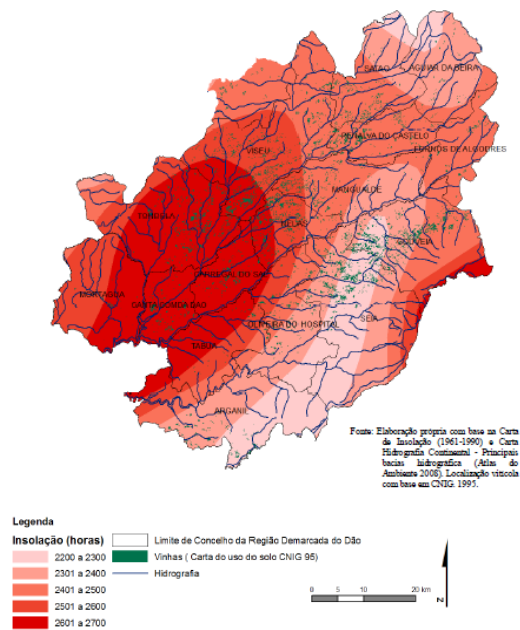
prolongada. No inverno, os meses mais frios são dezembro e janeiro com temperaturas mínimas de 2°C na zona de Viseu e da Serra da Estrela e entre 3 e 4°C na restante região (8). No mapa correspondente à variação da temperatura na Região Demarcada do Dão, é possível verificar que a sub-região com menor temperaturas média diária é a Serra da Estrela, devido à sua proximidade com um enclave montanhoso relativamente às demais sub-regiões. As sub-regiões de Besteiros e Terras de Senhorim são as que apresentam temperatura média anual mais alta. Estas sub-regiões apresentam também as maiores horas de exposição solar, sendo a Serra da Estrela a sub-região com menor número de horas de exposição solar. A descrição da temperatura média anual e da exposição solar encontra-se na Tabela 4 (14).

A precipitação média anual da Região Demarcada do Dão é mais elevada nas sub-regiões próximas dos enclaves montanhosos (Serra da Estrela e Besteiros), onde é possível encontrar valores entre os 2401 a 2600 mm por ano. As restantes sub-regiões apresentam valores de precipitação média anual entre os 800 e os 1400 mm. (14) Os mapas representativos da precipitação, temperatura e exposição solar encontram-se na Figura 7.

a) Temperatura Média Diária



b) Exposição solar



c) Precipitação Média Anual

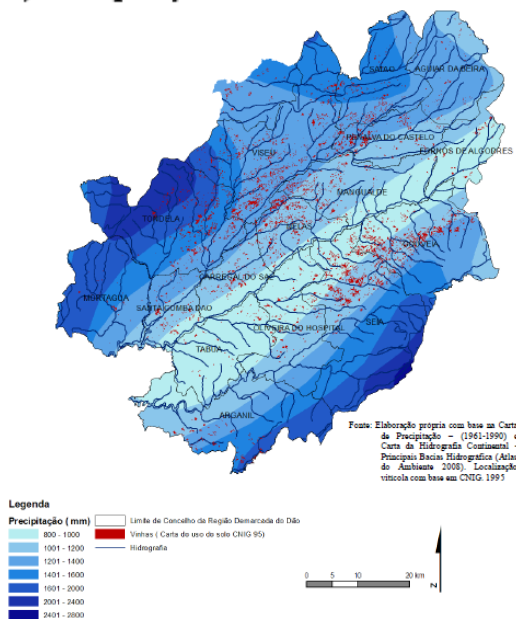


Figura 7- Mapas representativos das condições climáticas da Região Demarcada do Dão em que a) Temperatura média diária, b) Exposição solar e c) Precipitação média anual(14)

Tabela 4- Descrição das características edafo climáticas relativas à temperatura média diária, exposição solar, altitude média de produção e precipitação média anual das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão (14)

Sub-Região	TMD ¹ (°C)	ES ² (horas)	AMP ³ (m)	PMA ⁴ (mm)
Alva	7,5-16,0	2200-2700	<300-700	800-2600
Besteiros	10 -16,0	2501-2700	<300-700	800-2600
Castendo	12,5-15,0	2401-2500	300-700	1201-1400
S. Estrela ^a	7,5-15	2200-2400	300-900	800-2600
Silgueiros	12,5-15	2401-2700	300-700	1201-1400
T. Azurara ^b	12,5-15,0	2401-2600	300-700	800-1200
T. Senhorim ^c	12,5-16,0	2401-2700	<300-700	800-1200

¹ Temperatura média anual

^a Serra da Estrela

² Exposição solar

^b Terras de Azurara

³ Altitude média da plantação

^c Terras de Senhorim

⁴ Precipitação média anual

Apesar de podermos que a Região Demarcada do Dão é homogénea em termos macroclimáticos, já não se pode garantir o mesmo no que se refere aos aspetos microclimáticos, devido à variabilidade oro-hidrográfica existente (12). Esta falta de uniformidade microclimática pode ser avaliada através da classificação de Thornthwaite, que se estrutura na avaliação de quatro índices: Hídrico, Eficiência Térmica (ET), Aridez e da Concentração Estival da Eficiência Térmica (CEET) (8,12). No trabalho de Grácio, A. foi explicada esta classificação climática para a Região Demarcada do Dão, tendo sido possível concluir que as sub-regiões que apresentam maior variabilidade nos quatro índices referidos são Alva, Besteiros e Serra da Estrela. Estas regiões são as que apresentam maior área e as que se encontram mais próximas de enclaves montanhosos (Besteiros situa-se no enclave da Serra do Caramulo e Alva e Serra da Estrela próximos da Serra da Estrela) (12). Na Tabela 5 as respetivas classificações de Thornthwaite e uma tabela com os valores respetivos de cada índice para cada sub-região.

Tabela 5-Classificação Climática de Thornwaite para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão (12)

Sub-Região	Í. Hídrico ¹	Í. de ET ²	Í. de Aridez ³	Í. de CEET ⁴
Alva	Húmido	570-721 e 712-855	0-16,7% e 16,7-33,3%	<48%
Besteiros	Super-húmido e húmido	570-721 e 712-855	0-16,7% e 16,7-33,3%	<48%
Castendo	Húmido	712-855	16,7-33,3%	<48%
S. Estrela	Super-húmido e húmido	427-570 e 712-855	0-16,7% e 16,7-33,3%	<48% e entre 48 e 51,9%
Silgueiros	Húmido	712-855	16,7-33,3%	<48%
T. Azurara	Húmido	712-855	16,7-33,3%	<48%
T. Senhorim	Húmido	712-855	16,7-33,3%	<48%

¹ O Índice Hídrico determina o tipo climático local e reflete as condições prevalentes durante o ano, abrangendo períodos secos e chuvosos, classificando uma região com os climas de super-húmido, húmido, sub-húmido, semi-árido ou árido.

² O Índice de Eficiência Térmica (ET) depende da temperatura e do fotoperíodo e está relacionado com o valor de evapotranspiração potencial que se define como a quantidade de água que poderá passar para a atmosfera diretamente ou através de plantas, caso a humidade no solo estiver sempre disponível, em quantidade suficiente.

³ O Índice de Aridez define-se como a deficiência hídrica da evapotranspiração potencial apresentada em percentagem

⁴ O Índice de Concentração Estival de Eficiência Térmica (CEET) é o coeficiente percentual entre a evapotranspiração potencial nos meses de verão com os todos os meses do ano.

2.4. Processo de vinificação de vinhos tintos

O processo de vinificação de um vinho define-se como o conjunto de processos necessários para a obtenção de um vinho, tinto ou branco. Sendo que o processo é distinto para vinhos tintos e para vinhos brancos. A vinificação de vinhos tintos tem como processos principais a fermentação alcoólica, a maceração e, por fim, a fermentação malolática (16).

Estes processos desenrolam-se em quatro etapas distintas. A primeira etapa consiste nas operações mecânicas realizadas após a receção das uvas, como o desengace (separação das uvas do cacho) e o seu esmagamento. Estas operações têm como objetivo a libertação da polpa e do sumo, aumentando a velocidade da fermentação, facilitando a maceração e aumentando a dissolução de compostos fenólicos no mosto que irá ser fermentado.

A segunda etapa consiste na maceração (imersão das películas da uva no mosto a fermentar para a extração da cor, aromas e taninos) e na fermentação alcoólica, sendo que os processos ocorrem em simultâneo, numa cuba, para a qual o vinho foi transferido após a primeira etapa (15,16). No caso dos vinhos tintos, esta etapa ocorre com a presença do

bagaço (película e grainhas) das uvas. Nesta etapa ocorre o aumento da temperatura e a produção de etanol que vão facilitar a dissolução de compostos fenólicos (antocianinas e taninos) do bagaço para o mosto. Durante a fermentação são realizadas remontagens regulares que resultam na homogeneização da temperatura, da concentração de açúcar e da população de leveduras na cuba, bem como facilitam a extração de compostos fenólicos do mosto. A fermentação alcoólica considera-se terminada quando a massa volúmica do vinho atinge valores entre os 0,991 e os 0,996 g/mL e quando a concentração de açúcares (glucose e frutose) é inferior às 2 g/L (16) .

Na terceira etapa realiza-se a separação do vinho do bagaço. Após a drenagem do vinho, o bagaço é retirado e prensado. O objetivo desta etapa consiste em extrair a maior quantidade possível de sumo ainda existente no bagaço, a qual deve ser realizada rapidamente, devido à sensibilidade do mesmo a processos oxidativos (16). Por fim, a última etapa do processo de vinificação dos vinhos tintos compreende a fermentação malolática. Esta é uma segunda fermentação que consiste na transformação de ácido málico em ácido láctico, por ação de bactérias lácticas, tendo como consequência a diminuição da acidez total e um aumento do pH. Após a realização desta fermentação, realiza-se uma clarificação do vinho com a adição de substâncias proteicas (gelatinas, por exemplo) que vão flocular e, ao precipitarem arrastam as partículas que causam turbidez no vinho. O vinho irá depois ficar em estágio em barricas de madeira ou inox. No final do estágio o vinho será estabilizado, filtrado e engarrafado.

O processo de vinificação pode também influenciar as concentrações de extrato seco total, pois a utilização de técnicas como o esmagamento, desengace, o contacto com a película e a fermentação alcoólica promovem a extração de substâncias minerais e orgânicas das uvas (18). No entanto, o extrato seco total depende também da concentração do vinho e da evaporação da fase líquida, sendo necessário garantir que outros compostos presentes no vinho não sofram alterações químicas neste processo. Vinhos tintos contêm cerca de 25 a 30 g/L de extrato seco total (19). Na Figura 8 é possível observar o esquema do processo de vinificação para vinhos tintos.

1º Etapa

- Colheita/Receção das uvas
- Esmagamento e desengace

2º Etapa

- Maceração
- **Fermentação alcoólica**

3º Etapa

- Remontagem
- Prensagem

4º Etapa

- **Fermentação malolática**
- Transfegas
- Estágio
- Estabilização
- Filtração
- Engarrafamento

Figura 8- Processo de vinificação para vinhos tintos.

2.4.1. Aditivos utilizados no processo de vinificação

2.4.1.1. Dióxido de enxofre

A adição do dióxido de enxofre é uma prática recorrente devido às suas diversas propriedades benéficas na condução da vinificação e na conservação dos vinhos (20). Este aditivo tem propriedades antioxidantes, é um inibidor de enzimas oxidásicas e um antisséptico. Tendo em consideração que a dose diária admissível de dióxido de enxofre segundo a OMS é de 0,7 mg/kg de peso corporal, o OIV fixou um limite legal de 0,150 g/L para vinhos tintos contendo até 4 g/L de matérias redutoras e 0,300 g/L para vinhos com mais de 4 g/L de matérias redutoras (20).

O dióxido de enxofre pode encontrar-se no vinho na sua forma livre ou combinada estando presente nas formas SO_2 , HSO_3^- e SO_3^{2-} . O SO_2 corresponde à fração de dióxido de enxofre livre e o ião bissulfito (HSO_3^-) representa a fração de ácido neutralizado pelas bases (16). A soma destas duas frações representa a totalidade de SO_2 presente no vinho, sendo a fração livre a que apresenta maiores propriedades antissépticas e antioxidantes. Estas três formas encontram-se em equilíbrio, fortemente dependente da temperatura, do teor alcoólico e do pH, sendo que quanto maior o teor alcoólico e a temperatura, menor será a dissociação do HSO_3^- e quanto maior os valores de pH, menor será a percentagem de SO_2 livre no vinho.

O ião bissulfito tem a capacidade de se combinar com moléculas que contenham grupos carbonilo, formando assim a fração combinada de dióxido de enxofre presente no vinho (19). Estas reações de combinação dependem do pH e da temperatura. Algumas destas reações são irreversíveis e formam a fração combinada estável (20). As reações de combinação reversíveis, originam produtos de combinação mais instáveis, constituindo assim uma reserva da fração livre, ou seja, à medida que o teor de SO₂ livre vai diminuindo, estes produtos de combinação vão-se decompondo, originando iões HSO₃⁻, de forma a restabelecer o equilíbrio da reação. O dióxido de enxofre livre é determinado por titulação iodométrica direta e o dióxido de enxofre combinado é igualmente determinado por titulação iodométrica, mas após a realização de uma hidrólise alcalina. Na Figura 9 observa-se as reações de equilíbrio durante a solubilização do dióxido de enxofre.

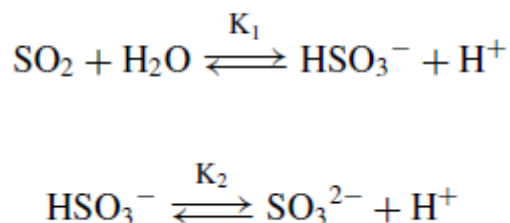


Figura 9- Reações de equilíbrio durante a solubilização do SO₂

2.4.1.1.1. Propriedades antissépticas

O dióxido de enxofre tem propriedades antifúngicas e antimicrobianas que protegem os vinhos de contaminações por leveduras e microrganismos. Este pode destruir a população fúngica existente e proteger os vinhos de refermentações indesejáveis. A fração de dióxido de enxofre que se encontra combinada não apresenta uma ação antisséptica em leveduras, ao contrário da fração de dióxido de enxofre livre. O dióxido de enxofre é fungistático a pH altos e a baixas concentrações, e é fungicida a pH baixos e altas concentrações (16).

Em relação às suas propriedades antimicrobianas, é a fração livre de dióxido de enxofre que apresenta um maior efeito. No entanto, a fração de dióxido de enxofre combinada apresenta também atividade antimicrobiana (sendo entre 5 a 10 vezes mais fraca que a fração de dióxido de enxofre livre). A adição de dióxido de enxofre às uvas permite uma atuação mais rápida nas bactérias antes de se iniciar a fermentação, bem como permite a formação da fração de dióxido de enxofre combinado, que vai retardar o crescimento bacteriano até ao fim da fermentação alcoólica. Deste modo, o meio que ainda continha

açúcar, fica protegido do desenvolvimento bacteriano que poderia levar à produção de acidez volátil (16).

2.4.1.1.2. Propriedades antioxidantes

Os fenômenos de oxidação que ocorrem nos vinhos podem ter origem química ou enzimática. As reações de oxidação químicas são mais lentas que as reações enzimáticas, necessitando de catalisadores como íons de ferro ou cobre. Em relação aos fenômenos de oxidação enzimáticas, o dióxido de enxofre evita a concretização de reações de oxidação ao diminuir a atividade de enzimas oxidativas, protegendo assim o vinho até ao início da fermentação (16). Das enzimas oxidativas presentes nos vinhos, a tirosinase é facilmente inativada pelo dióxido de enxofre enquanto que a lacase é mais resistente (20). A inativação destas enzimas realiza-se através da redução do Cu II destas enzimas, que se caracteriza por estar ligado à sua molécula proteica. A eficácia da sulfitação aumenta com a diminuição do pH, devido a uma diminuição da atividade enzimática, associado a um aumento da concentração de íons H⁺. A destruição das oxidases presentes no vinho nem sempre é completa, pois a atividade oxidásica pode verificar-se novamente com o desaparecimento da fração livre do dióxido de enxofre.

2.4.2. Ácido Cítrico

O ácido cítrico pode ser proveniente das uvas em concentrações que podem atingir os 500 mg/L. Devido às suas propriedades organoléticas e complexantes (a formação de um anião complexo solúvel com o íão Fe³⁺, que funciona como agente bloqueador da casse férrica), tem sido considerado um aditivo vinícola de grande importância, tendo 1g/L como limite legal (21). Apesar destas propriedades, pode ser uma fonte de instabilidade biológica, pois pode sofrer degradação por bactérias lácticas. A sua degradação funciona como uma fonte de energia para as bactérias lácticas, uma vez que providencia elementos que permitem às leveduras manter a sua atividade e viabilidade celular. O metabolismo do ácido cítrico leva à produção de energia, à regulação do pH intracelular e à síntese de fosfolípidos. Este consumo de ácido cítrico, por parte das bactérias lácticas, ocorre durante a sua inoculação e a fermentação malolática (22). Encontra-se representado na Figura 10 a via de degradação do ácido cítrico por bactérias lácticas.

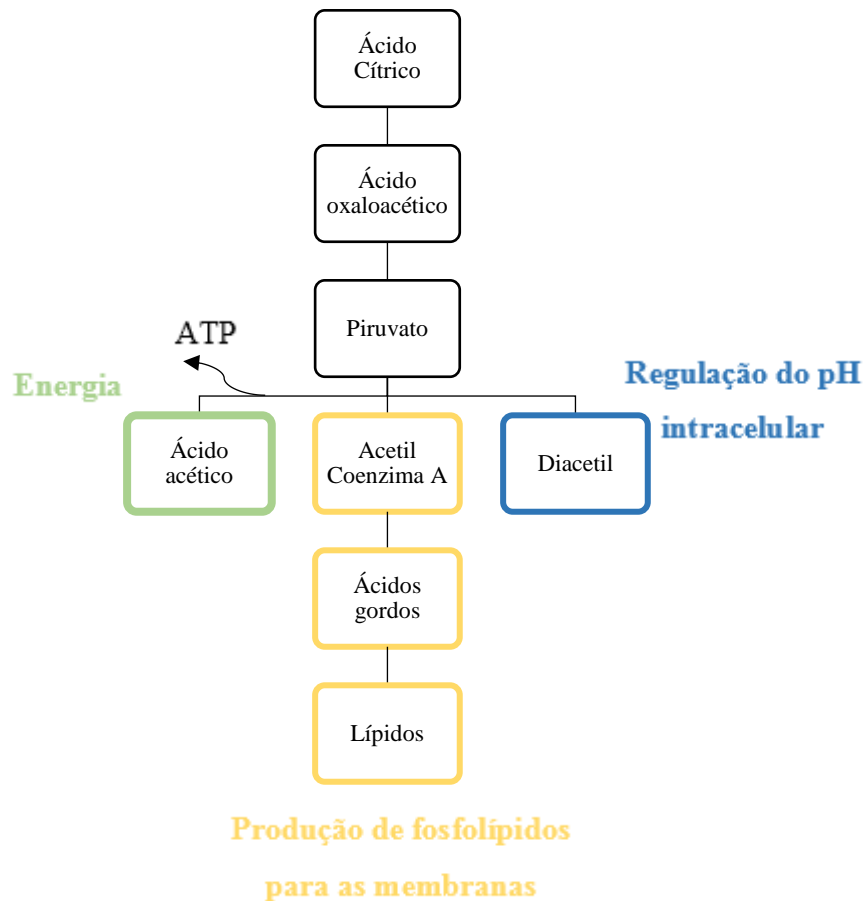


Figura 10- Via de degradação do ácido cítrico por bactérias lácticas. Adaptado de (22)

2.5. Parâmetros físico-químicos dos vinhos

Para a realização deste trabalho foram analisados 22 parâmetros físico-químicos como a massa volúmica a 20°C, extrato seco, acidez volátil, acidez total, pH, dióxido de enxofre livre, combinado e total, a intensidade, tonalidade, fenóis totais, antocianinas, título alcoométrico volúmico adquirido (TAVA), açúcares totais, cobre, ferro, sulfatos, cloretos, metanol, álcoois superiores, ácido cítrico e fenóis voláteis. Estes parâmetros foram selecionados por fornecerem informações acerca da composição do vinho, tais como a sua acidez (acidez total, acidez volátil e pH), as suas características cromáticas (intensidade e tonalidade da cor, fenóis totais e antocianinas), o seu grau alcoólico (TAVA), a constituição de compostos inorgânicos (ferro, cobre, sulfatos e cloretos), o processo de vinificação (massa volúmica a 20°C, extrato seco total, dióxido de enxofre livre, combinado e total, açúcares totais e ácido cítrico) e a existência de contaminações (fenóis voláteis).

Neste capítulo vão ser discutidos os processos bioquímicos de certos parâmetros e a sua importância para a caracterização de vinhos tintos

2.5.1. Compostos no processo de vinificação

No capítulo 2.4. foi descrito o processo de vinificação para vinhos tintos, a importância da massa volúmica no controlo de vinificação, as etapas que influenciam a concentração de extrato seco e a os aditivos adicionados ao vinho, como o dióxido de enxofre e o ácido cítrico. Assim, relativamente a estes parâmetros, apenas será mencionado neste capítulo (caso exista), a sua gama de variação esperada num vinho tinto e os seus limites legais.

A massa volúmica e o extrato seco não têm limites legais estipulados, mas apresentam uma gama de variação esperada em vinhos tintos. O dióxido de enxofre livre e combinado não apresentam valores esperados, nem limites legais estipulados. O dióxido de enxofre total e o ácido cítrico não apresentam nenhuma gama de variação esperada e têm como limite legal $\leq 150\text{mg/L}$ e de $\leq 1\text{ g/L}$ respetivamente. Esta informação encontra-se sintetizada na Tabela 6.

Tabela 6- Gama de variação (Δ) esperada e limite legal estipulado para a massa volúmica a 20°C, extrato seco total, dióxido de enxofre total e ácido cítrico

	Δ esperada	Limite legal estipulado
MV¹ a 20°C	0,991-0,996 g/mL	-
Extrato Seco	25 – 30g/L	-
SO₂² Total	-	$\leq 150\text{ mg/L}^*$
Ácido Cítrico	-	$\leq 1\text{ g/L}$

¹ – Massa volúmica ; ² – Dióxido de enxofre ; Δ – gama de variação

*para vinhos com teor de açúcar <5g/L

2.5.2. Ácidos orgânicos

A presença de ácidos orgânicos nos vinhos tem uma importante contribuição para a sua composição, estabilidade e qualidades organoléticas (19). Os ácidos são extraídos das uvas durante o esmagamento, (23) e são resultantes da atividade de diversos microrganismos (bactérias lácticas, acéticas e leveduras), de processos químicos naturais verificados durante a evolução dos mostos e dos vinhos e, por fim, de diferentes processos tecnológicos como a

adição de corretivos ácidos (20). Apesar de ser possível encontrar uma grande variedade de ácidos distintos nos vinhos, é mais interessante, do ponto de vista de uma caracterização, possuir um conhecimento global e não individualizado, de acordo com propriedades físicas e químicas comuns, tais como a determinação de ácidos livres (acidez total), de ácidos voláteis e a medição de pH (20). Na Tabela 8 encontra-se indicada a gama de variação esperada e os limites legais estipulados para cada parâmetro da acidez total, volátil e pH.

A acidez total representa um índice global da acidez, pois é composta por todos os componentes com características ácidas a pH 7, independentemente da sua volatilidade e da sua origem, com a exceção do ácido carbônico e sulfuroso (20). A acidez total de um vinho tem em consideração vários tipos de ácidos, como ácidos orgânicos e inorgânicos tal como aminoácidos. O ácido orgânico presente em maiores concentrações é o ácido tartárico (19). Este parâmetro é importante na caracterização físico-química dos vinhos e depende de parâmetros topográficos, como a exposição solar. Outros estudos comprovaram a sua utilidade como parâmetro diferenciador de vinhos provenientes de diferentes regiões em conjunto com outros parâmetros como o pH (24), os ácidos orgânicos e as cinzas (25). O método descrito pelo OIV para a determinação da acidez total consiste na realização de uma titulação na presença de um indicador (azul de bromofenol) e os resultados são expressos em g/L de ácido tartárico, sendo que a sua concentração num vinho não pode ser menor que 3,5 g/L (26).

A acidez volátil é considerada um dos mais importantes parâmetros físico-químicos a ser monitorizado durante o processo de vinificação e, por isso, influente na qualidade dos vinhos (19). É constituída pelo conjunto de ácidos gordos da série acética presente nos vinhos, quer no estado livre e salificado, excluindo assim o ácido láctico, succínio, carbônico e sulfuroso, que são ácidos com alguma volatilidade que podem interferir na determinação deste índice (19). O principal constituinte da acidez volátil é o ácido acético. Este ácido é produzido por leveduras durante a fermentação alcoólica, e durante a fermentação malolática, devido à degradação do ácido cítrico por bactérias lácticas. (17,24) As leveduras produzem pequenas quantidades de ácido acético no início da fermentação alcoólica. A fermentação malolática é também acompanhada por um ligeiro aumento do ácido acético, devido à degradação do ácido cítrico. A deteção da acidez volátil no palato apenas é possível a partir de uma concentração superior aos 0,70 g/L. (16,17) O método oficial descrito pelo OIV, consiste na separação da acidez volátil, realizada por arrastamento de vapor de água,

após uma acidificação com ácido tartárico. O destilado obtido irá ser titulado acidimetricamente, usando a fenolftaleína como indicador. Os limites legais diferem entre vinhos brancos e vinhos tintos, sendo que para vinhos tintos o limite legal é 20 meq/L (equivalente a 1,2 g/L segundo conversões fornecidas por Handbook of Enology- The Microbiology of Wine and Vinifications, (16)).

Em relação ao parâmetro do pH, este tem como valores ideais para vinhos tintos entre 3,3 e 3,6, sendo a sua manutenção em valores acídicos crucial para a sua estabilidade. Valores mais elevados de pH tornam o vinho mais suscetível à oxidação e à contaminação microbiológica e podem provocar um aumento da acidez volátil. Valores superiores a 3,9 podem resultar na perda de cor dos vinhos tintos e na formação de casse férica. A determinação do pH é realizada por potenciometria. Na Tabela 7 observa-se a gama de variação e o limite legal estipulado para os parâmetros da acidez total, acidez volátil e do pH.

Tabela 7- Gama de variação (Δ) e limite legais estipulados para os parâmetros da acidez total, acidez volátil e pH.

	Δ esperada	Limite legal estipulado
Acidez total	-	$\geq 3,5$ g/L
Acidez volátil	-	$\leq 1,2$ g/L
pH	3,3-3,6	-

Δ – gama de variação

2.5.3. Compostos fenólicos – Características cromáticas e Fenóis voláteis

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo de substâncias essenciais para as características e qualidade dos vinhos, tendo origem nas uvas, na atividade microbiana de leveduras e no contacto a madeira das barricas, de onde os compostos fenólicos podem ser eluídos. Afetam a aparência, sabor, fragância e as propriedades antimicrobianos do vinho, sendo assim responsáveis pela diferença na cor e sabor entre os vinhos tintos (onde se encontram com concentrações entre os 900 a 1400 mg /L). Os compostos fenólicos são constituídos por anéis de benzenos cíclicos, possuindo um ou mais grupos hidroxilo diretamente associados à estrutura do anel. Podem ser divididos em flavonoides (compostos por antocianinas, flavonóis e flavanóis) e em não-flavonoides (constituídos por ácidos fenólicos, aldeídos e álcoois) (17).

Em relação aos flavonoides, há um destaque para as antocianinas, constituídas por dois anéis de benzeno ligados por um heterocíclico catiónico oxigenado (19). A classificação das antocianinas baseia-se na posição dos grupos hidroxilo e metilo no anel B da molécula de antocianidina. Deste modo, as moléculas de antocianinas podem-se dividir em cinco classes: cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina, representados na Figura 11. Estes compostos são mais estáveis na sua forma glicosilada (antocianina) do que na sua forma agliconada (antocianidina). (16,18)

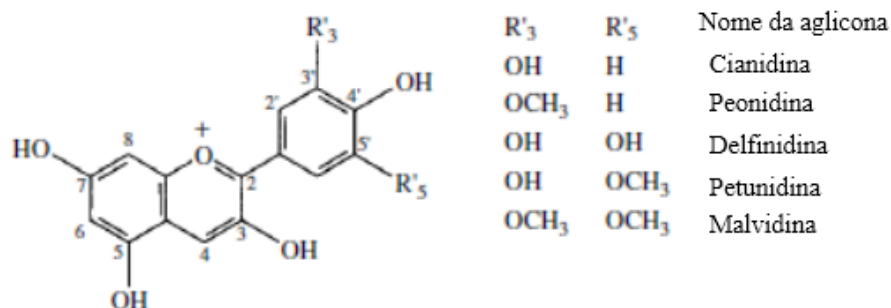


Figura 11- Estrutura das antocianidinas e os seus respectivos derivados (14)

Em vinhos novos, as antocianinas estão, predominantemente, em equilíbrio dinâmico entre cinco estados moleculares, sendo que a sua proporção depende do pH e do conteúdo de SO₂, como é possível verificar na Figura 12. Em valores de pH baixos, as antocianinas encontram-se na forma de catião flavilium (A⁺), que tem uma coloração vermelha, aumentando a intensidade da cor. Com o aumento do pH, há uma diminuição deste catião devido à sua conversão em carbinol base (AOH) através de um ataque nucleofílico da água. O composto formado desta reação é incolor e vai dar origem a chalcona C através de uma reação de tautomerização. Independentemente dos valores de pH, ocorre a desprotonação do catião flavilium (A⁺), originando as bases quinoidais que possuem uma coloração azul/violeta. A evolução da cor nos vinhos é um processo complexo e que se deve aos processos de auto-associação e de co-pigmentação. Ambos envolvem a agregação molecular através de ligações hidrofóbicas entre antocianinas (auto-associação), ou com outros compostos orgânicos (co-pigmentação) (17). A acumulação de moléculas de antocianinas nestes complexos limita o acesso da água ao catião flavilium, diminuindo a formação do composto incolor, base carbinol. A variação na proporção destes co-pigmentos varia de vinho para vinho e pode explicar a diferença na coloração de vinhos produzidos pela mesma variedade de castas (17).

As características cromáticas são constituídas pelos parâmetros dos fenóis totais, intensidade e tonalidade da cor e antocianinas, e são importantes para a realização de uma distinção entre vinhos com idades diferentes. A presença de fenóis totais nos vinhos situa-se entre 23 a 100 unidades de absorvância, com um valor médio de 54 unidades de absorvância, o que influencia as características cromáticas do vinho (27). Com o envelhecimento dos vinhos, há a ocorrência de vários processos químicos que alteram as suas características cromáticas. No entanto, a velocidade a que estes processos ocorrem depende de condições externas, tais como o fenómeno oxidativo (O_2 e SO_2), temperatura e tempo, bem como de condições internas, tais como a concentração de fenóis totais, a razão entre antocianinas e taninos e o tipo de taninos (19).

A intensidade de vinhos que não foram expostos a arejamento mantém-se, podendo até diminuir, enquanto que a intensidade da cor de vinhos que foram expostos a arejamento aumenta, ou seja, para um melhor desenvolvimento da cor durante o envelhecimento, vinhos novos requerem arejamento, no entanto, estes devem estar devidamente protegidos com uma concentração apropriada de SO_2 livre (concentrações elevadas podem inibir as restantes reações contribuidoras para a cor dos vinhos) (19). Esta mudança na intensidade da cor dos vinhos ocorre devido ao aumento da dissociação de complexos formados por auto-associação e co-pigmentação, sendo que as antocianinas livres sofrem reações de oxidação ou formam novos complexos com taninos (16,17). Verifica-se assim, que durante o período de envelhecimento de um vinho, a concentração de antocianinas livres detetadas a uma absorvância de 520 nm diminui, mas há um aumento dos complexos corados de antocianinas e taninos detetados a absorvâncias de 420 e 620 nm (17,26). Na Figura 12 observa-se a representação dos vários estados de antocianinas presentes no vinho.

A tonalidade de um vinho indica o desenvolvimento da sua cor para tons mais alaranjados, sendo que vinhos novos têm valores de tonalidade na ordem dos 0,5 e 0,7, aumentando com o envelhecimento do vinho, podendo chegar a valores na ordem dos 1,2 e 1,3 (29). O método de determinação da tonalidade consiste na razão de absorvâncias de 520/420 nm. Como referido no parágrafo anterior, há uma diminuição das antocianinas livres detetadas a 520 nm durante o envelhecimento e ocorre a formação de complexos, detetados a 420 nm. Deste modo, vários estudos comprovam que o aumento da tonalidade é uma característica que distingue vinhos mais velhos dos vinhos mais novos (27–29).

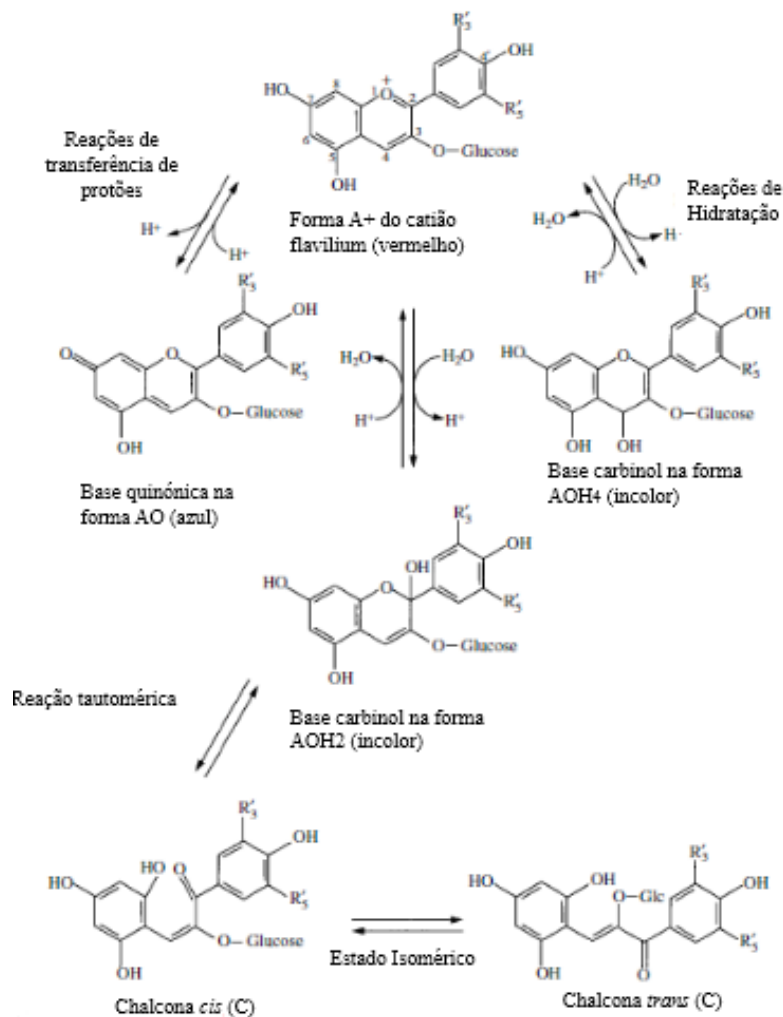


Figura 12- Representação dos vários estados de antocianinas presentes nos vinhos (19)

2.5.3.1. Mecanismo de formação de fenóis voláteis

No grupo dos não-flavonoides estão incluídos os ácidos fenólicos provenientes de diferentes partes da uva e que são extraídos durante a maceração no processamento do vinho. (19) Encontram-se presentes em concentrações que variam entre 100 e os 200 mg/L nos vinhos tintos. Os ácidos fenólicos encontram-se divididos em duas classes: os derivados do ácido hidroxibenzóico e os derivados do ácido hidroxicinâmico (p-cumárico, ferrúlico ou caféico) (16,17). Os derivados do ácido hidroxicinâmico apresentam-se como precursores na formação de fenóis voláteis (vinilfenóis e etilfenóis) que afetam a qualidade sensorial do vinho.

