



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2016/2017

Petra Carina  
Gonçalves Grilo

Impacto da poda e das operações enológicas na  
extração dos compostos responsáveis pela cor  
dos vinhos tintos





Petra Carina  
Gonçalves Grilo

Impacto da poda e das operações enológicas na  
extração dos compostos responsáveis pela cor  
dos vinhos tintos

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 Cláudia Sofia Cordeiro Nunes do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e co-orientação da Doutora Ana Maria Lopes Rodrigues Macena, responsável pelo departamento da Qualidade e Investigação da Global Wines S.A.



O júri/ The jury

Presidente/ President

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues  
Professor Auxiliar c/ Agregação da Universidade de Aveiro

Arguente/ Arguent

Prof. Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço  
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador/ Supervisor

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes  
Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## Agradecimentos

Aos grandes responsáveis por tudo isto, agradeço esta concretização e todas as etapas até aqui, sem eles nada era possível, à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã que sempre me apoiaram incondicionalmente. Agradeço também ao Tiago pela persistência e todo o apoio na conclusão de mais uma etapa. Agradeço à Prof. Cláudia Nunes e ao Prof. Manuel Coimbra pela ajuda e determinação para a conclusão desta etapa. Agradeço em especial à Ana Rodrigues por todo o conhecimento científico, ensinamentos do dia a dia, por todos os conselhos e confiança depositada em mim ao longo destes anos. Agradeço também ao Eng. Osvaldo Amado pela oportunidade e todos os ensinamentos e a toda a equipa de enologia que me acompanhou nestes anos. Um obrigado por me tornarem a profissional que hoje sou e por fazer parte desta equipa. A todos os que me rodeiam e tornaram isto possível, obrigado.





palavras-chave

vinho tinto, cor, compostos fenólicos, poda mínima, enzimas de maceração

resumo

O contato visual é a primeira percepção que o consumidor tem com um vinho, pelo que a cor é um dos parâmetros organoléticos mais importante nos vinhos tintos tornando-se um fator de qualidade no ponto de vista do consumidor. A cor nos vinhos tintos é devida à composição em compostos fenólicos provenientes da uva e extraídos para o vinho durante a fermentação. Deste modo existe uma crescente procura por técnicas que possam otimizar, desde a vinha, a presença destes compostos na uva, bem como a sua extração eficaz para o vinho. Na viticultura, a poda mínima tem sido estudada de forma a reduzir os custos de produção mas aumentando o teor de compostos fenólicos na uva. Por outro lado, durante vinificação são utilizadas enzimas de maceração para facilitar a extração dos compostos fenólicos para o vinho.

Neste trabalho foi estudado o efeito da poda mínima e da adição de diferentes enzimas de maceração, em separado, na composição fenólica e cor do vinho tinto. A poda mínima foi estudada nas castas de Alfrocheiro e Touriga-Nacional, em dois anos diferentes, 2014 e 2016. Em 2014, as uvas da casta Touriga-Nacional provenientes da poda mínima apresentaram valores superiores nos parâmetros fenólicos, intensidade de cor e taninos, ao contrário do Alfrocheiro. No ano 2016, na poda mínima, a casta Touriga-Nacional apresentou uvas com uma composição idêntica à poda manual. No caso do Alfrocheiro, em 2016, a poda mínima apresentou maior conteúdo em compostos fenólicos. Nos vinhos provenientes dos dois tipos de poda apenas a Touriga-Nacional apresentou valores mais elevados na intensidade de cor, antocianinas coradas e pigmentos poliméricos na poda mínima. Diferentes enzimas de maceração, com concentrações de 2 e 4 g/hL, foram testadas na casta Touriga-Nacional. Apenas o vinho tratado com Vinoxym (poligalacturonase) a 4 g/hL, obteve valores superiores na extração de compostos fenólicos em relação ao vinho sem tratamento enzimático.

Considerando os resultados obtidos pode-se concluir que a poda mínima é uma prática vitícola viável, uma vez que permite obter uvas de qualidade semelhante à poda manual tendo um custo de operação mais baixo. Relativamente à utilização das enzimas comerciais, apenas a Vinoxym parece ter um impacto positivo na extração dos compostos da cor, o que levanta a questão para a real necessidade da utilização destes produtos enológicos durante a vinificação.



key words

red wine, color, phenolic compounds, minimal pruning, macerating enzymes

abstract

Visual contact is the first contact that consumer has with a wine, as color is one of the most important organoleptic parameter in red wines being a quality factor. In red wines, phenolic compounds are responsible for wine color. There is a growing interest about techniques that can optimize the presence of these compounds in the grape, as well as their efficient extraction into the wine. In viticulture, several techniques such as minimal pruning are studied in order to achieve low production costs with higher phenolic compounds content in the grape. On the other hand, in winemaking, maceration enzymes can be used to facilitate the extraction of phenolic compounds into the wine.

In this work, the effect of minimal pruning and the addition of different commercial maceration enzymes, on the phenolic composition and color of red wines were studied separately. The minimal pruning was studied in Alfrocheiro and Touriga-Nacional grape varieties, in two different years (2014 and 2016). In 2014, Touriga-Nacional grapes from minimal pruning showed higher values in phenolic parameters, color intensity and tannin, contrary to Alfrocheiro. In 2016, Touriga-Nacional grapes from minimal pruning are similar to the manual ones, whereas Alfrocheiro grapes showed higher values for phenolic parameters. In wines of Touriga-Nacional from minimal pruning higher values in color intensity, colored anthocyanins and polymeric pigments were obtained. In 2014, different enzymes were tested in Touriga-Nacional wines, at two concentrations 2 g/hL and 4g/hL. Only the wine using Vinoxym (polygalacturonase) at 4 g / hL, obtained higher values in phenolic compounds extraction than wine without enzymatic treatment.

Considering the results obtained in both years of study it can be concluded that minimal pruning is a viable viticulture practice, since it allows to obtain grapes with similar quality to manual pruning with a lower production costs. Concerning the maceration enzymes, only Vinoxym seems to have a positive impact in color compounds extraction which brings up the question of the real need of usage of these kind of products in winemaking.



# Índice

Índice de Ilustrações.....	xii
1. Revisão bibliográfica.....	1
1.1 Compostos fenólicos .....	2
1.1.1 Antocianinas.....	3
1.1.2 Taninos.....	7
1.1.3 Reações de condensação entre Taninos e Antocianinas.....	11
1.1.4 Copigmentação.....	15
1.2 Evolução dos compostos fenólicos durante a maturação da uva.....	17
1.3 Efeito da poda de inverno.....	21
1.4 Evolução dos compostos fenólicos durante a vinificação .....	23
1.4.1 Maceração .....	24
1.4.2 Aplicação de enzimas de maceração comerciais.....	25
1.5 Objetivos .....	28
2. Metodologia .....	30
2.1. Amostragem .....	30
2.1.1 Controlo de maturação .....	30
2.1.1.1 Massa volúmica.....	31
2.1.1.2 Açúcares totais .....	31
2.1.1.3 Teor alcoólico provável.....	31
2.1.1.4 Acidez total .....	31
2.1.1.5 pH.....	31
2.1.2 Controlo de maturação fenólico .....	31
2.1.2.1 Somers.....	32
2.1.2.2 Método da metilcelulose precipitável .....	33
2.2 Vinificação .....	34
2.2.1 Mosto.....	37
2.2.1.1 -Dióxido de enxofre livre (SO <sub>2</sub> L) .....	37
2.2.2 Vinho.....	37
2.2.3 Análise estatística.....	38
3. Resultados e Discussão .....	38
3.1. Controlo de maturação das uvas.....	38
3.2 Evolução dos compostos fenólicos .....	44

3.3	Efeito do tipo de poda na composição do vinho .....	49
3.3.1	Impacto da adição de enzimas comerciais na composição fenólica dos vinhos.....	55
4.	Conclusão .....	62
5.	Bibliografia .....	64

## Índice de Ilustrações

Figura 1: Estrutura base dos flavonóides (10).....	2
Figura 2: - Variação da estrutura dos flavonoides no anel C (Adaptado de Fulcrand et al. (2006) (24) ). .....	3
Figura 3: - Localização das antocianinas no bago (adaptado de Ferna et al, (29)). .....	4
Figura 4: Estrutura das antocianinas com a variação dos grupos substituintes e correspondentes nomenclaturas. ....	5
Figura 5: Reações químicas do catião flavylium em equilíbrio (adaptado de (15))......	5
Figura 6: Piranoantocianina (adaptado de (24)). .....	7
Figura 7: Localização dos taninos condensados (proantocianidinas) no bago. (adaptado de (107)).	8
Figura 8: Estruturas monoméricas dos flavan-3-óis.....	9
Figura 9: Tanino condensado (adaptado de (13)). .....	9
Figura 10: Tanino hidrolisável (adaptado de (13)). .....	10
Figura 11: Polimerização de proantocianidinas (adaptado de (37)). .....	11
Figura 12: Condensação antocianina - tanino (A-T). .....	12
Figura 13: Condensação Tanino - Antocianina (T-A). .....	13
Figura 14: Condensação mediada por grupo etilo. ....	15
Figura 15: Efeito hiperocrômico e intervalo batocrômico na copigmentação; A) Cianidina 3-glucosideo, B) Cianidina 3-glucosideo + ácido rosmarínico. ....	16
Figura 16: Biossíntese de compostos fenólicos (adaptado de (48)). .....	18
Figura 17: Evolução do teor de antocianinas e taninos ao longo da maturação. T grainha: Taninos da grainha; T película: Taninos da película (adaptado de (37)). .....	20
Figura 18: Evolução na proporção entre taninos (T) e antocianinas (A) durante a vinificação nas fases maceração pré fermentação (MpF), fermentação alcoólica (FA) e maceração pós fermentação (PfM); evolução da intensidade de cor (CI). (adaptado de (37)). .....	23
Figura 19: Esquema do processo de vinificação.....	35
Figura 20: Esquema do processo de vinificação.....	35
Figura 21:Esquema geral de vinificação, suas aplicações e análises efetuadas. DAP: fosfato de diamónio; SO <sub>2</sub> : dióxido de enxofre. ....	36
Figura 22: Quantificação de AR (g/L) em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014. ....	39
Figura 23: Quantificação do TAP% em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014. ....	39
Figura 24: Quantificação do AT (g/L) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014. ....	40
Figura 25:Quantificação do pH em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014. ....	41
Figura 26: Quantificação dos Açúcares totais (g/L) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016. ....	42
Figura 27: Quantificação dos Açúcares totais (g/L) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016. ....	42

Figura 28: Quantificação do TAP (%) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016. ....	42
Figura 29: Quantificação dos AT (g/L) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016. ....	43
Figura 30: Quantificação do pH em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016. ....	43
Figura 31: Quantificação da intensidade de cor em pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	45
Figura 32: Quantificação do índice de fenóis totais (UA) em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	46
Figura 33: Quantificação das antocianinas totais (UA) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	46
Figura 34: Quantificação dos taninos (mg/L eq. epicatequina) no dia de colheita na casta TN, no ano de 2014. ....	47
Figura 35: Quantificação da intensidade de cor em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016. ....	48
Figura 36: Quantificação do índice de fenóis totais (UA) em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016. ....	49
Figura 37: Evolução do pH em quatro diferentes etapas após o final da FA nas castas Alf (esquerda) e TN (direita). ....	50
Figura 38: Quantificação da intensidade de cor em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	51
Figura 39: Quantificação dos pigmentos poliméricos (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	52
Figura 40: Quantificação do índice de fenóis totais (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	52
Figura 41: Quantificação das antocianinas coradas (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	53
Figura 42: Quantificação das antocianinas totais (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	54
Figura 43: Quantificação dos pigmentos totais (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014. ....	54
Figura 44: Quantificação de taninos (mg/L eq. epicatequina) na casta TN, no final da FML, no ano de 2014. ....	55
Figura 45: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA)+ na casta TN, com a aplicação da enzima Vinoxym, no ano de 2014. ....	55
Figura 46: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA) na casta TN, com a aplicação da enzima Prozym, no ano de 2014. ....	55
Figura 47: Quantificação de taninos (mg/L eq. epicatequina) na casta TN, com a aplicação das diferentes enzimas nas duas concentrações escolhidas, no final da FML, no ano de 2014. ....	55
Figura 48: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA) na casta TN, com a aplicação da enzima Bioenzym, no ano de 2014. ....	55



Figura 49: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA)+ na casta TN, com a aplicação da enzima Vinoxym, no ano de 2014.....	57
Figura 50: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA) na casta TN, com a aplicação da enzima Prozym, no ano de 2014. ....	58
Figura 51: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA) na casta TN, com a aplicação da enzima Bioenzym, no ano de 2014.....	59
Figura 52: Quantificação de taninos (mg/L eq. epicatequina) na casta TN, com a aplicação das diferentes enzimas nas duas concentrações escolhidas, no final da FML, no ano de 2014. ....	60



## 1. Revisão bibliográfica

O primeiro contacto que o consumidor tem com um vinho é o contacto visual, constituindo este a primeira propriedade organolética decisiva na sua preferência. Na forma como o produto é apresentado ao consumidor as características decisivas são primeiro características extrínsecas (embalagem e rótulo) e depois características intrínsecas como a cor e turbidez, sendo que uma inicial rejeição poderá ser devida a uma cor pobre ou presença de precipitados na garrafa, bem como tonalidades não expectáveis em relação ao seu envelhecimento (1). Das diferentes formas de categorizar os vinhos, a cor é uma das formas mais vulgares de o fazer, separando-os em vinhos brancos, tintos e rosés. Estes não diferem entre si apenas na coloração, existem grandes diferenças nas restantes propriedades organoléticas, assim como na composição química (2).