A produção de vinilfenóis e etilfenóis é acontece pela ação da levedura *Brettanomyces*. O mecanismo de produção destes compostos envolve a ação de duas enzimas que vão utilizar os ácidos hidroxicinâmicos como substrato (19). A primeira enzima a atuar é a hidroxicinamato descarboxilase que vai converter os ácidos hidroxicinâmicos a vinilfenóis. A segunda enzima a atuar é a vinilfenol redutase que vai reduzir os vinilfenóis a etilfenóis.

A primeira enzima a atuar está presente num elevado número de bactérias, fungos e leveduras. No entanto, a enzima responsável pela redução a etilfenóis apenas se encontra presente nas leveduras *Brettanomyces* (cuja espécie mais prevalente no vinho é a *Brettanomyces bruxellensis*) (16). A formação de fenóis voláteis por ação desta levedura é influenciada pela estripe, pelo pH do vinho, pela quantidade de nutrientes presentes no mosto e pelo estado de contaminação das adegas e equipamentos (17). Estes compostos vão afetar negativamente o aroma dos vinhos em concentrações de 400µ/L para os etilfenóis e de 725µ/L para os vinilfenóis (17). Na Figura 13 encontra-se representado o mecanismo de formação de fenóis voláteis.

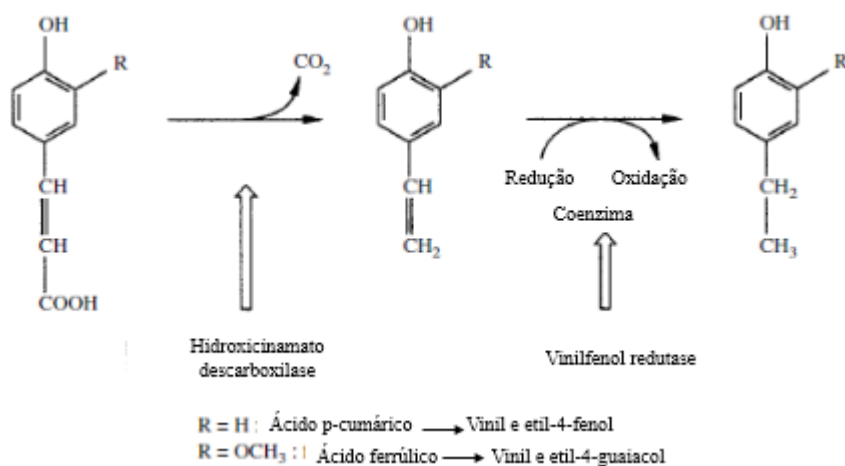


Figura 13- Mecanismo enzimático para a produção de etil-fenóis pela *Brettanomyces sp.* (13)

2.5.4. Etanol, álcoois superiores e metanol

Um dos constituintes presentes no vinho em maior quantidade, para além da água, é o etanol. Este é produzido, na sua maioria, pela fermentação alcoólica do açúcar, sendo um dos principais produtos resultantes da mesma (16,18). Além disso, o etanol afeta as características organoléticas do vinho e é essencial para a sua estabilidade e envelhecimento. A concentração em que se encontra presente varia conforme a região e o tipo de vinho. Na

região dos Vinhos Verdes, o teor alcoólico dos vinhos varia entre 9 e 10%, enquanto que na Região Demarcada do Dão, os vinhos devem ter um teor alcoólico mínimo de 11% (10). Vinhos tintos possuem um teor de etanol entre os 12 e os 14%, sendo o mínimo legal permitido de 9%, segundo o Regulamento da Comissão Europeia nº 491/2009 (Tabela 8) (26). Os principais fatores que controlam a produção de etanol são o conteúdo em açúcares (glucose e frutose), a temperatura de fermentação e a espécie de levedura (17).

A metabolização dos açúcares para a formação de etanol nos vinhos deve-se à ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que degrada os açúcares a piruvato, originando etanol através da via glicolítica. O aumento do conteúdo de etanol durante a fermentação leva à inibição de microrganismos e leveduras que produziram compostos aromáticos indesejáveis. Esta ação inibitória, combinada com a acidez presente no vinho, permite que o vinho se mantenha estável durante vários anos na ausência de ar. O etanol é um importante solvente, não só para a extração de taninos e pigmentos das uvas, mas, em especial, para a solubilização de compostos voláteis produzidos durante a fermentação, contribuindo para uma melhor expressão global do aroma nos vinhos (17).

Os álcoois com mais de dois átomos de carbono são denominados de álcoois superiores, sendo produzidos na sua maioria durante a fermentação alcoólica (19). Apesar de se encontrarem em concentrações menores que o etanol, podem ter um papel importante no aroma do vinho. São formados por leveduras a partir diretamente de açúcares ou de aminoácidos presentes nas uvas, através da reação de Ehrlich (Figura 14). A reação de Ehrlich consiste na desaminação de aminoácidos originando ácido α -cetónico, que é descarboxilado a aldeído, e por fim, reduzido a álcool pelo NADH (16). A formação de álcoois superiores a partir dos açúcares, ocorre por uma via anabólica - via do piruvato - sendo que os ácidos cetónicos atuam como intermediários.

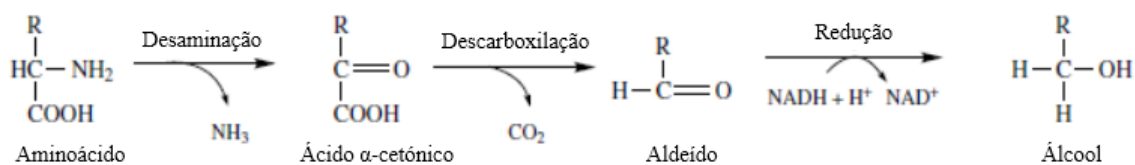


Figura 14- Mecanismo de formação de álcoois superiores através de aminoácidos. Reação de Ehrlich (16)

O conteúdo de álcoois superiores de um vinho varia de acordo com as condições de fermentação, especialmente das espécies de leveduras. Mas quando há o aumento dos fatores que elevam a velocidade da reação (biomassa de leveduras, oxigenação, temperaturas altas e a presença de matéria em suspensão), verifica-se o aumento da formação de álcoois superiores (19).

O metanol não é um dos principais constituintes do vinho e não tem impacto nas suas características organolépticas. Este resulta da hidrólise enzimática de pectinas e é formado antes e durante a fermentação (19). O conteúdo de metanol depende do conteúdo de pectinas presente nas uvas e do quão extenso é o processo de maceração, ocorrendo em maior concentração quando o mosto é fermentado com a película das uvas, como no caso dos vinhos tintos.(16,17,30)

Tabela 8- Limite legal estipulado para o parâmetro TAVA que equivale ao número de litros de etanol contidos em 100 litros de vinho.

	Limite legal estipulado
TAVA¹	≥9% (V/V)

¹ – Título Alcoométrico Volúmico Adquirido que equivale ao número de litros de etanol contidos em 100 litros de vinho.

2.5.5. Açúcares totais

Os principais açúcares presentes no vinho são as hexoses D-frutose (cetose) e a D-glucose (aldose) e são produzidas durante o processo de maturação das uvas por hidrólise da sacarose (que origina glucose e frutose) e do amido (que apenas origina glucose) (15). No início do processo de maturação, o teor de glucose é muito superior ao teor da frutose, mas durante a maturação esta razão entre os teores de glucose e frutose muda devido à ação de uma epimerase, aumentando assim os teores da frutose. No fim da maturação, esta razão é próxima de 1. Na fermentação alcoólica, a glucose é preferencialmente fermentada pela maioria das leveduras (19). Deste modo, a razão entre os teores de glucose e frutose, atinge valores menores que 1 no final da fermentação alcoólica. Um dos produtos resultantes da metabolização dos açúcares por leveduras durante a fermentação alcoólica é o etanol. É necessário entre 16,5 a 18 g/L de açúcar para a produção de 1 % de volume de etanol.

Um dos métodos de quantificação da sacarose, glucose e frutose descrito pelo OIV é através de métodos enzimáticos (20). Este método é mais específico, rápido, exato e com uma acentuada reprodutibilidade.

2.5.6. Compostos inorgânicos

Vários compostos inorgânicos encontram-se naturalmente presentes no vinho em concentrações não tóxicas. Destes destacam-se, para este trabalho, os minerais como ferro e o cobre e os sulfatos e cloretos como os aniões inorgânicos. (17,18)

A composição mineral do vinho reflete a sua origem (20). Representando cerca de 1,5 a 3 g/L no seu conjunto, os minerais presentes no vinho provêm, em grande parte, da absorção radicular, sendo que 86% do conteúdo de minerais do vinho provém do solo e os restantes podem ser atribuídos a outros fatores como o clima, a poluição e práticas vinícolas (33). Neste trabalho vão ser avaliadas as concentrações dos compostos minerais como o ferro (Fe) e o cobre (Cu). O ferro provém, na sua maioria, do solo de produção da vinha, de fertilizantes e de equipamento utilizado durante o processo de vinificação. Este mineral tem um papel fundamental na estabilidade dos vinhos devido aos efeitos na oxidação e no envelhecimento. A presença de ferro não tem limite legal estipulado (17, 25).

O cobre provém também do solo, mas a sua maioria tem origem nos tratamentos cúpricos antifúngicos dados ao vinho e encontra-se no estado oxidado Cu^{2+} (18, 26). Os vinhos novos contêm sempre uma quantidade de cobre entre os 0,3 e 0,4 mg/L, mas estas concentrações podem aumentar, excedendo, por vezes, 1 mg/L, durante o envelhecimento, caso o vinho esteja em contacto com equipamento de cobre, aumentando o risco de casse cúprica. O limite legal para a concentração do cobre nos vinhos é de 1 mg/L (26).

A composição mineral existente num vinho pode ser utilizada para a identificação e discriminação de vinhos de diferentes regiões e países. (26, 27) Entre os vários parâmetros utilizados para a caracterização dos vinhos, a avaliação da composição mineral é a melhor maneira para realizar uma diferenciação entre os mesmos (36). A correspondência entre o vinho e as amostras do solo de onze elementos metálicos, entre os quais o ferro e o cobre, foi estudada por Fabani *et al* (36). O estudo concluiu que o ferro era um dos elementos com uma maior correlação entre as concentrações presentes no solo e nos vinhos, e que poderia ser utilizado como parâmetro de origem geográfica, pois era um elemento influenciado por variações regionais de zonas de vinificação. Kment *et al* realizaram uma comparação

estatística dos principais compostos minerais presentes no vinho com a composição do solo, tendo concluído que a presença do cobre se devia, mais frequentemente, aos tratamentos dados ao vinho do que à sua presença na composição do solo. Ambos os minerais vão ser analisados por absorção atômica (34) .

A presença de aniões inorgânicos presentes nos vinhos corresponde à presença de sais solúveis. Os sulfatos encontram-se nos vinhos em concentrações entre os 100 e os 400 mg/L. No entanto, estas concentrações podem aumentar gradualmente durante o envelhecimento, devido à oxidação do dióxido de enxofre presente (17,18).

A concentração de cloretos nos vinhos é dependente do tipo de solo da plantação vinícola. Encontram-se, normalmente, em concentrações abaixo dos 50mg/L, no entanto vinhos originados de vinhas plantadas em solos calcáricos alcalinos e em solos localizados próximos do mar (com maior concentração de cloreto de sódio), apresentam uma maior concentração de cloretos (37,38). Na Tabela 9 observa-se a gama de variação e o limite legal estipulado para os parâmetros do cobre, sulfatos e cloretos.

Tabela 9- Gama de variação (Δ) e limite legal estipulado para os parâmetros do cobre, sulfatos e cloretos.

	Δ esperada	Limite legal estipulado
Cobre	-	≤ 1 mg/L
Sulfatos	100-400 mg/L	≤ 2 g/L
Cloretos	<50 mg/L	≤ 1 g/L

2.6. Influência das condições edafoclimáticas

O vinho é um produto produzido mundialmente em locais com características edafoclimáticas distintas entre si. As características do vinho produzido em cada região vão ser influenciadas pelas condições edafoclimáticas, tais como o tipo de solo presente, a topografia da região, a temperatura, a precipitação e a exposição solar. Estes parâmetros podem variar mediante alguns intervalos: temperatura (<0° C a 38°C), precipitação (0,1 a 20 dm), exposição solar (1200 a 2800 horas por ano), altitude (6 a 3000 metros de altitude com declives até 60%) e, por fim, os solos (graníticos, arenosos, calcáricos, xistosos, argilosos, sedimentares). Estas condições têm uma grande influência no amadurecimento e na qualidade de qualquer produto agrícola, afetando o tipo, a qualidade e o rendimento de

produção (37–39). Neste capítulo, vai ser analisada a influência das condições edafoclimáticas na viticultura e na composição do vinho.

2.6.1. Temperatura

De todos os elementos climáticos que influenciam a produção e qualidade das uvas, a temperatura pode ser considerada o que provoca um maior efeito no comportamento fisiológico e nas mudanças químicas que irão ocorrer nos bagos, durante a fase de crescimento e de maturação (42). A temperatura afeta o processo de fotossíntese, a respiração e a concentração de compostos fenólicos responsáveis pela cor.

Em relação ao efeito da temperatura na fotossíntese, foi observado que a vinha exposta a temperaturas mais elevadas (25°C e os 30°C) apresentava maior rendimento da fotossíntese do que quando exposta a temperaturas mais baixas (42,43). Quando a vinha é sujeita a prolongados dias com temperaturas acima dos 30°C, há uma redução do rendimento da fotossíntese (45). A temperatura influencia também a concentração de componentes como os compostos fenólicos responsáveis pela cor no vinho, sendo que altas temperaturas (entre os 30 e os 35°) durante a maturação vão provocar a diminuição de compostos fenólicos, enquanto que temperaturas mais baixas (15°) durante a maturação, vão promover o aumento de compostos fenólicos associados à cor (41, 45–47).

O processo de respiração do bago é um processo importante para a maturação da uva, ocorrendo nesta fase a formação de ácidos orgânicos a partir de açúcares, como o ácido málico (49). Esta formação de ácidos orgânicos é um passo intermediário no processo de respiração, libertando parte da energia acumulada nas moléculas de açúcar (50). Se ocorre o aumento da temperatura do bago durante a maturação, há um aumento na degradação do ácido málico. Tal fenómeno sugere que o processo de respiração é sensível ao aumento de temperatura (51). O efeito da temperatura na uva encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10- Efeito da temperatura na fotossíntese, nos compostos fenólicos responsáveis pela cor e na respiração.

	Aumento da temperatura	Diminuição da temperatura
Fotossíntese	↑	↓
Compostos fenólicos	↓	↑
Respiração	↑	↓

2.6.2. Exposição solar

O efeito da luz na composição química da uva é largamente dependente do aumento da temperatura à qual a uva é sujeita, como resultado da sua exposição solar (52). A luz solar providencia energia para a realização de processos metabólicos como a fotossíntese e calor, quer por aquecimento direto da superfície da uva, quer por aquecimento da atmosfera circundante. O efeito da exposição solar no desenvolvimento da uva e na composição da mesma tem sido estudado, mostrando que o aumento da exposição solar durante a maturação da uva aumenta a sua composição química e, conseqüentemente, a do vinho. Uvas que sofreram uma maior exposição à luz, têm maiores concentrações de açúcares, antocianinas e taninos e menores valores de acidez total, ácido málico e pH, quando comparadas com uvas com menor exposição (50,51). No entanto, uma exposição prolongada à luz solar que leve a um aumento de temperaturas do bago e da atmosfera entre os 30 e os 35°C, levam a uma redução do conteúdo fenólico, em especial as antocianinas (52,53).

2.6.3 Precipitação

O nível de precipitação e o período em que este ocorre vão influenciar as características do vinho e a disponibilidade de água. Na fase de desenvolvimento, há a acumulação de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, minerais, micronutrientes e compostos aromáticos, afetando a qualidade das uvas. Um aumento do stress hídrico nesta fase diminuiu a acumulação destes compostos (56,57). A disponibilidade da água durante esta fase de desenvolvimento influencia o conteúdo de açúcares no vinho. O stress hídrico elevado, devido a baixas precipitações, prejudica o desenvolvimento dos bagos e pode levar a perdas de qualidade (58).

A ocorrência de precipitação antes da colheita das uvas vai provocar uma diluição dos açúcares existentes na uva, diminuindo a sua concentração e originando vinhos com menor teor alcoólico. Quando a precipitação neste período é baixa, as uvas obtidas são mais pequenas, mas têm uma maior concentração de açúcares e de compostos fenólicos e voláteis,

originando vinhos com maior teor alcoólico, aroma e cor mais intensos (58). Precipitação excessiva, neste período, pode causar um aumento do tamanho do bago e promover a diminuição da concentração de ácidos orgânicos, antocianinas e taninos (59).

2.6.4. Solo

Vários fatores ambientais que afetam o crescimento da vinha e a composição química da uva e do vinho estão relacionadas com as propriedades existentes nos solos. A capacidade de retenção do solo pode afetar a disponibilidade de água e nutrientes para a vinha e a sua penetrabilidade influencia o crescimento das raízes, enquanto que a capacidade de reter o calor e de refletir a luz afeta o microclima da região (60). A capacidade do solo de reter água é uma das características mais importantes e que tem um papel significativo na composição química da uva. Quando a capacidade de retenção do solo é baixa, limita o acesso da vinha à água, originando a diminuição do tamanho do bago, mas aumentando o seu conteúdo em antocianinas e taninos (61). Quando este stress hídrico não é excessivo, pode ser favorável para a qualidade potencial da uva (62). Um estudo realizado por Koundouras *et al* comprovou que o stress hídrico provocado por certos tipos de solos, provocou um aumento no potencial enológico da casta tinta Agiotgitiko, ao promover a concentração de antocianinas e de composto fenólicos na pele do bago, aumentando a quantidade de glico-conjugados nos componentes aromáticos e acelerando a acumulação de açúcar e a degradação de ácido málico no sumo (63).

Um outro estudo, realizado por Wang *et al*, verificou o efeito de diferentes tipos de solo (calcário, arenoso e sedimentar) nas características químicas das bagas e do vinho (64). Este estudo confirmou que os vinhos, cujas vinhas foram plantadas em solos calcários, tinham um maior conteúdo em açúcares, maior razão entre açúcares e ácidos e maior conteúdo de antocianinas. Por outro lado, os vinhos provenientes de solos arenosos tinham maior composição em compostos fenólicos e taninos e que os vinhos, com origem em solos sedimentares, apresentam uma composição mais fraca. Ainda se concluiu o tipo de solo afeta as propriedades químicas dos bagos e, conseqüentemente, a qualidade do vinho.

2.6.5. Altitude e declive

A altitude e o declive podem influenciar as condições climáticas em que a vinha se encontra, pois afetam diretamente a temperatura, a precipitação, a humidade, e a exposição

solar. Deste modo, a altitude pode afetar a maturação da uva e a duração da sua época de crescimento (17) .

Um estudo realizado na Região Demarcada do Douro, utilizando as castas Touriga Nacional e Touriga Francesa, plantadas a diferentes altitudes durante três anos, concluiu que as vinhas que se encontravam a maiores altitudes (entre 300 a 350 metros acima do nível do mar) originavam uvas e vinhos com maior concentração de antocianinas monoglucosidadas, em comparação com as vinhas que se encontravam plantadas a menores altitudes (entre 100 e 150 metros acima do nível do mar). No entanto, verificou-se que a biossíntese de monómeros de catequina na película do bago, dímeros de procianidinas e proantocianidinas totais era favorecida a menores altitudes (65). As vinhas plantadas a maiores altitudes estavam expostas a menores valores de temperatura, mas a maiores valores de humidade, em comparação com as vinhas plantadas em altitudes mais baixas. (62,63)

Um outro estudo realizado também na Região Demarcada do Douro com duas variedades de castas, a Touriga Nacional (situada a 90,155 e 210 metros) e a Touriga Francesa (situada a 85,145 e 180 metros), concluiu que as uvas da casta Touriga Francesa, que cresceram a menores altitudes, tinham menores concentrações de carotenóides em comparação às concentrações verificadas em maiores altitudes (67). Maiores altitudes foram associadas a menor crescimento do bago e à diminuição da degradação de carotenoides durante o período de maturação, o que pode explicar os valores de carotenoides a altas altitudes verificada na casta Touriga Franca. No entanto, tal não se verificou na casta Touriga Nacional, onde a maior concentração de carotenoides foi significativamente maior nos 155 metros de altitude, em comparação com os 90 e os 210 metros. Tal sugere que temperaturas moderadas, em conjunto com altitudes moderadas, e com uma boa exposição solar são as condições ideais para o desenvolvimento da cor e a acumulação de carotenoides (67).

Em relação ao declive, este tem uma elevada influência na temperatura e na drenagem do solo, fatores críticos para o crescimento da vinha. Uma vinha pode ser plantada em terrenos com declive (até 60%) ou em terraços. Vinhas plantadas em declives, têm menor exposição ao calor e ao frio, dependendo da orientação do declive. A altitude influencia a temperatura, como também a interceção solar a que a vinha está sujeita, sendo que uma maior interceção solar origina um vinha mais quente. No entanto, a contribuição do declive depende também da região em que se encontra plantada a vinha, havendo contudo, uma preferência pelos declives virados a sul por proporcionarem vinhas com maiores

temperaturas e maiores interceções solares, ideais para a maturação do bago. O declive influencia também outros parâmetros como o tamanho da vegetação circundante e a composição química das vinhas (68).

3. Parte experimental

3.1. Amostragem

Para a realização deste trabalho foram avaliados os parâmetros físico-químicos de vinhos tintos provenientes das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão. Este vinho foi obtido na garrafeira da Comissão Vitivinícola Regional do Dão. Os vinhos encontravam-se armazenados numa posição deitada, sem iluminação, expostos a uma temperatura de 14^oC e a uma humidade de 77%. A recolha de amostras e a realização do trabalho laboratorial ocorreu entre dezembro de 2016 e abril de 2017.

Foram estudadas um total de 106 garrafas de vinho tinto, provenientes de oito colheitas distintas (de 2008 a 2015). Na Figura 15 é possível observar a amostragem dividida pelas sub-regiões, a sua distribuição ao longo dos anos em estudo e a distribuição dos diferentes anos de colheita dos vinhos nas sete sub-regiões. Através da observação desta figura, verifica-se que a sub-região com maior número de amostras é Besteiros (18 garrafas) e a sub-região com menor número de amostras é Alva (12 garrafas). Os anos mais representados são 2012 (26 garrafas), 2013 e 2014 (ambos com 29 garrafas). Observa-se também que das 106 amostras analisadas, apenas dez se definem por serem monovarietais.

Na Tabela 11 é possível observar que, nos dez vinhos monovarietais a casta mais predominante é Touriga Nacional com seis amostras, seguido de Alfocheiro, Jaen e Syrah. As sub-regiões de Besteiros e Silgueiros são as sub-regiões com maior número de vinhos monovarietais, enquanto que as sub-regiões de Alva e Serra da Estrela não apresentam vinhos monovarietais. No Anexo IV encontra-se a representação da quantidade de vinhos dos anos de colheita em estudo distribuídas por cada uma das sete sub-regiões.

Assim, observa-se que a sub-região de Silgueiros é a que apresenta maior variedade de amostras, pois tem vinhos do período de 2008 e 2014 e tem três vinhos monocasta. A sub-região com menor variabilidade de amostras é Alva, pois não só é a região que tem o menor número de amostras, apenas tem amostras entre 2012 e 2015, e não apresenta vinhos monovarietais.

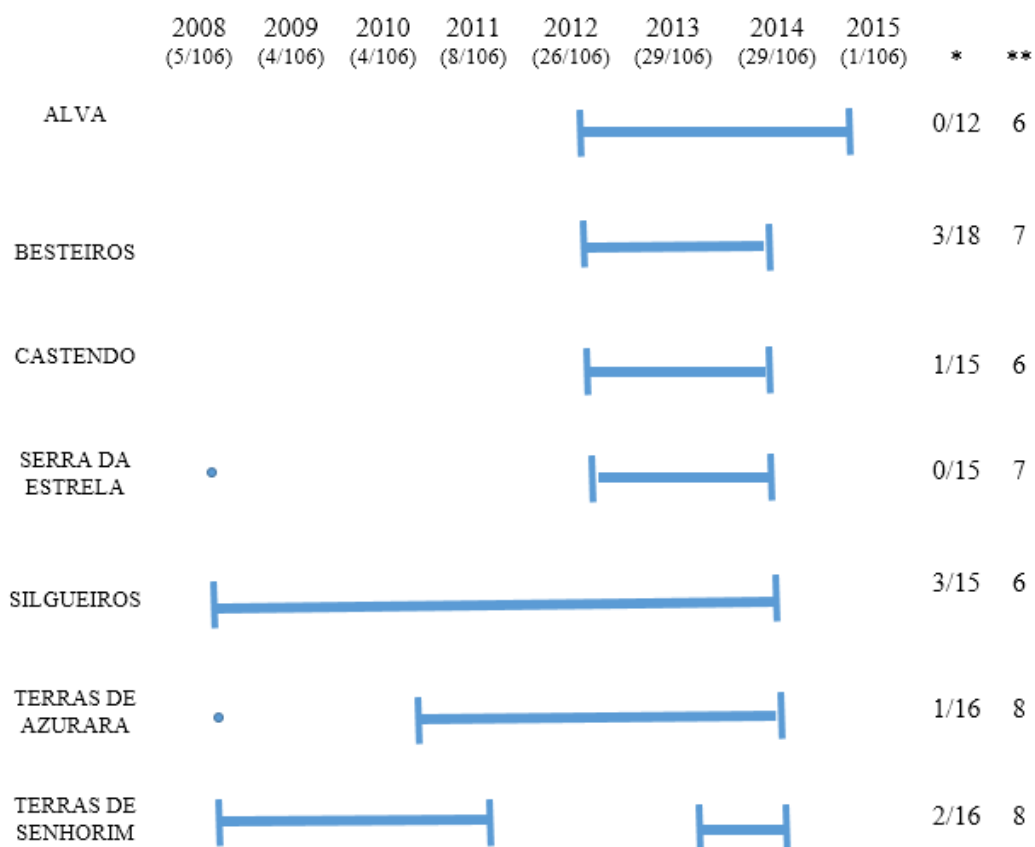


Figura 15- Representação da amostragem descrevendo o número de agentes económicos, os anos de colheita, o número de garrafas por ano e dos vinhos monocasta por cada sub-região da Região Demarcada do Dão em que * corresponde ao número de vinhos monocasta/número de vinhos totais e ** corresponde ao número de produtores por sub-região.

Tabela 11- Distribuição das amostras de vinhos tintos monovarietais pelas sete sub-regiões e identificação das castas monovarietais existentes na amostragem.

	Touriga Nacional	Jaen	Alfrocheiro	Syrah	Total
Alva					0
Besteiros	2			1	3
Castendo	1				1
S. da Estrela					0
Silgueiros	1		2		3
T. Azurara	1				1
T. Senhorim	1	1			2
Total	6	1	2		10

3.2. Parâmetros físico-químicos

Os métodos utilizados pelo laboratório da Comissão Vitivinícola Regional do Dão baseiam-se, na sua maioria, nos métodos do “Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Must”, definidos pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), um organismo de natureza técnica e científica, cuja competência é reconhecida no ramo da viticultura (20). Este organismo tem como principal objetivo a indicação das medidas a tomar que permitam resolver as preocupações dos produtores, dos consumidores e de outras partes interessadas nas fileiras do vinho, apoiar outras organizações governamentais e não governamentais que realizam atividade de normalização, contribuir para a harmonização internacional das práticas e normas existentes e, se necessário, desenvolver novas normas internacionais a fim de melhorar as condições de elaboração e de comercialização de produtos vitivinícolas, tendo em conta os interesses do consumidor (20).

De modo a adaptar os métodos às condições disponíveis no laboratório, foram realizadas algumas alterações aos estipulados pelo OIV. Estes métodos alterados constituem os Métodos Internos do laboratório da Comissão Vitivinícola Regional do Dão. Dentro dos Métodos Internos, há métodos baseados apenas em artigos científicos, como a intensidade e tonalidade da cor, antocianinas e fenóis totais (69), fenóis voláteis (70), e na norma portuguesa como os álcoois superiores totais e o metanol (Norma Portuguesa 3263:1990). Dos 22 parâmetros físico-químicos realizados para este trabalho 11 são utilizados para a certificação dos vinhos tintos DO Dão e o laboratório encontra-se acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) para a realização de 15 dos métodos. Na Tabela 12 encontram-se sintetizados a origem dos métodos utilizados, quais são utilizados na certificação dos vinhos DO Dão e para quais o laboratório de encontra acreditado pelo IPAC.

Tabela 12- Identificação dos métodos utilizados para a certificação de vinhos tintos e os acreditados pelo IPAC

Parâmetros analisados	Métodos	EOC ^a	Acreditação IPAC
Massa Volúmica a 20°C	OIV-MA-AS2-01B ¹	X	X
Extrato Seco total	OIV-MA-AS2-03B ¹	X	X
Acidez total	MI32 ²	X	X
Acidez volátil	MI38 ²	X	X
pH	OIV-MA-AS313-15 ¹	X	X
SO ₂ livre	MI09 ²	X	X
SO ₂ combinado	MI36 ²	X	X
SO ₂ total	MI10 ²	X	X
Intensidade	MI39 ³		
Tonalidade	MI40 ³		
Fenóis totais	MI22 ³		
Antocianinas	MI21 ³		
TAVA	MI04 ²	X	X
Açúcares totais	MI08 ²	X	X
Cobre	MI02 ²	X	X
Ferro	MI01 ²		X
Sulfatos	OIV-MA-AS321-05A ¹		X
Cloretos	OIV-MA-AS321-02 ¹		X
Metanol	MI18 ⁴		
Álcoois Superiores	MI18 ⁴		
Ácido cítrico	MI15 ²		X
Fenóis voláteis	MI33 ³		

1- Métodos do OIV.

2- Métodos Internos do Laboratório da Comissão Vitivinícola do Dão realizados com base nos métodos do OIV.

3- Métodos Internos do Laboratório da Comissão Vitivinícola do Dão realizados com base em artigos e trabalhos científicos.

4- Métodos Internos do Laboratório da Comissão Vitivinícola do Dão realizados com base na Norma Portuguesa 3263:1990 - Bebidas alcoólicas e espirituosas.

a- Ensaio Obrigatório para a certificação de vinhos DO Dão

3.2.1. Determinação da massa volúmica a 20°C

O parâmetro da massa volúmica a 20°C permite saber se o processo de fermentação foi finalizado. A sua determinação consistiu na colocação de cerca de 250 mL da amostra de

vinho em estudo numa proveta com 36 mm de diâmetro e 320 mm de altura. De seguida, foram inseridos o areómetro e o termómetro. Aguardou-se um minuto para permitir o equilíbrio da temperatura e realizou-se a leitura do termómetro. O termómetro foi removido e foi lida o valor de temperatura. Aguardou-se novamente um minuto, de modo a permitir a estabilização do areómetro, e realizou-se de seguida a leitura da massa volúmica aparente. O valor da massa volúmica a 20°C foi calculado com base na correção efetuada à temperatura (baseado em tabelas providenciadas pelo OIV), ao areómetro e dos valores do dióxido de enxofre total. A massa volúmica foi expressa em g/L, apresentados com 4 casas decimais. Na Tabela 13 encontra-se representado os valores da repetibilidade, variabilidade intralaboratorial e incerteza relativa para este parâmetro.

Tabela 13- Representação dos valores de repetibilidade (r), variabilidade intralaboratorial (VI) e incerteza relativa para o parâmetro da massa volúmica a 20°C

	MV ≤ 1,0000 g/mL
r	0,00042 g/mL
VI	0,0052 g/mL
Incerteza relativa	±0,06%

3.2.2. Determinação do extrato seco total

O extrato seco total é o conjunto de toda a matéria que é não volátil sob condições físicas específicas. Estas condições físicas devem ser fixadas de modo a que as substâncias que a constituem sofram o mínimo de alterações. Este parâmetro foi determinado indiretamente a partir da densidade do vinho desalcoholizado. O extrato seco foi expresso pela quantidade de sacarose necessária num litro de água para se obter uma solução com a mesma densidade que o vinho desalcoholizado. Os resultados foram expressos em g/L com uma casa decimal e encontra-se representado na Tabela 14 a incerteza relativa para este método. O extrato seco total (d_r) foi calculado a partir das massas volúmicas, da densidade do vinho e da densidade da solução hidroalcoólica com a mesma força alcoólica que o vinho obtido, todas a uma temperatura de 20°C através da seguinte fórmula:

$$d_r = 1,001801 (\rho_v - \rho_a) + 1000$$

Na qual:

ρ_v = densidade do vinho a 20°C (corrigida com a acidez volátil)¹

ρ_a = densidade a 20°C da solução hidroalcoólica com título alcoométrico do vinho segundo as tabelas fornecidas pelo OIV.

O coeficiente 1.0018 aproxima-se a 1 quando ρ_v é menor que 1.05, que é uma situação frequente.

¹NOTA: Antes de realizar este cálculo, a massa volúmica do vinho deve ser corrigida para o efeito da acidez volátil (a – expressa em mili equivalente por litro) através da fórmula:

$$d_v = d \frac{20}{20} - 0,0000086a$$

Ou da fórmula:

$$\rho_v = \rho_{20} - 0,0000086a$$

Tabela 14- Representação do valor de incerteza relativa para o parâmetro do extrato seco total

	Extrato seco total
Incerteza relativa	±2%

3.2.3. Determinação da acidez volátil

A determinação da acidez volátil tem como objetivo conhecer a fração de ácidos da série acética presente no vinho na forma livre e combinada, tais como sais. O princípio do método baseou-se na titulação dos ácidos voláteis, separados do vinho por arrastamento por vapor de água e retificação dos vapores. Esta titulação foi realizada num destilado obtido com o auxílio de um aparelho de destilação por arrastamento de vapor de água (Jaulms da marca LEQUEUX), do qual de seguida se retira a influência da acidez proveniente do dióxido de enxofre livre e combinado. Para a obtenção do destilado, foram colocados 20 mL de amostra no aparelho de destilação e adicionados cerca de 0,5 g de ácido tartárico, tendo, de seguida, procedido à destilação, recolhendo-se cerca de 250 mL de destilado para um erlenmeyer. De seguida, o destilado obtido foi titulado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando-se a fenolftaleína até ao aparecimento de uma cor carmim, e registou-se o volume do hidróxido de sódio gasto (V). Após esta titulação, adicionaram-se quatro gotas de ácido clorídrico a ¼ (v/v), 2 mL de cozimento de amido a 5g/L e cristais de iodeto de potássio, seguindo-se uma titulação com uma solução de iodo a 0,005M até ao

aparecimento de uma coloração azul, tendo sido o volume gasto novamente registado (V1). De seguida, adicionou-se uma solução saturada de borato de sódio a 55 g/L até ao reaparecimento da cor carmim. Foi titulado novamente com solução de iodo a 0,005M até ao reaparecimento de uma coloração azul, tendo-se novamente registado o volume gasto (V2). A acidez volátil foi expressa em g de ácido acético/L apresentada às centésimas. Na Tabela 15 encontra-se representado a repetibilidade, variabilidade intralaboratorial e a incerteza relativa para este método. A obtenção da acidez total realizou-se através da aplicação de uma fórmula:

$$AV = 0,300 * \left(\left(V * \frac{[NaOH]}{0,1} \right) - \left(0,1 * V_1 * \frac{[I_2]}{0,005} \right) - \left(0,05 * V_2 * \frac{[I_2]}{0,005} \right) \right)$$

Em que:

AV – Acidez volátil.

V – Volume gasto na titulação com a solução de hidróxido de sódio, em ml.

V1 – Volume gasto na titulação com a solução de iodo (titulação do dióxido de enxofre livre), em ml.

V2 – o volume gasto na titulação com a solução de iodo (titulação do dióxido de enxofre combinado), em ml.

[NaOH] – a concentração da solução de hidróxido de sódio em M.

[I₂] – a concentração da solução de iodo em M.

Tabela 15- Representação da repetibilidade (r), da variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro da acidez volátil.

	Acidez volátil
r	0,04 g/L
VI	0,08 g/L
Incerteza relativa	Ac. Volátil ≤ 0,4 g/L – 16% Ac. Volátil > 0,4 g/L – 7%

3.2.4. Determinação da acidez total

A determinação da acidez total tem como objetivo conhecer a soma dos ácidos tituláveis a pH 7 com o auxílio de uma solução alcalina, e utilizando uma solução de azul de bromotimol como indicador do fim da reação. Iniciou-se a sua determinação com a adição

de 30 mL de água tipo II, 1 mL de solução azul de bromotimol a 4g/L e 10 mL de amostra para um erlenmeyer. De seguida realizou-se a sua titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M até ao aparecimento de uma coloração azul-esverdeada e registou-se o volume de hidróxido de sódio gasto (n), em ml. O cálculo da acidez total, expressa em gramas de ácido tartárico por litro e apresentados às centésimas, foi dada pela seguinte expressão:

$$AT = 7,5 \times n \times C_{\text{NaOH}}$$

Tabela 16- Representação da repetibilidade (r), variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro da acidez total.

	Acidez total
r	0,08 g/L
VI	0,21 g/L
Incerteza relativa	Ac. Total ≤6,0 g/L – 6%
	Ac. Total ≤6,0 g/L – 5%

3.2.5. Determinação do pH

A determinação do pH foi determinada por potenciometria, utilizando um potenciómetro (marca HANNA). A calibração do potenciómetro foi efetuada a 20°C usando as soluções tampão de pH 6,88 e 3,00 adquiridos comercialmente. Como controlo da calibração, utilizou-se a solução tampão de pH 4,00 a 20°C (também adquirida comercialmente). Após a calibração do aparelho, a determinação do pH foi realizada através da colocação de um eletrodo num copo de precipitação contendo a amostra de vinho em agitação, tendo o cuidado de efetuar as leituras a uma temperatura de entre os 20 e 25 ° C. O valor de pH foi lido diretamente, tendo sido realizadas pelo menos duas determinações à mesma amostra. O resultado final foi considerado a média aritmética de duas determinações, apresentadas com duas casas decimais. Na Tabela 17 encontra-se representado a repetibilidade, variabilidade intralaboratorial e a incerteza relativa para este método.

Tabela 17- Representação da repetibilidade (r), variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro do pH.

	pH
r	0,03
VI	0,05
Incerteza relativa	±2%

3.2.6. Determinação do dióxido de enxofre livre, combinado e total

A determinação do dióxido de enxofre livre, combinado e total realizou-se por potenciometria com titulação iodométrica direta. Foi utilizado um titulador automático Crison Titromanic 2S com um sampler 45, constituído por uma bureta calibrada de 10 mL e um elétrodo duplo de platina que era previamente calibrado antes da realização dos ensaios com as amostras. Para realizar a determinação do dióxido de enxofre livre, combinado e total, foi colocado um volume de amostra superior a 5 mL num tubo de ensaio próprio para utilização no aparelho, tendo-se adicionado à amostra cristais de iodeto de potássio e um magnete revestido de teflon. Procedeu-se, de seguida, à titulação automática. Os resultados obtidos para o dióxido de enxofre livre, combinado e total foram fornecidos pelo software do equipamento, foram expressos em mg/L e apresentados às unidades. O Limite de Quantificação (LQ) do dióxido de enxofre livre é 12 mg/L, do dióxido de enxofre combinado é 16 mg/L e do dióxido de enxofre total é 36 mg/L. Encontra-se representado na Tabela 18 a repetibilidade, variabilidade intralaboratorial, limite de deteção e quantificação e a incerteza relativa para cada método.

Tabela 18 - Representação da repetibilidade (r), da variabilidade intralaboratorial (VI), do limite de deteção (LD), Limite de quantificação (LQ) e da incerteza relativa (I. relativa) para os parâmetros do dióxido de enxofre livre (SO₂ L), combinado (SO₂ C) e total (SO₂ T)

	SO₂ L	SO₂ C	SO₂ T
r	≤50 mg/L – 8 mg/L]50; 90] mg/L – 11 mg/L	16 mg/L	13 mg/L
VI	≤50 mg/L – 9 mg/L]50; 90] mg/L – 21 mg/L	16 mg/L	22 mg/L
LD	8 mg/L	10 mg/L	17 mg/L
LQ	12 mg/L	16 mg/L	25 mg/L
I. relativa	±35%	±15%	±18%

3.2.7. Determinação da intensidade e da tonalidade da cor

Para a determinação da intensidade e da tonalidade da cor, foi utilizado um espectrómetro U- 2910 HITACHI. Como preparação da amostra, cerca de 10 mL de vinho foram centrifugados a 3500rpm durante 10 minutos. Para a determinação da intensidade das amostras, foi utilizada uma célula de quartzo que foi lavada com a amostra previamente centrifugada. De seguida, foi introduzido na célula um volume de amostra que permitiria efetuar a medição das absorvâncias. Para a intensidade, foram medidas a comprimentos de onda de 420, a 520 e a 620 nm e para a tonalidade os comprimentos de onda utilizados foram apenas 420 e 520 nm.

A intensidade da cor do vinho foi dada pela seguinte fórmula, com os resultados expressos em u.a. e apresentados às milésimas:

$$I= A420 + A520 + A620$$

A tonalidade da cor foi dada pela seguinte fórmula, sendo os seus resultados adimensionais e apresentados às milésimas.

$$T= A420 / A520$$

3.2.8. Determinação das antocianinas

Para a determinação das antocianinas no vinho foi realizado um tratamento da amostra com metabissulfito e um tratamento com uma solução de ácido clorídrico. No tratamento com a solução de metabissulfito de sódio, foram adicionados 300µl de amostra a uma célula de 1 mm de percurso ótico e foi medida a sua absorvância a 520 nm. Após esta leitura, foram adicionados 4,5µl de metabissulfito de sódio a 20% (m/v) à amostra na célula. Esta foi vedada com parafilm e invertida várias vezes de modo a homogeneizar a amostra. Aguardou-se um minuto, de modo a permitir a realização da reação, e foi lido o valor da absorvância a 520 nm. Em relação ao tratamento com ácido clorídrico a 1M, foi colocado 10 mL de ácido clorídrico e 100µl de amostra num tubo de ensaio. A solução foi homogeneizada por agitação e colocada num banho a 45 °C durante uma hora. Após este período, aguardou-se a estabilização para a temperatura ambiente e leu-se a absorvância a 520 nm. De seguida, realizou-se a leitura da amostra a uma absorvância de 520 nm em

células com 10 mm de percurso óptico. A concentração de antocianinas no vinho é expressa em mg/L, apresentada as unidades e é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas} = 20 * (101 A_{520}^{HCl} * -\frac{50}{3} * A_{520}^{SO2})$$

Sendo:

A_{520}^{HCl} – absorvância, a 520 nm, da amostra tratada com ácido

A_{520}^{SO2} – absorvância, a 520 nm, da amostra tratada com metabisulfito de sódio

3.2.9. Determinação dos fenóis totais

A determinação dos fenóis totais baseia-se na diluição da amostra de vinho numa razão de 1/101 com uma solução de ácido clorídrico 1M, seguida da determinação da absorvância a 280 nm em células de 10 mm de percurso ótico. Para tal, realizou-se a mesma preparação utilizada na determinação das antocianinas com ácido clorídrico 1M. A concentração dos fenóis totais, expressa em u.a. e apresentada às décimas, foi dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Fenóis Totais} = 101 * A_{280}^{HCl} - 4$$

A_{280}^{HCl} - Absorvância, a 280 nm, da amostra tratada com ácido clorídrico

3.2.10. Determinação do Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA)

A determinação do TAVA tem como objetivo conhecer o grau alcoólico de cada vinho. O TAVA equivale ao número de litros de etanol contidos em 100 litros de vinho, sendo ambos os volumes medidos a uma temperatura de 20°C. Para tal, foi realizada a destilação do vinho alcalinizado, sendo que a destilação da amostra foi conseguida através da utilização de um equipamento de destilação com uma coluna retificadora em hélice em malha metálica. Antes da realização da destilação, a amostra foi homogeneizada por agitação e colocada em balões volumétricos de 250 ml, tendo-se aferido o volume após um acerto da temperatura a 20°C. De seguida, a amostra foi transferida do balão volumétrico para o balão de destilação, para o qual tinha sido previamente transferido entre 10 a 20 ml de óxido de cálcio a 120 g/L. O balão volumétrico foi lavado quatro vezes com água destilada, que foi igualmente transferida para o balão de destilação. Iniciou-se o processo de destilação, recolhendo-se cerca de 235 a 240 mL de destilado para o mesmo balão volumétrico, utilizado

anteriormente. Após este passo, aferiu-se o balão volumétrico com o destilado previamente acertado a uma temperatura de 20°C, com água destilada tipo II, a uma temperatura de 20±1°C. O destilado obtido foi homogeneizado por agitação e transferido para uma proveta cilíndrica, mantida em posição vertical. Foram, de seguida, introduzidos o alcoómetro e o termómetro, e após uma estabilização térmica efetuou-se a leitura da temperatura que se deveria encontrar entre os 20±°C. Após a estabilização do alcoómetro efetuou-se a leitura sobre a sua escala, registando-se o valor do título alcoométrico volúmico aparente. O TAVA é calculado a partir do título alcoométrico aparente com a realização de uma correção da temperatura através de tabelas fornecidas pelo OIV. Os resultados são expressos em % (v/v) e apresentados às décimas. Na Tabela 19 encontra-se representado a repetibilidade, a variabilidade intralaboratorial e a incerteza relativa para este parâmetro.

Tabela 19- Representação da repetibilidade (r), da variabilidade intralaboratorial (VI) e da incerteza relativa para o parâmetro do Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA).

	TAVA
r	0,10 % (V/V)
VI	0,1 % (V/V)
Incerteza relativa	±2%

3.2.11. Determinação dos açúcares totais

A determinação da sacarose baseia-se na ação da enzima β-frutose-1,6-bisfosfatase que vai hidrolisar a sacarose em D-glucose e D-frutose, como representado na reação (1). A determinação da D-glucose e da D-frutose baseia-se na ação da hexocinase (HK) que vai degradar a D-glucose em glucose-6-fosfato e a D-frutose em frutose-6-fosfato sendo que esta vai ser degradada a glucose-6-fosfato pela fosfoglucoase isomerase (PGI), como se verifica nas reações (2) e (3). Na presença de glucose-6-fosfato desidrogenase, a glucose-6-fosfato é oxidada pelo NADP⁺ originando gluconato-6-fosfato e NADPH (G6P-DH), como se observa na reação (4). A formação de NADPH aumenta a absorvência a 340 nm, sendo assim possível determinar a concentração dos açúcares que permanece nos vinhos. Na Figura 16 encontra-se representadas as reações que permitem esta determinação.

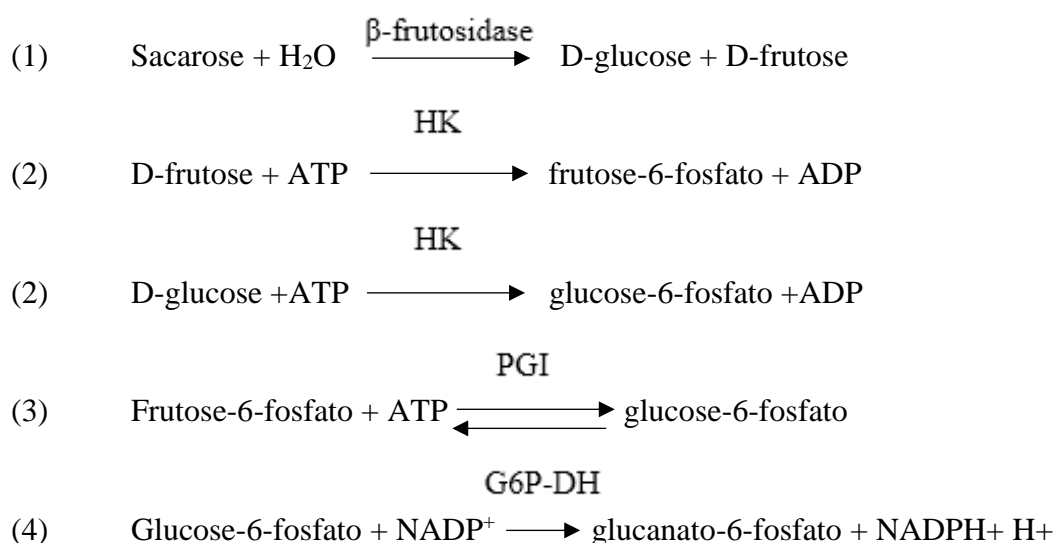


Figura 16- Reações enzimáticas nas quais se baseia a determinação da sacarose, D-glucose e D-frutose através de métodos enzimáticos.

A técnica de análise sequencial utilizou um equipamento da HORIBA ABX, modelo Pentra 400 que permitiu a análise enzimática dos açúcares totais (sacarose, D-glucose e D-frutose) e do ácido cítrico. A determinação da sacarose, D-glucose e D-frutose permite conhecer a concentração de açúcares totais numa amostra de vinho e foi realizada por métodos enzimáticos. Efetuou-se uma curva de calibração com base nas absorvâncias obtidas com a utilização dos padrões de calibração com concentrações de 0,1; 1,0; 4,0 e 6,0 g/L de sacarose, D-glucose e D-frutose, seguindo-se o método dos mínimos quadrados recorrendo ao Microsoft Excel. O teste à curva de calibração é realizado com soluções controlo com concentrações de 0,3; 3,0; e 6,0 g/L de sacarose, D-glucose e D-frutose. Por fim, foram medidas as absorvâncias das amostras em duplicado e o seu teor de sacarose, D-glucose e D-frutose foi expresso em g/L e arredondado às décimas.

Tabela 20- Representação da repetibilidade (r), do limite de precisão intermédia (LPI), da percentagem de recuperação (%R), do limite de deteção (LD) e de quantificação (LQ) e a incerteza relativa para o parâmetro dos açúcares totais.

	Açúcares totais
r	$\leq 0,5 \text{ g/L} - 0,1 \text{ g/L}$ $]0,5; 4,0] \text{ g/L} - 0,4 \text{ g/L}$ $]4,0; 6,0] \text{ g/L} - 0,6 \text{ g/L}$
LPI	$\leq 0,5 \text{ g/L} - 0,1 \text{ g/L}$ $]0,5; 4,0] \text{ g/L} - 0,5 \text{ g/L}$ $]4,0; 6,0] \text{ g/L} - 0,8 \text{ g/L}$
R(%)	102%
LD	14 mg/L
LQ	50 mg/L
Δa	$[-0,01; 0,02]$
Δb	$[0,0007; 0,0008]$
σ residual	0,01
Incerteza relativa	$\leq 0,5 \text{ g/L} - 54\%$ $]0,5; 4,0] \text{ g/L} - 29\%$ $]4,0; 6,0] \text{ g/L} - 19\%$

3.2.12. Determinação do ferro

A concentração de ferro nos vinhos foi determinada diretamente ou através da diluição da amostra, utilizando espectroscopia de absorção atómica, a 248,3 nm com base na NP EN 2280 (1988). Antes de realizar a determinação do ferro da amostra foi ligada a lâmpada de cátodo oco do ferro e a lâmpada de deutério, tendo-se aguardado o tempo necessário para a sua estabilização. De seguida, procedeu-se à otimização do comprimento de onda do equipamento a 248,3 nm, tendo-se acertado o zero com água tipo I e optimizou-se a aspiração com solução de optimização (solução de ferro a 6mg/L). Efetuou-se uma curva de calibração com base nas absorvâncias obtidas com padrões de calibração de concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 e 7,0 mg/L de ferro, lidos em duplicado. Para a representação da curva de calibração utilizou-se o método dos mínimos quadrados recorrendo ao Microsoft Excel. Após a calibração e aceitação dos parâmetros da curva de calibração, mediu-se, em duplicado, a

absorvância da amostra, sendo o teor de ferro na amostra expresso em mg/L, arredondado às décimas.

Tabela 21- Representação da repetibilidade (r), do limite de precisão intermédia (LPI), da percentagem de recuperação (%R), do limite de deteção (LD) e de quantificação (LQ) o intervalo da ordenada da origem (Δa) e do declive (Δb), desvio padrão (σ) e a incerteza relativa para o parâmetro do ferro.

	Ferro
r	0,2 mg/L
LPI	0,3 mg/L
R(%)	99%
LD	0,3 mg/L
LQ	1,0 mg/L
Δa	[0,00; 0,01]
Δb	[0,03; 0,04]
σ residual	0,005
Incerteza relativa	19%

3.2.13. Determinação do cobre

A concentração do cobre existente nos vinhos foi determinada diretamente ou por diluição da amostra por espectrofotometria de absorção atómica a 324,8 nm com base no método descrito no OIV. Antes de se iniciar a determinação, seleccionou-se a lâmpada de cátodo oco de cobre e aguardou-se o tempo necessário para a sua estabilização. Efetuou-se uma curva de calibração com base nas absorvâncias dos padrões de calibração com concentrações de 0,10; 0,20; 0,40; 0,50; 0,60; 0,80; 1,00; 1,20 e 1,50 mg/L de cobre. Os padrões de calibração foram absorvidos por ordem crescente de concentração e as absorvâncias foram lidas, em duplicado, pelo equipamento. Para a representação da curva de calibração utilizou-se o método dos mínimos quadrados, recorrendo ao Microsoft Excel. Após a realização da calibração, as amostras foram absorvidas diretamente e as suas absorvâncias lidas pelo equipamento em duplicado. O teor de cobre foi expresso em mg/L e arredondado às centésimas.

Tabela 22- Representação da repetibilidade (r), do limite de precisão intermédia (LPI), da percentagem de recuperação (%R), do limite de deteção (LD) e de quantificação (LQ), o intervalo da ordenada da origem (Δa) e do declive (Δb), desvio padrão (σ) e a incerteza relativa para o parâmetro do cobre.

	Cobre
r	0,03 mg/L
LPI	0,3 mg/L
R(%)	98%
LD	0,03 mg/L
LQ	0,10 mg/L
Δa	[0,002; 0,02]
Δb	[0,08; 0,10]
σ residual	0,005
Incerteza absoluta	$\pm 0,14$ mg/L

3.2.14. Determinação dos sulfatos

A determinação dos sulfatos consiste numa determinação gravimétrica após precipitação de sulfato de bário. O fosfato de bário precipitado nas mesmas condições é eliminado através de uma lavagem do precipitado com ácido clorídrico 2M. Para a realização da determinação foram introduzidos 40 ml da amostra de vinho num tubo de centrifugação com capacidade para 50 ml. Adicionaram-se 2 ml de ácido clorídrico 2M e 2 ml de cloreto de bário 200 g/L. Agitou-se com o auxílio de uma vareta e foi deixada em repouso durante 5 minutos, de modo a permitir a realização da reação. Centrifugou-se, de seguida, a amostra durante 5 minutos a 3500 rpm e decantou-se cuidadosamente o líquido sobrenadante. Procedeu-se à lavagem do precipitado com a adição de 10 mL de ácido clorídrico 2M seguindo-se uma nova centrifugação durante 5 minutos a 3500 rpm. Decantou-se novamente o líquido sobrenadante, tendo-se procedido com a lavagem, por mais duas vezes, com 15 mL de água destilada tipo II. Após a lavagem com a água, o precipitado resultante foi cuidadosamente transferido, com o auxílio de água tipo II, para uma cápsula de platina previamente calcinada, arrefecida e pesada que foi colocada sobre um banho de água a 100 °C até à evaporação completa da água. O precipitado seco obtido foi brevemente calcinado, várias vezes, sobre uma chama até se obter um resíduo branco. Foi arrefecido num exsiccador

e pesado. O conteúdo de sulfatos foi expresso em miligramas por litro de sulfato de potássio (K_2SO_4), e arredondado às unidades, cujo resultado é apresentado pela fórmula, em que m corresponde à massa de sulfatos pesada:

$$18,67 \times 1000 \times m$$

Tabela 23- Representação da repetibilidade (r), variabilidade interna (VI), percentagem de recuperação (% recuperação) e incerteza relativa para o parâmetro dos sulfatos.

	Sulfatos
r	$\leq 1000 \text{ mg } K_2SO_4/L - 27 \text{ mg } K_2SO_4/L$ $> 1000 \text{ mg } K_2SO_4/L - 41 \text{ mg } K_2SO_4/L$
VI	$\leq 1000 \text{ mg } K_2SO_4/L - 49 \text{ mg } K_2SO_4/L$ $> 1000 \text{ mg } K_2SO_4/L - 50 \text{ mg } K_2SO_4/L$
% recuperação	[92; 104]
Incerteza absoluta	66 mg/L

3.2.15. Determinação dos cloretos

A determinação dos cloretos, ocorreu diretamente no vinho por potenciométrica usando um eletrodo de Ag/AgCl. Foi utilizado um potenciômetro JENWAY, um eletrodo de referência Ag/AgCl de dupla junção, com uma solução saturada de nitrato de potássio como eletrólito de referência e um eletrodo seletivo de membrana sólida. Para a determinação dos cloretos foram introduzido 5 mL da solução padrão de cloreto (cloreto de potássio a 2,1027 g/L) num copo de precipitação de 150 mL, adicionando-se de seguida 95 mL de água tipo II e 1,0 mL de ácido nítrico. O eletrodo foi emergido nesta solução que foi deixada a estabilizar com agitação moderada, num agitador magnético. Após este período de estabilização foi adicionada solução de nitrato de prata a 4,7912 g/L em etanol 10% (v/v) com uma microbureta, respeitando o seguinte procedimento: adicionaram-se os primeiros 4 mL em frações de 1 mL e leram-se os correspondentes valores de microvolt. De seguida, adicionaram-se os 2 ml seguintes em frações de 0,20 mL e, por fim, prosseguiu-se a adição em frações de 1 mL até se ter adicionado um total de 10mL. Após cada adição aguardaram-se 30 segundos antes de se ler o valor de milivolt correspondente. Os valores obtidos foram utilizados para a construção de um gráfico para determinar o potencial correspondente ao ponto de equivalência. De modo a controlar as condições da determinação, foram colocados

5 mL da solução padrão de cloretos num copo de 150 mL, adicionaram-se 95 mL de água tipo II e 1 mL de ácido nítrico. Colocou-se o eléctrodo na solução em agitação e titulou-se até se obter o potencial do ponto de equivalência, tendo-se repetido esta determinação até se obter uma boa concordância de resultados. Para a determinação do teor de cloretos, colocaram-se 50 mL da solução padrão de cloreto, 50 mL de água destilada e 1 mL de ácido nítrico num copo de 150 mL. Mergulhou-se o eléctrodo e deixou-se estabilizar com agitação moderada no agitador magnético. De seguida, titulou-se em frações de 0,2 mL mantendo-se a agitação, até se obter o potencial do ponto de equivalência. O ponto final do doseamento e o volume de solução de nitrato de prata exatamente gasto é dado pela seguinte fórmula:

$$V = V' + \Delta Vi \frac{\Delta \Delta E1}{\Delta \Delta E1 + \Delta \Delta E2}$$

Em que:

V = volume titulado no ponto de equivalência

V' = volume de titulado antes da maior diferença de potencial

ΔVi = volume constante de adição de titulado (0,2 mL)

$\Delta \Delta E1$ = segunda diferença de potencial antes da maior mudança de potencial

$\Delta \Delta E2$ = segunda diferença de potencial depois da maior mudança de potencial

O teor de cloretos é expresso em miligramas de NaCl por litro e é dado pela seguinte fórmula:

$$32,9 \times V$$

Tabela 24- Representação da repetibilidade (r), da variabilidade interna (VI), da percentagem de recuperação (% recuperação) e da incerteza relativa para o parâmetro dos cloretos.

	Cloretos
r	2,0 mg NaCl/L
VI	3,5 mg NaCl/L
LD	13,4 mg NaCl/L
LQ	16,6 mg NaCl/L
% recuperação	[97; 110]
Incerteza relativa	≤ 55 mg/L - ±20%
	>55 mg/L - ± 15%

3.2.16. Determinação dos álcoois superiores e metanol

A determinação dos álcoois superiores e do metanol em vinhos foi realizada a partir da amostra destilada, usando como padrão interno o 4-metil-2-pentanol a 1g/L. Os álcoois superiores consistem na soma dos álcoois 2-butanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, álcool alílico e o álcool isoamílico presentes na amostra. Concretizou-se uma curva de calibração com soluções padrão com base na razão das áreas dos picos cromatográficos dos compostos e do padrão interno adicionado, seguindo as condições cromatográficas indicadas na Tabela 25. Estas soluções padrão foram preparadas a partir de duas soluções mãe: uma solução A com 1,7 g de etanal e 2,6 g de metanol e uma solução B com 0,1 g de 2-butanol, 0,4 g de 1-propanol, 0,9 g de isobutanol, 0,1 g de álcool, 0,1g de 1-butanol e 3,2 g de álcool isoamílico. A partir destas soluções, foram criadas soluções padrão com diluições de 1/10, 1/100, 1/200 e 1/400. A 10 mL de cada uma destas soluções padrão foi adicionado 1 mL de padrão interno e efetuou-se a sua injeção automática e em duplicado no cromatógrafo. A preparação da amostra, para esta determinação, consistiu na destilação de 200 mL de vinho. Foram medidos 10 mL deste destilado para um balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se 1 mL da solução de padrão interno a 1g/L. De seguida, foi injetou-se um volume de 1µL no cromatógrafo. A concentração dos álcoois superiores e do metanol é expressa em 100 mL/álcool absoluto, sendo para tal necessário calcular a sua concentração em mg/L, calculada pela seguinte fórmula:

$$C_i(\text{mg/L}) = C_p b + (A_i A_p - a)$$

Em que:

C_i é a concentração do composto em análise

C_p é a concentração do padrão interno

b é o declive da reta de calibração

A_i é a área do composto em análise

A_p é a área do pico do padrão interno

a é a ordenada na origem da reta de calibração

De modo a expressar os álcoois superiores e metanol em 100 mL/álcool absoluto utiliza-se a seguinte fórmula:

$$C_i(\text{mg}/100\text{mL a.a.}) = C_i(\text{mg/L}) * 10/\text{TAVA}$$

Em que:

C_i é a concentração em mg/100 mL de álcool absoluto

TAVA é o título alcoométrico adquirido determinado previamente

Tabela 25 - Condições do cromatógrafo para a determinação dos álcoois superiores totais e metanol

Condições do cromatógrafo para a determinação dos álcoois superiores totais e metanol	
Temperatura do detetor	250 °C
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura inicial do forno	35 °C
Isotérmica inicial	2,30 minutos
Rampa de temperatura	5°C /min
Temperatura final do forno	100 °C
Isotérmica final	1 minuto
Débito do ar	300 ml/min
Débito do hidrogénio	30 ml/min
Débito do hélio	30ml/min
Volume de injeção	1,0µl

3.2.17. Determinação do ácido cítrico

A determinação do ácido cítrico baseia-se na sua degradação a oxaloacetato e acetato por ação da enzima citrato liase (CL), como demonstrada na reação (1). O oxaloacetato e o seu produto de descarboxilação, o piruvato, vão ser reduzidos a L-malato e a L-lactato por ação das enzimas L-malato desidrogenase (L-MDH) e pela L-lactato desidrogenase (L-LDH) na presença de NADH, como se verifica nas reações (2) e (3). Estas reações encontram-se representadas na Figura 17.

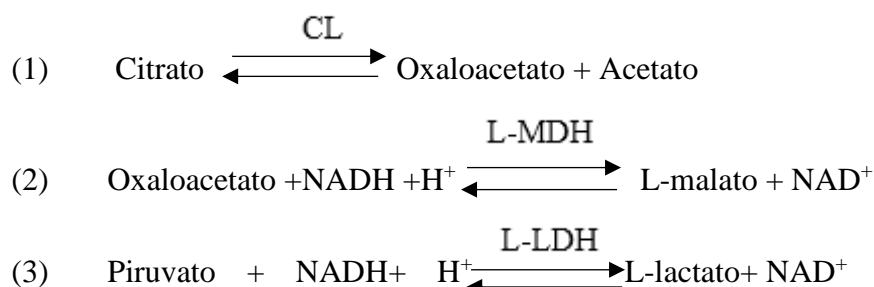


Figura 17- Degradação enzimática do ácido cítrico nas quais se baseiam a sua determinação por métodos enzimáticos.

A determinação dos teores de ácido cítrico no vinho foi realizada através de métodos enzimáticos e determina-se pelo aumento das absorvâncias a 334, 340 ou 365 nm, devido à formação de NAD⁺. Efetuou-se uma curva de calibração com base nas absorvâncias obtidas para os padrões de calibração com concentrações de 50, 100, 200, 500 e 800 mg/L de ácido cítrico. Utilizou-se o método dos mínimos quadrados recorrendo ao Microsoft Excel. Após a realização da calibração, esta foi testada recorrendo-se a soluções controlo com concentrações de 50, 400 e 800 mg/L de ácido cítrico. Por fim, a absorvância da amostra foi medida sendo o seu teor de ácido cítrico expresso em mg/L e arredondado às unidades. O LQ do método é de 50 mg/L.

Tabela 26- Representação da repetibilidade (r), do limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ), percentagem de recuperação (% R), o intervalo da ordenada da origem (Δa) e do declive (Δb) e incerteza relativa do parâmetro do ácido cítrico.

	Ácido cítrico
r	< 100 mg/L – 8 mg/L ≥ 100 mg/L – 27 mg/L
LPI	< 100 mg/L – 10 mg/L ≥ 100 mg/L – 46 mg/L
R(%)	94%
LD	14 mg/L
LQ	50 mg/L
Δa	[-0,002; 0,01]
Δb	[0,0007; 0,0008]
σ residual	0,003
Incerteza relativa	21%

3.2.18. Determinação dos fenóis voláteis

A concentração de fenóis voláteis foi determinada a partir da quantificação do 2-metoxi-4-etil-fenol e do 4-etil-fenol por cromatografia gasosa com detetor FID, após a realização da sua extração líquido-líquido utilizando como padrão interno o 3,4-dimetil-fenol e seguindo as condições cromatográficas indicadas na Tabela 27. A extração líquido-

líquido consistiu na transferência de cerca de 100 mL de amostra para um erlenmeyer, efetuando-se, de seguida, uma alteração do seu pH a 8 com uma solução de hidróxido de sódio 12M. Transferiram-se 50 mL da amostra a pH 8 para um balão de 100 mL ao qual se adicionaram 0,5 mL de padrão interno (que consistia numa solução de 3,4-dimetil-fenol com uma solução hidroalcoólica a 75% e com uma concentração de 1030 mg/L) e 4 mL de éter-hexano 1/1 (v/v). Esta solução foi agitada durante 5 minutos com o auxílio de um agitador magnético, e foi, cuidadosamente, transferida para uma ampola de decantação. Foi deixada 5 minutos em repouso, de modo a permitir a separação entre a fase aquosa e a fase orgânica. A fase aquosa era recolhida para o balão de 100 mL e a fase orgânica para um frasco de vidro apropriado. Repetiu-se o processo de extração mais duas vezes. No frasco com a fase aquosa, foi quebrada a emulsão com o auxílio de um agitador magnético e foi retirada a fase aquosa com uma micropipeta para um frasco de cromatografia. Este foi convenientemente vedado e armazenado a uma temperatura de -4°C durante 12 horas. Após este tempo de espera foram injetados $2\mu\text{L}$ no cromatógrafo. A calibração do cromatógrafo efetuou-se com a injeção, em duplicado, de $2\mu\text{L}$ de cada uma das soluções padrão preparadas a partir de diluições da solução mãe, tendo-se obtido três soluções com as seguintes concentrações de 2-metoxi-4-etil-fenol e de 4-etil-fenol, apresentadas na Tabela 28. Os resultados são expressos em $\mu\text{g/L}$ e arredondados às unidades.