A cor poderá antecipar alguma informação sobre o aroma e sabor, especialmente nos vinhos tintos, e pode também identificar a sua região e a sua identidade no que diz respeito às castas utilizadas. Por outro lado, fornece informações sobre outras características dos vinhos como o nível de oxidação, estrutura, condições de conservação, idade, entre outros. Deste modo, a cor é, talvez, o aspeto mais facilmente associado à qualidade de um vinho tinto (3).

A composição química que determina a cor dos vinhos tintos engloba várias famílias de compostos fenólicos que devido à sua elevada solubilidade e reatividade, encontram-se em elevada quantidade no sumo de uva e mais tarde estão envolvidos em inúmeras reações químicas ao longo das várias etapas de vinificação (1). A composição destes compostos fenólicos pode ser influenciada por diversos fatores incluindo as características e adaptação climática da casta, a tecnologia utilizada na vinificação, bem como as reações que ocorrem ao longo do envelhecimento, explicando a evolução natural da cor ao longo do tempo, cujo aspeto no início da vinificação pode ser muito diferente do aspeto do produto final engarrafado(2)

## 1.1 Compostos fenólicos

Uma das características mais marcantes da maturação da uva é a rápida acumulação de compostos fenólicos, metabolitos secundários do catabolismo de açúcares (4). Estes compostos, englobam várias famílias como os flavonóides e os não-flavonóides. Os não-flavonóides são incolores, no entanto podem contribuir para a cor dos vinhos através de fenómenos de copigmentação. Os compostos não-flavonóides presentes nas uvas, maioritariamente na polpa, e no vinho são ácidos fenólicos tais como o ácido hidroxibenzóico e o ácido hidroxicinâmico (5).

Os flavonóides são os compostos mais relevantes num vinho tinto do ponto de vista da qualidade. Nos flavonóides estão incluídos os flavonóis, flavan-3-ol, antocianinas e seus produtos de reação e em menor quantidade os flavanonóis e flavonas. Altos teores em flavonóis estão relacionados com elevados fenómenos de co-pigmentação e conseqüentemente uma maior estabilização da cor do vinho tinto (5,6).

O termo utilizado, fenólico ou polifenol, descreve compostos que possuem um anel benzénico substituído por vários grupos hidroxilo (-OH) (5). A estrutura base dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos polihidroxilados, A e B, compreendidos entre um anel pirano central, o anel C (7). (**Fig.1**). Devido ao seu carácter ácido, derivado dos grupos hidroxilo e ao seu carácter nucleofílico derivado do anel benzeno, estes são compostos com uma elevada reatividade (5).

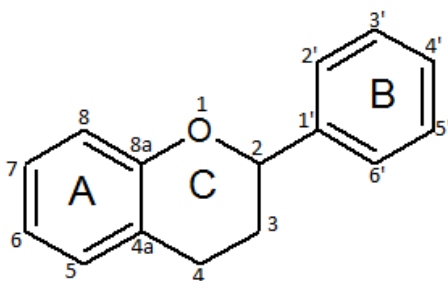


Figura 1: Estrutura base dos flavonóides (10).

No grupo de flavonoides, os compostos diferem no número e localização dos grupos hidroxilo e metoxilo no anel B (5). O número de ligações duplas (insaturação), no anel C, determina a classe de flavonoides. Um anel C completamente insaturado corresponde ao catião *pyrilium*, estrutura base das antocianinas. Um anel C completamente saturado corresponde a um flavanol, nomeadamente o flavan-3-ol, estrutura base das proantocianidinas ou também conhecidos por taninos (5,8) (**Fig.2**).

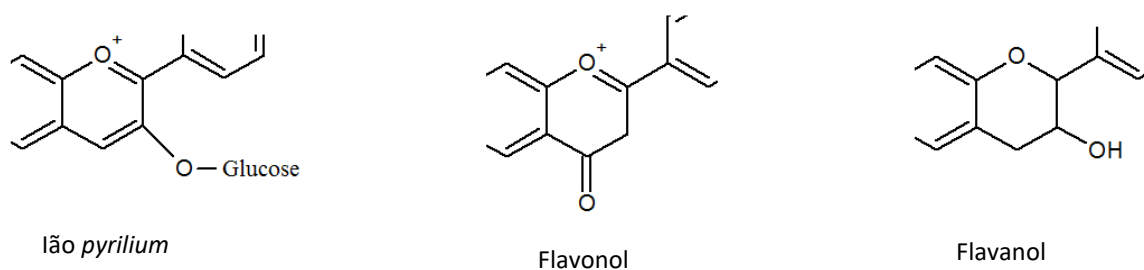


Figura 2: - Variação da estrutura dos flavonoides no anel C (Adaptado de Fulcrand et al. (2006) (24) ).

### 1.1.1 Antocianinas

As antocianinas encontram-se maioritariamente na película das uvas, mais especificamente nos vacúolos das células da película (**Fig. 3**), com a exceção das castas tintureiras em que também são encontradas na polpa, como por exemplo do Alicante-Bouschet (3,9,10). A sua síntese é iniciada no pintor e são gradualmente acumuladas ao longo da maturação (6,11). A sua extração depende da sua concentração na uva e da capacidade da película para libertar estes compostos como consequência da degradação da parede celular por enzimas pectolíticas, naturalmente existentes na uva. A localização destes pigmentos é um fator limitante na sua extração, pois constitui uma barreira física, cuja permeabilidade terá de ser promovida. A fermentação possui por si só as condições necessárias à permeabilidade desta barreira física, como é o caso do etanol no meio e o aumento das temperaturas (3,11).

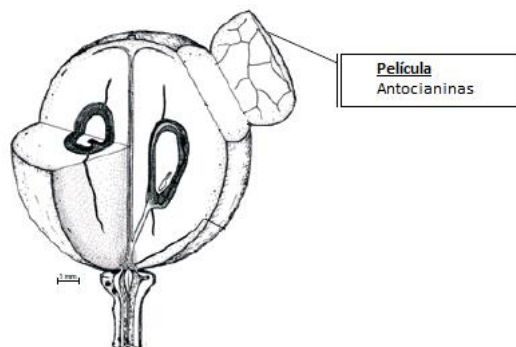


Figura 3: - Localização das antocianinas no bago (adaptado de Ferna et al, (29)).

As antocianinas são as responsáveis pela cor dos vinhos tintos tendo já sido identificadas seis antocianinas: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina, em que diferem na posição e número dos grupos hidroxilo e metoxilo (grupos R) localizados no anel B (**Fig.4**) (12). As antocianinas encontradas na uva e no vinho foram principalmente identificadas na forma 3-*O*-monoglicosídeo e 3-*O*-acetilada (5,7,13) sendo a mais abundante na uva a malvidina-3-glucosídeo (14). (14). Na espécie *Vitis vinifera* todas as antocianinas estão na forma 3-glucosídeo. Em espécies não *Vitis vinifera*, a forma 3,5-diglicéridos é muito comum. As antocianinas não ocorrem nas plantas como agliconas (antocianidinas), pois são muito instáveis; a forma 3-glucosídeo confere assim estabilidade química e solubilidade (5,14)

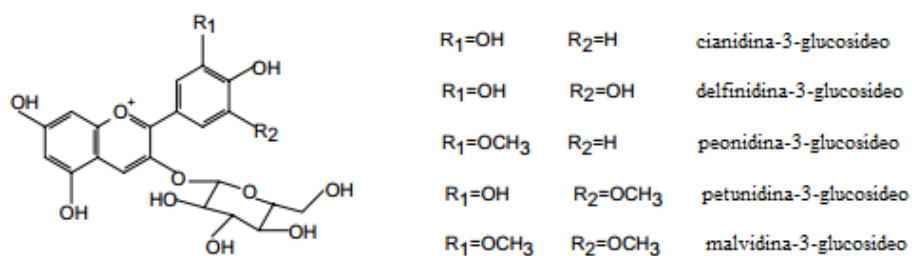


Figura 4: Estrutura das antocianinas com a variação dos grupos substituintes e correspondentes nomenclaturas.

Em meio ácido ou neutro, coexistem quatro formas diferentes de antocianinas em equilíbrio: o cátion *flavilium* (vermelho), a base quinoidal (azul), a pseudo-babe carbinol (incolor) e a calcona (incolor) (5). O equilíbrio das antocianinas divide-se em duas reações paralelas com o aumento do pH representadas na **Fig.5**:

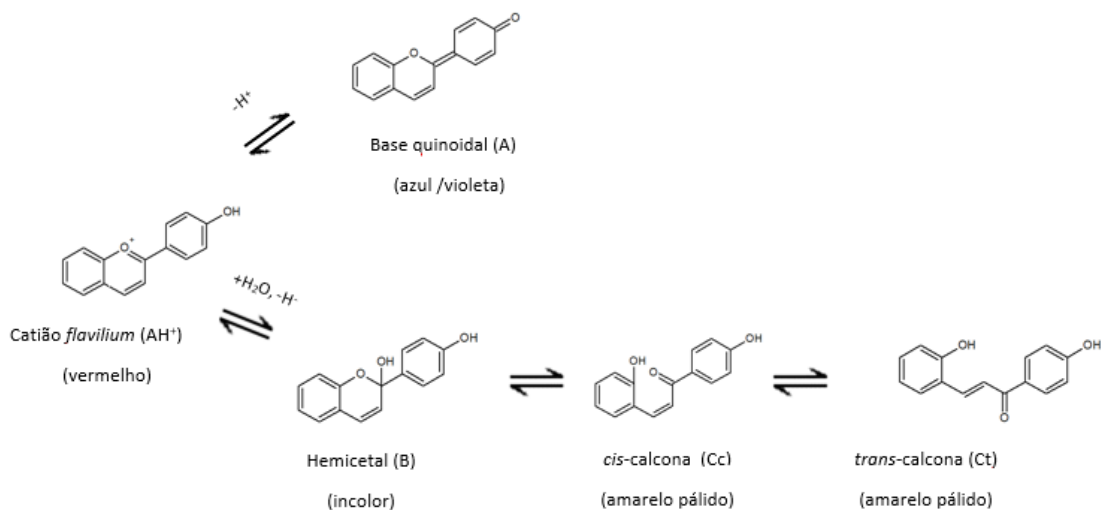
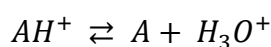
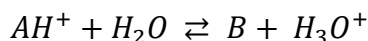


Figura 5: Reações químicas do cátion *flavilium* em equilíbrio (adaptado de (15)).

O catião *flavylium* ( $AH^+$ ), vermelho, é desprotonado com ligeiros aumentos de pH e origina uma base quinona neutra (A) com coloração azul/violeta (15,16):

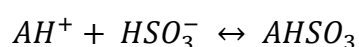


O catião *flavylium* ( $AH^+$ ) sofre hidratação na posição 2 do anel C seguida de perda de protão dando origem a uma forma hidratada hemiacetal (B) incolor:



Este tipo de reação é mais lenta que a desprotonação e requer várias horas até atingir o equilíbrio (17). A descoloração das antocianinas fica quase completa a pH 4, a qual pode ser explicada através do seu equilíbrio. O aumento de pH leva a uma progressiva perda de cor vermelha, acompanhada de uma descoloração das soluções devido à formação da pseudobase hidratada (incolor) a qual alcança um valor máximo a pH 4 (16,18). Existe também a formação da *cis*-calcona, a partir do hemiacetal, B, através de um processo tautomérico. A *cis*-calcona sofre isomerização e origina a forma *trans*-calcona. Ambas as formas, *cis* e *trans*, são pigmentos amarelo pálido (15–17,19).

Desde o final da fermentação maloláctica até ao engarrafamento do vinho, ocorrem mudanças no pH originando diminuições no teor em antocianinas devido à quebra de ligações das antocianinas e reações de estabilização com taninos. As antocianinas livres desaparecem por completo ao fim de algum tempo, no entanto o vinho continua vermelho. Isto deve-se à formação de pigmentos poliméricos com unidades monoméricas de flavan-3-ol e proantocianidinas, formação de novos pigmentos como piranoantocininas e produtos de polimerização (20,21). Estas reações são dependentes do pH, pois devido ao aumento da acidez no meio, as formas catiónicas das antocianinas e dos taninos estão mais disponíveis, favorecendo as reações de condensação (22). A descoloração de antocianinas pode também ser devida às adições de anidrido sulfuroso,  $SO_2$ , que actua como antimicrobiano, antifúngico e antioxidante. Este composto, em pH ácido, é convertido na forma de  $HSO_3^-$ , reage as antocianinas, catião *flavylium*,  $AH^+$ , na posição C4, formando um aducto incolor,  $AHSO_3$  (23–25):



Devido à sua carga positiva, os catiões *flavylium* ( $AH^+$ ) não são muito estáveis, estando envolvidos em reações com outros compostos presentes no vinho como ácido



pirúvico, acetaldeído, ácidos hidroxicinâmicos, catequinas e outros polifenóis. Estes compostos comportam-se como nucleófilos e reagem com a porção electrofílica do catião *flavilium*, originando diferentes tipos de piranoantocianinas, compostos mais resistentes à perda de cor (**Fig.6**).

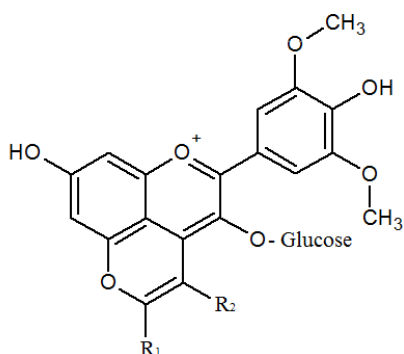


Figura 6: Piranoantocianina (adaptado de (24)).

O nucleófilo ataca o carbono 4, C4, da antocianina, formando um anel pirano adicional entre C4 e o grupo hidroxilo do C5 (24).

As antocianinas não possuem odor e quase não possuem sabor. No entanto, podem interagir com substâncias do aroma e influenciar o sabor do vinho. Têm também capacidade de reagir com outros componentes, nomeadamente com os taninos, e formar complexos estáveis (8,26).

### 1.1.2 Taninos

Enquanto as antocianinas são as grandes responsáveis pela cor dos vinhos tintos, os taninos são os grandes responsáveis pela adstringência (3). Na maioria, os taninos encontrados nos vinhos tintos, são provenientes das partes sólidas da uva, como a película e a grainha (**Fig.7**), mas também provenientes do engaço (quando utilizados na vinificação) (5,27). Estes são produzidos logo na primeira fase do crescimento da uva, ao contrário das

antocianinas que são produzidas apenas a partir do pintor (6). Embora estes compostos sejam incolores, no processo de vinificação vão reagir com as antocianinas de modo a originarem novos pigmentos, mais estáveis e coloridos, os pigmentos poliméricos, ou mesmo polimerizar entre si originando macromoléculas, os taninos condensados (28–30). Estes são denominados por proantocianidinas devido à produção de antocianidinas quando aquecidos em meio ácido que resultam na quebra de ligações interflavânicas (5,10,30,31).

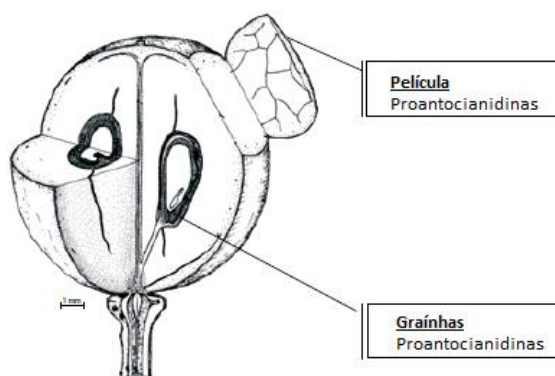


Figura 7: Localização dos taninos condensados (proantocianidinas) no bago. (adaptado de (107)).

As proantocianidinas são unidades de flavan-3-ol constituídas por monómeros de (+)-catequina e (-)-epicatequina, designadas por procianidinas, e monómeros de (-)-epigalocatequina, designadas por prodelfidinas (**Fig.8**), por vezes esterificadas por ácido gálico. A composição varia com a localização dos taninos na uva (5).

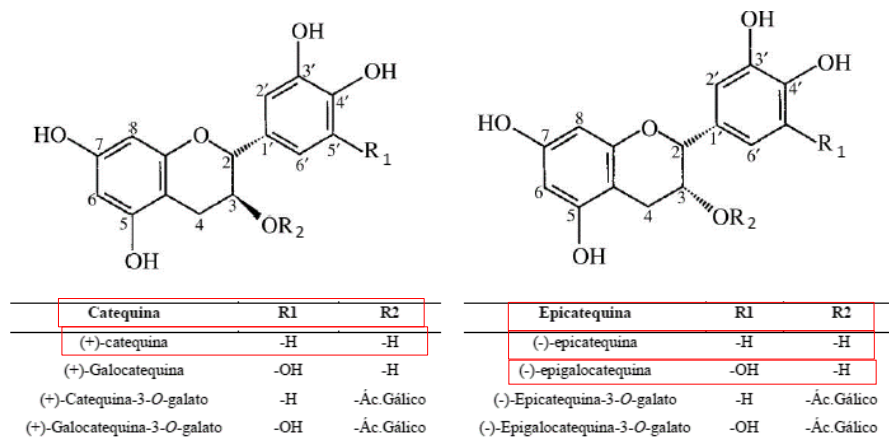


Figura 8: Estruturas monoméricas dos flavan-3-óis.

As procianidinas são encontradas tanto na película como na grainha, já as prodelfidinas estão apenas localizadas na película (21,32). Independentemente do tecido, o monómero (-)-epicatequina é o monómero mais presente nos taninos da espécie *Vitis vinifera* e as proantocianidinas representam a forma polimérica mais abundante dos flavan-3-ol (5,33). Os taninos encontrados no vinho podem ser taninos condensados, de origem natural na uva, ou taninos hidrolisáveis devido à aplicação de produtos enológicos, madeiras ou através do envelhecimento em barricas (34). Os taninos condensados (**Fig.9**) são moléculas que possuem a capacidade de precipitarem proteínas em solução ricas em prolina (3,35).

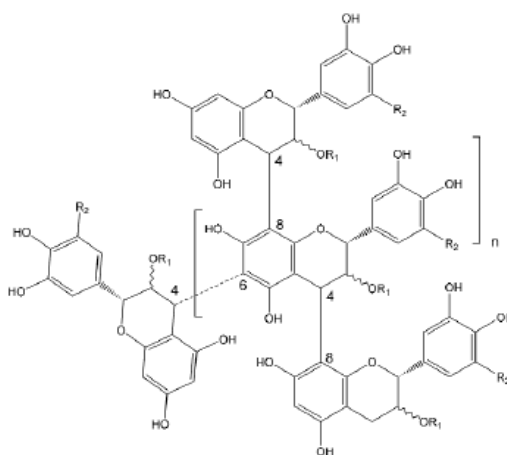


Figura 9: Tanino condensado (adaptado de (13)).

Devido a esta característica, que os outros compostos fenólicos não possuem, os taninos, juntamente com proteínas presentes na saliva, estão envolvidos na sensação de adstringência dos vinhos, sensação de boca seca ou áspera (33).

Os taninos hidrolisáveis (**Fig.10**), ou taninos enológicos, não estão presentes naturalmente na uva, mas podem ser encontrados noutras plantas como é o caso da madeira de carvalho francês ou americano. Estas madeiras podem ser aplicadas na vinificação deixando passar para o vinho taninos hidrolisáveis, libertando ácido elágico após hidrólise ácida. Várias razões levam à presença de taninos enológicos durante as vinificações, nomeadamente uma melhoria da cor e estabilização dos pigmentos. Estes taninos enológicos podem fornecer pigmentos que reagem direta ou indiretamente com antocianinas levando à produção de pigmentos mais estáveis, mais resistentes à hidratação e à descoloração pelo SO<sub>2</sub>, e possibilitando ainda reações de copigmentação (1).

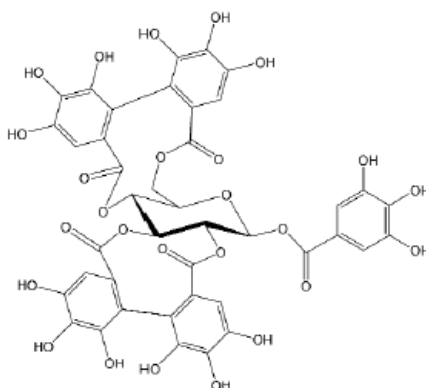


Figura 10: Tanino hidrolisável (adaptado de (13)).

Ao longo do processo de vinificação, também as formas monoméricas dos taninos, flavan-3-ol, diminuem dando lugar às espécies polimerizadas (2). Os taninos são considerados moléculas volumosas devido às reações de polimerização, através de ligações interflavânicas entre os carbonos C4-C8 ou C4-C6, que ocorrem espontaneamente no vinho, em meio ácido, à temperatura ambiente (**Fig. 11**).

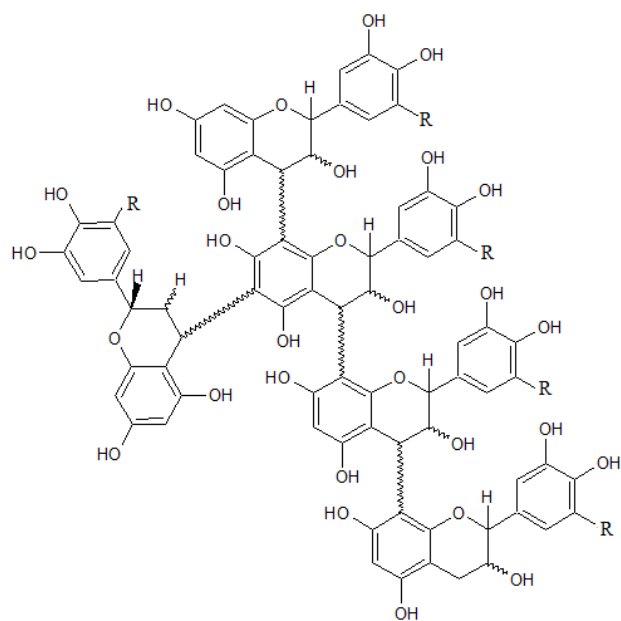


Figura 11: Polimerização de proantocianidinas (adaptado de (37)).