Tabela 27- Concentração de 2-metoxi-4-etil-fenol e de 4-etil-fenol em L dos três padrões necessários para a calibração do método.

	2-metoxi-4-etil-fenol ($\mu\text{g/L}$)	4-etil-fenol ($\mu\text{g/L}$)
Padrão 1	60	180
Padrão 2	450	1350
Padrão 3	1200	3600

Tabela 28- Condições do cromatógrafo para a determinação do parâmetro dos fenóis voláteis.

Condições do cromatógrafo para a determinação dos fenóis voláteis	
Temperatura do injetor	230 °C
Temperatura do detetor	250 °C
Temperatura inicial do forno	35 °C
Isotérmica inicial	0,50 min
Rampa de temperatura nº1	40 °C/min
Temperatura final do forno	50 °C
Isotérmica	0 minutos
Rampa de temperatura nº2	14 °C/min
Temperatura final	100 °C
Isotérmica	1 minuto
Rampa de temperatura nº 3	3 °C/min
Temperatura final	200 °C
Tempo de isotérmica final	1 minuto
Débito do hélio	5 a 6 ml/min
Débito do hidrogénio	65ml/min
Débito do ar	300ml/min
Volume de injeção	2 µl

3.3. Tratamento de resultados

Para a realização deste trabalho foram estudadas 106 garrafas de vinhos tintos provenientes das 7 sub-regiões que constituem a Região Demarcada do Dão. Para cada garrafa foram realizados 22 parâmetros físico-químicos: massa volúmica a 20°C, extrato seco total, acidez total, acidez volátil, pH, dióxido de enxofre livre, combinado e total, intensidade e tonalidade da cor, fenóis totais, antocianinas, TAVA, açúcares totais, ferro, cobre, sulfatos, cloretos, álcoois superiores, metanol, ácido cítrico e fenóis voláteis. Seguindo os procedimentos do laboratório da Comissão Vitivinícola Regional do Dão, os parâmetros seriam realizados em duplicado numa garrafa, para cada dez garrafas analisadas. Os resultados obtidos relativos aos parâmetros analisados foram organizados pelas sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão a que pertenciam. Os resultados obtidos foram também divididos por sub-regiões utilizando apenas amostras provenientes unicamente do

ano de colheita de 2012, 2013 e por fim, 2014, os anos de colheita mais representados na amostragem. De modo a visualizar a variação e distribuição de cada parâmetro para cada sub-região e para as sub-regiões apenas com dados dos três anos de cada ano de colheita mais representado, recorreu-se a um tipo de gráfico denominado de *boxplot* realizado através do programa Excel for Windows da Microsoft, versão 2016. O *boxplot* é um gráfico constituído pelo primeiro e pelo terceiro quartil (nos quais se localizam 50% das concentrações), pelos limites extremos (mínimo e máximo), podendo também estar presentes possíveis valores atípicos.

Para avaliar a significância estatística entre as sete sub-regiões para cada parâmetro, foi utilizada a ANOVA unidirecional. Esta foi realizada com um nível de confiança de 95%, indicando significância estatística se $p < 0,05$, através do programa GraphPad Prism 6. Foi realizado um teste post hoc de Tukey para indicar quais as sub-regiões apresentavam diferenças significativas entre si. Este tratamento estatístico foi também aplicado às amostras provenientes apenas dos anos de colheita de 2012 e 2014. Não foi possível realizar a análise estatística para o ano de 2013 pois na sub-região de Silgueiros, apenas há uma amostra. Os dados com valores abaixo do limite de quantificação foram representados por metade do valor do limite de quantificação estabelecido para esse método.

De forma a perceber se as diferenças significativas observadas entre as sete sub-regiões em determinados parâmetros se deviam o fator sub-região ou ao fator ano (7 anos de colheita visto que o ano de 2015 não foi considerado por ter apenas uma amostra) foi realizado um teste estatístico denominado Análise Simultânea de Componente (ASCA). Na realização desta análise estatística, as variáveis sub-região e ano foram padronizadas para terem uma média de 0 e o desvio padrão de 1. Os testes de significância realizados foram testes de permutação. Permutação consiste na mudança ao acaso da ordem das colunas na matriz dos dados. Os dados foram permutados 2000 vezes, com um p-value de 0,01. A análise estatística foi realizada no software MATLAB, v7.12 do ano 2011^a.

4. Resultados e discussão

Numa fase inicial, foi introduzido o modo de funcionamento da empresa e as suas principais áreas de trabalho, como o laboratório, a receção das amostras, a câmara de provadores, na qual se realizam as provas sensoriais e a aquisição dos selos de certificação, sendo todas estas áreas essenciais no processo para a certificação e autenticação de um vinho.

Nesta fase, foi realizada uma formação inicial, que tinha como objetivo a aquisição de conhecimentos teóricos, a aprendizagem dos métodos para a concretização dos parâmetros escolhidos nas amostras em estudo e, também, o manuseamento do equipamento necessário para a realização dos parâmetros. No laboratório, para além do treino prático, foi apresentada a política de segurança e de qualidade da empresa e foi efetuado trabalho laboratorial que consistia na realização de assistência técnica aos agricultores. Relativamente à câmara de provadores, foi permitido o acompanhamento e participação em algumas provas sensoriais realizadas.

Na fase seguinte, foi efetuada a seleção das amostras por sub-região, a partir das garrafeiras da Comissão Vitivinícola Regional do Dão, e a realização dos métodos aprendidos na primeira fase para a obtenção dos resultados em cada parâmetro estudado. Apenas duas garrafas da sub-região de Alva foram enviadas pelo produtor visto que não existiam em número suficiente na garrafeira. Em cada semana de trabalho foram analisadas 10 garrafas das setes sub-regiões distintas, com a exceção das duas últimas duas semanas, nas quais apenas foram analisadas 8 garrafas. No total foram analisados 22 parâmetros em 106 garrafas provenientes de 7 sub-regiões distintas da Região Demarcada do Dão. O procedimento realizado seguiu o procedimento da empresa, tendo sido realizados duplicados em apenas uma garrafa numa série de 10 garrafas. Quando não era possível realizar os duplicados na mesma garrafa, devido à falta de amostra, estes seriam realizados numa outra garrafa da mesma série de dez vinhos. Como tal, os valores de n são bastante heterogéneos entre as sub-regiões e os parâmetros estudados. Encontra-se na Figura 18 o diagrama de trabalho e a lista de parâmetros analisados.



Figura 18- Diagrama de trabalho realizado no laboratório da ¹Comissão Vitivinícola Regional do Dão e parâmetros físico-químicos analisados em cada garrafa em estudo.

4.1 Parâmetros físico-químicos dos vinhos

Com vista a sintetizar e permitir uma melhor interpretação dos resultados obtidos, após a análise dos parâmetros físico-químicos realizados no vinho, foi elaborada uma tabela com informação relativa à gama de variação (com informação relativa ao máximo e ao mínimo) e aos valores de mediana para cada parâmetro em cada sub-região, considerando as amostras de 2008 a 2015. Por observação das gamas de variação na Tabela 7, verifica-se que para o parâmetro do dióxido de enxofre livre, as sub-regiões de Besteiros, Silgueiros, Terras de Azurara e Terras de Senhorim apresentam valores abaixo do LQ. Para o ferro, o cobre e o ácido cítrico, todas as sub-regiões apresentam valores abaixo do LQ (sendo que o cobre apresenta também os valores de mediana abaixo do LQ em todas as sub-regiões tal como o ácido cítrico, com a exceção de Besteiros e Terras de Senhorim). Nos cloretos apenas a sub-região de Terras de Azurara apresenta valores abaixo do LQ. Silgueiros é a única sub-região que não apresenta maior gama de variação em nenhum dos parâmetros estudados, no entanto, apresenta maior número de parâmetros com as maiores medianas. Alva é a sub-região na qual se verifica maior número de parâmetros com menor gama de variação e Terras de Azurara e Terras de Senhorim são as sub-regiões onde se verifica número de parâmetros maior gama de variação. Alva e Terras de Azurara as sub-regiões que apresentam maior número de parâmetros com menores medianas.

Apesar da amostragem variar entre 2008 e 2015, os anos que se encontram mais representados na amostragem são os anos de 2012 (26 garrafas), 2013 e 2014 (ambos com 29 garrafas). Como tal, foram também realizadas tabelas para cada ano, representando as gamas de variação e os valores de medianas para os parâmetros em estudo nas sete sub-regiões, e gráficos *boxplot* para cada parâmetro destes três anos. Nas tabelas destes três anos observa-se que o dióxido de enxofre livre apresenta valores menores que o LQ em algumas sub-regiões, para os anos de 2012 e 2013, e que os cloretos apenas apresentam valores menores que o LQ em 2012. Os parâmetros do ferro, do cobre e do ácido cítrico apresentam valores abaixo do LQ em algumas sub-regiões, para estes três anos. As tabelas com as informações acerca da gama de variação e mediana e os gráficos de *boxplot*, para os anos de 2012, 2013 e 2014, encontram-se em anexo (Anexo V, Anexo VI e Anexo VII respetivamente)

Tabela 29 - Representação da gama de variação (Δ) e dos valores de mediana (MED) dos 22 parâmetros físico-químicos estudados para cada uma das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os vinhos entre os anos de 2008 e de 2015.

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão														
Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
MV ^a	0,9912 – 0,9951 n = 12	0,9931	0,9914-0,9958 n = 20	0,9934	0,9914-0,9952 n = 16	0,9934	0,9906-0,9959 n = 17	0,9935	0,9221-0,9967 n = 16	0,9941	0,9900-0,9556 n = 19	0,9922	0,9909-0,9965 n = 19	0,9942
E. Seco ^b	27,1-34,4 n = 12	30,3	28,1-38,6 n = 20	32,4	25-35,4 n = 16	32	26,8-36 n = 17	31,8	29,4-42,6 n = 16	34,7	25,8-37,2 n = 19	37,2	25-42,6 n = 19	33,9
A. volátil ^b	0,57-0,82 n = 12	0,69	0,50-1 n = 22	0,66	0,41-0,69 n = 16	0,58	0,48-0,91 n = 15	0,59	0,54-0,63 n = 16	0,54	0,39-0,86 n = 19	0,64	0,50-0,88 n = 17	0,64
A. total ^b	5,01-5,39 n = 12	5,21	5,2-6,33 n = 20	5,7	4,36-6,41 n = 20	5,3	4,86-6,11 n = 16	5,55	5,21-6,32 n = 15	5,79	4,83-6,3 n = 22	5,65	4,83-6,25 n = 18	5,59
pH ^c	3,66-3,99 n = 12	3,76	3,56-3,81 n = 22	3,68	3,6-3,79 n = 17	3,7	3,62-3,9 n = 16	3,71	3,6-3,92 n = 16	3,74	3,48-3,84 n = 20	3,74	3,61-3,92 n = 18	3,78
SO ₂ L. ^d	14-28 n = 12	18	<12-24 n = 22	14	13-28 n = 19	19	12-32 n = 16	18	<12-29 n = 15	14	<12-28 n = 19	17	<12-30 n = 18	18
SO ₂ C. ^d	27-115 n = 12	64	39-108 n = 22	55	33-87 n = 19	61	27-113 n = 16	53	39-71 n = 15	54	33-110 n = 19	53	32-106 n = 18	61
SO ₂ T. ^d	43-143 n = 12	85	52-129 n = 22	69	48-109 n = 19	81	39-144 n = 16	73	53-93 n = 15	73	42-124 n = 19	70	46-125 n = 18	77
TAVA ^e	11,2-14,6 n = 12	12,9	13,1-14,4 n = 18	13,3	11,3-14,8 n = 16	12,9	12,2-13,8 n = 15	13,2	12 -14,4 n = 15	13,7	12,4-14,8 n = 17	13,9	12,3-14,6 n = 16	13,1

< - indica um valor menor que o LQ do método.

a – g/mL

b – g/L

c – adimensional

d – mg/L

e – % (V/V)

f – unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV – massa volúmica

E. – extrato

A.- acidez

SO₂ – dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. – Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. – totais

A.T.- açúcares totais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. – voláteis

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
Sulfatos ^d	400-912 n =16	762	411-863 n =21	568	203-785 n =15	554	297-1590 n =16	544	438-1157 n =16	619	280 -986 n =18	496	437-866 n =16	588
Cloretos ^d	27,5-47 n =13	33,2	27,2-61,8 n =19	47,5	22,8-99,6 n =17	40,7	21,8-74 n =16	31,4	28 -70,9 n =16	45,6	<16,6-40,7 n =18	26,4	17,3-108,9 n =17	36,3
Int. ^f	7,957-12,735 n =12	9,011	7,39-13,485 n =22	10,436	5,959-14,241 n =18	9,692	7,276-13,07 n =17	9,12	7,709-16,13 n =15	11,734	6,967-13,7 n =19	9,57	6,88-19,08 n =18	10,774
Tonalidade ^c	0,728-0,9 n =12	0,8025	0,69-0,921 n =22	0,8335	0,687-0,895 n =18	0,8055	0,722-0,984 n =17	0,841	0,677-0,906 n =15	0,844	0,685-0,981 n =19	0,854	0,722-0,969 n =18	0,8605
Anto. ^d	85-262 n =12	110	52-278 n =22	101	79-229 n =18	154	54-201 n =17	125	41-304 n =15	129	11-376 n =19	94	69-217 n =18	109
Fenóis t. ^f	42,9-59,4 n =12	53,5	43,3-68 n =22	55,3	40,6-80 n =18	58,7	28-82 n =17	44,6	51,9-88,7 n =15	67	40,7-73,1 n =19	53,3	41,3-105,9 n =18	60,6
Ferro ^d	<1-2 n =12	<1	<1-4,6 n =21	1,2	<1-3,7 n =17	2,5	<1-2,4 n =17	1,2	<1-4,3 n =17	1,1	<1-5,2 n =13	<1	<1-4,2 n =19	2
Cobre ^d	<0,1-0,13 n =12	<0,1	<0,1-0,13 n =23	<0,1	<0,1-0,48 n =20	<0,1	<0,1-0,5 n =17	<0,1	<0,1-0,34 n =17	<0,1	<0,1-0,38 n =19	<0,1	<0,1-0,17 n =19	<0,1
A.T. ^b	0,4-1 n =12	0,7	0,4-2,6 n =21	0,9	0,3-1,6 n =16	0,9	0,4-1,7 n =18	0,9	0,4-1,6 n =18	1	0,5-1,6 n =16	1	0,4-2,8 n =16	0,7

< - indica um valor menor que o LQ do método.

a – g/mL

b – g/L

c – adimensional

d – g/L

e – %(V/V)

f – unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV – massa volúmica

E. – extrato

A.- acidez

SO₂ – dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. – Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. – totais

A.T.- açúcares totais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. – voláteis

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
Á. Cítrico ^d	<50-72 n =12	<50	<50-195 n =22	61	<50-142 n =15	<50	<50-129 n =15	<50	<50-106 n =17	<50	<50-80 n =17	<50	<50-92 n =20	38
A.S.T. ^g	291-497 n =13	338	216-451 n =20	346	254-479 n =17	315	267-454 n =17	310	261-464 n =15	288	234-411 n =20	306	239-406 n =18	284
Metanol ^g	131-186 n =13	152	95-208 n =20	149	146-215 n =17	171	122-183 n =17	159	140-182 n =15	162	103-179 n =20	144	110-250 n =18	153
Fenóis v. ^h	0-1520 n =13	145	0-4731 n =19	325	0-1922 n =17	198	0-1663 n =20	0	0-3561 n =17	410	0-2283 n =20	329	0-3566 n =17	128

< - indica um valor menor que o LQ do método.

a - g/mL

b - g/L

c - adimensional

d - mg/L

e - %(V/V)

f - unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV - massa volúmica

E. - extrato

A.- acidez

SO₂ - dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. - Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. - totais

A.T.- açúcares totais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. - voláteis

O parâmetro da massa volúmica é utilizado como controlo da fermentação alcoólica, através da realização de uma medição aproximada da quantidade de açúcar presente no mosto. A fermentação considera-se acabada quando a massa volúmica se encontra entre 0,991 e os 0,996 g/mL (16). Por observação do gráfico de *boxplot* na Figura 19 a) que se refere às amostras entre 2008 e 2015, é possível concluir que a grande maioria dos valores se encontram dentro deste intervalo, com a exceção das sub-regiões da Serra da Estrela (0,9906 g/mL), Terras de Azurara (0,990 g/mL), Silgueiros (0,9967 g/mL) e Terras de Senhorim (0,9965 g/mL). O resultado do teste estatístico ANOVA unidirecional, realizado com um nível de significância de 95% (os resultados são significativos para $p\text{-value}\leq 0,05$), para as amostras entre 2008 e 2015 e 2012 e 2014, indicou que apenas foram encontradas diferenças significativas entre 2008 e 2015. As sub-regiões nas quais foram encontradas diferenças são as mesmas em que os valores de massa volúmica se encontravam fora da gama de variação esperada, com a exceção da sub-região da Serra da Estrela (entre Terras de Azurara com Silgueiros e Terras de Senhorim, ambos com $p\text{-value}\leq 0,01$). A tabela com o resultado do teste estatístico encontra-se no Anexo VIII, Tabela A.1.

A massa volúmica é um parâmetro essencialmente dependente do processo de vinificação, sendo que os valores observados fora da gama de variação esperada se podem dever ao processo de vinificação praticado pelo produtor vinícola, de modo a obter o vinho desejado. Valores de massa volúmica mais altos podem dever-se ao facto de o vinho ter atingido o teor alcoólico desejado pelo produtor, antes de a massa volúmica atingir a gama de variação esperada. Valores mais baixos podem dever-se a uma decisão do produtor de deixar decorrer a fermentação para além da gama esperada, de modo a obter um vinho com maior teor alcoólico. No entanto, neste trabalho, não foram obtidas quaisquer informações acerca das diferenças realizadas no processo de vinificação na Região Demarcada do Dão.

Os resultados obtidos para o parâmetro do extrato seco total não se encontram na gama variação normal para este parâmetro (entre 25 e 30 g/L), sendo que todas as sub-regiões a ultrapassam. (Figura 19 b) Este parâmetro é dependente dos processos de vinificação como o esmagamento, o desengace, contacto com a película e o processo de fermentação longo que vão promover uma maior quantidade de extrato seco total. Não há limite legal para os valores do extrato seco total mostrando que, apesar de os resultados se encontrarem acima da gama esperada, as suas concentrações não são inadequadas para a composição do vinho. Estudos indicam que as concentrações de extrato seco total podem influenciar as

características organoléticas dos vinhos, pois vinhos com concentrações de extrato seco total entre os 20 e os 30 g/L produzem vinhos mais aguados, enquanto que vinhos com concentrações de extrato seco acima dos 30 g/L são mais encorpados, persistindo mais tempo no palato (18,71). Foi realizada uma análise estatística ANOVA com nível de significância de 95% (indicando diferenças significativas quando $p\text{-value}\leq 0,05$) nas sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para as amostras entre 2008 e 2015 e para os anos com maior representação. Observou-se que a sub-região de Silgueiros apresentava diferenças significativas com a sub-região de Terras de Azurara nas amostras de 2008 e 2015 ($p\text{-value}\leq 0,05$). A Tabela com o resultado estatístico encontra-se no Anexo VIII, Tabela A.2

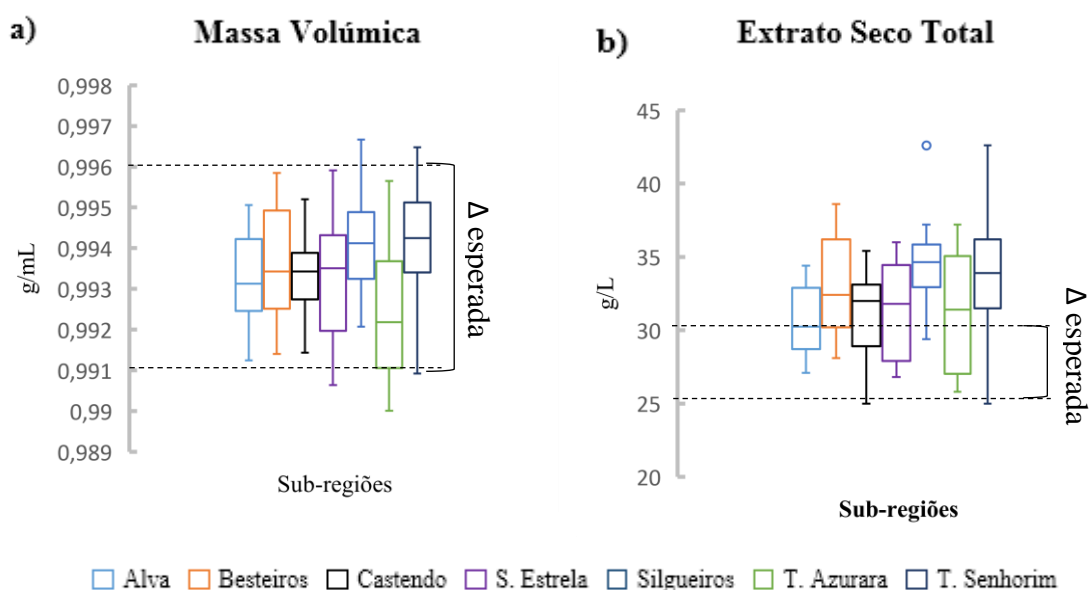


Figura 19- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão e indicação das gamas de variação (Δ) esperada para os parâmetros da **a)** massa volúmica e **b)** do extrato seco total.

Para o parâmetro da acidez total verifica-se, por observação do seu gráfico *boxplot* na Figura 20 a), que todos os valores se encontram acima do mínimo legal exigido (3,5 g/L), e que a sub-região de Alva se destaca das demais sub-regiões, devido à pouca variação que apresenta. A sub-região de Castendo que apresenta o menor valor de mediana depois de Alva.

O parâmetro da acidez total já foi utilizado como parâmetro diferenciador de distintas regiões de vinho, visto ser afetado por algumas condições climáticas, nomeadamente a exposição solar (72). Através da análise estatística ANOVA unidirecional, realizada com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p\leq 0,05$),

confirma-se que a sub-região de Alva se destaca das demais sub-regiões, entre os anos de 2008 e 2015 (Tabela 30). Esta é significativamente diferente de Besteiros ($p\text{-value}\leq 0,0001$), de Silgueiros ($p\leq 0,01$) e de Terras de Azurara ($p\text{-value}\leq 0,05$). Castendo é apenas significativamente diferente de Besteiros (com $p\text{-value}\leq 0,05$). No ano de 2014 apenas se verificaram diferenças significativas entre Terras de Senhorim e as sub-regiões de Besteiros e Castendo (com $p\leq 0,01$ e $p\leq 0,05$ respectivamente). Como mencionado anteriormente, a acidez total poderá ser influenciada pela exposição solar. No entanto, visto que não foi possível obter informações concretas relativas à exposição solar à qual a produção vinícola naquela sub-região foi exposta nos anos em estudo, e esta não ser a única sub-região com valores elevados de exposição solar, não é possível confirmar se a sub-região de Alva se diferencia das de Besteiros, Silgueiros e Terras de Azurara devido a esse fator.

Acerca da acidez volátil, observa-se que nenhuma sub-região atinge o limite legal de 1,2 g/L. Baixos valores de pH e uma proteção adequada do vinho, com recurso a dióxido de enxofre, influenciam os valores de acidez volátil. Por observação dos gráficos *boxplot* referentes aos parâmetros da acidez volátil (Figura 20 b)), do pH (Figura 20c)) e do dióxido de enxofre livre (Figura 20d)), é possível verificar uma subtil relação entre os três. As sub-regiões que apresentam menor mediana no parâmetro da acidez volátil são as que apresentam maior mediana no parâmetro do dióxido de enxofre livre (Castendo e Serra da Estrela). As sub-regiões com maiores valores de mediana relativamente à acidez volátil (Alva e Besteiros) apresentam uma mediana alta para o pH (Alva), ou apresentam uma mediana baixa em relação ao dióxido de enxofre (Besteiros). Em relação à sub-região de Terras de Senhorim, apesar de apresentar igualmente das maiores medianas para o parâmetro do pH, a sua mediana no parâmetro da acidez volátil não é das mais elevadas. Tal deve-se ao facto de esta sub-região apresentar uma mediana elevada para o parâmetro do dióxido de enxofre livre o que indica que se encontra devidamente protegida. As diferenças significativas entre as sub-regiões nos gráficos *boxplot* foram analisados através do teste estatístico ANOVA unidirecional, com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p\leq 0,05$) para os parâmetros da acidez volátil, do pH e do dióxido de enxofre livre para os anos entre 2008 e 2015 e para 2012 e 2014. A acidez volátil não apresenta diferenças significativas entre 2008 e 2015 e para os anos de 2012 e 2014. O pH apenas apresenta diferenças estatísticas para o ano de 2014 (entre Terras de Senhorim com Castendo e Besteiros, $p\leq 0,01$ e $p\leq 0,05$, respectivamente). O dióxido de enxofre apenas apresenta

diferenças significativas para o ano de 2012 (Besteiros com Alva, Castendo e Serra da Estrela, todos com $p \leq 0,05$). As tabelas que indicam as diferenças significativas apresentadas por estes parâmetros encontram-se no Anexo VIII- Tabela A.3 (pH) e Tabela A.4 (dióxido de enxofre livre). Assim, verifica-se que as relações subtis observadas nos gráficos de *boxplot* não são confirmadas pela análise estatística. Apesar de existirem quatro sub-regiões com valores de dióxido de enxofre livre abaixo do LQ (Besteiros, Silgueiros, Terras de Azurara e Terras de Senhorim), a inexistência de diferenças significativas no parâmetro do dióxido de enxofre livre indica que a proteção do vinho é feita de igual modo por toda a Região Demarcada do Dão.

Para o pH, os resultados obtidos são superiores à gama de variação esperada num vinho tinto, indicando que o vinho está mais desprotegido, o que levaria a um aumento da acidez volátil. No entanto, tal não se verificou pela análise estatística. Os resultados obtidos em relação aos parâmetros do dióxido de enxofre combinado e total encontram-se no Anexo IX, pois apresentam menor influência nas características dos vinhos tintos em comparação com o dióxido de enxofre livre, e porque não foram detetadas diferenças significativas entre as sub-regiões para amostras entre 2008 e 2015.

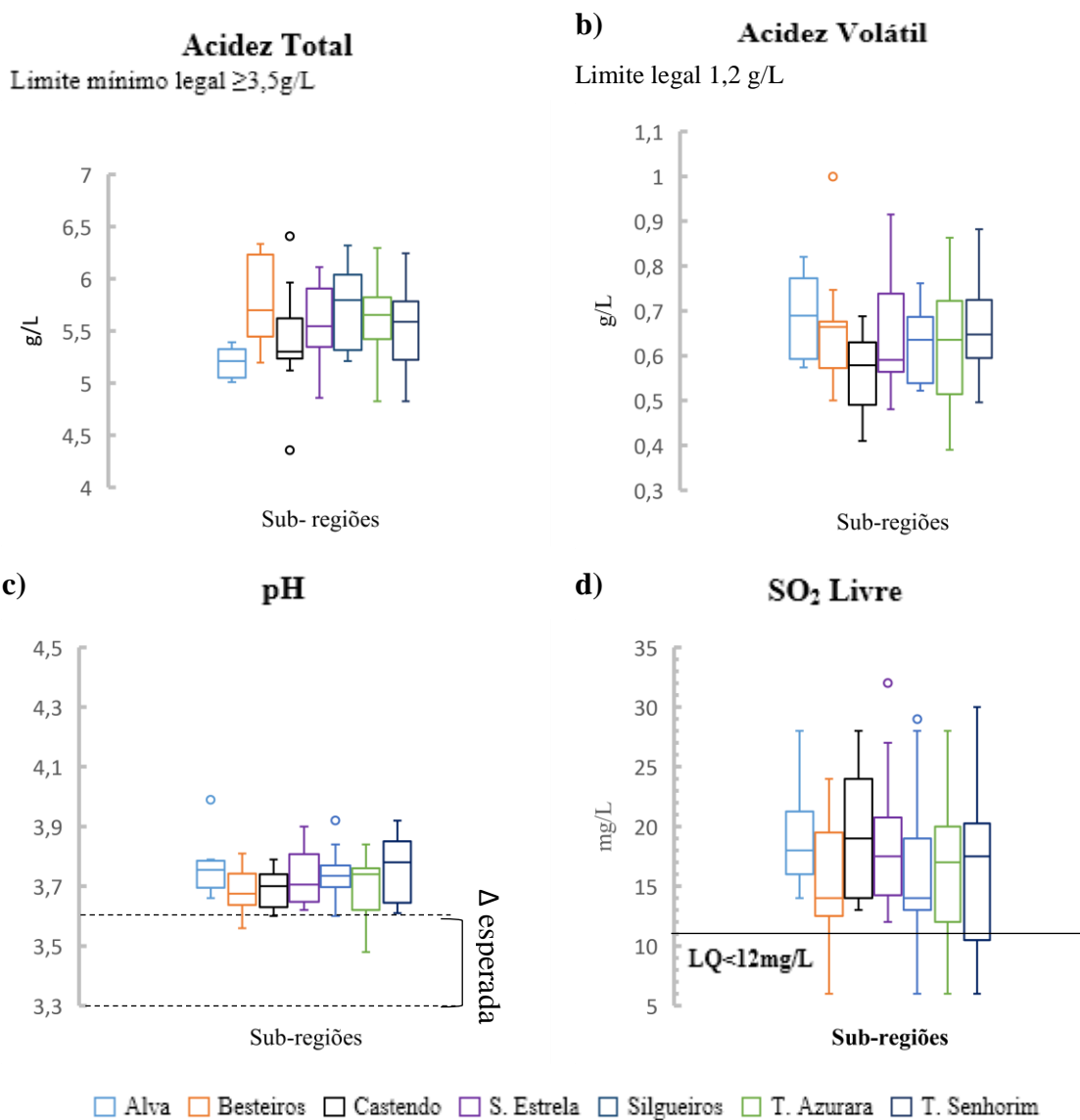


Figura 20- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão e indicação das gamas de variação (Δ) esperada para os parâmetros da a) acidez total, b) acidez volátil. c) do pH e d) do dióxido de enxofre (SO₂) livre.

Tabela 30- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2014 em relação ao parâmetro da acidez total, obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Acidez total	Alva							
	Besteiros	X ³		X ¹				*2
	Castendo							*1
	S. Estrela							
	Silgueiros	X ²						
	T. Azurara	X ¹						
	T. Senhorim							

Leg: X De 2008 a 2015 + 2012 - 2013 * 2014

Em que: ¹- $p \leq 0,05$; ²- $p \leq 0,01$ ³- $p \leq 0,001$;

Outras características físico-químicas dos vinhos que dependem igualmente dos parâmetros do pH e do dióxido de enxofre livre, são a intensidade e a tonalidade da cor e as antocianinas. Estes parâmetros são também influenciados pela concentração de fenóis totais. Maiores valores de pH e menores valores de dióxido de enxofre livre tornam o vinho mais propenso à oxidação, diminuindo a intensidade, as concentrações de antocianinas e alterando a tonalidade(19). Por observação dos gráficos *boxplot* relativos ao pH (Figura 20 c)), antocianinas (Figura 21 a), tonalidade (Figura 21 b) e intensidade (Figura 21 d)), não foi possível verificar nenhuma relação entre a variação de dióxido de enxofre livre e pH com a variação apresentada pela intensidade, a tonalidade e pela concentração de antocianinas. Tal se pode dever ao facto de o dióxido de enxofre livre se encontrar igualmente distribuído pelas sub-regiões da Região Demarcada do Dão e pelo facto de os valores de pH não serem suficientemente altos (apenas acima de 3,9 é que o pH afeta as características cromáticas de um vinho). O parâmetro da tonalidade é influenciado pela idade dos vinhos, sendo que quanto mais velhos, maior a sua tonalidade. A distribuição das amostras, por anos, pelas sete sub-regiões (Anexo IV), é bastante heterogénea, no entanto observa-se que as sub-regiões de Silgueiros, Terras de Azurara e Terras de Senhorim são as que apresentam maior número de amostras mais antigas, comparando com as sub-regiões de Alva, Besteiros, Castendo e Serra da Estrela. Através da análise estatística ANOVA unidirecional realizada com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$), indicou diferenças significativas para o parâmetro da tonalidade entre Terras de Senhorim

com Castendo ($p \leq 0,05$) entre 2008 e 2015. (Anexo VIII- Tabela A.5). Estas diferenças significativas podem dever-se ao facto de Terras de Senhorim ser a sub-região com menor número de amostras para o ano de 2014 e a que apresenta maior número de amostras para o ano de 2008 (ambos os anos com duas amostras), e Castendo ser a sub-região que apresenta maior número de amostras do ano de 2014 (sete amostras). Para o parâmetro das antocianinas não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das sub-regiões.

Em relação ao parâmetro dos fenóis totais, este encontra-se dentro da gama de variação encontrada em vinhos tintos em todas as sub-regiões e, tal como seria esperado, este parâmetro influencia o parâmetro da intensidade da cor. Através dos gráficos de *boxplot* (Figura 21 c) e d)), observa-se que Silgueiros é a sub-região com maiores valores de mediana para os dois parâmetros. Serra da Estrela é a sub-região com menor valores de mediana no parâmetro dos fenóis totais e a segunda com menores valores de mediana no parâmetro da intensidade. Esta relação é confirmada pelos resultados do teste estatístico ANOVA unidirecional, com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$), onde nos fenóis totais se destacam as diferenças estatísticas entre Silgueiros com Alva ($p \leq 0,01$), com Besteiros ($p \leq 0,01$), com Serra da Estrela ($p \leq 0,0001$), e com Terras de Azurara ($p \leq 0,01$), e no parâmetro da intensidade verificam-se diferenças significativas entre Silgueiros com a sub-região de Castendo ($p \leq 0,05$) e com a sub-região da Serra da Estrela ($p \leq 0,01$). Estas diferenças significativas observadas nos dois parâmetros podem ter sido influenciadas pelo ano de 2012, como se pode verificar nos *boxplot* realizados. (Anexo V – Figura k) e l)). Tal informação é igualmente confirmada através da realização da análise estatística ANOVA unidirecional com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$). Para os fenóis totais, no ano de 2012, destacam-se as diferenças significativas entre Silgueiros com Alva ($p \leq 0,01$), com Besteiros ($p \leq 0,001$), com Serra da Estrela ($p \leq 0,001$) e com Terras de Azurara ($p \leq 0,0001$). No que concerne a intensidade, observam-se diferenças significativas entre Silgueiros com Serra da Estrela ($p \leq 0,01$) e com Terras de Azurara ($p \leq 0,001$). Assim, é possível confirmar uma relação entre os dois parâmetros e a influência do fator ano nos mesmos. A síntese da análise estatística para o parâmetro dos fenóis voláteis e intensidade encontra-se na Tabela 31 e 32, respetivamente.