Estas reações são favorecidas a pH 2,0 (5). O grau de polimerização dos taninos afeta a sua reatividade. Os taninos condensados necessitam ser suficientemente volumosos para produzir combinações estáveis com as proteínas, mas se forem demasiado volumosos não conseguem aceder aos sítios ativos da proteína. Na boca, a interação entre o tanino e a proteína da saliva resulta numa saliva mais pobre em propriedades lubrificantes e uma maior fricção entre as superfícies da boca o que ativa mecano-receptores levando à percepção de uma sensação de secura mais vulgarmente conhecido como adstringência (36,37).

### 1.1.3 Reações de condensação entre Taninos e Antocianinas

A proporção relativa de antocianinas e flavanóis nas uvas depende da casta, mas pode ser modificada pelo meio ambiente e condições de vinificação. As espécies monoméricas na sua forma catiónica aumentam de acordo com o aumento da acidez, estando mais disponíveis para reações de condensação (22). Estas duas estruturas condensam espontaneamente à temperatura ambiente, ao pH do vinho, tendo sido identificados três tipos de reações:

## Reações de condensação direta:

### Condensação de Antocianinas – Taninos (A-T), (Fig. 12):

A antocianina na forma de cátion *flavilium* ( $A^+$ ) funciona como electrófilo e o tanino na forma de proantocianidina (T) funciona como nucleófilo possuindo os carbonos C6 e C8 parcialmente carregados negativamente originando o complexo A-T entre os carbonos C4 da antocianina e C6/C8 da proantocianidina. Este complexo é um flaveno incolor que pode sofrer uma oxidação retomando a forma de cátion *flavilium* vermelho e ainda sofrer desidratação levando à formação do cátion xantilium, laranja avermelhado (5,24).

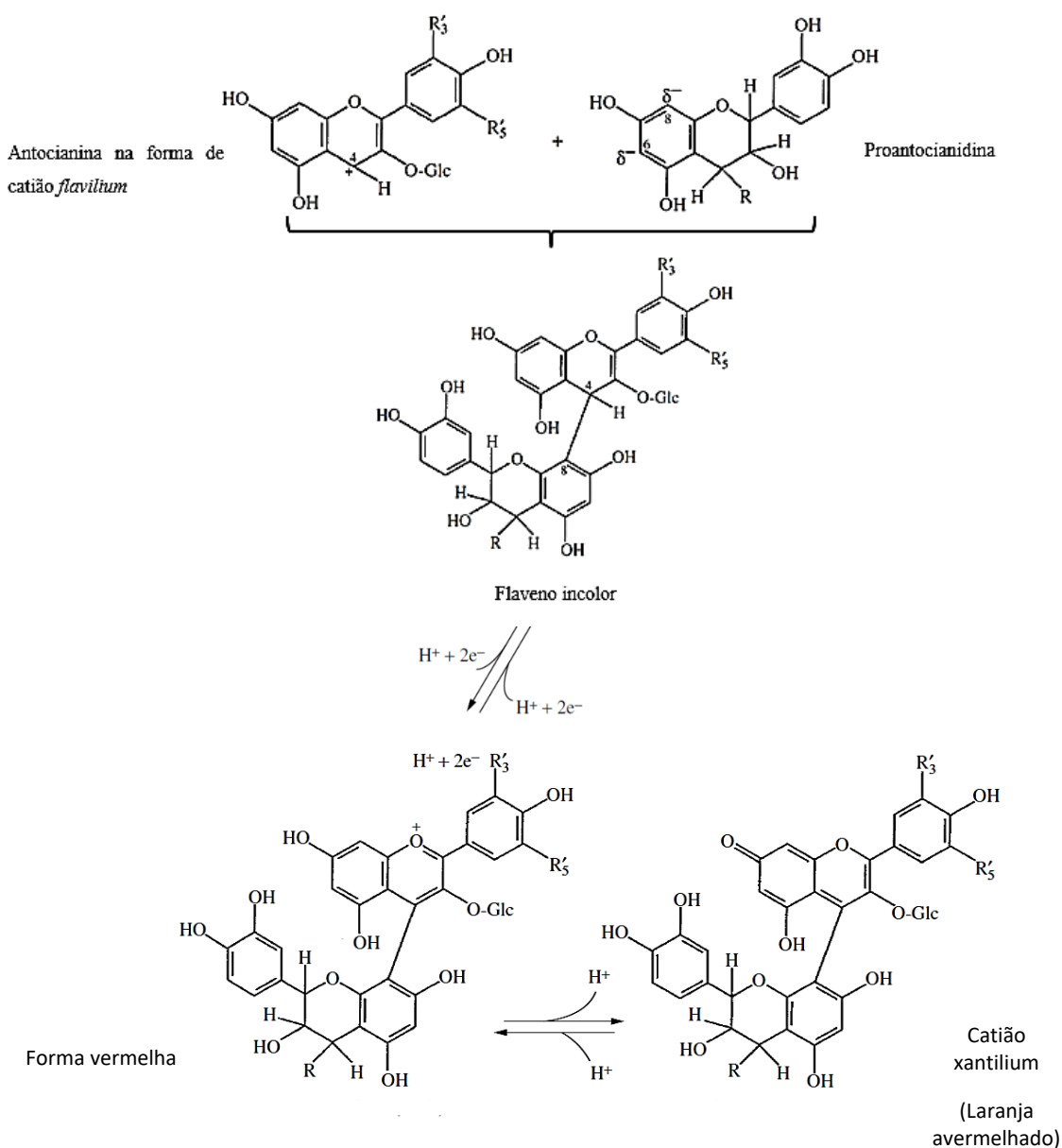


Figura 12: Condensação antocianina - tanino (A-T).

Condensação Tanino – Antocianina (T-A), (**Fig. 13**):

Neste tipo de condensação, a proantocianidina depois de protonada gera um carbocátion que reage com os sítios nucleofílicos da forma hemicetal hidratada das antocianinas, C6 ou C8. O complexo formado é incolor, o qual pode sofrer uma desidratação, independentemente das condições do meio, formando um complexo laranja-avermelhado estável (5).

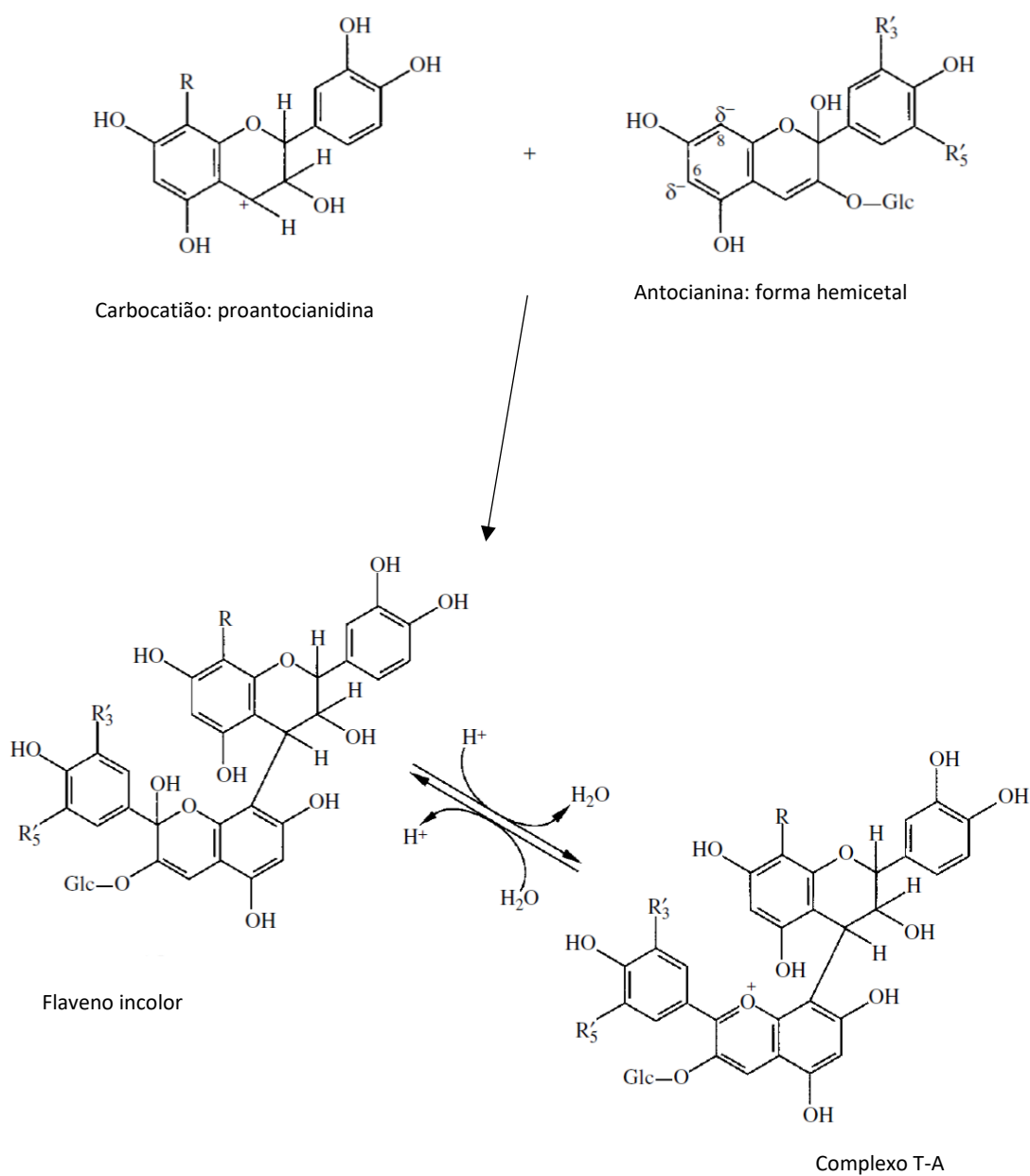


Figura 13: Condensação Tanino - Antocianina (T-A).

### **Reações de condensação indireta:**

Condensação com uma ligação etilo mediada por acetaldeído:

A oxidação de compostos fenólicos produz componentes não fenólicos como etanol e ácido tartárico, promovendo reações de condensação entre antocianinas e taninos e também a polimerização de taninos. Alguns compostos como o acetaldeído, são compostos presentes no vinho, derivado do metabolismo das leveduras no decorrer da fermentação alcoólica e da oxidação do etanol em etapas seguintes associada à autooxidação de polifenóis. Estes compostos estão também envolvidos nas reações de condensação (18). O acetaldeído, na sua forma de carbocatião, reage com o flavanol nas posições C6 ou C8 que por conseguinte, após a perda de uma molécula de água, o produto desta condensação origina dímeros de flavanol incolores ligados por pontes etilo (5). Esta espécie com a adição de acetaldeído fica sujeito a hidrólise com possibilidade de formação de um carbocatião suscetível ao ataque nucleofílico de outro flavanol ou antocianinas na forma hemiacetal, promovendo a condensação de A-T, T-T ou A-A, (**Fig.14**), (5,24,37,38). O acetaldeído pode também estar envolvido nas reações entre antocianinas e taninos cujo mecanismo aumenta a estabilidade da cor nos vinhos (1).



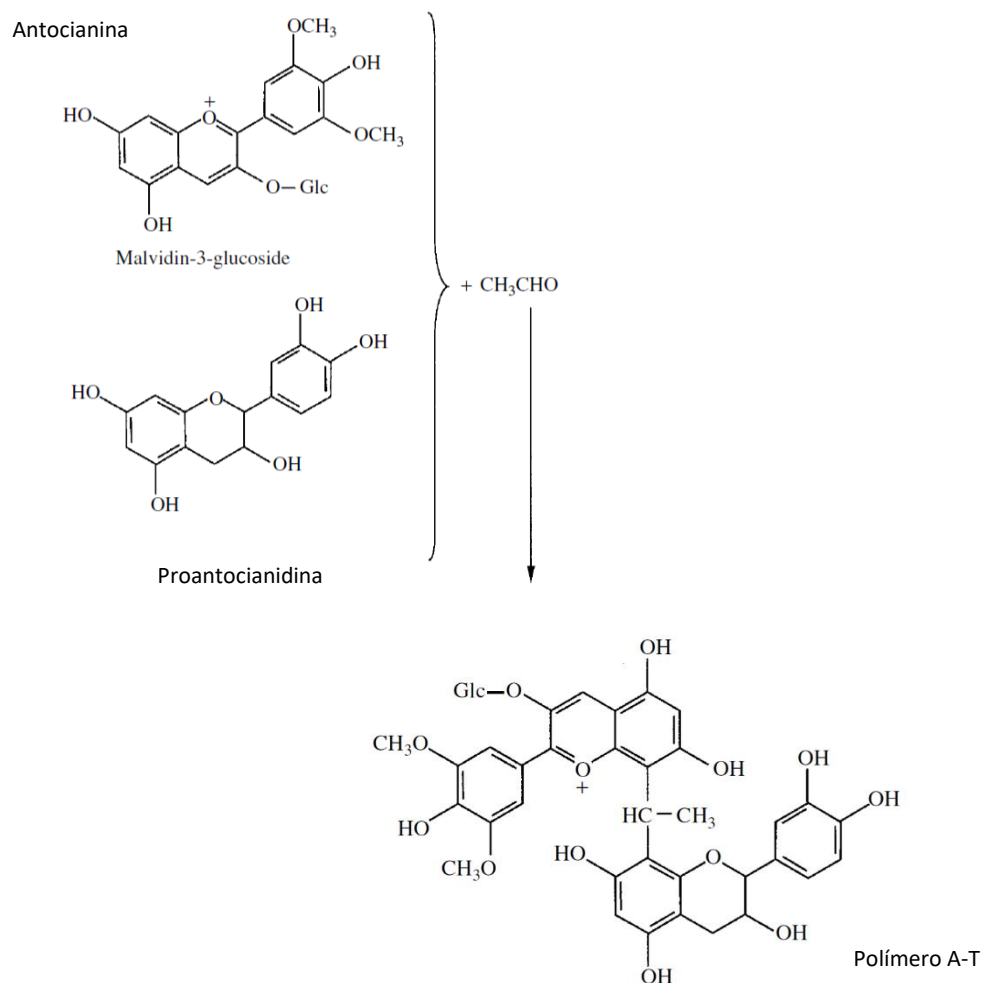


Figura 14: Condensação mediada por grupo etilo.

#### 1.1.4 Copigmentação

A cor dos vinhos tintos não é apenas conferida pelos teores e perfis das antocianinas, bem como, a estabilidade da cor depende, não apenas da concentração de antocianinas, mas também de fenômenos intermoleculares, quando associadas com outros compostos e auto-associação de antocianinas monoméricas (39,40). A copigmentação é um exemplo de fenômenos intermoleculares que pode contribuir entre 30% a 50% de cor nos vinhos tintos novos (27,40,41). A copigmentação nos vinhos resulta de interações moleculares hidrofóbicas entre antocianinas monoméricas e outras moléculas orgânicas

(geralmente incolores), denominadas de cofatores, formando associações moleculares ou complexos (28,40,42). Os cofatores mais comuns incluem uma variedade de compostos, como ácidos fenólicos, flavonóides, e particularmente derivados de flavonóis e subgrupos flavona, aminoácidos e alcalóides, e ainda as próprias antocianinas quando as suas concentrações forem elevadas (auto-associação) (27,40,41). Mirabel *et al*, (1999) citou alguns cofatores como sendo bons cofatores e maus cofatores no sentido de um aumento ou diminuição da intensidade de cor, respetivamente. Nos bons cofatores enumerou alguns flavonóis, rutina e quercetina, e proantocianidinas. Nos maus cofatores referiu a (-)-epicatequina e (+)-catequina. Certos cofatores podem forçar o equilíbrio na direção de uma diminuição na intensidade de cor. Esta chamada anti-copigmentação revelou um decréscimo na cor que pode ter resultado de certas combinações com compostos fenólicos, principalmente compostos provenientes da gráinha (41). Os fenómenos de copigmentação dependem de diversos fatores como pH, concentração, temperatura e estrutura das antocianinas que deverá ser estequiometricamente favorável para associação com outras moléculas (39). Este processo resulta num aumento da absorvância na gama do visível, efeito ou intervalo hiperacrómico, isto é, aumenta a intensidade de cor, e um intervalo positivo no comprimento de onda máximo de absorvância, intervalo batocrómico, onde o máximo de absorvância torna-se mais elevado, também chamado de “bluing effect” pois verifica-se uma mudança de cor nas antocianinas de vermelho para mais azul (Fig.15), (31,41,43).

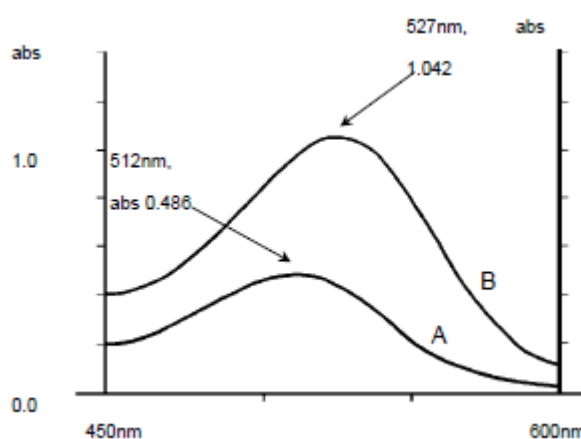


Figura 15: Efeito hiperacrómico e intervalo batocrómico na copigmentação; A) Cianidina 3-glucosídeo, B) Cianidina 3-glucosídeo + ácido rosmarínico.

Durante o envelhecimento as antocianinas copigmentadas diminuem, enquanto as antocianinas polimerizadas aumentam em todos os vinhos tintos observando-se consequentes mudanças na cor. A reação das moléculas de antocianinas nos complexos de copigmentação é configurado em forma de “sandwich” limitando a hidratação destas moléculas e consequentemente a formação de formas hidratadas incolores (calcona ou pseudobase carbinol) permitindo uma maior estabilidade da cor (40,41).

## 1.2 Evolução dos compostos fenólicos durante a maturação da uva

A biossíntese de compostos fenólicos nas plantas, neste caso na uva, embora sejam metabolitos secundários, está associada ao metabolismo primário. A síntese destes compostos é feita via ciclo do xiquimato e via geral dos fenilpropanóides, uma das vias mais bem caracterizadas nas plantas. No entanto são necessários metabolitos intermediários no metabolismo dos açúcares (4). Na glicólise, o fosfoenolpiruvato que é posteriormente transformado em piruvato como produto final da glicólise, alternativamente pode entrar na via do ácido xiquímico juntamente com a eritrose-4-fosfato. Estes dois compostos condensam dando origem ao xiquimato e posteriormente ao corismato. Este último composto é um ponto de ramificação para a biossíntese de aminoácidos aromáticos, como é o caso da fenilalanina, composto de partida na via dos fenilpropanóides (44). A fenilalanina é desaminada pela fenilalanina amônia-liase (PAL), dando origem ao ácido cinâmico (45,46). O ácido *trans*-cinâmico pode dar origem a ácidos benzóicos ou ser transformado em ácido *p*-coumárico, o qual pode ser convertido pela Coenzima-A (CoA) e formar o composto *p*-coumaril-CoA. Este último composto juntamente com 3 moléculas de malonil-CoA origina calconas, catalisado pela calcona sintase (CHS). As moléculas de malonil-CoA dão origem a três moléculas de acetato que originam o anel aromático A e por sua vez o anel B e os átomos 2, 3 e 4 do anel C são formados a partir do precursor do fenilpropanóide (46). Posteriormente, a calcona é isomerizada pela calcona isomerase (CHI), originando flavanonas. A estrutura base das flavononas é então precursor das flavonas, isoflavonas e flavonóis ou pode ser utilizada para originar antocianinas e taninos via dihidroflavonóis, (**Fig. 16**) (47).

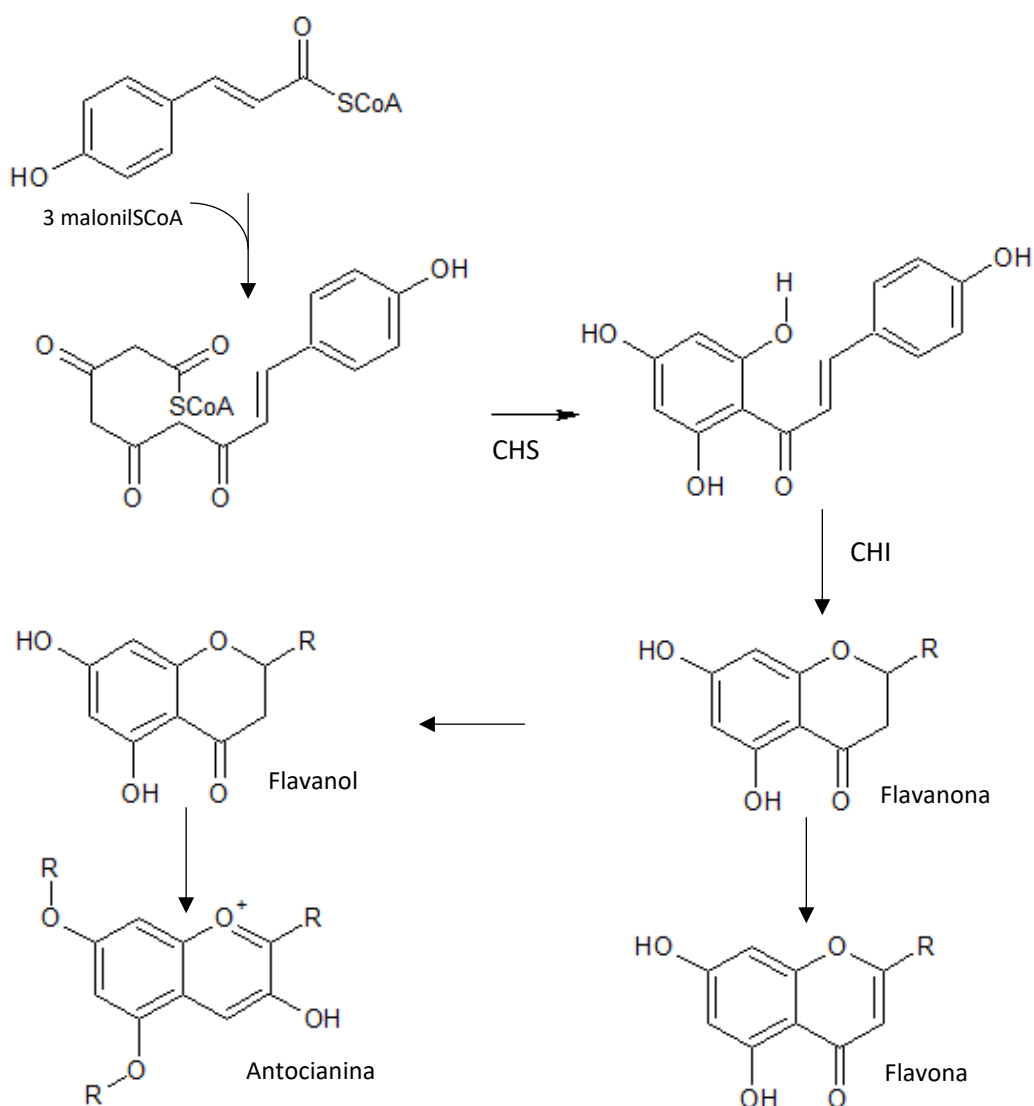


Figura 16: Biossíntese de compostos fenólicos (adaptado de (48)).

A data de colheita das uvas é determinante para a qualidade dos vinhos, não apenas pela maturação tecnológica, considerando açúcares e ácidos, mas também pela maturação fenólica, considerando a composição fenólica das uvas, especialmente a concentração de taninos e antocianinas (11,49). As mudanças que ocorrem na maturação não ocorrem simultaneamente e evoluem de forma diferente. Esta evolução é influenciada pela zona geográfica, fatores genéticos e ainda por práticas de viticultura diferentes. Os compostos fenólicos não evoluem da mesma forma que os açúcares, pois a sua concentração máxima

não coincide com o máximo de acumulação de açúcares, sendo necessário o controlo de maturação fenólica acrescido ao controlo de maturação tecnológico (49–52).