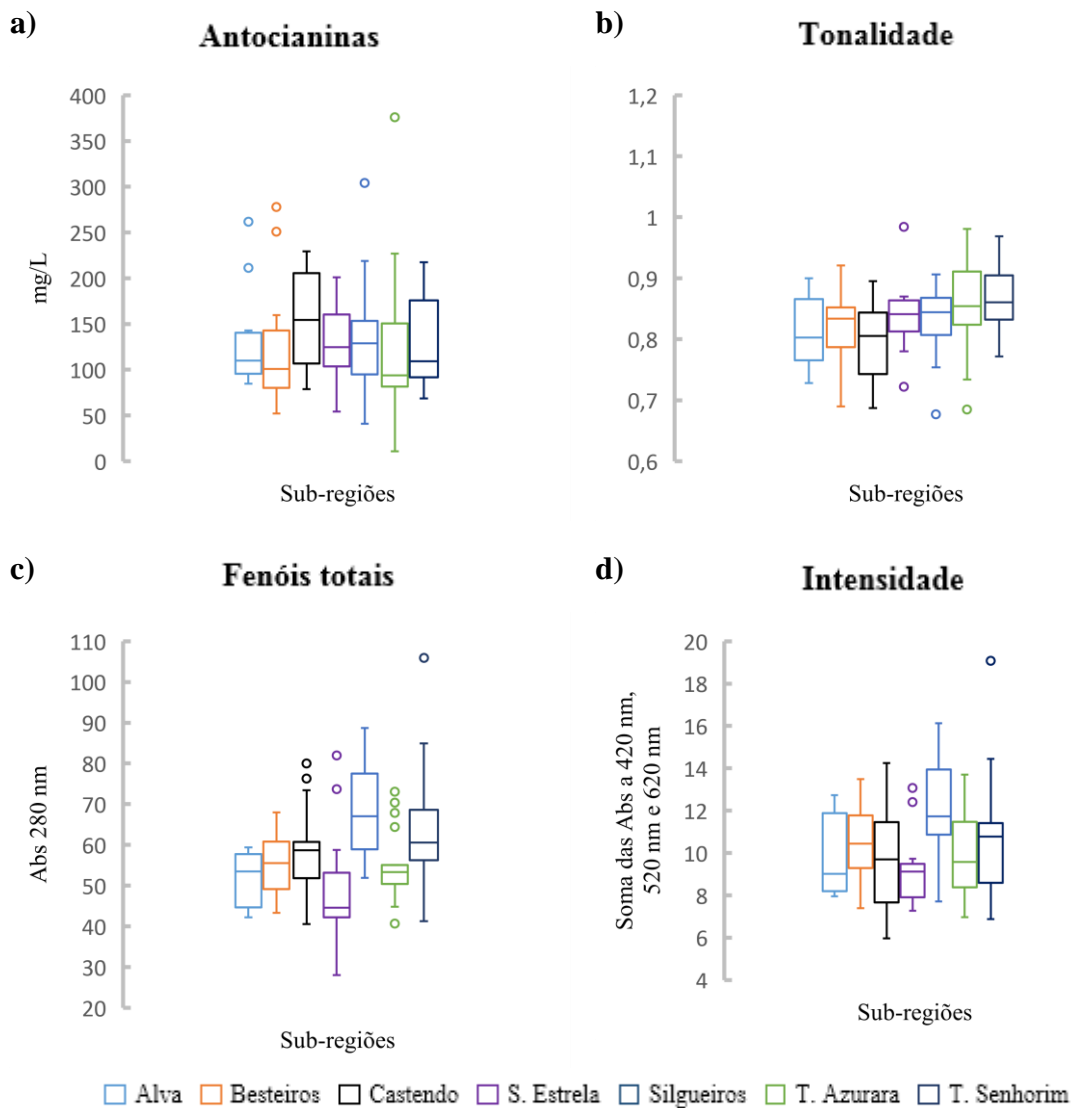


Figura 21- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os parâmetros das a) antocianinas, b) tonalidade c) fenóis voláteis e d) da intensidade

Tabela 31- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2012 em relação ao parâmetro dos fenóis totais, obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Fenóis totais	Alva					X ² ; + ²		
	Besteiros					X ² ; + ³		
	Castendo							
	S. Estrela			+ ¹		X ⁴ ; + ³		X ²
	Silgueiros							
	T. Azurara			+ ¹		X ² ; + ⁴		
	T. Senhorim							

Leg: X De 2008 a 2015 + 2012 - 2013 * 2014

Em que: ¹- $p \leq 0,05$; ²- $p \leq 0,01$ ³- $p \leq 0,001$; ⁴- $p \leq 0,0001$

Tabela 32- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2013 em relação ao parâmetro da intensidade da cor, obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Intensidade da cor	Alva							
	Besteiros							
	Castendo					X ¹		
	S. Estrela					X ² ; + ²		
	Silgueiros							
	T. Azurara		+ ¹			+ ³		
	T. Senhorim							

Leg: X De 2008 a 2015 + 2012 - 2013 * 2014

Em que: ¹- $p \leq 0,05$; ²- $p \leq 0,01$ ³- $p \leq 0,001$

A concentração de etanol presente num vinho é dependente da concentração de açúcares presentes no mosto e é analisada através do Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA). Este parâmetro tem um mínimo legal de $\geq 9\%$ (v/v). Por observação do gráfico de *boxplot* (Figura 22a)) confirma-se que todos os valores se encontram acima do mínimo legal imposto. Para este parâmetro, verifica-se que a sub-região de Castendo apresenta a menor mediana, ao invés da sub-região de Terras de Azurara que apresenta o maior valor de mediana. No entanto, estas diferenças observadas não são significativamente diferentes como confirmado pela análise estatística ANOVA unidirecional, realizada com

um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$) para os anos entre 2008 e 2015 e os anos de 2012 e 2014, em que o parâmetro TAVA não apresentou diferenças significativas em nenhum ano em estudo.

Um dos parâmetros que influencia a concentração de etanol presente nos vinhos é a concentração de açúcares, sendo que quanto maior for uma quantidade de açúcares presente no mosto, durante a fermentação alcoólica, maior será a percentagem de etanol no vinho. Para este parâmetro foram considerados a soma das concentrações de sacarose, frutose e glucose. Por observação do gráfico *boxplot* (Figura 22 b)), não é possível observar uma relação com a TAVA. O resultado da análise estatística ANOVA unidirecional com nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$) indica apenas diferenças significativas para o ano de 2012 (Alva com Silgueiros, com $p \leq 0,05$) e 2014 (Besteiros e Castendo com $p \leq 0,05$). A tabela encontra-se no Anexo VIII- Tabela A.6. A concentração de açúcares é controlada pelo processo de vinificação, ou seja, o produtor pode decidir parar o processo fermentativo quando atingir o nível alcoólico desejado, mesmo que ainda haja concentração de açúcares que ainda poderiam ser fermentados.

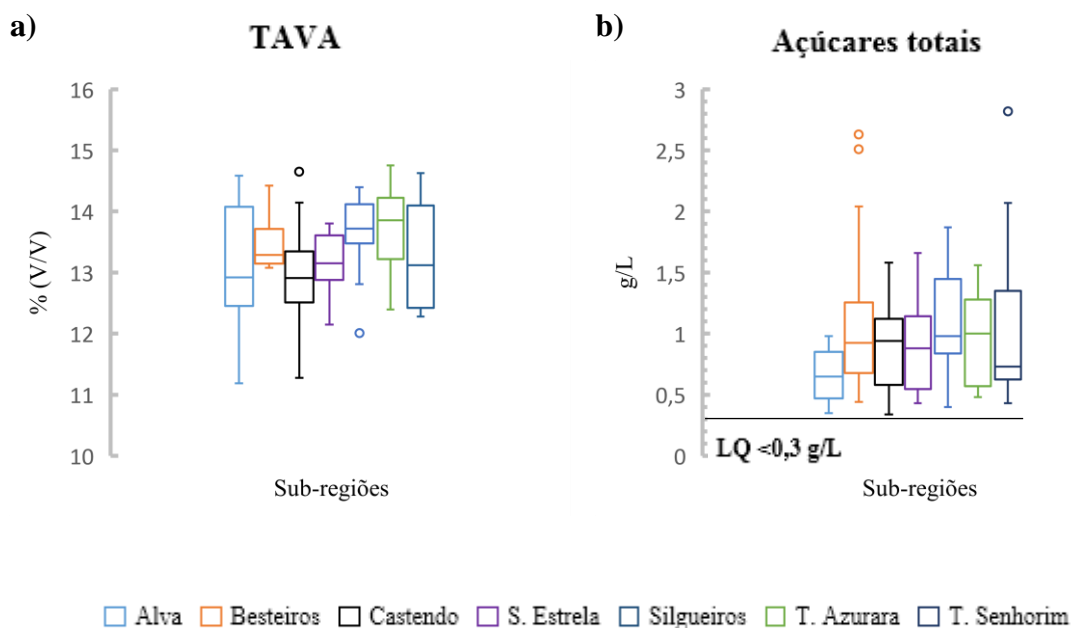


Figura 22- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os parâmetros do a) Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA) e b) Açúcares totais.

Os parâmetros mais dependentes das características dos solos onde é plantada a vinha são o ferro, o cobre, os cloretos e os sulfatos. Por observação dos gráficos de *boxplot* da Figura 23 é possível observar que nenhum dos parâmetros ultrapassou os limites legais

(apenas o ferro não tem limites legais), mas foram detetados valores abaixo do LQ em todos os parâmetros, com exceção dos sulfatos (os sulfatos não têm LQ). No parâmetro dos sulfatos, todas as sub-regiões ultrapassam a gama de variação esperada (entre 100 e 400 mg/L), tal pode ser justificado pelo facto de durante o envelhecimento ter ocorrido a oxidação do dióxido de enxofre presente no vinho, aumentando, conseqüentemente, a concentração de sulfatos.

A análise estatística ANOVA com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$) foi realizada para os parâmetros do ferro, do cobre, dos sulfatos e dos cloretos. Não foram detetadas diferenças significativas nas sete sub-regiões entre 2008 e 2015 para os parâmetros do ferro, cobre e sulfatos. Apenas no parâmetro dos sulfatos foram encontradas diferenças significativas nos anos de 2012 e 2014. A diferença encontrada, para estes anos, no parâmetro dos sulfatos, pode dever-se ao facto de não haver amostras suficientes nos anos dificultando a obtenção de uma homogénea. A tabela referente à análise estatística do parâmetro dos sulfatos encontra-se no Anexo X – Tabela A7.

Em relação aos cloretos, no gráfico de *boxplot* na Figura 23 d), com as amostras de 2008 a 2015, destaca-se Terras de Azurara por ter menor valores de mediana, em comparação com as restantes sub-regiões. Esta distinção foi comprovada pela análise estatística ANOVA unidirecional, realizada com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$) entre 2008 e 2015, onde se verificou que Terras de Azurara era significativamente diferente de Besteiros ($p \leq 0,001$), Castendo ($p \leq 0,01$), Silgueiros ($p \leq 0,001$) e Terras de Senhorim ($p \leq 0,05$). A síntese da análise estatística encontra-se na Tabela 33. A observação de diferenças significativas entre sub-regiões em relação ao parâmetro dos cloretos não seria de esperar, uma vez que este não é influenciado pelo fator ano. Assim, as diferenças significativas observadas em relação à sub-região de Terras de Azurara não eram esperadas, considerando a homogeneidade dos solos da Região Demarcada do Dão. Estudos indicam que alguns processos de vinificação possam influenciar a composição dos cloretos no vinho para além dos solos. Vinhas plantadas com porta enxertos têm menores quantidades de cloretos do que vinhas plantadas sem porta enxertos (73), e tratamentos realizados com resinas de troca iónica, com o objetivo de reduzir elevados níveis de potássio e cálcio, podem aumentar as concentrações de cloretos nos vinhos (38). No entanto, para este estudo não foram obtidas informações relativas aos processos vinícolas

Tabela 33- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015, 2012, 2013 e 2014 em relação ao parâmetro dos cloretos obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Cloretos	Alva							
	Besteiros						X ³	
	Castendo						X ²	
	S. Estrela							
	Silgueiros						X ⁴	
	T. Azurara							
	T. Senhorim						X ¹	

Leg: X De 2008 a 2015 + 2012 - 2013 * 2014

Em que: ¹- $p \leq 0,05$; ²- $p \leq 0,01$ ³- $p \leq 0,001$

Relativamente aos parâmetros dos álcoois superiores e do metanol, encontra-se na Figura 24 a) e 24 b) a sua distribuição ao longo das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão. Para os álcoois superiores observa-se que Silgueiros tem o menor valor de mediana e Alva e Besteiros os valores mais altos. Relativamente ao metanol, Castendo apresenta o maior valor de mediana e Terras de Senhorim apresenta a menor mediana. Através da realização da análise estatística ANOVA unidirecional, com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$), não foram detetadas diferenças significativas para os álcoois superiores entre 2008 e 2015 nem nos anos de 2012 e 2014. Para o metanol foram encontradas diferenças significativas entre Castendo com Terras de Azurara ($p \leq 0,05$). Estes parâmetros dependem do processo de vinificação, da a casta utilizada, das leveduras e das condições de fermentação (74). Estas diferenças observadas não são suficientemente significativas para indicar distinções entre os processos de vinificação nas sete sub-regiões. A síntese da análise estatística do metanol encontra-se representada o Anexo X – Tabela A8.

O ácido cítrico é um dos principais aditivos presentes na composição do vinho, com um limite legal de 1g/L. Por observação do gráfico de *boxplot* na Figura 24 c) referente aos anos entre 2008 e 2015, verifica-se que todas as sub-regiões possuem valores dentro do limite legal e todas apresentam valores abaixo do LQ. No entanto, observa-se um destaque da sub-região de Besteiros em relação às demais, pois tem maior variação nos seus valores e maiores valores de mediana. Este destaque confirmou-se com a realização da análise

estatística ANOVA unidirecional, realizada com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$), onde se verificou que a sub-região de Besteiros era significativamente diferente de todas as sub-regiões em estudo, com exceção da sub-região de Castendo. Visto que a concentração deste parâmetro no vinho é dependente do processo de vinificação, é provável que esta diferença significativa se possa dever à adição de maior concentração desde aditivo ao vinho, por parte do produtor vinícola, em comparação com os demais produtores da Região Demarcada do Dão sem, no entanto, ultrapassar o limite legal estabelecido. Também são observadas diferenças significativas para o ano de 2014 entre Besteiros e Castendo ($p \leq 0,01$). Na Tabela 34 encontra-se a síntese da análise estatística em relação ao parâmetro do ácido cítrico.

Por fim, outro parâmetro igualmente influenciado pela também prática vinícola e cuja presença é considerada um contaminante, são os fenóis voláteis. Por observação do gráfico de *boxplot*, representado na Figura 24 d) verifica-se que a sub-região da Serra da Estrela apresentou menor variação nos seus valores, indicando menor quantidade de vinho contaminado. A análise estatística ANOVA unidirecional, realizada com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$), indica que não foram verificadas diferenças estatísticas entre 2008 e 2015, nem em nenhum dos restantes anos mais analisados. Este resultado já era previsível, uma vez que o cuidado com a possível contaminação do vinho é uma preocupação de qualquer produtor vinícola e não é influenciado pelas condições naturais das sub-regiões da Região Demarcada do Dão.

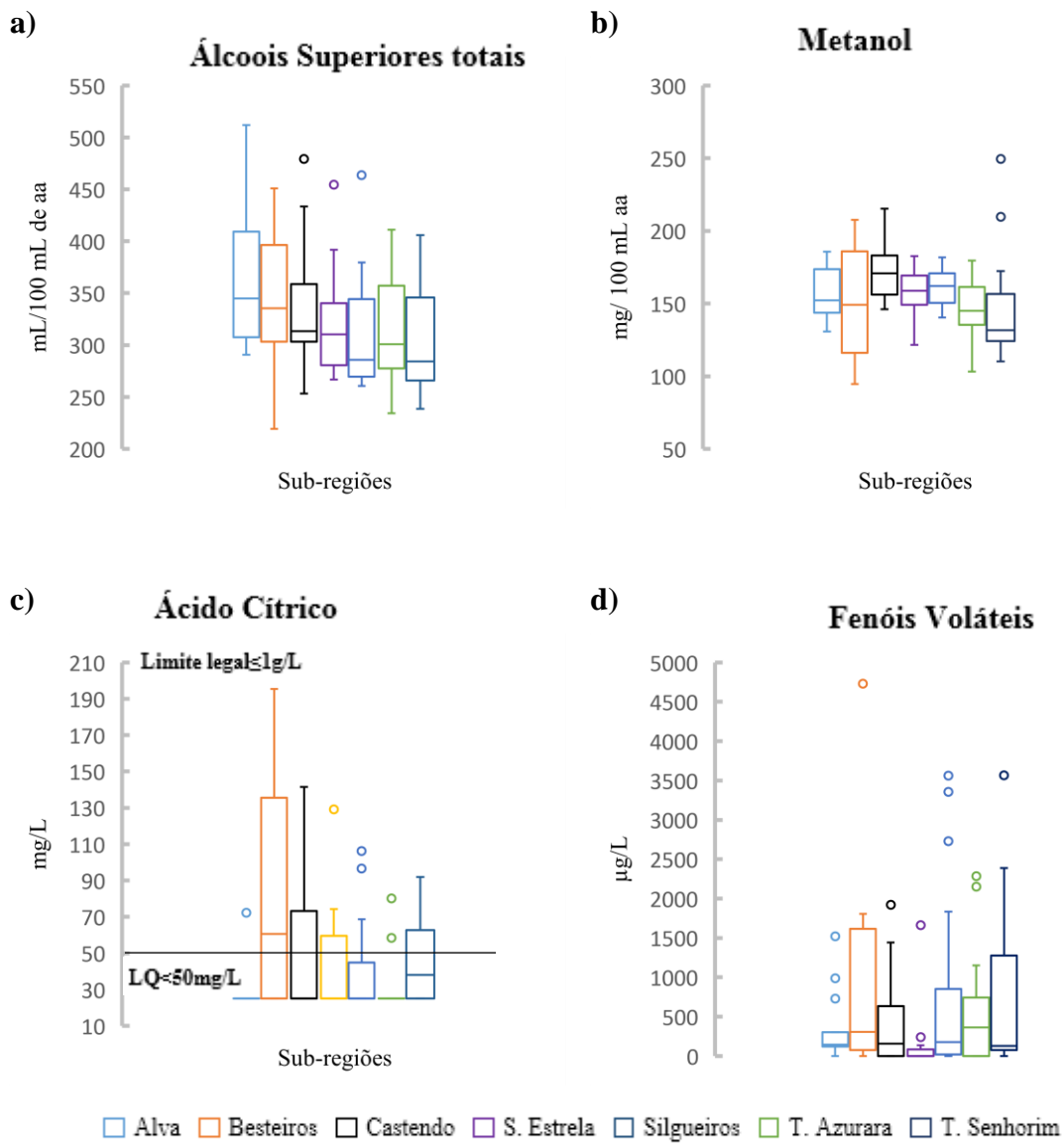


Figura 24- Dispersão dos resultados das amostras entre 2008 e 2015 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para os parâmetros do a) álcoois superiores totais, b) metanol, c) ácido cítrico e d) fenóis voláteis.

Tabela 34- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 e 2014 em relação ao parâmetro do ácido cítrico obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95%.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Ácido Cítrico	Alva		X ²					
	Besteiros							
	Castendo		* ²					
	S. Estrela		X ¹					
	Silgueiros		X ²					
	T. Azurara		X ³					
	T. Senhorim		X ¹					

Leg: X De 2008 a 2015 + 2012 - 2013 * 2014

Em que: ¹- $p \leq 0,05$; ²- $p \leq 0,01$ ³- $p \leq 0,001$;

4.2 Influência do fator sub-região e ano de colheita

De modo a verificar qual dos fatores, sub-região ou ano de colheita, teria maior influência na variância observada nos resultados, foi realizada a Análise Simultânea de Componentes (ASCA). A significância destes fatores foi avaliada através de um teste de permutação (2000 permutações). De acordo com os resultados, o ano de colheita e a sub-região foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$), descrevendo 16,2% da variância total. O ano de colheita foi o fator que teve maior impacto, explicando 9,4% da variância total dos resultados ($< 0,0005$), enquanto que as sub-regiões explicaram apenas 6,8% da variância dos resultados ($p = 0,0005$). Estes resultados encontram-se sintetizados na Tabela 35. A codificação dos parâmetros para a realização desta análise estatística encontra-se na Tabela 36.

Tabela 35- Teste de significância para os fatores anos e sub-regiões para os vinhos provenientes das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão e para os anos entre 2008 e 2015, sendo significativa quando $p < 0,01$.

	p-value (2000 permutações)	Variância explicada
Ano	$< 0,0005$	9,4%
Sub-região	0,0005	6,8%

*p-value $< 0,01$

Por observação da Figura 25 a), é possível verificar que existe uma tendência de organização das amostras ao longo do PC1 de acordo com o ano de colheita, em que no extremo PC1 positivo se localizam os vinhos mais antigos (2008), e que os vinhos mais novos se encontram localizados no extremo do PC1 negativo (2014).

As contribuições das 22 variáveis e a sua importância para a distinção das amostras, de acordo com o ano de colheita, pode ser avaliada tendo em conta as contribuições fatoriais que se encontram na Figura 25 b). Verificou-se que os vinhos mais velhos se distinguem através das concentrações dos fenóis totais, (6), da intensidade (8), da tonalidade (7) e dos sulfatos (18) e que os vinhos mais novos se diferenciavam através das concentrações dos parâmetros das antocianinas (5) e do dióxido de enxofre livre (16). A indicação destes parâmetros na distinção de vinhos novos e de vinhos mais velhos era de esperar. Para as características cromáticas, constituídas pelos parâmetros das antocianinas, tonalidade, intensidade e fenóis totais, há estudos que permitem a distinção entre vinhos novos e vinhos mais velhos. Estes estudos concluem que vinhos novos se caracterizam por terem maior intensidade e maior quantidade de pigmentos vermelhos a 520 nm, enquanto que vinhos mais velhos se caracterizam por maiores valores de tonalidade e pigmentos mais amarelados (28,29). Ao longo do processo de envelhecimento, regista-se uma diminuição dos valores de absorvância a 520 nm e um aumento dos valores de absorvância a 420 e a 620 nm. Estas alterações podem ser explicadas pela transição de antocianinas monoméricas para poliméricas (75). Para os sulfatos, há um aumento da sua concentração nos vinhos devido à oxidação do dióxido de enxofre, sendo assim de esperar que vinhos mais velhos possuam maior concentrações de sulfatos. Em relação ao dióxido de enxofre livre, este encontra-se presente em maiores concentrações e vinhos novos, pois ocorre uma libertação progressiva da fração livre ao longo do tempo, estando também sujeito a processos de oxidação durante o envelhecimento, diminuindo a sua concentração ao longo do tempo. Assim, vinhos mais novos têm concentrações mais elevadas de dióxido de enxofre livre do que vinhos mais velhos (20).

Tabela 36- Codificação das 22 variáveis em estudo para a realização da análise estatística.

Código	Parâmetro	Código	Parâmetro
1	Açúcares totais	12	Massa Volúmica
2	Acidez total	13	Extrato seco
3	Acidez volátil	14	pH
4	Acido cítrico	15	SO ₂ combinado
5	Antocianinas	16	SO ₂ livre
6	Fenóis totais	17	SO ₂ total
7	Tonalidade	18	Sulfatos
8	Intensidade	19	TAV
9	Cloretos	20	Metanol
10	Cobre	21	Álcoois superiores
11	Ferro	22	Fenóis Voláteis

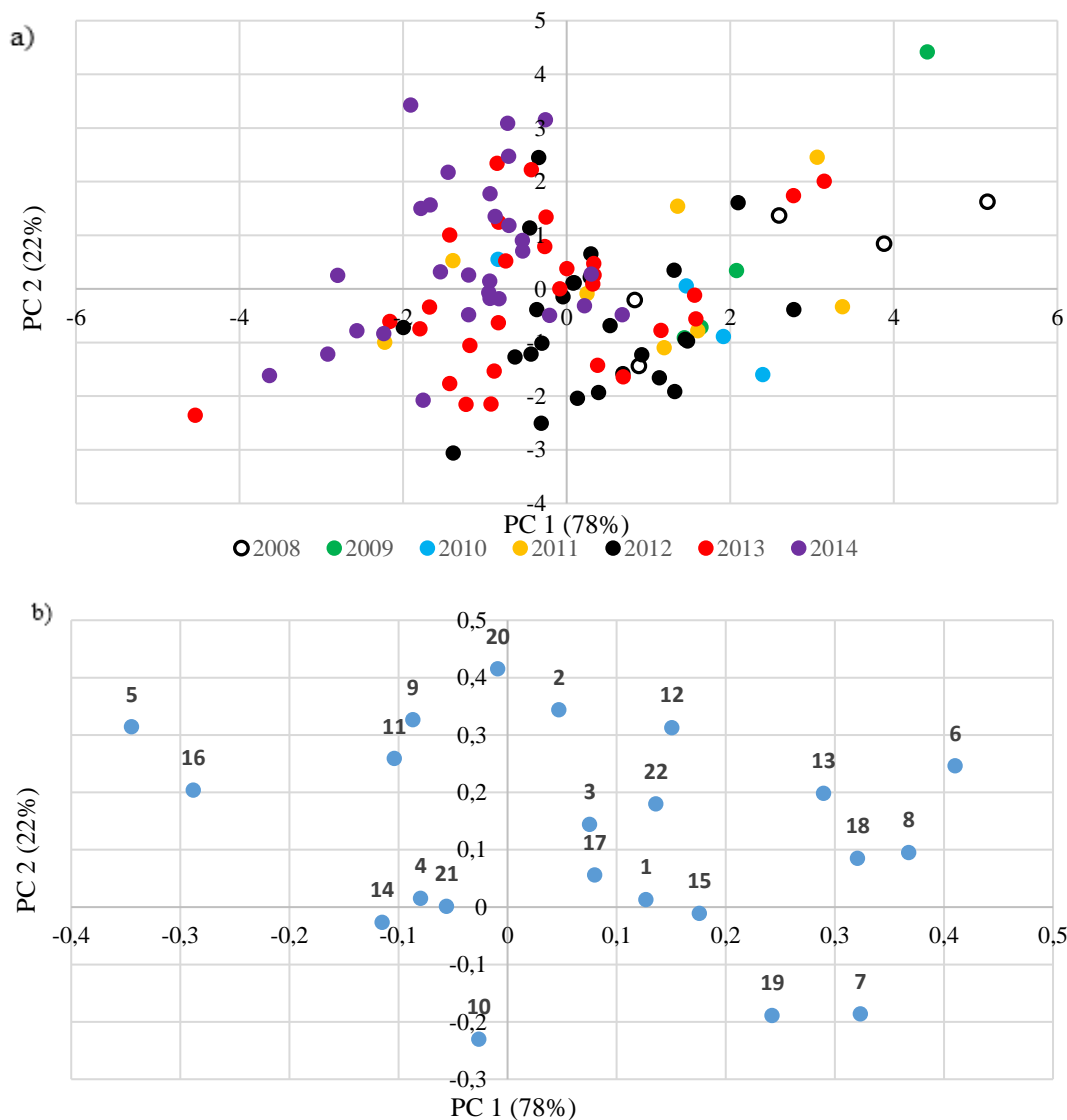


Figura 25- Análise simultânea de componentes (ASCA) realizado com p -value $<0,01$, para os anos de colheita entre 2008 e 2014 sendo que a) coordenadas fatoriais e b) contribuições fatoriais

Em relação às sub-regiões, observa-se na Figura 26 a), que há uma dispersão das amostras ao longo do PC1 e do PC2 e que não é possível obter uma diferenciação clara das sete sub-regiões entre si. No entanto, é possível observar no PC2 positivo, o destaque de algumas amostras pertencentes à sub-região de Besteiros. Segundo a Figura 26 b), relativa às contribuições fatoriais, observa-se que o parâmetro que explica o destaque destas amostras foi o ácido cítrico (4). O ácido cítrico, apesar de endógeno, é também considerado um aditivo enológico devido às suas propriedades benéficas para as características organoléticas e para a conservação do vinho, sendo legalmente limitado a 1 g/L.

Foi discutido anteriormente a variação do ácido cítrico nas sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão através do *boxplot* da Figura 24 c), em que a análise estatística ANOVA unidirecional concretizada demonstrou, igualmente, o destaque da sub-região de Besteiros em relação às demais para este parâmetro, apesar de nenhuma amostra desta sub-região ultrapassar o limite legal estipulado. Assim, é possível concluir que o destaque destas amostras não se deve a um excesso de ácido cítrico acima do limite legal e, por observação dos registos relativos às amostras em destaque, verificou-se que todas elas pertencem ao mesmo produtor vinícola. Este produtor tem como prática a adição de maior concentração de ácido cítrico ao vinho que os demais produtores neste estudo, sem ultrapassar o limite legal. As amostras que se destacam neste parâmetro encontram-se sinalizadas na Figura 26 a)

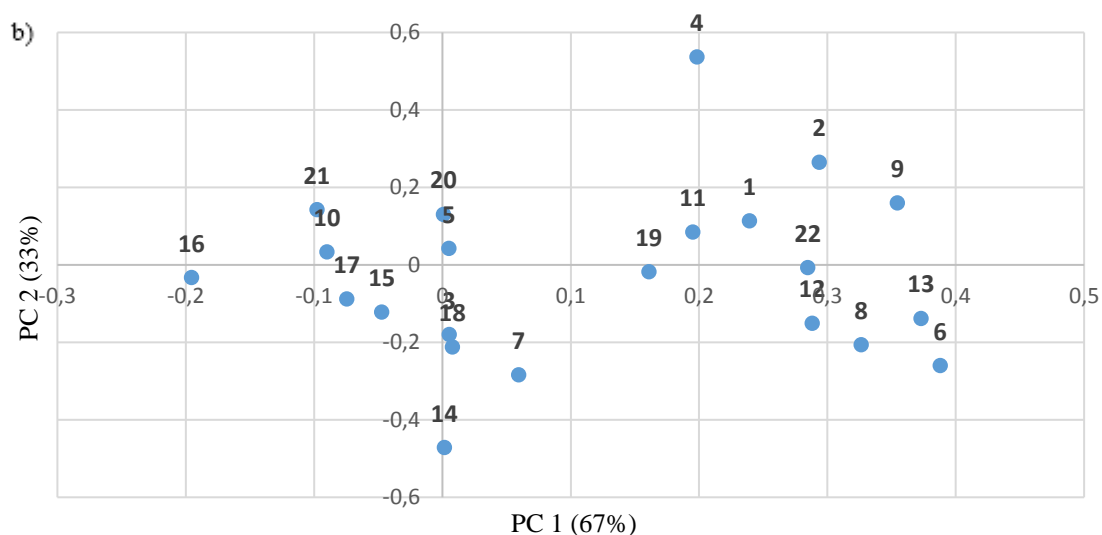
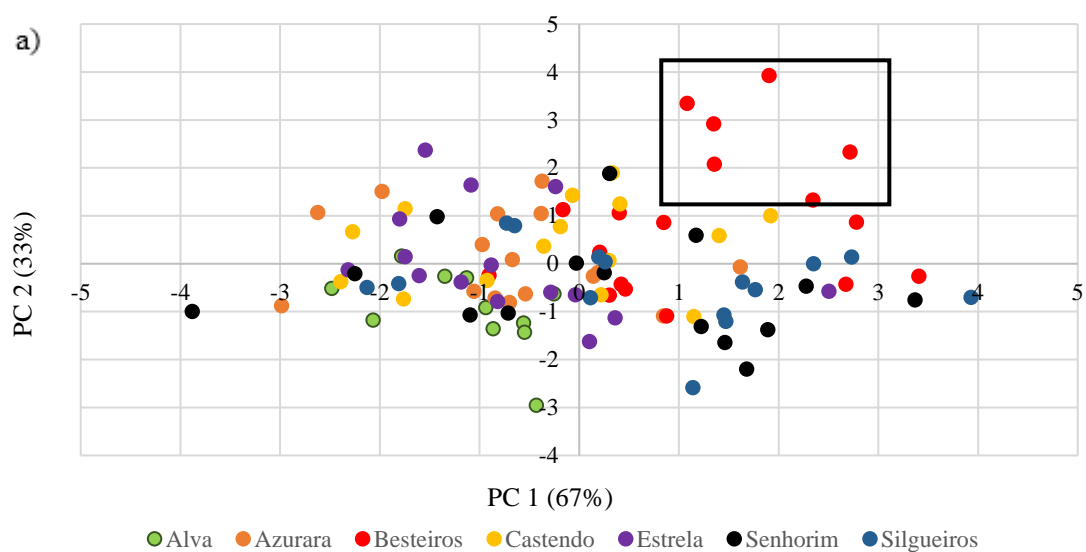


Figura 26- Análise Simultânea de Componentes (ASCA) realizado com p-value de $<0,01$ para os vinhos provenientes das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão entre 2008 e 2014 em que a) coordenadas fatoriais e b) as contribuições fatoriais. Encontram-se sinalizadas as amostras com maior concentração de ácido cítrico.

5. Conclusões

Numa fase inicial foi possível conhecer a Comissão Vitivinícola Regional do Dão e perceber o seu principal objetivo como entidade que representa os interesses dos produtores envolvidos na produção e comercialização de vinhos da Região Demarcada do Dão. Foi, ainda, realizado um acompanhamento do processo de certificação e autenticação dos vinhos no laboratório acreditado, das provas sensoriais realizadas na câmara de provadores e do processo de venda e selos de garantia, que permitiu um enriquecimento profissional e pessoal.

Numa segunda fase, foram avaliados os parâmetros físico-químicos dos vinhos provenientes das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram a massa volúmica a 20°C, o extrato seco total, a acidez total, a acidez volátil, o pH, o dióxido de enxofre livre, combinado e total, a intensidade da cor, a tonalidade, os fenóis totais, as antocianinas, o título alcoométrico volúmico adquirido, os açúcares totais, o ferro, o cobre, os sulfatos, os cloretos, os álcoois superiores totais, o metanol, o ácido cítrico e os fenóis voláteis. A avaliação destes parâmetros físico-químicos permitiu a realização de uma caracterização dos vinhos tintos da Região Demarcada do Dão. Observou-se que todos os vinhos analisados se encontravam dentro dos limites legais estipulados relativamente à acidez total, acidez volátil, sulfatos, cloretos, cobre, título alcoométrico volúmico adquirido, dióxido de enxofre total e ácido cítrico.

Foram utilizadas duas abordagens para o processamento estatístico realizada. Primeiramente, analisou-se os resultados da matriz total obtida (resultados das garrafas de 2008 a 2015), e de seguida, restringiu-se esse processamento apenas aos resultados obtidos de garrafas provenientes dos anos mais representativos da amostragem (2012, 2013 e 2014.). Da aplicação do teste estatístico (ANOVA e cálculo do p-value com 95% de confiança) na matriz total, para os parâmetros da acidez total, cloretos e ácido cítrico, verificou-se que as sub-regiões de Alva, Terras de Azurara e Besteiros, respetivamente, apresentavam diferenças significativas para mais do que uma das restantes sub-regiões. No entanto, não foi possível relacionar a diferenças significativas apresentadas por estes parâmetros nestas sub-regiões com as suas condições edafoclimáticas. A evidência do ácido cítrico deve-se ao processo de vinificação empregue por um produtor da sub-região de Besteiros e não pelas condições edafoclimáticas. Para além disto, foi possível verificar uma relação entre o

parâmetro da intensidade da cor e dos fenóis totais (ambos com diferenças significativas na sub-região de Silgueiros). Estas diferenças podem ter sido influenciadas pelo ano de 2012, segundo os resultados do teste estatístico realizado para este ano. No parâmetro da tonalidade observou-se a distinção da sub-região com maior número de vinhos velhos (Terras de Senhorim) com a sub-região com maior número de vinhos recentes (Castendo). Através da análise multivariável ASCA, foi possível concluir que o fator ano de colheita tinha maior influência na variabilidade apresentada nos resultados do que o fator sub-região.

Deste modo, concluiu-se que não foi possível efetuar uma distinção entre os vinhos provenientes das sete sub-regiões da região Demarcada do Dão através dos parâmetros físico-químicos analisados.

Para um trabalho futuro, recomenda-se:

- incrementar o número de amostras por sub-região e por ano de colheita.
- criar de uma base de dados detalhada sobre as características edafoclimáticas da Região Demarcada do Dão e das suas sub-regiões, ao longo de pelo menos 10 anos, considerando a importância significativa deste fator.
- recolher informação detalhada e sistematizada sobre os produtores vinícolas da região e em relação aos seus processos de vinificação.

6. Bibliografia

1. Regulamento (CE) N° 479/2008 do Conselho de 29 de Abril. Jornal Oficial da União Europeia 2008 p. 61.
2. 2017 World Viticulture Situation - OIV Statistical Report on World Viticulture International Organisation of Vine and Viticulture. Int Organ Vine Wine. 2017;
3. Informação de mercado N° 1/2017. Inst da Vinha e do Vinho. 2017;1-2.
4. Decreto-lei n° 8/85 de 4 de Junho do Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação [Internet]. Diário da República: I Série, °128 1985. Available from: http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/236?newsId=813&fileName=Lei_8_85.pdf
5. Decreto-lei de 11 de Julho do Ministério do Fomento [Internet]. Diário de República: I Série, n° 164 1912. Available from: <http://www.leideportugal.com/diario-primeira-serie/1912-07-05/20>
6. Decreto-lei n° 376/93 de 5 de Novembro do Ministério da Agricultura. Diário da República: I Série-A, n° 259 1993.
7. Portal da Comissão Vitivinícola Regional do Dão [Internet]. A Comissão - Laboratório. 2017 [cited 2016 Oct 17]. Available from: <http://www.cvrdao.pt/laboratorio.asp>
8. Loureiro V, Cardoso A. A Região do Dão. In: Ferreira e Silva M, editor. Os Vinhos do Dão. Chaves Ferreira- Publicações S.A.; 1993. p. 11-21.
9. União das Adegas Cooperativas do Dão. UDACA [Internet]. 2017 [cited 2017 Jan 16]. Available from: <http://www.udaca.pt/mapa-da-regiao/>
10. Portaria n° 246/2014 de 25 de Novembro do Ministério da Agricultura e do Mar. Diário da República, I Série, n° 228 2014.
11. “Vinhos Dão” - Folheto Informativo. Comissão Vitivinícola Regional do Dão.
12. Grácio A. Estudo de adaptação e afinidade em viticultura - Anteprojeto de um delineamento experimental para a região demarcada dos Vinhos do Dão. Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas. 1965;94.
13. Portaria n° 593/2010 de 29 de julho do Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas. Diário da República, I Série, n° 146 2010.

14. Silva C. A base de dados da CVR Dão relativos à atribuição da denominação de origem no período de 1998 a 2004 como ferramenta de conhecimento da região e do sector. (Tese de mestrado Mestrado em Viticultura e Enologia, Universidade Técnica de Lisboa e Universidade do Porto); 2008.
15. Curvelo-Garcia A. Caracterização enológica da Região Demarcada do Dão - Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas. *Vinea* *Vino Port Doc.* 1978;2.
16. Ribérei-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. The Microbiology of Wine and Vinifications. In: Sons JW&, editor. *Handbook of Enology*. 2nd ed. West Sussex, England; 2006. p. 470.
17. Jackson RS. *Wine Science - Principles and Applications*. In: 3rd ed. Academic Press, Burlington, EUA; 2008.
18. Castilhos M., Cattelan M., Conti-Silva A., Bianchi V. Influence of two different vinification procedures on the physicochemical and sensory properties of Brazilian non- *Vitis vinifera* red wines. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;54(2):360–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.020>
19. D.Dubourdieu, Ribérei-Gayon; P, Glories; Y, Maujean; A. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. In: *Handbook of Enology*. 2nd Editio. 2006.
20. A. Curvelo-Garcia PB. *Química Enológica - métodos analíticos*. 2015.
21. Europeia JO da U. Regulamento (CE) N° 606/2009. 2009.
22. Murat, M.; Renouf V. Citric acid metabolism in lactic bacteria and controlling the diacetyl content in wine. 2005.
23. Volschenk H, Vuuren HJJ Van. Malic Acid in Wine : Origin , Function and Metabolism during Vinification. *South African J Enol Vitic.* 2006;27(2):123–36.
24. Van der Voet, H.; Doornbos D. The use of pattern recognition techniques in chemical differentiation between bordeaux and bourgogne wines. *Anal Chim Acta.* 1984;(159):159–71.
25. Larrechi, M. ; Franques, M.; Ferre, M. ; Rius F. Structure modelling and discrimination of catalan white wines. *J Chemom.* 1988;3:261–74.
26. Regulamento (CE) n° 491/2009 de 25 de Maio. *Jornal Oficial da União Europeia I.* 154/1 2009 p. 56.
27. Waterhouse A. Determination of Total Phenolics. In: Wiley J, editor. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2002. p. 1–8.

28. Poiana, M. ; Moigradean, I.; Harmanescu M. The establishing the quality of red wines on the basis of chromatic characteristics. *J Agroalimnt Process Technol.* 2007;XIII(1):199–208.
29. Babincev, L.; Guresic, D.; Simonovic R. Spectropgotometric characterization of red wine color from the vineyard region of Methoia. *J Agric Sci.* 2016;61(3):281–90.
30. Gómez-Cordovés, C.; González-SanJosé M. Interpretation of color variables during the aging of red wines: relationship with families of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1995;43(3):0–4.
31. Birse MJ. The color of red wine. (Tese de Doutoramento, University of Adelaide); 2007.
32. Hodson G, Wilkes E, Azevedo S, Battaglone T. Methanol in wine. 40th World Congr Vine Wine. 2017;2028.
33. Fabani MP, Arrúa RC, Vázquez F, Diaz MP, Baroni M V, Wunderlin DA. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chem [Internet]. Elsevier Ltd;* 2010;119(1):372–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.085>
34. Kment P, Mihaljevic M. Food Chemistry Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chem.* 2005;91:157–65.
35. González A, Llorens A, Cervera ML, Armenta S, Guardia M De. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chem.* 2009;112:26–34.
36. Rebolo S, Peña RM, Latorre MJ, Garc S, Botana AM, Herrero C. Characterisation of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra wines using pattern recognition analysis. *Anal Chim Acta.* 2000;417:211–20.
37. Coli MS, Gil A, Rangel P, Souza ES, Oliveira MF, Cristina A, et al. Chloride concentration in red wines : influence of terroir and grape type. *Food Sci Technol.* 2015;35(1):95–9.
38. Hernández, G.; La Torre, A.; León J. Boron, sulphate , chloride and phosphate contents in musts and wines of the Tacoronte-Acentejo D . O . C . region (Canary Islands). *Food Chem.* 1997;60(3):339–45.
39. Anderson JD, Jones G V, Tait A, Hall A, Trought MCT. *Analysis of Viticulture*

- Region Climate. *J Int des Sci la Vigne du Vin*. 2012;46(3):149–65.
40. Fraga H, Malheiro AC, Santos JA. Agricultural and Forest Meteorology Climate factors driving wine production in the Portuguese Minho region. *Agric For Meteorol*. 2014;185:26–8.
 41. Jones G V, White MA, Cooper OR, Storchmann K. Climate change and global wine quality. *Clim Change*. 2005;(73):319–43.
 42. Montes C, Tonietto J. Climatic potential for viticulture in Central Chile. *Aust J Grape Wine Res*. 2012;18:20–8.
 43. Bertamini M, Zulini L, Muthuchelian K, Nedunchezian N. Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes. *Biol Plant*. 2007;51(2):381–5.
 44. Greer DH. Modelling leaf photosynthetic and transpiration temperature-dependent responses in *Vitis vinifera* cv . Semillon grapevines growing in hot , irrigated vineyard conditions. *AoB Plants*. 2012;1–13.
 45. Camps, J.; Ramos M. Grape harvest and yield responses to inter-annual changes in temperature and precipitation in an area of north-east Spain with a Mediterranean climate. *Int J Biometeorol*. 2012;56:853–64.
 46. Spayd SE, Tarara JM, Mee DL, Ferguson JC. Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv . Merlot Berries. *Am J Enol Vitic*. 2002;3(December 2001):171–82.
 47. Coombe BG. Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Hortic*. 1987;
 48. Shinomiya R, Fujishima H, Muramoto K, Shiraishi M. Impact of temperature and sunlight on the skin coloration of the “ Kyoho ” table grape. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;193:77–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.042>
 49. Staden J Van, Volschenk H, Vuuren HJJ Van. Malic Acid Distribution and Degradation in Grape Must During Skin Contact : The Influence of Recombinant Malo-Ethanol Wine Yeast Strains. *South African J Enol Vitic*. 2005;26(1):16–20.
 50. Popescu-mitroi I, Radu D, Stoica F. Researches concerning the malic acid content of wines during storage period. *J Agroalimnt Process Technologies*. 2009;15(3):414–20.

51. Bondada, B.R. MK. Not all shrivells are created equally - Morpho-anatomical and compositional characteristics differ among different shrivel types that develop during ripening of grape (*Vitis Vinifera* L.) berries. *Am J Plant Sci.* 2012;3:879–98.
52. Bergqvist J, Dokoozlian N, Ebisuda N. Sunlight Exposure and Temperature Effects on Berry Growth and Composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *Am J Enol Vitic.* 2001;1(April 2000):3–9.
53. Song J, Smart R, Wang H, Damberg B, Sparrow A, Qian MC. Effect of grape bunch sunlight exposure and UV radiation on phenolics and volatile composition of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir wine. *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;173:424–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.150>
54. Mori K, Goto-yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J Exp Bot.* 2007;58(8):1935–45.
55. Guidoni S, Ferrandino A, Chorti E, Guidoni S, Ferrandino A. Effect of Different Cluster Sunlight Exposure Levels on Ripening and Anthocyanin Accumulation in Nebbiolo Grapes Effect of Different Cluster Sunlight Exposure Levels on Ripening and Anthocyanin Accumulation in Nebbiolo Grapes. *Am J Enol Vitic.* 2010;(November 2015).
56. Conde C, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, et al. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Glob Sci Books.* 2007;
57. Peyrot C, Leeuwen C Van, Tominaga T, Dubourdieu D, Soyer J, Gaudill J. Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. 2005;85(May 2004):73–85.
58. Leeuwen C Van, Friant P, Choné X, Tregoat O, Koundouras S, Dubourdieu D. Influence of Climate , Soil , and Cultivar on Terroir. *Am J Enol Vitic.* 2004;3(October 2002):207–17.
59. Keller M, Smith JP, Bondada BR. Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *J Exp Bot.* 2006;57(11):2577–87.
60. Martinez RF, Ascacibar FJM, Espinoza AVP, Lorza RL. Predictive modelling in grape berry weight during maturation process : comparison of data mining , statistical and artificial intelligence techniques. *Spanish J Agric Res.*

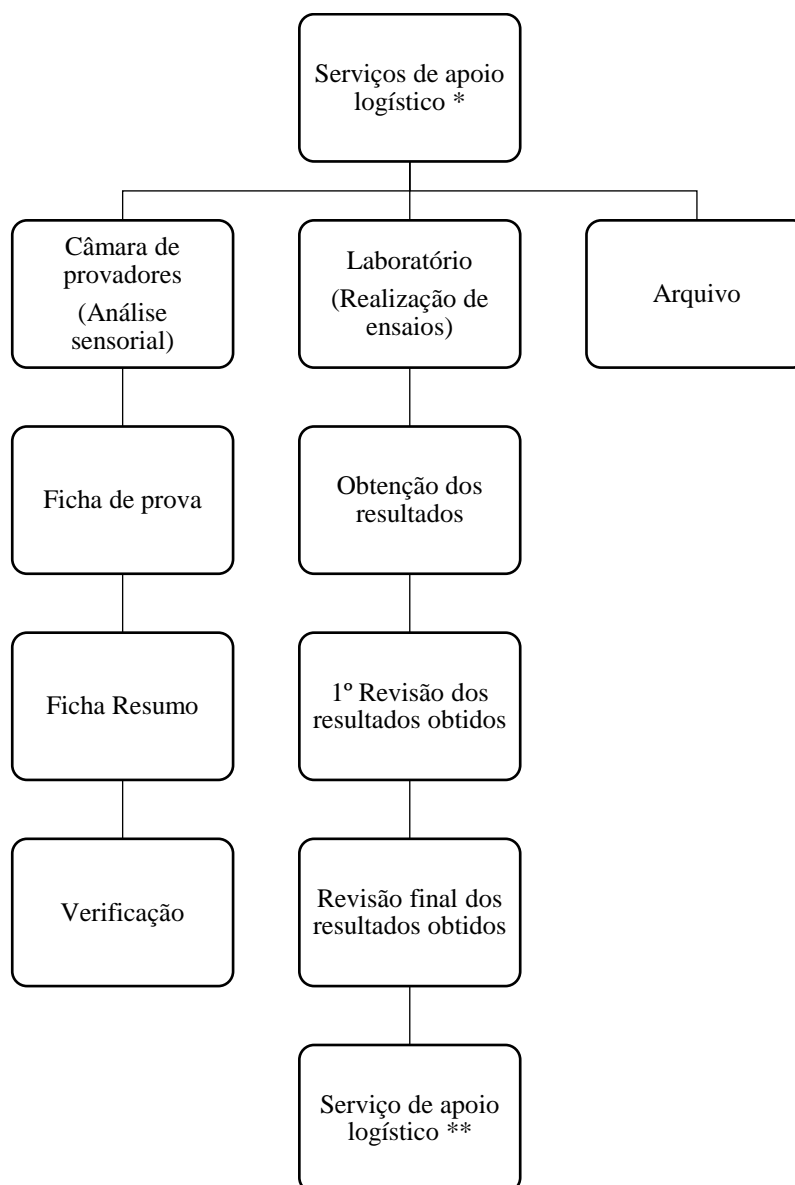
- 2011;9(4):1156–67.
61. Chone X, Leeuwen C Van, Chery P. Terroir Influence on Water Status and Nitrogen Status of non-Irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). Vegetative Development , Must and Wine Composition (Example of a Medoc Top Estate Vineyard , Saint Julien Area , Bordeaux , 1997). South African J Enol Vitic. 2001;22(1).
 62. Roby G, Harbertson JF, Adams DA, Matthews MA. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition : Anthocyanins and tannins. Aust J Grape Wine Res. 2004;100–7.
 63. Stefanos Koundouras, Vassilios Marinos, Anna Gkouliotti, Yorgos Kotseridis C van L. Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated Cv . Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L .). Effects on Wine Phenolic and Aroma Components. J Agric Food Chem. 2006;(54):5077–5068.
 64. Wang R, Sun Q, Chang Q. Soil Types Effect on Grape and Wine Composition in Helan Mountain Area of Ningxia. PLoS One. 2015;1–12.
 65. Machado M, Mateus N. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. J Sci Food Agric. 2002;1695(July):1689–95.
 66. Falcão LD, Burin VM, Chaves ES, Vieira HJ, Brighenti E, Rosier J. Vineyard altitude and mesoclimate influences on the phenology and maturation of Cabernet-Sauvignon grapes from Santa Catarina State. J Int des Sci la Vigne du Vin. 2010;(September):135–50.
 67. Oliveira JM, Araújo IM, Pereira ÓM, Maia JS, Amaral AJ, Maia MO. Characterization and differentiation of five “ Vinhos Verdes ” grape varieties on the basis of monoterpenic compounds. Anal Chim Acta. 2004;513:269–75.
 68. Huggett J. Geology and wine : a review. Proc Geol Assoc [Internet]. The Geologists’ Association; 2006;117(2):239–47. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-7878\(06\)80012-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-7878(06)80012-X)
 69. Somers TC, Evans ME. Spectral Evaluation of Young Red Wines : Anthocyanin Equilibria , Total Phenolics , Free and Molecular SO₂,” Chemical Age .” J Sci Food Agric. 1977;279–81.
 70. Gonçalves MGA. Leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* – Métodos de

despiste rápido e a sua incidência em vinhos portugueses. (Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia pela Universidade de Lisboa); 1996.

71. Neto, F.; Castilhos, M.; Telis, V.; Telis-Romero J. Effect of ethanol , dry extract and reducing sugars on density and viscosity of Brazilian red wines. *J Sci Food Agric.* 2015;(95):1421–7.
72. Rizzon, L.; Zanuz, M.; Miele A. Evolução da acidez durante a vinificação de uvas tintas de três regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. *J Food Sci Technol.* 1998;18.
73. Leske P., Sas A, Coulter A, Stockley C, Lee T. The composition of Australian grape juice : chloride , sodium and sulfate ions. *Aust J Grape Wine Res.* 1997;3:26–30.
74. Jose Luis Aleixandre, Victoria Lizama Alvarez MJG. Varietal Differentiation of Red Wines in the Valencian Region (Spain). *J Agric Food Chem.* 2002;50:751–5.
75. Poiana, M.; Gergen, I.; Alexa E. Establishing of chromatic and antioxidant characteristics of some red wines from Minis vineyard. *Sciebtific Study Res.* 2007;VIII(3):319–28.

ANEXOS

Anexo I



* Nesta fase inicial o papel dos serviços de apoio logístico é a realização da receção, triagem, confidencialização e codificação das amostras; ** Nesta fase final, o papel dos serviços de apoio logístico consiste na emissão dos resultados obtidos para o cliente.

Figura A1.1 – Representação esquemática do sistema de gestão concretizado na Comissão Vitivinícola Regional do Dão na realização do controlo de qualidade dos vinhos da Região Demarcada do Dão.

Anexo II

Tabela com informação relativa aos concelhos e freguesias que pertencem à Região Demarcada do Dão

Nem sempre a totalidade dos concelhos mencionados como pertencentes à Região Demarcada do Dão fazem parte da mesma, sendo que por vezes apenas algumas freguesias desses concelhos é lhe pertencem. Esta informação foi obtida a partir da Portaria nº 246/2014, do Diário da República nº228/2014, Série I de 2014-11-25.

Tabela A2.1. – Representação das localidades pertencentes a cada sub-região da Região Demarcada do Dão.

Sub-regiões	Localidades pertencentes
Alva	Oliveira do Hospital, Arganil e Tábua
Besteiros	Constituída pelos concelhos de Mortágua, Santa Comba Dão e Tondela, sendo que do concelho de Tondela apenas fazem parte as freguesias de do município de Tondela, a União de Freguesias de Barreiro de Besteiros e Tourigo, da União de Freguesias de Caparrosa e Silvares apenas a freguesia de Caparrosa, a União de Freguesias de Mouraz e Vila Nova da Rainha, a União de Freguesias de São Miguel do Outeiro e Sabugosa, a União de Freguesias de Tondela e Nandufe, a União de Freguesias de Vilar de Besteiros e Mosteiro de Fráguas, e as freguesias de Campo de Besteiros, Canas de Santa Maria, Castelões, Dardavaz, Ferreirós do Dão, Lajeosa do Dão, Lobão da Beira, Molelos, Parada de Gonta, Santiago de Besteiros e Tonda;
Castendo	Constituída pelos concelhos de Penalva do Castelo e Sátão, sendo que do concelho do Sátão apenas fazem parte as freguesias de Rio de Moinhos e Silvã de Cima.
	Em relação à sub-região da Serra da Estrela, é formada pelos concelhos de Gouveia e Seia. Do

Serra da Estrela	<p>concelho de Gouveia fazem parte as freguesias de constituída pela União de Freguesias de Figueiró da Serra e Freixo da Serra, União de Freguesias de Melo e Nabais, União de Freguesias de Rio Torto e Lagarinhos, União de Freguesias de Moimenta da Serra e Vinhó, União de Freguesias de Gouveia (São Pedro e São Julião) e pelas freguesias de Arcozelo, Cativeiros, Nespereira, Paços da Serra, Ribamondego, São Paio, Vila Cortês da Serra, Vila Franca da Serra e Vila Nova de Tazem. Do concelho de Seia fazem parte as freguesias de União de Freguesias de Carragozela e Várzea de Meruge, União de Freguesias de Sameice e Santa Eulália, da União de Freguesias de Santa Marinha e São Martinho apenas a freguesia de Santa Marinha, União de freguesias de Seia, São Romão e Lapa dos Dinheiros, União de Freguesias de Torrozelos e Folhadosa, União de Freguesias de Tourais e Lajes e pelas freguesias de Girabolhos, Paranhos, Pinhanços, Sandomil, Santa Comba, Santiago e Travancinha.</p>
Silgueiros	<p>A sub-região de Silgueiros é constituída por algumas freguesias do concelho de Viseu, tais como Fragosela, Povolide, São João de Lourosa, Santos Evos e Silgueiros.</p>
Terras de Azurara	Mangualde
Terras de Senhorim	Carregal do Sal e Nelas

Anexo III

Apresentação da tabela que corresponde os concelhos da Região Demarcada do Dão pela Zona Central Norte, Zona Central Sul e pela Zona Periférica e pelas atuais sub-regiões.

Esta tabela faz a correspondência entre a divisão inicial da Região Demarcada do Dão em três sub-regiões para a as sete divisões definidas atualmente para a Região Demarcada do Dão. Segundo Loureiro, V. e Cardoso, A. em “Os Vinhos do Dão”, não são conhecidas bases científicas e geográficas para a divisão da Região Demarcada do Dão em sete sub-regiões. Curvelo-Garcia realizou um trabalho de caracterização do vinho desta região com as três sub-regiões.

Tabela A.3. – Correspondência da divisão inicial da Região Demarcada do Dão com a divisão atual em sete sub-regiões.

Zonas	Concelhos pertencentes	Sub-regiões atuais
Zona Central Norte¹	Viseu; Tondela; Nelas; Carregal do Sal; Mangualde; Penalva do Castelo e Sátão.	Silgueiros, Terras de Azurara, Terras de Senhorim, Castendo e parte de Besteiros
Zona Central Sul²	Gouveia e Seia	Serra da Estrela
Zona Periférica³	Tábua e Oliveira do Hospital	Alva (sem Arganil) e parte de Besteiro

¹ A Zona Central Norte divide-se em três zonas, A, B e C:

A: Freguesia de Fail, Fragosela, Povolide, Ranhados, Santos Evos (cerca de 1/3), S. João de Lourosa, Silgueiros e Vila Chã de Sá do concelho de Viseu. Freguesias de Canas da Sabugosa (cerca de 1/2), Fereirós, Lageosa, Lobão, Mouraz (cerca de 2/3), Parada de Gouta, Sabugosa (cerca de 2/3), Tonda e Tondela (cerca de 1/2) do concelho de Tondela; todas as freguesias dos concelhos de Nelas e Carregal do Sal.

B: Freguesia de Alcafache, Cunha Baixa, Espinho, Fornos de Macieira do Dão, Lobelhe, Mangualde, Mesquitela, Moimenta de Macieira do Dão e Santiago de Cassurães do concelho de Mangualde.

C: Freguesias de Ínsua, Luzinde e Pindo do concelho de Penalva do Castelo, e a freguesia de Rio de Moinhos do concelho do Sátão.

² A Zona Central Sul é constituída por D:

D: Freguesia de Arcozelo, Cativelos, Gouveia (cerca de 1/5), Lagarinhos, Melo, Moimenta da Serra, Nabais, Nespereira, Paços da Serra (cerca de 1/5), Rio Torto, S. Paio, Vila Nova de Tázem e Vinho do concelho de Gouveia; freguesias de Girabolhos, Lages, Paranhos, Pinhanços, Santa Comba, Tourais, Santa Marinha (cerca de 1/5) e S. Martinho de Seia (cerca de 1/5) do concelho de Seia.

³ A zona Periférica é dividida em duas zonas E e F:

E: todas as freguesias do concelho de Tábua e Oliveira do Hospital

F: a restante parte da zona.

Anexo IV

Distribuição das amostras pelos anos em estudo (de 2008 a 2015) e pelas sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão

Esta tabela indica a distribuição das amostras pelos diferentes anos de estudo e pela sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão. É possível observar nesta tabela que há sub-regiões que possuem vinhos mais antigos que as restantes. Esta característica poderá influenciar os resultados de alguns parâmetros tais como o da tonalidade de cor, que depende da idade do vinho.

Tabela A4.1 – Distribuição da amostragem pelos diferentes anos de colheita e pelas sub-regiões da Região Demarcada do Dão.

		Sub-regiões							Total
		Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim	
Anos	2008	-	-	-	1	1	1	2	5
	2009	-	-	-	-	3	-	1	4
	2010	-	-	-	-	1	2	1	4
	2011	-	-	2	-	2	1	3	8
	2012	5	8	2	3	2	6	-	26
	2013	3	4	4	8	1	3	6	29
	2014	3	6	7	3	5	3	2	29
	2015	1	-	-	-	-	-	-	1
Total:		12	18	15	15	15	16	15	106

Anexo V

Tabela com informação acerca da gama de variação (Δ) e a mediana (MED) para todos os parâmetros estudados relativa ao ano de 2012. Gráficos de *boxplot* para cada parâmetro relativamente apenas às amostras provenientes do ano de 2012

Legenda para interpretação dos gráficos boxplots:

- a) Massa volúmica
- b) Extrato seco total
- c) Acidez total
- d) Acidez volátil
- e) pH
- f) Dióxido de enxofre (SO₂) Livre
- g) Dióxido de enxofre Combinado
- h) Dióxido de enxofre Total
- i) Antocianinas
- j) Tonalidade
- k) Intensidade
- l) Fenóis totais
- m) Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA)
- n) Açúcares totais
- o) Ferro
- p) Cobre
- q) Sulfatos
- r) Cloretos
- s) Álcoois Superiores totais
- t) Metanol
- u) Fenóis voláteis
- v) Ácido cítrico

Tabela A5.1 – Representação da gama de variação (Δ) e da mediana (MED) de cada parâmetro estudado e para cada uma das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para o ano de 2012

Variação e mediana dos resultados provenientes das amostras do ano de 2012 para as sete sub-regiões												
Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
MV ^a	0,9912 – 0,9942 n = 5	0,9929	0,9914-0,9954 n = 9	0,9934	0,9931-0,9938 n = 2	0,9935	0,9911-0,9939 n = 3	0,9916	0,9928-0,9929 n = 2	0,9928	0,9903-0,9956 n = 7	0,9911
E. Seco ^b	29,9-33,1 n = 5	30,5	30,2-38,6 n = 9	35,4	32-35,4 n = 2	33,7	27,6-30 n = 3	27,6	33,3-33,9 n = 2	33,6	25,8-35,9 n = 7	29,4
A. volátil ^b	0,57-0,82 n = 5	0,73	0,5-1 n = 10	0,57	0,52-0,54 n = 2	0,53	0,48-0,58 n = 2	0,56	0,63 n = 2	0,63	0,39-0,73 n = 7	0,64
A. total ^b	5-5,39 n = 5	5,08	5,2-6,32 n = 10	5,5	5,12-5,25 n = 2	5,18	4,86-6,03 n = 3	5,01	5,21-6,12 n = 2	5,66	4,83-6,3 n = 7	5,79
pH ^c	3,66-3,79 n = 5	3,74	3,56-3,74 n = 10	3,67	3,71-3,78 n = 2	3,75	3,69-3,73 n = 3	3,71	3,73-3,92 n = 2	3,83	3,48-3,84 n = 7	3,69
SO ₂ L. ^d	16-28 n = 5	18	<12-14 n = 10	13	19-24 n = 3	22	15-27 n = 3	20	17-18 n = 2	18	<12-24 n = 7	18
SO ₂ C. ^d	54-115 n = 5	70	39-62 n = 9	53	73-87 n = 3	84	59-92 n = 3	66	52-53 n = 2	53	33-66 n = 7	55

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a – g/mL

b – g/L

c – adimensional

d – g/L

e – %(V/V)

f – unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV – massa volúmica

E. – extrato

A.- acidez

SO₂ – dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. – Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. – totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. – voláteis

Varição e mediana dos resultados provenientes das amostras do ano de 2012 para as sete sub-regiões

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
SO ₂ T. ^d	71-143 n =5	87	53-74 n =10	62	92-109 n =3	108	74-119 n =3	86	69-71 n =2	70	42-83 n =7	78
TAVA ^e	12,7-14,6 n =5	14	13,1-14,4 n =9	13,3	12,9-14,7 n =2	13,8	12,2-13,7 n =3	13,3	14,1-14,4 n =2	14,4	12,7-14,7 n =6	13,3
Sulfatos ^d	420-912 n =5	797	480-863 n =10	661	757-785 n =2	771	343-526 n =3	405	598-764 n =2	681	280-596 n =7	502
Cloretos ^d	27,5-47 n =5	28,9	27,2-61,8 n =9	34	31,9-37,2 n =3	34	21,8-34,4 n =3	22,8	34,5-68 n =2	51,2	<16,6-40,7 n =6	23,6
Int. ^f	8,515-12,735 n =5	11,63	9,386-13,06 n =10	10,988	9,293-12,431 n =2	10,862	8,34-9,731 n =3	9,462	12,91-15,176 n =2	14,03	6,967-10,629 n =8	8,657
Tonalidade ^c	0,76-0,867 n =5	0,781	0,794-0,856 n =10	0,838	0,767-0,841 n =2	0,804	0,722-0,851 n =3	0,81	0,789-0,865 n =2	0,827	0,824-0,906 n =8	0,853
Anto. ^d	85-132 n =5	100	70-160 n =10	101	153-181 n =2	167	126-201 n =3	172	97-127 n =2	112	11-163 n =8	96
Fenóis t. ^f	48,6-59,4 n =5	57,8	50,5-62,9 n =10	55,5	60,6-73,4 n =2	67	45,5-58,8 n =3	47,3	73,5-77,5 n =2	75,5	44,8-64,4 n =8	50,7

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a - g/mL

b - g/L

c - adimensional

d - g/L

e - %(V/V)

f - unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV - massa volúmica

E. - extrato

A.- acidez

SO₂- dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. - Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. - totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. - voláteis

Varição e mediana dos resultados provenientes das amostras do ano de 2012 para as sete sub-regiões

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
Ferro ^d	<1-1,1 n =5	<1	<1-2 n =11	<1	1-2,7 n =3	2,7	>1-1,1 n =3	1,07	>1-1,4 n =3	1,4	>1-4,2 n =7	<1
Cobre ^d	<0,1-1,3 n =5	<0,1	<0,1-0,1 n =10	<0,1	<0,1-0,5 n =2	0,3	<0,1-0,5 n =3	0,2	<0,1-0,1 n =3	<0,1	<0,1-0,1 n =7	<0,1
A.T. ^b	0,6-1 n =5	0,8	0,6-1 n =9	0,9	0,9-1,6 n =2	1,2	0,4-1,2 n =4	0,9	1,2-1,5 n =3	1,4	0,5-1,3 n =6	0,9
Á. Cítrico ^d	<50 n =5	<50	<50-144 n =9	<50	<50-100 n =2	62	<50-66 n =3	<50	<50 n =2	<50	<50-62 n =6	<50
A.S.T. ^g	291-497 n =5	327	291-451 n =10	353	303-304 n =3	303	295-378 n =3	310	263-288 n =2	275	277-411 n =6	306

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a - g/mL

b - g/L

c - adimensional

d - g/L

e - %(V/V)

f - unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV - massa volúmica

E. - extrato

A.- acidez

SO₂ - dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. - Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. - totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. - voláteis

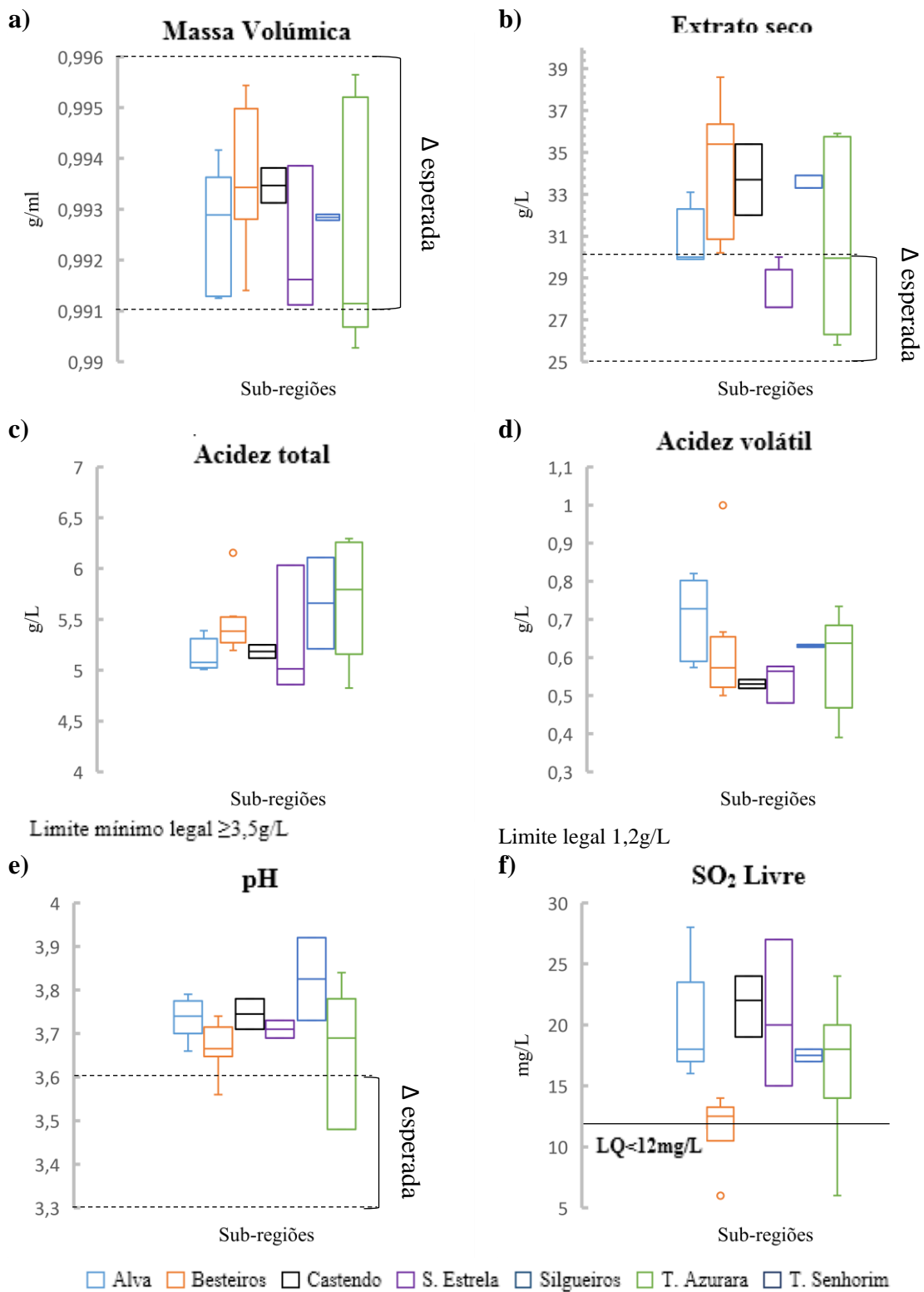


Figura A5.1. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros da a) massa volúmica a 20°C, b) extrato seco total, c) acidez total, d) acidez volátil, e) pH e f) dióxido de enxofre (SO₂) livre para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2012.