Os compostos fenólicos presentes na película aumentam desde a fase de mudança de cor, denominada por pintor, até à maturação completa. Na grainha, os teores de compostos fenólicos diminuem ligeiramente dependendo das concentrações iniciais, as quais variam de casta para casta. Algumas castas possuem naturalmente teores baixos, como é o caso de Cabernet-Sauvignon, enquanto outras possuem teores mais altos, como Pinot-Noir (37). A adaptação de certas castas a diferentes condições climáticas e a diferentes tipos de solos podem influenciar o grau de acumulação e extração de compostos fenólicos na uva, como é o caso dos anos mais secos e mais quentes, que acumulam um maior teor de polifenóis (11,51,53–55).

O conceito de maturação fenólica não consiste apenas nas concentrações dos compostos, mas também na sua estrutura e capacidade de serem extraídas das uvas durante a vinificação (37). Algumas das mudanças associadas à maturação das uvas são alterações ao nível das paredes celulares da película e polpa devido à ação de enzimas pectolíticas. Estas enzimas hidrolisam as pectinas da parede celular tornando-a permeável. A degradação das paredes celulares aumenta com a maturação da uva (56,57). Contudo, nem sempre o máximo de capacidade de extração coincide com o máximo de teor de compostos fenólicos na película da uva (50). Ainda assim é difícil determinar um critério para decidir a colheita. Utilizando os resultados das antocianinas como limite de maturação, geralmente a colheita é marcada para antes do decréscimo normal do teor de antocianinas de modo a obter vinhos com maior intensidade de cor (50,57,58). As variações nas concentrações nestes compostos fenólicos monoméricos presentes nas uvas durante o período de maturação, exibem 2 fases: um aumento por volta do pintor, seguido de um decréscimo por volta da maturação (59). Normalmente, no máximo da maturação tecnológica, estes compostos fenólicos estão já numa fase de decréscimo (53). As antocianinas iniciam a sua acumulação no pintor, etapa onde surge cor nos bagos das uvas tintas, atingindo o seu máximo de concentração na fase de maturação completa. Durante a maturação, numa primeira fase, aumentam gradualmente, seguido de um rápido aumento na segunda fase (**Fig. 17**) (39).

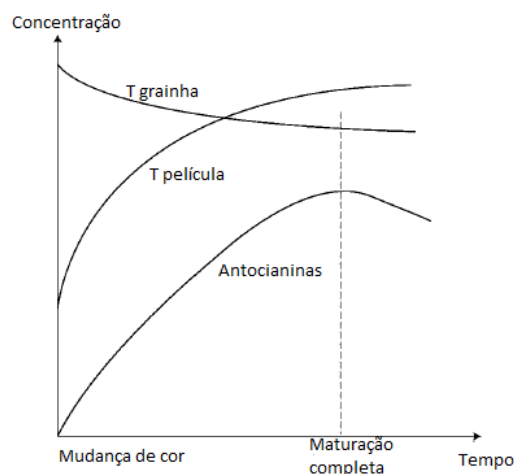


Figura 17: Evolução do teor de antocianinas e taninos ao longo da maturação. *T grainha*: Taninos da grainha; *T película*: Taninos da película (adaptado de (37)).

As concentrações de antocianinas no bago podem ser afetadas pela temperatura. Baixas temperaturas levam a uma maior produção de antocianinas, enquanto altas temperaturas demonstram uma maior degradação de antocianinas na película do bago (4).

Os taninos condensados presentes nas películas da uva diferem dos presentes na grainha, tanto pelas concentrações iniciais como pela presença de prodelídnas. Apesar das grainhas apresentarem maiores concentrações de taninos condensados, os compostos presentes nas películas, devem ser mais facilmente extraídos durante a vinificação, dada a sua localização e uma maior solubilidade e polaridade das prodelídnas quando comparadas com as procianidinas (9). Ao longo da maturação os taninos da grainha diminuem aumentando a proporção dos taninos da película (53). Nos taninos, a extração está relacionada com uma solubilidade limitada em etanol assim a extração aumenta com o aumento de teor alcoólico durante a vinificação (3). No ponto de maturação completa as antocianinas atingem o seu pico de concentração, ainda assim, neste ponto, atingem menores concentrações que os taninos da película e que os taninos da grainha (37).

### 1.3 Efeito da poda de inverno

Um dos fatores que influencia a maturação da uva e conseqüentemente as concentrações de compostos fenólicos presentes na altura da colheita são as diversas operações de viticultura e em particular a poda. Na generalidade o termo “poda” refere-se especificamente à poda de inverno. Por definição, a poda de inverno compreende a remoção dos sarmentos, ladrões, folhas e outras partes vegetativas da videira (60). A poda é a operação vitícola mais importante do ciclo anual, e é feita de forma a regular o nível de produção da videira e orientar o crescimento da planta (61,62). Uma das maiores motivações no desenvolvimento de sistemas de poda alternativos à poda manual é a redução ou otimização de custos, associado à escassez de mão-de-obra e elevados custos da poda manual. Os sistemas de poda variam de acordo com o país, região e casta, no entanto a poda manual é ainda um trabalho intensivo uma vez que remove por volta de 85 a 90% do crescimento anual da videira (63). A adoção de podas mecânicas em várias regiões e condições parece não ter um impacto negativo na qualidade do vinho, exceto onde a produção excede a capacidade da videira, diminuindo em boa parte os custos de produção sem comprometer a qualidade do produto final (35,64).

A poda mínima é baseada num cordão simples com um único arame. As varas não são podadas exceto a um nível definido abaixo do arame para impedir o contacto com o solo (65). Este tipo de poda, naturalmente leva a uma maior carga à poda, desenvolvimento precoce da área foliar, obtenção de maior área foliar total, maior número de cachos, embora com bago menor em relação à poda manual, e maior produção (66,67). É referido que na poda mínima a videira demonstra capacidade para, através da autorregulação, controlar a carga excessiva, manter a sua forma, produtividade e qualidade de produção sendo também adequado para colheita mecânica (35,65). Estudos ao longo de 15 anos na Austrália mostraram que videiras não podadas ou utilizando poda mínima aumentara 60% a sua produtividade sem efeitos prejudiciais na maturação das uvas, sendo um tipo de poda já utilizada na produção de vinhos há mais de 30 anos (68). Outros estudos acerca destes sistemas revelaram que a videira tem a capacidade, através de um crescimento equilibrado, de possuir uma distribuição favorável de pequenos cachos de modo a controlar algumas

doenças, uma mais fácil colheita mecânica e conseqüentemente uma melhor qualidade, desde que atinja os níveis de açúcar adequados. O tamanho do bago pode ser reduzido até 30% comparado com a poda manual (64,65,67). Comparando a poda mínima com podas mais intensivas, a poda mínima produz, em maturações idênticas, mostos com uma melhor composição de ácidos orgânicos, cor mais intensa e teores mais elevados de polifenóis produzindo vinhos com teores alcoólicos mais baixos (64). Cruz *et al.* (35), em três anos de estudo observaram pequenas diferenças analíticas entre modalidades, poda manual e poda mínima, nos parâmetros das uvas e conseqüentemente no vinho. Este estudo foi feito em 3 anos, em que nos primeiros dois anos as diferenças na intensidade de cor foram mínimas, e no último ano observou-se uma redução em 2 pontos na intensidade da cor. Ainda assim sugeriram a viabilidade da poda mecânica, com redução de trabalho manual e maior rendimento. Outros estudos observaram que as videiras com poda mínima atingiam a mesma maturação que a videira controle (poda manual), onde os açúcares acumulados na poda mínima eram 25% abaixo do controle, daí obterem teores alcoólicos mais baixos, os níveis de ácido tartárico por bago não revelavam qualquer diferença, indicando que podem alcançar a maturação com níveis de açúcares mais baixos. Porém a poda mínima continha níveis de antocianinas mais baixos (-26%) e de índice de fenóis totais (-22%). Avaliando o vinho duas semanas após o engarrafamento em que o teor alcoólico se revelou igual nas duas modalidades com maior acidez, pH mais baixo, e obtendo vinhos com menos cor na poda mínima (-31%) (68). Poni *et al* (62) observou na poda mínima, reduções notáveis no número e peso dos bagos por cacho com uma maturação tecnológica, ponto em que não aumentam mais açúcares nem diminui mais o teor em ácidos, idêntica, possuindo um teor de sólidos solúveis e acidez total ligeiramente menor à poda manual. Outros estudos (69) referem que a maturação tecnológica da poda mínima apresenta um ligeiro atraso devido à maior produção. A maioria dos estudos mostraram que, na poda mínima, a concentração de açúcar, assim como o pH foram reduzidos e a concentração de ácidos totais aumentou. Em termos de cor, sabor e qualidade do vinho, os resultados foram variáveis dependendo do clima e vigor (67)



#### 1.4 Evolução dos compostos fenólicos durante a vinificação

Durante a vinificação, a extração de compostos fenólicos é promovida pela maceração. Pode ocorrer maceração numa fase de pré-fermentação, durante a fermentação alcoólica (FA), e na pós-fermentação. Tanto as antocianinas como os taninos são compostos instáveis que interagem entre si e com outras espécies ao longo da vinificação e do envelhecimento dos vinhos tintos alterando cor e sabor (30). Ao longo da pré-fermentação a extração de taninos e antocianinas aumenta. Nos primeiros dias da fermentação alcoólica há um pico na intensidade de cor devido à extração de antocianinas na forma *flavylium*. Estas antocianinas decrescem até estabilizarem numa fase após FA. Ao longo da vinificação as formas livres das antocianinas vão diminuindo devido a reações de condensação e formação de pigmentos poliméricos. Os taninos condensados aumentam gradualmente durante a FA. À medida que a FA decorre, as unidades de flavanóis condensam formando taninos condensados. Na fase pós-FA há uma estabilização de ambos os compostos e consequentemente do índice de cor, (**Fig.18**), (37).

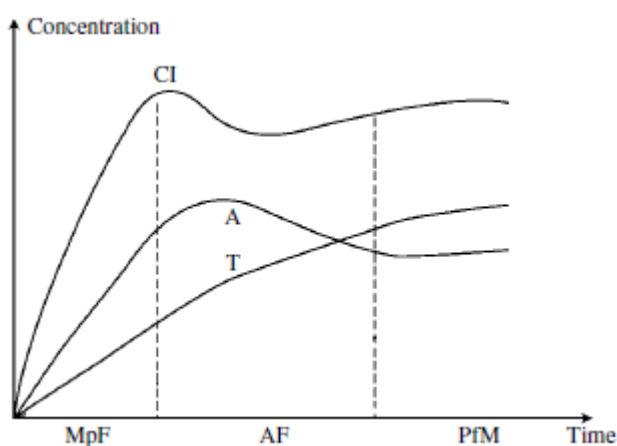


Figura 18: Evolução na proporção entre taninos (T) e antocianinas (A) durante a vinificação nas fases maceração pré fermentação (MpF), fermentação alcoólica (FA) e maceração pós fermentação (Pfm); evolução da intensidade de cor (CI). (adaptado de (37)).

Para além da fermentação alcoólica, os vinhos tintos passam pela fermentação maloláctica (FML), fermentação geralmente conduzida bactérias lácticas, levando a uma redução de acidez no meio (70). Esta desacidificação do meio deve-se à conversão de ácido L-málico em ácido L-láctico e dióxido de carbono, resultando num aumento do pH

no vinho. Este aumento de pH, pode causar a deslocalização do equilíbrio ácido-base das antocianinas levando a uma diminuição de cor após a FML através da conversão do catião *flavylium*, forma vermelha, na base quinoidal, forma azul/violeta (71–74). Após a FML o pH tende a estabilizar.

#### 1.4.1 Maceração

As uvas, especialmente as suas películas, possuem um grande número de diferentes compostos fenólicos que são parcialmente extraídos durante a vinificação (60). Na vinificação tradicional, a maceração é espontânea durante a fermentação (61). A fermentação alcoólica ocorre produzindo etanol, que sendo melhor solvente que a água participa na dissolução dos compostos fenólicos extraídos.

A maceração consiste na rutura das células da uva e consequente libertação de enzimas que facilitam a extração dos compostos fenólicos e a sua solubilização no mosto e vinho (61). Apenas cerca de 40% das antocianinas e 20% dos taninos presentes nas películas das uvas são transferidos para o vinho durante uma vinificação tradicional, devido principalmente à fraca permeabilidade da parede celular e membrana citoplasmática (37,75). A extração de antocianinas requer que a lamela média rica em pectina seja degradada e que as paredes celulares sejam quebradas de modo a permitir que células sejam libertadas e que o conteúdo dos vacúolos seja extraído ou solubilizado no vinho (58).

De modo a ajustar os níveis de extração durante a maceração existem operações tecnológicas disponíveis que atuam na destruição de tecido e favorecem a dissolução dos compostos fenólicos, como é o caso do aumento do tempo de maceração, da temperatura da maceração e também da promoção de reações enzimáticas através da adição de enzimas comerciais (5).

#### 1.4.2 Aplicação de enzimas de maceração comerciais

O envelope das células da película da uva, a parede celular e a membrana citoplasmática, limitam e previnem a libertação de compostos fenólicos para o mosto durante a fermentação. A estrutura da parede celular compreende três diferentes camadas sobrepostas, nomeadamente a cutícula, uma camada externa, coberta por ceras hidrofóbicas, subjacente à epiderme, constituída por uma ou duas camadas de células com um revestimento regular, que por sua vez é separada da polpa pela hipoderme, constituída por um número variável de camadas de células (60,76). A maioria dos compostos fenólicos situa-se dentro das células da hipoderme. As paredes celulares são compostas por, maioritariamente, 90% de polissacarídeos, nomeadamente pectinas, celulose e hemiceluloses, e 10% de proteínas (76,77). Os polissacarídeos pécticos da uva são divididos em dois grupos: polissacarídeos ricos em arabinose e galactose (PRAGs) e polissacarídeos ricos em ramnogalacturonana II (RG-II) (78). Os polissacarídeos pécticos, como as ramnogalacturonanas são de carácter ácido, denominados também por pectinas e as arabinanas, galactanas e arabinogalactanas são de carácter neutro. Em todo o tipo de frutas, a presença de pectinas é acompanhada por uma mesma extensão de enzimas capazes de quebrar as ligações entre elas. As enzimas representam um papel importante no processo de vinificação. Muitas destas enzimas são enzimas da microflora da própria uva e de microorganismos presentes naturalmente na vinificação (79). A rutura das células da uva e consequente libertação de enzimas facilita a libertação e solubilização dos compostos ligados às células da película, polpa e grainha, como os compostos fenólicos (61). A enzima é um catalisador com dupla especificidade, a do substrato sobre o qual atua e a da natureza da reação que favorece. As enzimas que facilitam a extração durante a vinificação são as hidrolases, sobretudo pectinases (80). A eficiência destas enzimas pectolíticas na extração da cor tem sido alvo de muitos estudos. No entanto, os resultados dos efeitos das enzimas nas frações de polissacarídeos são limitados. A quantidade de polissacarídeos extraídos e consequente extração de compostos fenólicos depende também do processo de vinificação (81). As pectinases são enzimas que compreendem uma gama de pH ótimo entre 2 e 8, pelo que a maioria das pectinases endógenas, provenientes da uva e de microorganismos associados, não são inibidas na gama de pH do vinho, entre 3 e 4, mas

podem ser influenciadas pela temperatura, pelos níveis de dióxido de enxofre, taninos e etanol (82).

O uso de enzimas de maceração de origem comercial é uma prática comum no processo de vinificação como suplementos às enzimas endógenas, de modo a garantir a efetividade das diversas biotransformações necessárias a um vinho com a qualidade desejada (79). Dado que os fenóis estão maioritariamente localizados nas células da película da uva, estas técnicas, geralmente atuam no sentido de degradar ou aumentar a permeabilidade da célula (83). Estas preparações de pectinases comerciais são usadas para melhorar a degradação estrutural dos polissacarídeos (75,84). As preparações comerciais de pectinases geralmente contêm uma mistura complexa de enzimas. Por esta razão existe um grande interesse em conhecer a ação precisa de cada enzima assim como as diferenças de ação no que diz respeito a uvas de diferentes castas e a diferentes tipos de vinificação (85). As preparações enzimáticas disponíveis no mercado são maioritariamente provenientes de *Aspergillus sp.* e consistem em misturas de poligalacturonase, pectina liase e pectina metiltransferase e pequenas quantidades de outras enzimas com atividades secundárias (84,86). As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são classificadas em pectina metil esterase, pectina liase e poligalacturonase de acordo com o tipo de reação que catalisam (87). A pectina metil esterase, (EC 3.1.1.11), PM, catalisa a des-esterificação da pectina por quebra de ligações éster entre o grupo hidroxilo e o ácido carboxílico dos resíduos dos ácidos galacturónicos, atuando ao longo da cadeia e deste modo libertando metanol convertendo a pectina em pectato. O seu pH ótimo situa-se entre os 7 e 8. A ação desta enzima não deverá ser demasiado elevada de modo a não produzir metanol em excesso. A pectina-liase (EC 4.2.2.2), PL, quebra ligações glicosídicas através da  $\beta$ -eliminação, na cadeia de ácido galacturónico, dando origem a produtos insaturados, devido à formação de duplas ligações entre C4 e C5 no resíduo terminal não redutor. A pectina liase demonstra especificidade para substratos metil esterificados, como é o caso da pectina (29,79). A poligalacturonase, PG, é a enzima maioritariamente encontrada nas preparações enzimáticas de enzimas pectolíticas. Catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de polímeros de pectina, originando a sua despolimerização em unidades de monómeros de ácidos galacturónicos (88). Visto que atua em moléculas com os grupos carboxílico livres, possui um efeito menor para pectinas altamente metiladas na ausência da pectina metilesterase, pois esta, gera sítios acessíveis para hidrólise, atuando sinergicamente na

presença de ambas (89). A poligalacturonase pode assumir a forma de exo ou endo. A exopoligalacturonase (EC 3.2.1.67) atua na extremidade não redutora do resíduo de ácido galacturônico encurtando a cadeia, enquanto a endopoligalacturonase (EC 3.2.1.15) atua aleatoriamente ao longo da cadeia reduzindo a viscosidade (29,86). O seu pH ótimo situa-se entre 4 e 5 (79). Vários estudos foram descritos no estado da arte sobre a utilização de diversas enzimas comerciais com o fim de estudar e testar uma melhor extração de polifenóis da uva.

Para além da atividade de pectinase, estas preparações contêm enzimas como celulasas e hemicelulasas, conhecidas como enzimas de liquefação (60,79). A pureza destas enzimas é igualmente importante pois se a  $\beta$ -glucosidase estiver presente, pode influenciar na cor das antocianinas convertendo-as em agliconas menos estáveis (3). No entanto se forem utilizadas em concentrações baixas não têm qualquer tipo de influência (29,90).

Durante a maceração, as preparações de enzimas produzem um aumento na quantidade de polifenóis extraídos das partes sólidas da uva, em comparação com um mosto sem adição de enzimas. No entanto, numa análise a longo prazo, o uso das mesmas preparações de enzimas não tem um efeito significativo na cor durante a conservação de todos os vinhos envolvidos no ensaio, dado que o comportamento de todos os vinhos tratados foi bastante semelhante ao controlo (85). Romero-Cascales et al. (91) encontraram diferenças entre vinhos tratados e não tratados enzimaticamente, onde os vinhos tratados revelaram um aumento de absorção a 280nm, maior teor em polifenóis, e maior teor em taninos. Zimman et al. (92) concluiu que a adição destas preparações enzimáticas aumentava o teor em proantocianidinas no vinho, mas não verificou qualquer aumento na intensidade de cor. Por outro lado, Sacchi et al. (3) verificou um aumento na extração de antocianinas, taninos condensados e uma maior intensidade de cor. No entanto, vários estudos contrariam a eficácia das enzimas de maceração no teor em antocianinas e intensidade de cor nos vinhos, levando a resultados contraditórios. Resultados estes que podem ser explicados devido às diferenças da própria composição fenólica da uva, a capacidade de extração, o tipo de viticultura, o seu ponto de maturação no momento da colheita e ainda diferentes técnicas de vinificação (78). Bautista-Ortín et al. (93), concluíram que também o tempo de maceração é um fator crítico para obter vinhos com uma boa intensidade de cor e estabilidade. No entanto, estes efeitos irão depender maioritariamente das características da

própria uva no momento da colheita e podem também mudar de ano para ano (93). Outro fator que influencia, não só a eficiência da maceração, mas a atividade das enzimas presentes em solução, é a temperatura de vinificação (90). Ainda assim, toda a informação não é conclusiva quanto ao efeito de cada uma das enzimas utilizadas comercialmente bem como fatores que possam influenciar a sua atividade (94).

## 1.5 Objetivos

A Global Wines é uma empresa produtora de vinhos de várias regiões do país tendo como missão a promoção e divulgação dos vinhos portugueses a nível nacional e internacional, procurando sempre uma melhoria contínua em termos de padrões de qualidade dos produtos colocados ao dispor dos seus consumidores. A empresa tem vindo nestes últimos anos a efetuar sucessivos investimentos nas suas áreas produtivas - vinha, receção, vinificação, armazenagem e engarrafamento. Hoje em dia um dos investimentos das empresas vitivinícolas passa pela investigação científica, com o intuito de compreender melhor certos processos de modo a melhorar as características dos seus produtos, bem como aliar esta melhoria a uma redução de custos de produção. A investigação científica na indústria vitivinícola começa na viticultura, passando por condições de vinificação, até ao envelhecimento em garrafa. Em todos os processos necessários para que se conceba o dito produto final, a indústria enológica tem disponíveis diversos produtos enológicos que podem melhorar características intrínsecas e extrínsecas dos vinhos. Dentro destes produtos enológicos, os auxiliares de vinificação têm grande destaque, nomeadamente as enzimas de maceração. No entanto, estes produtos têm gerado grande controvérsia pois os diversos estudos não são conclusivos quanto à sua eficácia. Deste modo, existe uma crescente necessidade de perceber a eficácia da sua utilização. Neste trabalho são avaliadas várias componentes que podem alterar os parâmetros da cor nos vinhos tintos, nomeadamente, o tipo de poda na viticultura, e a eficácia da aplicação das enzimas de maceração na vinificação. Este trabalho tem como objetivo estudar as diferenças entre dois tipos de poda, poda manual e poda mínima, avaliando o teor de compostos fenólicos ao longo da maturação para duas castas, Alfrocheiro, Alf, e Touriga-Nacional, TN. Na casta Touriga-Nacional, estudou-se também a eficácia da aplicação de três tipos de enzimas de

maceração, em duas concentrações diferentes, na extração dos compostos fenólicos e na evolução da cor dos vinhos ao longo do armazenamento.

## 2. Metodologia

### 2.1. Amostragem

Todas as uvas utilizadas neste trabalho foram provenientes da Quinta do Amieiro, Carregal do Sal, região vitivinícola do Dão. Utilizaram-se duas castas, Alfrocheiro e Touriga Nacional em que cada uma era proveniente de vinhas que tinham sido sujeitas a dois tipos de poda, poda manual e poda mínima. Na poda mínima foi efetuada uma passagem de uma pré-podadora à altura das unidades de frutificação, sendo posteriormente feita uma pequena correção manual das varas que não foram cortadas.