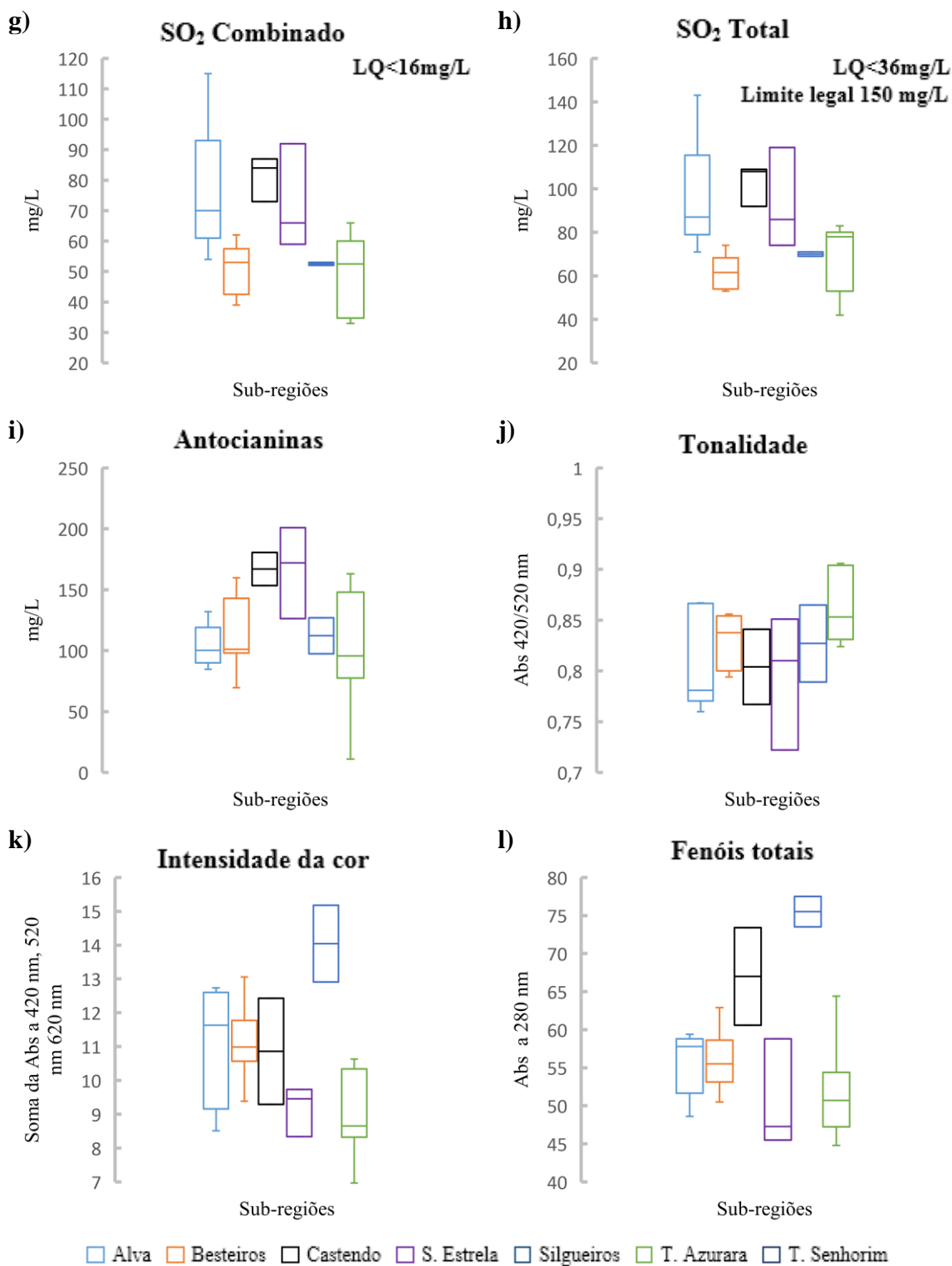


Figura A5.2. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do g) dióxido de enxofre combinado, h) dióxido de enxofre total, i) antocianinas, d) tonalidade, e) intensidade da cor e f) fenóis totais para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2012.

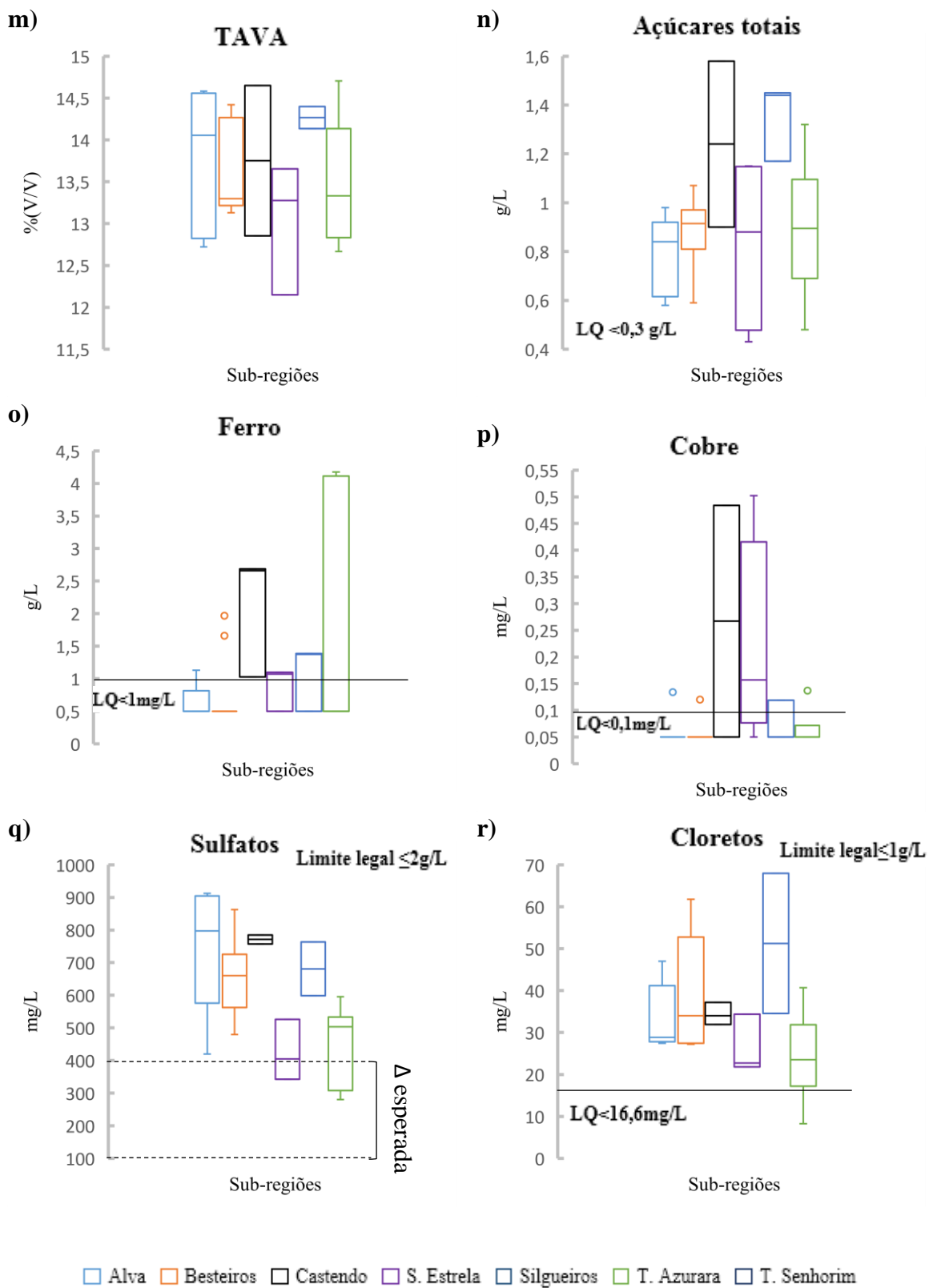


Figura A5.3. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do m) título alcoométrico volúmico adquirido (TAVA), n) açúcares totais, o) ferro, p) cobre, q) sulfatos e r) cloretos para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2012.

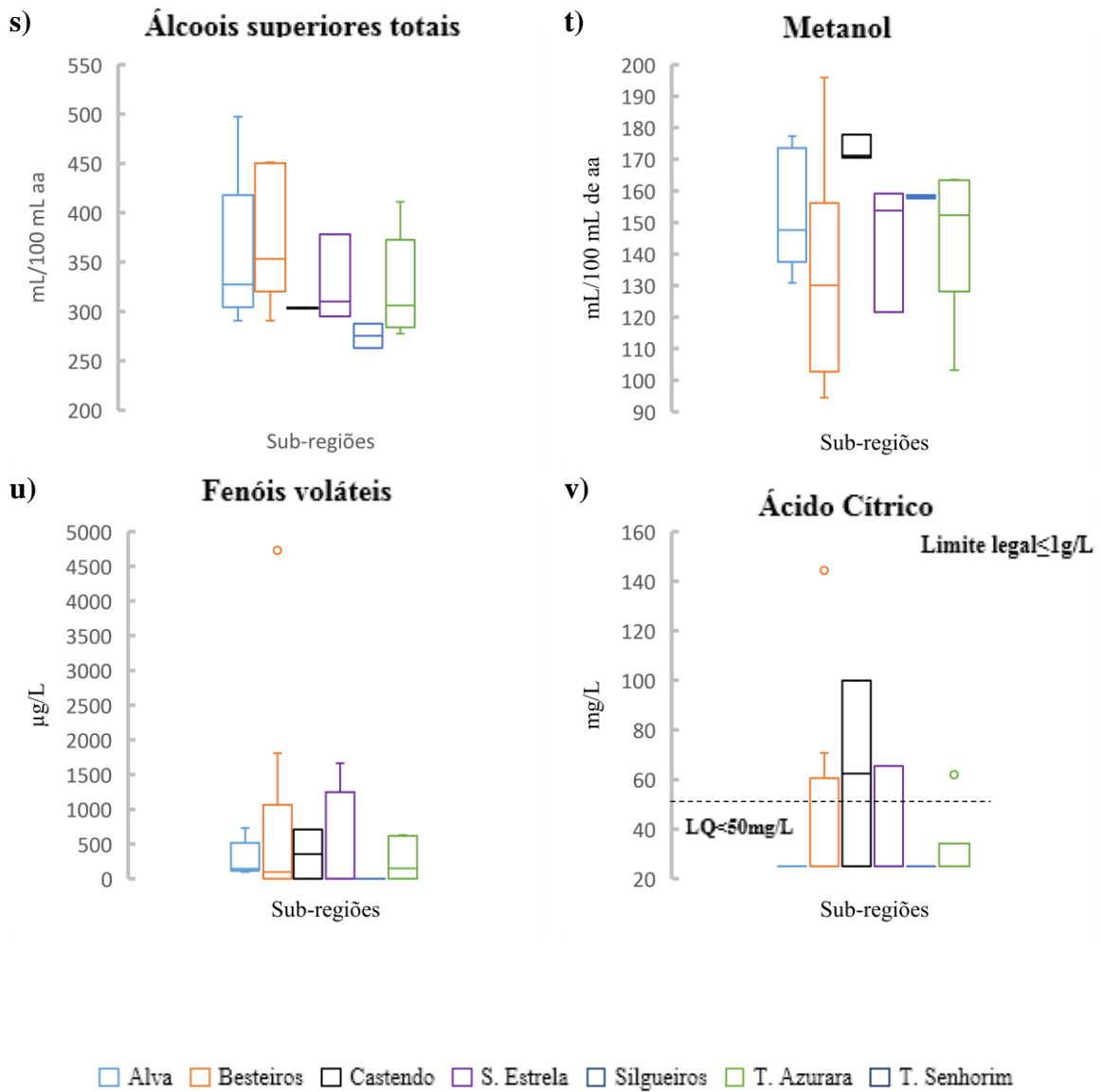


Figura A5.4. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do s) álcoois superiores totais, t) metanol, u) fenóis voláteis e v) ácido cítrico para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2012.

Anexo VI

Tabela com informação acerca da gama de variação (Δ) e a mediana (MED) para todos os parâmetros estudados relativa ao ano de 2013. Gráficos de *boxplot* para cada parâmetro relativamente apenas às amostras provenientes do ano de 2013

Legenda para interpretação dos gráficos boxplots:

Legenda para interpretação dos gráficos boxplots:

- a) Massa volúmica
- b) Extrato seco total
- c) Acidez total
- d) Acidez volátil
- e) pH
- f) Dióxido de enxofre (SO₂) Livre
- g) Dióxido de enxofre Combinado
- h) Dióxido de enxofre Total
- i) Antocianinas
- j) Tonalidade
- k) Intensidade
- l) Fenóis totais
- m) Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA)
- n) Açúcares totais
- o) Ferro
- p) Cobre
- q) Sulfatos
- r) Cloretos
- s) Álcoois Superiores totais
- t) Metanol
- u) Fenóis voláteis
- v) Ácido cítrico

Tabela A6.1 – Representação da gama de variação (Δ) e da mediana (MED) de cada parâmetro estudado e para cada uma das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para o ano de 2013.

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos de 2013 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão														
Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
MV ^a	0,9926-0,9951 n=3	0,9944	0,9915-0,9939 n=5	0,9923	0,9928-0,9950 n=4	0,994	0,9906-0,9959 n=10	0,9927	0,9944	0,9944	0,9912-0,9933 n=3	0,9918	0,9909-0,9951 n=7	0,9938
E. Seco ^b	28,7-34,4 n=3	32,3	28,1-33,3 n=5	29,4	28,9-35,2 n=4	33,1	26,8-36 n=10	31,2	34,4	34,4	26,3-31,3 n=3	29,2	25-36,7 n=7	33,9
A. volátil ^b	0,61-0,79 n=3	0,74	0,56-0,67 n=5	0,66	0,47-0,56 n=4	0,51	0,53-0,91 n=8	0,64	0,67-0,68 n=2	0,67	0,55-0,86 n=3	0,64	0,53-0,67 n=7	0,64
A. total ^b	5,01-5,19 n=3	5,16	5,49-6,33 n=5	5,91	4,36-5,29 n=7	5,22	5,29-6,11 n=9	5,55	5,924	5,924	5,58-5,74 n=3	5,64	4,83-6 n=6	5,40
pH ^c	3,68-3,99 n=3	3,75	3,56-3,81 n=5	3,67	3,68-3,76 n=4	3,73	3,62-3,87 n=9	3,7	3,77	3,77	3,53-3,71 n=3	3,64	3,65-3,92 n=6	3,75
SO ₂ L. ^d	14-28 n=3	18	13-24 n=5	19	13-28 n=5	19	12-32 n=9	16	29	29	12-24 n=3	15	<12-30 n=6	19
SO ₂ C. ^d	27-102 n=3	62	39-74 n=5	55	57-78 n=5	66	27-113 n=9	38	64	64	39-55 n=3	51	41-100 n=6	71

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a - g/mL

b - g/L

c - adimensional

d - g/L

e - %(V/V)

f - unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV - massa volúmica

E. - extrato

A.- acidez

SO₂ - dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. - Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. - totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. - voláteis

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos de 2013 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
SO ₂ T. ^d	43-120 n =3	84	52-98 n =5	75	71-103 n =5	81	39-144 n =9	57	93 n =1	93	51-79 n =3	66	65-122 n =6	87
TAVA ^e	11,2-14,1 n =3	12,6	13,2-13,7 n =4	13,3	11,3-14,1 n =4	13,1	12,2-13,8 n =8	13,21	14,1 n =1	14,1	12,4-14,4 n =3	13,3	12,4-14,6 n =6	12,7
Sulfatos ^d	400-764 n =3	639	411-485 n =5	414	527-753 n =4	627	297-923 n =9	615	587-591 n =2	589	280-986 n =3	577	459-703 n =6	547
Cloretos ^d	33,8-34,6 n =3	34,4	35,2-61,1 n =5	54,8	40-41,7 n =4	41	22,1-74 n =9	28,9	61,9 n =1	61,9	23,2-34,5 n =4	28,7	17,3-41,9 n =6	35,8
Int. ^f	8,29-11,96 n =3	9,062	8,871-12,558 n =5	9	6,23-11,6 n =5	8,938	7,678-13,07 n =10	9,2	10,86 n =1	10,86	6,967-9,328 n =3	9,223	6,88-14,45 n =6	8,489
Tonalidade ^c	0,753-0,9 n =3	0,808	0,7-0,848 n =5	0,787	0,792-0,895 n =5	0,842	0,78-0,87 n =10	0,836	0,87 n =1	0,87	0,807-0,83 n =3	0,824	0,856-0,969 n =6	0,884
Anto. ^d	92-211 n =3	97	53-251 n =5	113	94-190 n =5	105	94-169 n =10	118	154 n =1	154	87-99 n =3	98	90-217 n =6	105

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a - g/mL

b - g/L

c - adimensional

d - g/L

e - %(V/V)

f - unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV - massa volúmica

E. - extrato

A.- acidez

SO₂ - dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. - Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. - totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. - voláteis

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos de 2013 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
Fenóis t. ^f	43,8-57,7 n =3	54	44,8-64,7 n =5	53,7	45,6-59,8 n =5	57,4	28-73,7 n =10	43	65,9 n =1	65,9	44,8-53,3 n =3	52,3	41,3-84,9 n =6	54,2
Ferro ^d	<1 n =3	<1	<1-2 n =5	1,5	<-1-3 n =4	2,6	<1-2,9 n =8	1,4	1,2 n =1	1,2	<1-5,2 n =3	1,3	<1-4,2 n =7	1,8
Cobre ^d	<0,1 n =3	<0,1	<0,1 n =5	<0,1	<0,1-0,48 n =6	0,15	<0,1-0,27 n =10	<0,1	0,17-0,18 n =2	0,18	<0,1-0,38 n =4	0,26	<0,1-0,17 n =7	0,13
A.T. ^b	0,4-0,9 n =3	0,7	0,4-2,5 n =4	0,7	0,7-1,4 n =4	1	0,4-1,7 n =10	0,7	1 n =1	1	0,5-1,4 n =3	0,8	0,4-2 n =7	0,8
Á. Cítrico ^d	<50 n =3	<50	<50-140 n =4	124	<50-142 n =4	88	<50-129 n =8	<50	<50 n =1	<50	<50 n =3	<50	<50-78 n =8	<50
A.S.T. ^g	293-380 n =3	303	309-362 n =4	346	306-334 n =4	317	270-392 n =9	310	261 n =1	261	300-360 n =4	357	266-346 n =7	284
Metanol ^g	143-152 n =3	147	149-197 n =4	185	147-172 n =4	161	133-183 n =9	166	171 n =1	171	135-179 n =4	171	124-210 n =7	127
Fenóis v. ^h	133-1520 n =3		142 n =4		80-1725 n =5		925 n =9		0-1442 n =1		198 n =3		0-240 n =3	

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a - g/mL

b - g/L

c - adimensional

d - g/L

e - %(V/V)

f - unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV - massa volúmica

E. - extrato

A.- acidez

SO₂ - dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. - Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. - totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. - voláteis

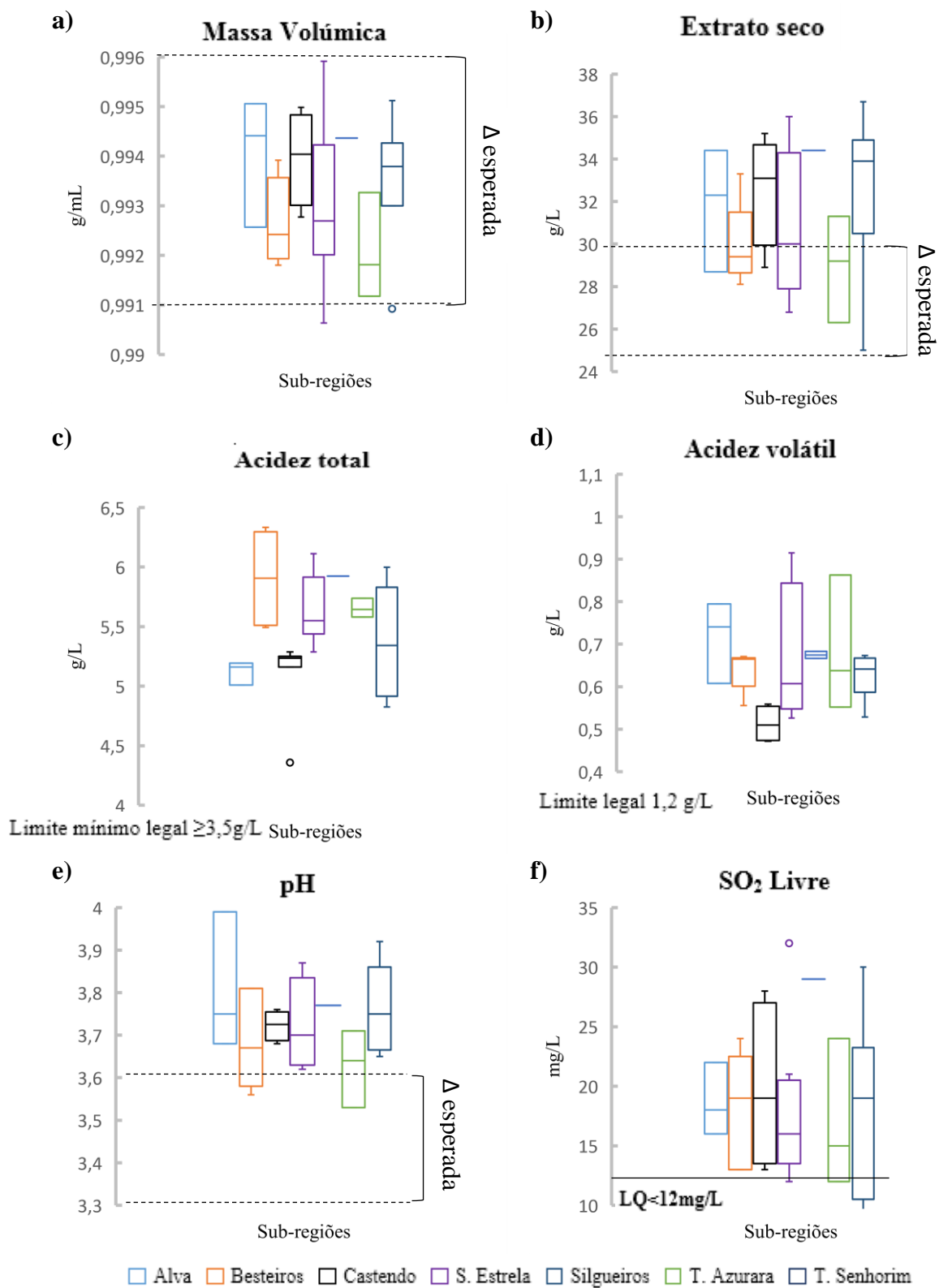


Figura A6.1. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros da a) massa volúmica a 20°C, b) extrato seco total, c) acidez total, d) acidez volátil, e) pH e f) dióxido de enxofre (SO₂) livre para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2013.

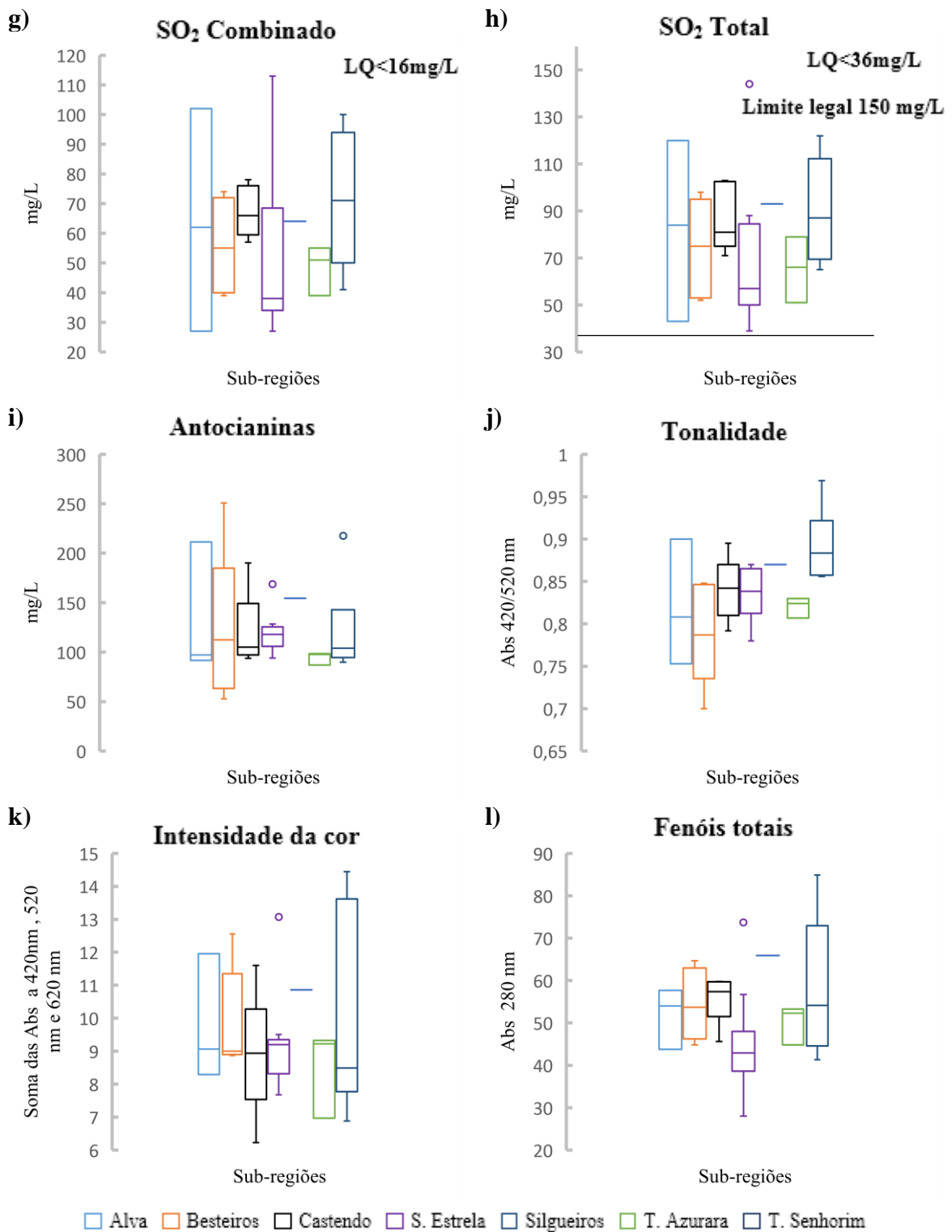


Figura A6.2. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do g) dióxido de enxofre combinado, h) dióxido de enxofre total, i) antocianinas, d) tonalidade, e) intensidade da cor e f) fenóis totais para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2013.

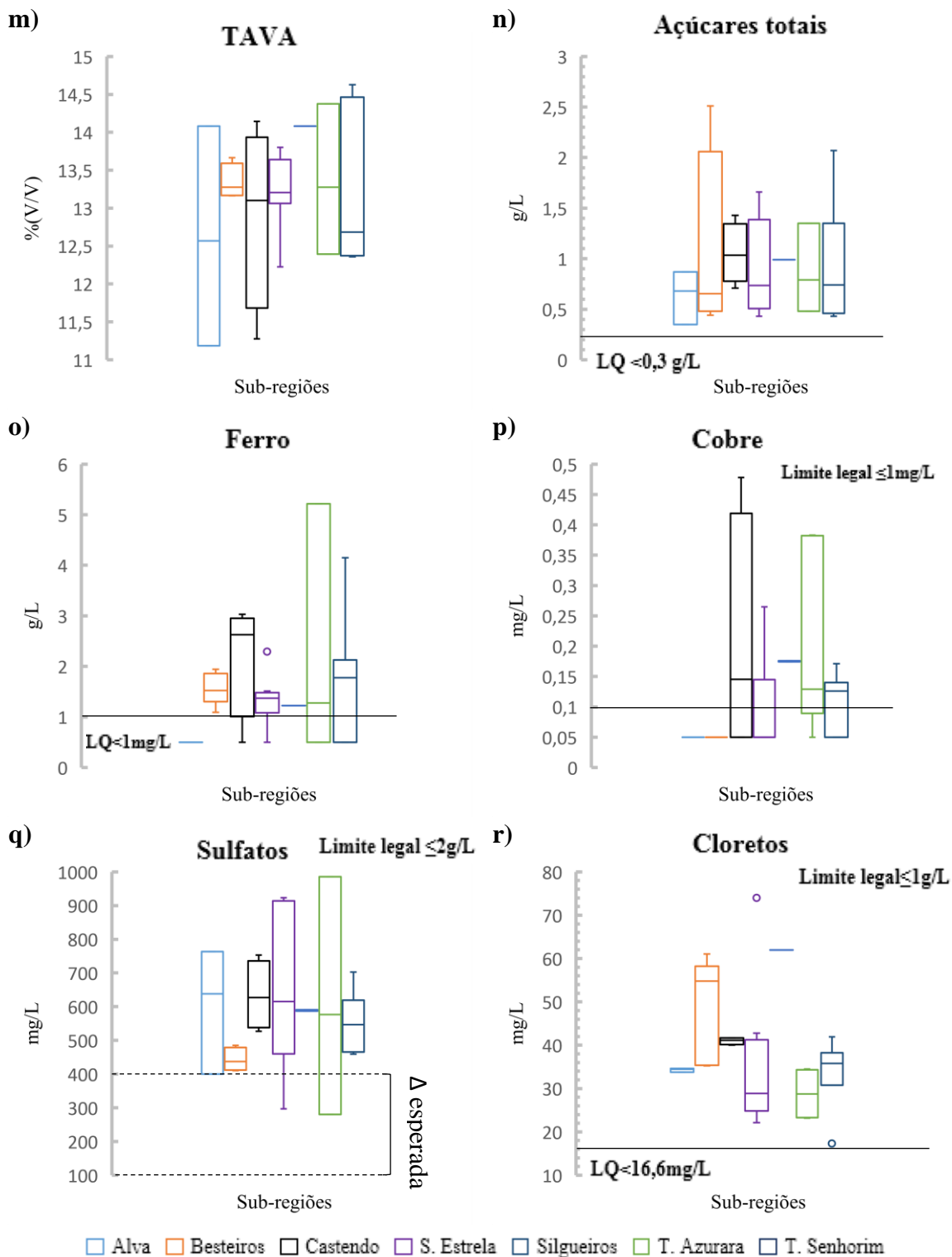


Figura A6.3. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do m) título alcoométrico volúmico adquirido (TAVA), n) açúcares totais, o) ferro, p) cobre, q) sulfatos e r) cloretos para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2013.

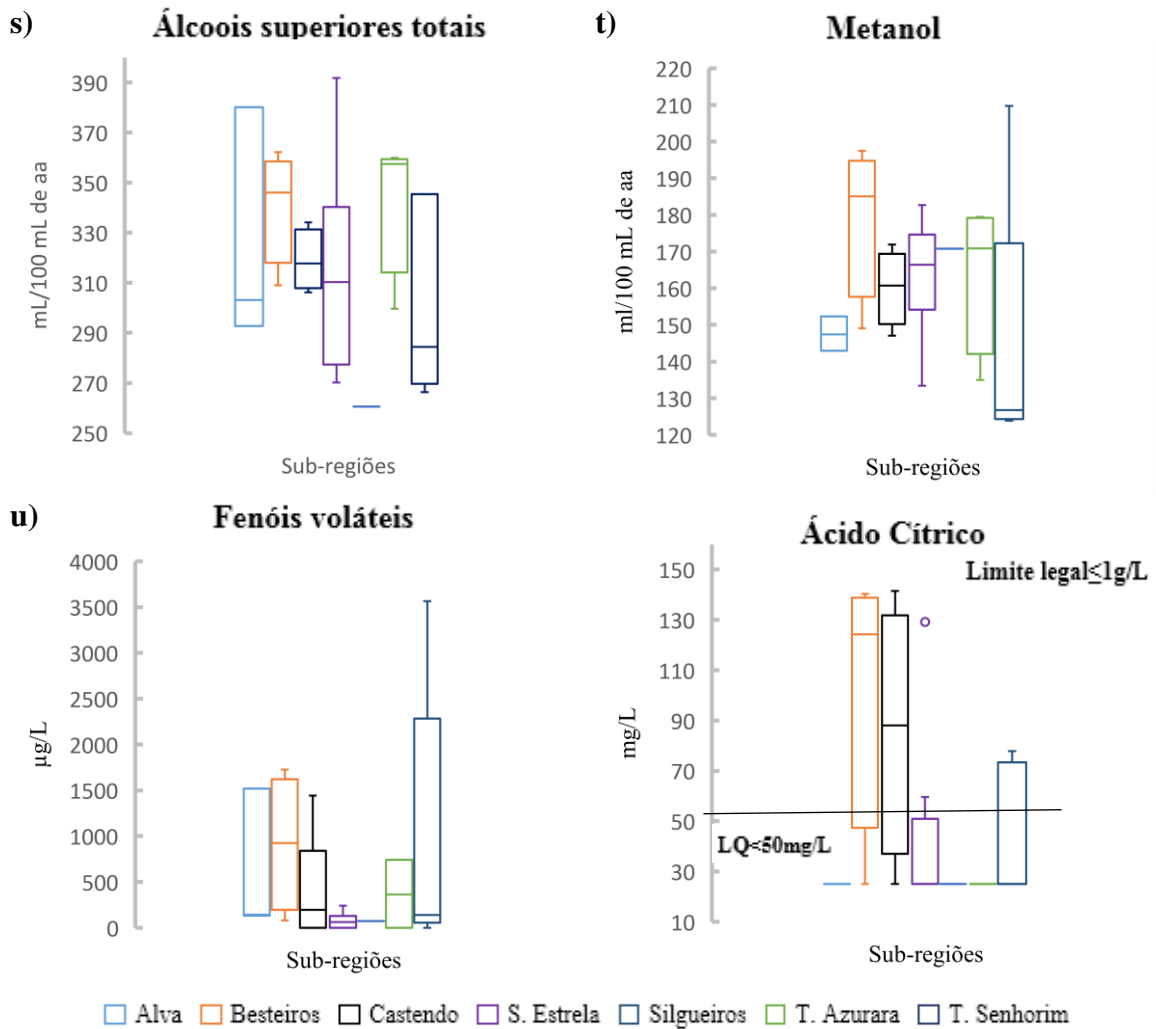


Figura A6.4. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do s) álcoois superiores totais, t) metanol, u) fenóis voláteis e v) ácido cítrico para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2013.

Anexo VII

Tabela com informação acerca da gama de variação (Δ) e a mediana (MED) para todos os parâmetros estudados relativa ao ano de 2014. Gráficos de *boxplot* para cada parâmetro relativamente apenas às amostras provenientes do ano de 2014

Legenda para interpretação dos gráficos boxplots:

Legenda para interpretação dos gráficos boxplots:

- a) Massa volúmica
- b) Extrato seco total
- c) Acidez total
- d) Acidez volátil
- e) pH
- f) Dióxido de enxofre (SO₂) Livre
- g) Dióxido de enxofre Combinado
- h) Dióxido de enxofre Total
- i) Antocianinas
- j) Tonalidade
- k) Intensidade
- l) Fenóis totais
- m) Título Alcoométrico Volúmico Adquirido (TAVA)
- n) Açúcares totais
- o) Ferro
- p) Cobre
- q) Sulfatos
- r) Cloretos
- s) Álcoois Superiores totais
- t) Metanol
- u) Fenóis voláteis
- v) Ácido cítrico

Tabela A6.1 – Representação da gama de variação (Δ) e da mediana (MED) de cada parâmetro estudado e para cada uma das sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão para o ano de 2014.

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos de 2014 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão														
Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
MV ^a	0,9924-0,9942 n=3	0,9932	0,9926-0,9958 n=6	0,9944	0,9914-0,9952 n=8	0,9934	0,9939-0,9949 n=3	0,9940	0,9921-0,9951 n=6	0,9939	0,99-0,9944 n=4	0,9916	0,9912-0,994 n=3	0,9936
E. Seco ^b	27,1-33,3 n=3	28,7	30,2-38 n=6	35,7	25-32,3 n=8	30,6	31,8-34,6 n=3	32,8	29,4-37 n=6	32,3	25,8-36,2 n=4	28,8	28,1-33,6 n=3	32,6
A. volátil ^b	0,58-0,72 n=3	0,66	0,66-0,75 n=7	0,70	0,41-0,68 n=8	0,61	0,59-0,74 n=3	0,73	0,52-0,72 n=5	0,64	0,50-0,6 n=4	0,55	0,50-0,72 n=3	0,71
A. total ^b	5,23-5,34 n=3	5,28	5,43-6,32 n=7	5,79	5,43-6,41 n=8	5,62	5,34-5,81 n=3	5,53	5,32-6,04 n=5	5,79	5,39-5,62 n=3	5,43	5-5,39 n=3	5,04
pH ^c	3,68-3,79 n=3	3,77	3,6-3,77 n=7	3,72	3,6-3,79 n=9	3,64	3,62-3,9 n=3	3,67	3,73-3,84 n=5	3,77	3,59-3,83 n=4	3,74	3,82-3,91 n=3	3,9
SO ₂ L. ^d	14-28 n=3	16	14-23 n=7	18	14-28 n=9	20	13-26 n=3	19	13-28 n=5	16	20-28 n=4	23	14-18 n=3	14
SO ₂ C. ^d	46-58 n=3	53	52-108 n=7	65	33-74 n=9	54	36-65 n=3	45	48-71 n=5	56	42-69 n=4	54	32-42 n=3	32

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a – g/mL

b – g/L

c – adimensional

d – g/L

e – % (V/V)

f – unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV – massa volúmica

E. – extrato

A.- acidez

SO₂ – dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado

e T.- total)

Int. – Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. – totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. – voláteis

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos de 2014 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
SO ₂ T. ^d	60-86 n =3	69	66-129 n =7	94	48-98 n =9	77	55-78 n =3	71	69-84 n =5	76	70-92 n =4	75	46-60 n =3	47
TAVA ^e	12,3-12,9 n =3	12,4	13,1-13,9 n =6	13,2	11,3-13,4 n =7	12,6	12,7-13,1 n =3	12,9	12-13,7 n =5	13,5	13,2-14,1 n =3	13,8	13,3-13,8 n =2	13,5
Sulfatos ^d	742-820 n =5	775	414-861 n =7	557	203-605 n =7	437	299-744 n =3	561	438-659 n =5	493	291-512 n =4	339	588-591 n =2	590
Cloretos ^d	27,6-33,2 n =4	30,7	42,6-51,9 n =6	47,6	37,8-99,6 n =8	43,2	28-45,6 n =3	34,9	28,2-47,8 n =6	45,6	29,6-36,1 n =3	34,3	22,1-108,9 n =2	65,5
Int. ^f	7,957-8,96 n =3	8,16	7,39-13,485 n =7	9,559	5,959-12,86 n =9	10,09	7,276-7,977 n =3	7,53	7,709-12,58 n =5	8,734	7,465-13,7 n =3	8,25	10,439-11,325 n =3	11,277
Tonalidade ^c	0,728-0,84 n =3	0,797	0,69-0,921 n =7	0,831	0,687-0,893 n =9	0,743	0,823-0,863 n =3	0,844	0,677-0,868 n =5	0,828	0,685-0,762 n =3	0,734	0,79-0,839 n =3	0,79
Anto. ^d	114-262 n =3	143	52-278 n =7	95	108-229 n =9	205	80-175 n =3	152	129-304 n =5	151	151-376 n =3	227	172-210 n =3	210

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a – g/mL

b – g/L

c – adimensional

d – g/L

e – %(V/V)

f – unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV – massa volúmica

E. – extrato

A.- acidez

SO₂ – dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. – Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. – totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. – voláteis

Variações e medianas de todos os parâmetros estudados nos vinhos de 2014 para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão

Parâmetros	Alva		Besteiros		Castendo		S. Estrela		Silgueiros		T. Azurara		T. Senhorim	
	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED	Δ	MED
Fenóis t. ^f	42,2-53 n =3	42,7	43,3-68 n =7	47,8	40,6-61,2 n =9	56,2	42,2-49,6 n =3	46,7	51,9-68,2 n =5	55,7	40,7-70,4 n =3	52	58,3-63,5 n =3	61,5
Ferro ^d	<1-1,3 n =3	<1	<1-4,6 n =6	1,5	<1-3,7 n =7	2,5	1,1-2,4 n =3	1,3	<1-4,3 n =5	2,2	1,2-1,3 n =3	1,2	<1-1,8 n =3	<1
Cobre ^d	<0,1 n =3	<0,1	<0,1-0,13 n =9	<0,1	<0,1-0,13 n =10	<0,1	<0,1-0,26 n =3	<0,1	<0,1-0,34 n =5	<0,1	<0,1 n =3	<0,1	<0,1 n =2	<0,1
A.T. ^b	0,4-0,82 n =3	0,5	0,6-2,6 n =8	1,3	0,3-1,2 n =8	0,6	0,5-1,2 n =3	1	0,4-1 n =6	0,8	0,7-1,3 n =3	1,1	0,6-0,9 n =2	0,8
Á. Cítrico ^d	<50 n =3	<50	<50-195 n =9	123	<50 n =7	<50	<50 n =3	<50	<50-106 n =7	65	<50-80 n =3	<50	<50 n =3	<50
A.S.T. ^g	345-379 n =4	362	216-378 n =6	322	253-479 n =8	347	267-313 n =4	304	267-464 n =5	271	312-384 n =4	357	395-406 n =2	401
Metanol ^g	167-186 n =3	179	130-208 n =6	173	146-215 n =8	183	149-158 n =4	151	140-166 n =5	149	122-161 n =4	151	118-160 n =3	160
Fenóis v. ^h	0-234 n =3		123 n =6		0-1632 n =8		503 n =4		0-1922 n =6		172 n =2		0 n =3	

< - indica um valor menor que o LOQ do método.

a - g/mL

b - g/L

c - adimensional

d - g/L

e - %(V/V)

f - unidades de absorvância

g - mg/100 mL de álcool absoluto

h - µg/L

MV - massa volúmica

E. - extrato

A.- acidez

SO₂ - dióxido de enxofre (L.- livre; C.- combinado e T.- total)

Int. - Intensidade da cor

Anto. - Antocianinas

t. - totais

A.R.- açúcares residuais

A.S.T.- álcoois superiores totais

v. - voláteis

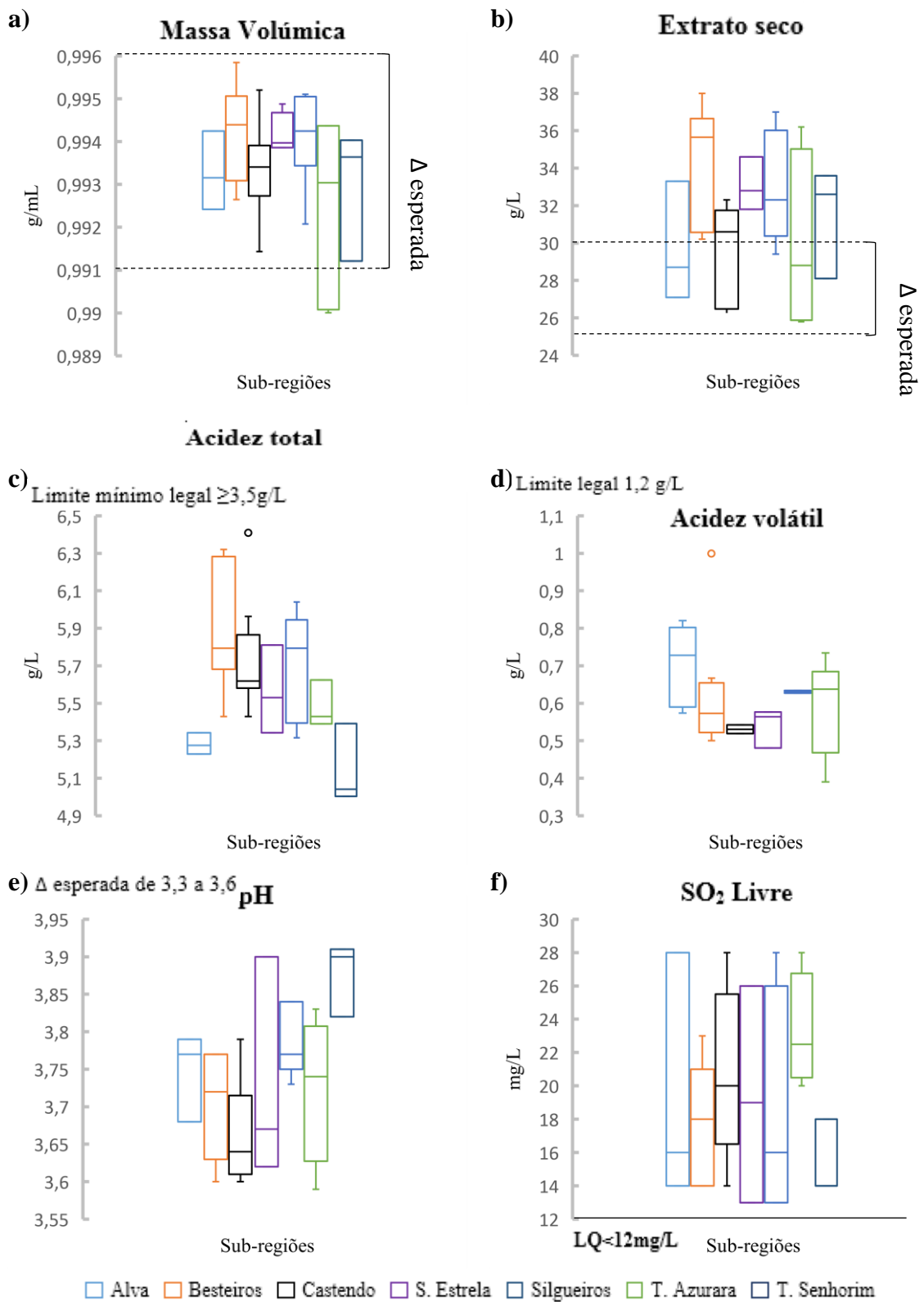


Figura A7.1. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros da a) massa volúmica a 20°C, b) extrato seco total, c) acidez total, d) acidez volátil, e) pH e f) dióxido de enxofre (SO₂) livre para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2014.

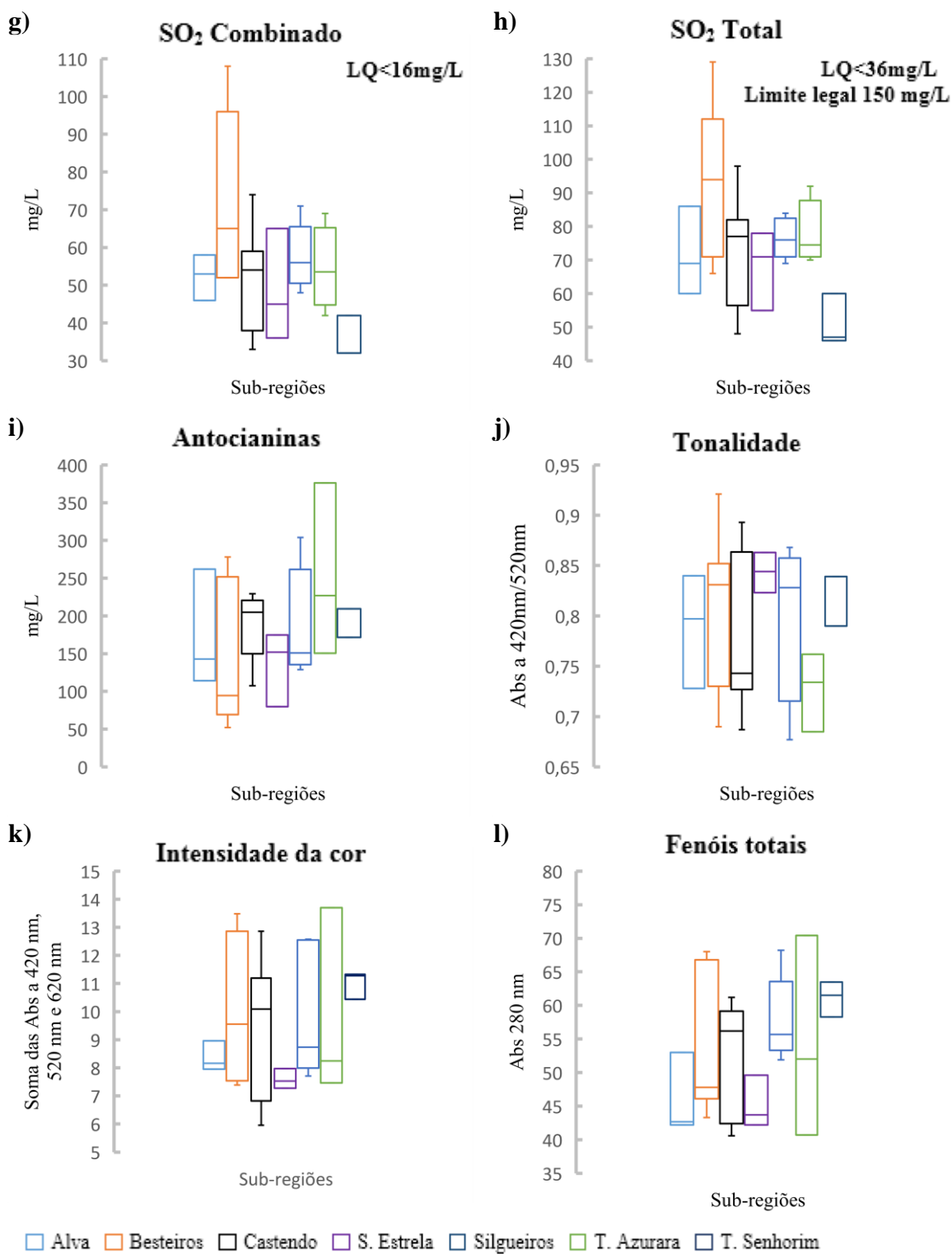


Figura A7.2. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do g) dióxido de enxofre combinado, h) dióxido de enxofre total, i) antocianinas, d) tonalidade, e) intensidade da cor e f) fenóis totais para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2014.

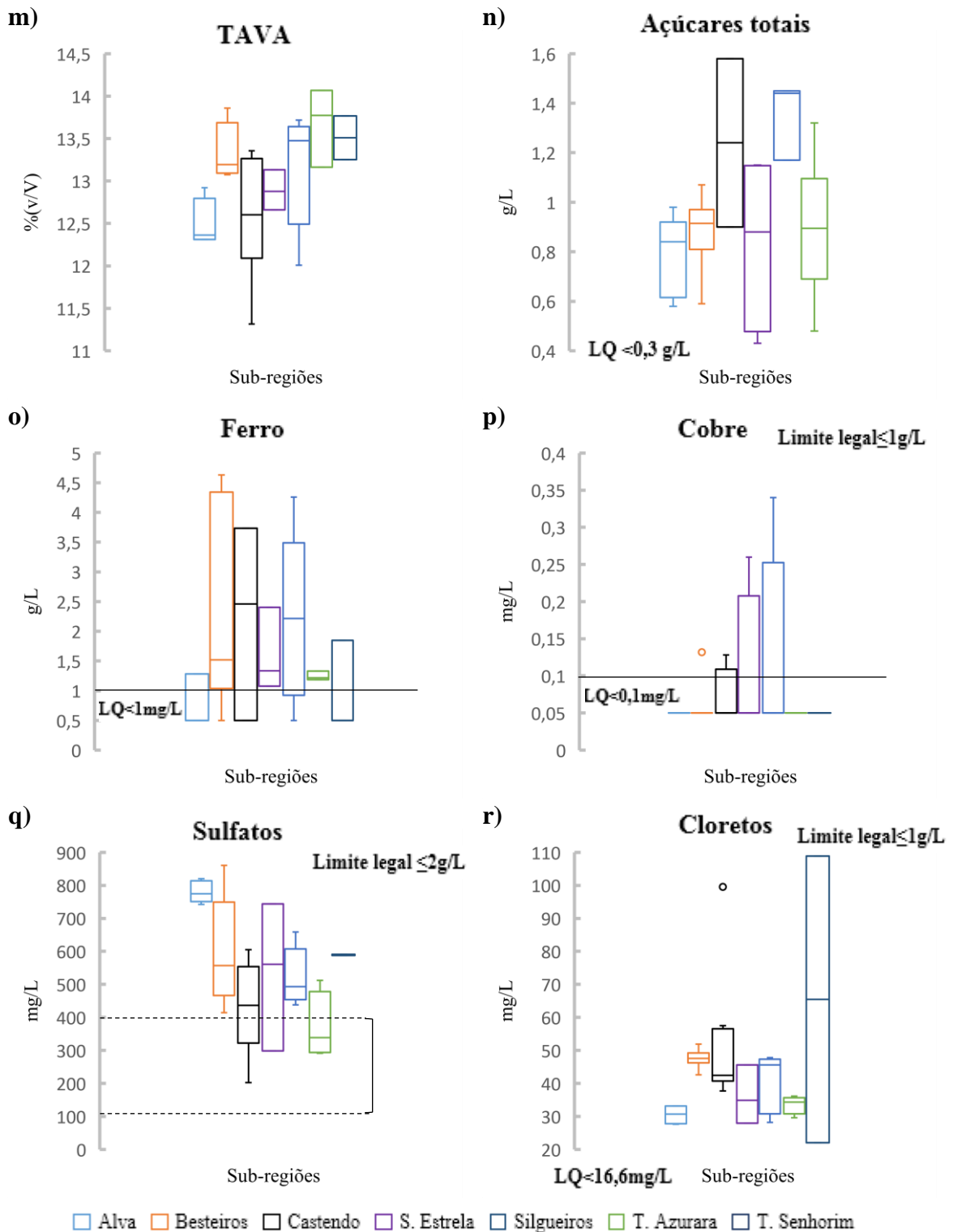


Figura A7.3. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do m) título alcoométrico volúmico adquirido (TAVA), n) açúcares totais, o) ferro, p) cobre, q) sulfatos e r) cloretos para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2014.

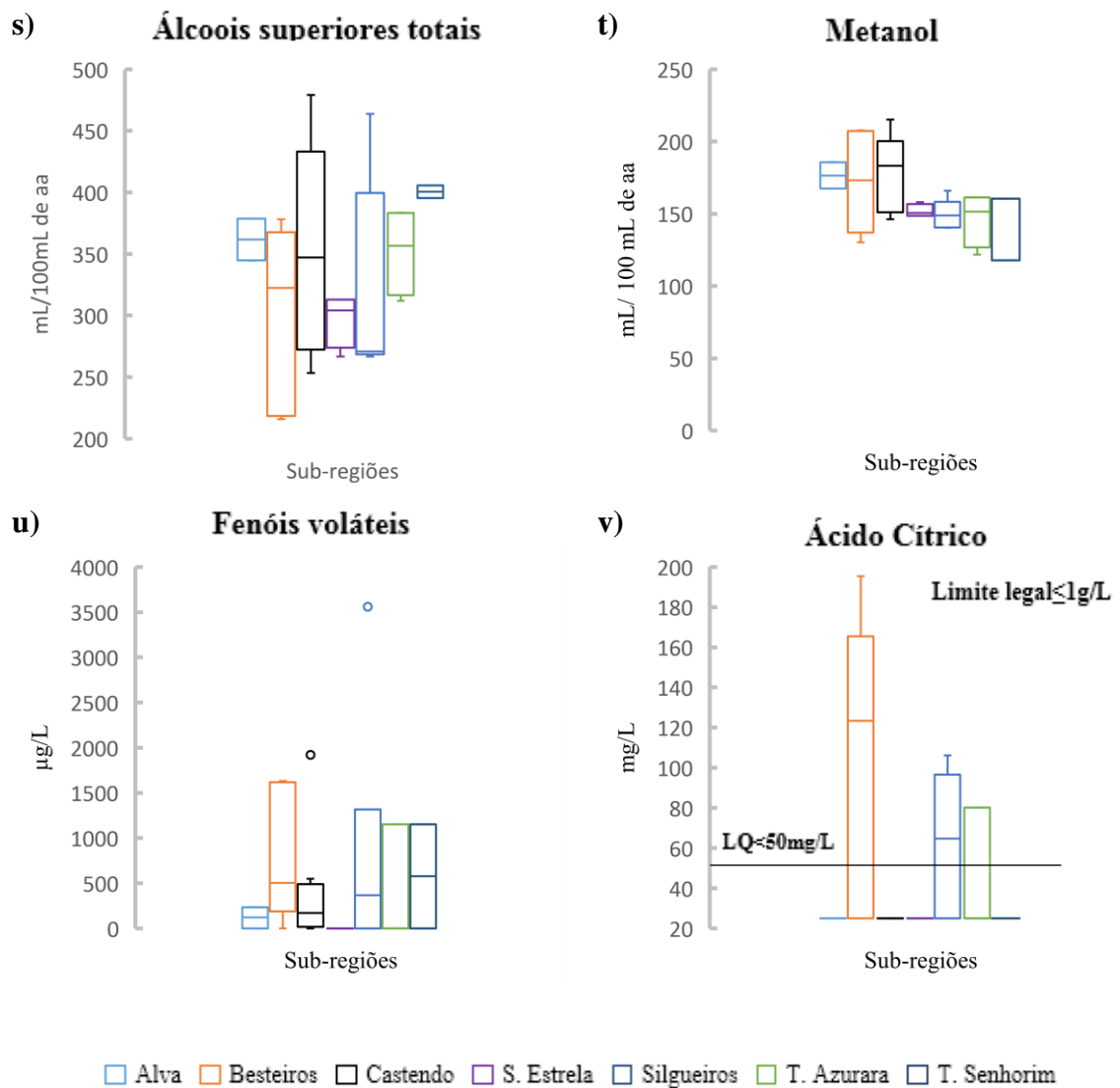


Figura A7.4. – Representação da dispersão dos resultados para os parâmetros do s) álcoois superiores totais, t) metanol, u) fenóis voláteis e v) ácido cítrico para as sete sub-regiões da Região Demarcada do Dão em relação às amostras do ano de colheita de 2014.

Anexo VIII

Tabela A8.1- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões para os anos de 2008 a 2015 em relação ao parâmetro da massa volúmica, obtidos através do teste estatístico ANOVA unidirecional realizado com um nível de significância de 95%, indicando diferenças estatísticas quando $p\text{-value} \leq 0,05$.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Massa Volúmica	Alva							
	Besteiros							
	Castendo							
	S. Estrela							
	Silgueiros						X ²	
	T. Azurara							
	T. Senhorim						X ²	

Leg: X Entre 2008 e 2015 + 2012 - 2013 * 2014

Em que: ² - $p \leq 0,01$

Tabela A8.2- Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 em relação ao parâmetro do extrato seco total, obtidos através da realização da ANOVA unidirecional com nível de significância de 95% indicando significância estatística se $p \leq 0,05$.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Extrato Seco Total	Alva							
	Besteiros							
	Castendo							
	S. Estrela							
	Silgueiros						X ¹	
	T. Azurara							
	T. Senhorim							

Leg: X Entre 2008 e 2015 + 2012 - 2013 * 2014

Em que: ¹ - $p \leq 0,05$;

Tabela A8.7 - Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 em relação ao parâmetro dos sulfatos, obtidos através do teste estatístico ANOVA unidirecional realizado com um nível de significância de 95%, indicando diferenças estatísticas quando $p\text{-value} \leq 0,05$.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Sulfatos	Alva						+ ¹	
	Besteiros						+ ¹	
	Castendo	* ²						
	S. Estrela	+ ¹						
	Silgueiros							
	T. Azurara	* ²						
	T. Senhorim							

Leg: X Entre 2008 e 2015
 + 2012
 - 2013
 * 2014

Em que: ¹ - $p \leq 0,05$; ² - $p \leq 0,01$;

Tabela A8.8 - Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2008 e 2015 em relação ao parâmetro dos sulfatos, obtidos através do teste estatístico ANOVA unidirecional realizado com um nível de significância de 95%, indicando diferenças estatísticas quando $p\text{-value} \leq 0,05$.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
Metanol	Alva							
	Besteiros							
	Castendo							
	S. Estrela							
	Silgueiros				* ¹			
	T. Azurara			X ² , * ¹				
	T. Senhorim			X ¹				

Leg: X Entre 2008 e 2015
 + 2012
 - 2013
 * 2014

Em que: ¹ - $p \leq 0,05$; ² - $p \leq 0,01$;

Anexo IX

Neste anexo encontram-se os gráficos de *boxplots* e o resultado da análise estatística ANOVA realizada com um nível de significância de 95% (que indica diferenças significativas quando $p \leq 0,05$). Por observação do gráfico de *boxplot* verifica-se que no caso do dióxido de enxofre total, este não ultrapassa o limite legal estipulado. Não foi possível observar nenhuma relação entre o dióxido de enxofre livre, com o dióxido de enxofre combinado e total. Tal foi verificado pela análise estatística realizada. Para o dióxido de enxofre combinado e total apenas se verificaram diferenças significativas para os anos de 2012 e 2014 e para o ano de 2014. No entanto, as diferenças significativas observadas são coincidentes nos dois parâmetros. As diferenças estatísticas entre Besteiros com Alva, Castendo e Serra da Estrela no ano de 2012 são igualmente coincidentes com as diferenças estatísticas verificadas no dióxido de enxofre livre. Tais diferenças não se refletem nas amostras entre 2008 e 2015 e apenas demonstram a relação, já conhecida, entre as concentrações do dióxido de enxofre livre, combinado e total.

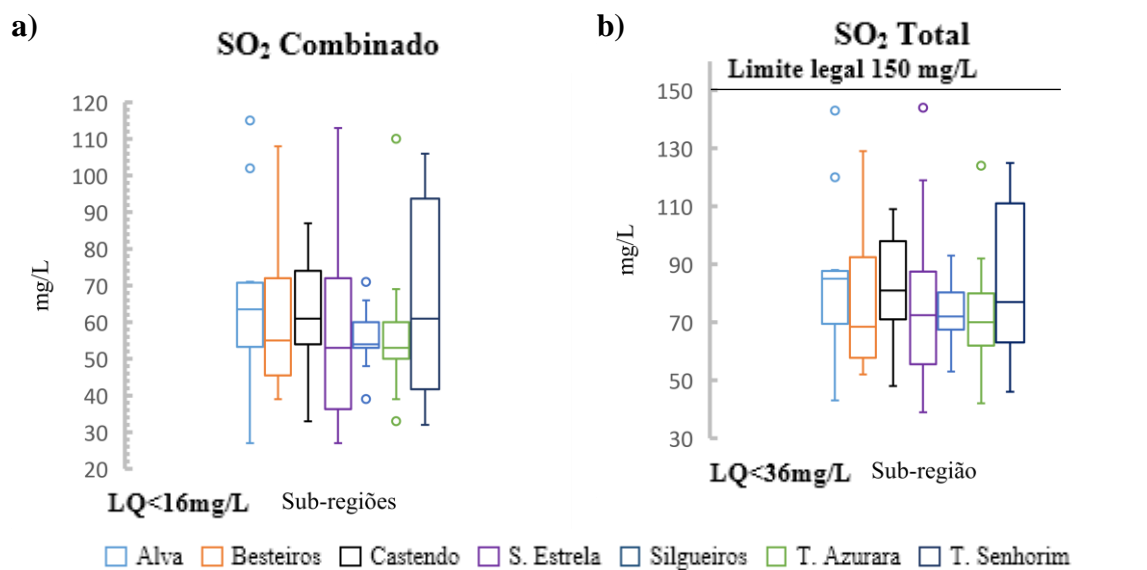


Figura A9.1 – Representação da dispersão dos resultados em relação aos parâmetros do dióxido de enxofre (SO₂) combinado e total entre as sete sub-regiões e para as amostras dos anos de colheita entre 2008 e 2015.

Tabela A.10 - Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões entre 2012 e 2014 em relação ao parâmetro do dióxido de enxofre combinado, obtidos através do teste estatístico ANOVA unidirecional realizado com um nível de significância de 95%, indicando diferenças estatísticas quando $p\text{-value} \leq 0,05$.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
SO ₂ Combinado	Alva		+ ¹					
	Besteiros							
	Castendo		+ ¹					
	S. Estrela							
	Silgueiros							
	T. Azurara				+ ¹			
	T. Senhorim			* ¹				

Leg: X Entre 2008 e 2015
 + 2012
 - 2013
 * 2014

Em que: ¹ - $p \leq 0,05$; ² - $p \leq 0,01$;

Tabela A.11 - Representação das diferenças significativas entre as sete sub-regiões para 2012 e 2014 em relação ao parâmetro do dióxido de enxofre total, obtidos através do teste estatístico ANOVA unidirecional realizado com um nível de significância de 95%, indicando diferenças estatísticas quando $p\text{-value} \leq 0,05$.

	Sub-regiões	Alva	Besteiros	Castendo	S. Estrela	Silgueiros	T. Azurara	T. Senhorim
SO ₂ Total	Alva		+ ¹					
	Besteiros							
	Castendo		+ ²					
	S. Estrela							
	Silgueiros							
	T. Azurara							
	T. Senhorim			* ²				

Leg: X Entre 2008 e 2015
 + 2012
 - 2013
 * 2014

Em que: ¹ - $p \leq 0,05$; ² - $p \leq 0,01$