As análises efetuadas nas diferentes etapas estão representadas na **Tabela 1**:

*Tabela 1: Análises efetuadas nas uvas, mosto e vinho: AT-acidez total, pH, TAP- teor alcoólico provável, MV-massa volúmica a 20°C, Açúcares, Método de Somers, quantificação de Taninos, TA-teor alcoólico, SO<sub>2</sub>- dióxido de enxofre e FTIR –espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.*

<i>Amostra</i>	<b>AT</b>	<b>pH</b>	<b>TAP</b>	<b>MV</b>	<b>Açúcares</b>	<b>Somers</b>	<b>Taninos</b>	<b>TA</b>	<b>SO<sub>2</sub></b>	<b>FTIR</b>
<i>Uvas</i>	x	x	x	x	x	x	x			
<i>Mosto</i>				x					x	
<i>Vinho</i>	x	x				x	x	x	x	x

Todos os reagentes utilizados nas análises efetuadas foram de qualidade analítica, PA.

#### 2.1.1 Controlo de maturação

O controlo de maturação, efetuado nas uvas após o pintor foi feito periodicamente, recolhendo uma amostra da vinha heterógena de 300 bagos, de modo a prever a data de colheita através do conteúdo em açúcares e teor alcoólico provável (TAP), assinalados na **Tabela 1**.



#### 2.1.1.1 Massa volúmica

A massa volúmica (MV) foi determinada a 20 °C, após filtração grosseira, com a utilização de um termomustímetro europeu (Dents, França), com uma gama de densidade de 0,990-1,200 g/mL. A temperatura correspondente foi também medida com um termómetro de álcool de modo a corrigir a MV para 20 °C.

#### 2.1.1.2 Açúcares totais

De acordo com o OIV (95), o teor aproximado em açúcares, A (g/L), pode ser obtido a partir do valor da MV (g/mL) a 20°C por intermédio de uma fórmula ou de uma tabela dela obtida. A fórmula para o teor em açúcares para mostos com valores iguais ou inferiores a 1,095 é  $A=2564 (MV(20\text{ °C}) - 1) - 17,6$  e para mostos com valores superiores a 1,095 é  $A=2472 (MV(20\text{ °C}) - 1) - 9,6$ .

#### 2.1.1.3 Teor alcoólico provável

O teor alcoólico provável (TAP) é determinado através da tabela de correspondência entre a densidade do mosto corrigida e o rendimento da fermentação, onde neste caso assumiu-se um rendimento de 1,75, considerando-se que 17,5 g de açúcar originam 1% álcool.

#### 2.1.1.4 Acidez total

A acidez total (AT) foi determinada pela titulação de 10 mL de mosto, aos quais se juntaram 30 mL de água desionizada e 1 mL de indicador azul de bromotimol. A titulação foi feita com NaOH 0,1 M até a cor do indicador alterar para verde-garrafa (pH neutro).

#### 2.1.1.5 pH

O pH foi medido com um potenciómetro Crison, mod. Basic 20<sup>+</sup> (Crison Instruments SA, Barcelona).

#### 2.1.2 Controlo de maturação fenólico

Ao longo da maturação, de forma a analisar a evolução dos compostos fenólicos desde a altura do pintor até à maturação final, foi realizado o controlo de maturação fenólico. Foram recolhidos 100 bagos os quais foram pesados ( $P_b$ ) e posteriormente colocados num pano seco de modo a retirar toda a humidade e cortados ao meio

facilitando a extração da polpa e grainhas. Este pano foi atado em forma de bola de modo a espremer os bagos até não terem mais sumo.

O volume de mosto ( $V_m$ ) obtido foi medido numa proveta e as grainhas e películas foram colocadas num frasco de 250 mL. Para solubilizar compostos fenólicos, foi-lhes adicionado  $(V_m - \frac{Pb}{8})$  mL de tampão de ácido tartárico a pH 3,2 e  $(\frac{Pb}{8})$  mL de etanol a 95%. Após 24 h de repouso a 25 °C, a solução foi centrifugada durante 10 min a 3500 rpm e posteriormente foi medida a absorvância a 420, 520 e 620 nm num espectrofotómetro UV/Visível Perkin Elmer, Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Waltham, USA).

#### 2.1.2.1 Somers

O método de Somers (96) foi utilizado para quantificar antocianinas, totais e coradas, índice de fenóis totais, intensidade de cor, tonalidade, pigmentos poliméricos, índice de polimerização, pigmentos totais e índice de ionização. As absorvâncias a 420, 520 e 620 nm permitem o cálculo de :

$$\text{Intensidade de cor} = (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \times 10;$$

$$\text{Tonalidade} = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

$$\text{Pigmentos poliméricos} = A_{420} \times 10$$

O índice de fenóis totais foi calculado através da medição da absorvância das amostras a 280 nm diluídas 100 vezes com água desionizada.

$$\text{Índice de fenóis totais} = A_{280} \times 100$$

A acidificação do meio a pH <1, para as antocianinas estarem na sua forma livre (catião *flavilium*), foi conseguida por adição de HCl (1:100) aos vinhos/extratos de uva, que foram incubados a 25 °C durante 3 h e posteriormente medida a absorvância a 520 nm. Através da adição em excesso de SO<sub>2</sub>, a cor medida a 520 nm corresponde aos pigmentos poliméricos estáveis. As absorvâncias a 520 nm na presença de HCl e SO<sub>2</sub> permitem o cálculo dos seguintes parâmetros:

$$\text{Índice de polimerização} = \frac{A520(SO_2)}{A520(HCl)} \times 100;$$

$$\text{Antocianinas coradas} = A520 - A520(SO_2);$$

$$\text{Antocianinas totais} = A520(HCl) - \frac{5}{3} A520(SO_2);$$

$$\text{Pigmentos Totais} = 101 \times A520(HCl)$$

$$\text{Índice de ionização} = 100 \times \frac{A520 - A520(SO_2)}{A520(HCl) - \frac{5}{3} A520(SO_2)} = \frac{\text{Antocianinas Coradas}}{\text{Antocianinas totais}}$$

O método de Somers foi realizado em duplicado nas mesmas datas que o controlo de maturação.

#### 2.1.2.2 Método da metilcelulose precipitável

O método da metilcelulose precipitável (MCP) (97) foi utilizado para quantificar os taninos presentes na uva e nos vinhos após a FML na casta TN. O método é baseado nas interações tanino-polímero (metilcelulose), o polímero interage com os taninos da amostra formando um complexo insolúvel que precipita.

Aos 50 bagos de uvas recolhidos foram-lhe retiradas as grainhas, triturados e homogeneizados. A 1 g de homogeneizado adicionou-se 10 mL de uma solução de etanol a 50% (v/v), agitou-se durante 60 min, em intervalos de 5 min, por forma a solubilizar por completo o material em solução. Ao fim desse tempo centrifugou-se a 4000 rpm durante 5 min. As amostras de vinho não necessitaram de qualquer tipo de preparação, apenas que não estivessem em contacto com oxigénio.

Para cada amostra, o método requer uma amostra controlo (sem adição de metilcelulose) e uma amostra tratada com metilcelulose. No controlo, adicionou-se 2 mL de uma solução saturada de sulfato de amónio a 0,25 mL vinho ou 1 mL de extrato de uva e perfez-se com água desionizada até aos 10 mL. As amostras foram preparadas em duplicado.

A 1 mL de extrato ou 0,25 mL de vinho, adicionaram-se 3 mL de metilcelulose, agitou-se algumas vezes, repousou 2-3 min, adicionou-se 2 mL de sulfato de amônio e fez-se volume com água desionizada para 10 mL (**Fig. 23**). As amostras repousaram durante 10 min à temperatura ambiente e centrifugaram-se durante 5 min a 4000 rpm. No sobrenadante leu-se a absorvância a 280 nm. O conteúdo em taninos foram obtidos pela seguinte fórmula:  $A_{280}(\text{taninos}) = A_{280}(\text{controlo}) - A_{280}(\text{amostra})$ .

A absorvância a 280 nm,  $A_{280}(\text{controlo})$ , permite determinar todos os compostos fenólicos e a absorvância a 280 nm do sobrenadante após a precipitação com metilcelulose,  $A_{280}(\text{amostra})$ , permite determinar os compostos que não precipitaram com o polímero. Através da subtração dos valores de  $A_{280}(\text{amostra})$  aos valores  $A_{280}(\text{controlo})$ , obtém-se a quantidade de taninos,  $A_{280}(\text{taninos})$ , que são relacionados com equivalentes de epicatequina através de uma reta de calibração. Esta foi realizada com 8 padrões de epicatequina (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 mg/L) obtendo a reta final de  $y = 0.0116x + 0.1145$ . A concentração de taninos é calculada em mg/L eq. epicatequina.

## 2.2 Vinificação

As uvas de Alf foram colhidas no dia 22 de setembro de 2014 e as uvas de TN no dia 30 de setembro de 2014. Esta data foi definida através do controlo de maturação tecnológico. Para a vinificação de uvas provenientes de cada tipo de poda foram utilizados 300 Kg, as quais foram esmagadas e desengaçadas mecanicamente. O mosto resultante, juntamente com as partes sólidas, foi introduzido em depósitos em inox com a capacidade de 100 L. Na casta Alf e TN vinificaram-se 2 depósitos para cada casta, um correspondente à poda manual e outro à poda mínima. Na casta TN foram ainda vinificadas uvas provenientes da poda manual com utilização de 3 tipos de enzimas de maceração: Vinozym: Vinozym® Vintage FCE; Prozym: ProZym® Maceração; e Bioenzym: Bioenzym RG PLUS EXTRACCION LIQUID, com duas concentrações diferentes. Assim, foram preparados mais seis ensaios de TN (**Fig. 19**):

- 1) Adição de 2g/hL de enzimas de maceração Vinozym – Vinozym 2;
- 2) Adição de 4g/hL de enzimas de maceração Vinozym – Vinozym 4;
- 3) Adição de 2g/hL de enzimas de maceração Prozym – Prozym 2;

- 4) Adição de 4g/hL de enzimas de maceração Prozym – Prozym 4;
- 5) Adição 2g/hL de enzimas de maceração de Bioenzym – Bioenzym 2;
- 6) Adição 4g/hL de enzimas de maceração de Bioenzym – Bioenzym 4.

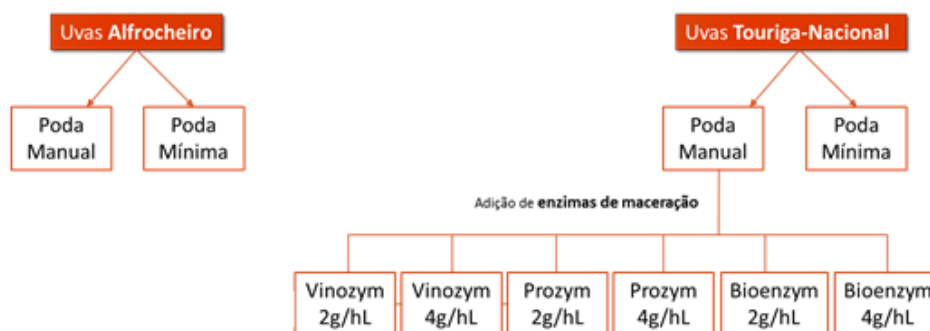


Figura 19: Esquema do processo de vinificação.

Na ficha técnica da Vinozym® Vintage FCE, são descritos os benefícios da utilização deste preparado enzimático como ‘*Enhances color*’, ‘*Improves overall flavor profile*’, ‘*Increases throughput*’ e ‘*Enables more fruity flavors*’. A poligalacturonase (PG) é a enzima principal, tendo uma atividade de 7500 PGNU/g.

Na ficha técnica da ProZym® Maceração, descrevem os seus benefícios tais como ‘Melhor extracção de antocianas e polifenóis’ e ‘Melhoria da cor dos vinhos novos’. A ProZym® Maceração é uma preparação enzimática constituída por: Pectina Liase (PL): > 100 U/g; Pectina Metil Esterase (PE): > 700 U/g e Poligalacturonase (PG): > 3500 U/g.

Na ficha técnica da Bioenzym RG PLUS EXTRACCION LIQUID descreve a enzima como pectocelulásica, ‘dirigida para uma fortíssima extração e estabilização da matéria corante dos vinhos tintos’, ‘Em vinhos tintos jovens possibilita uma ótima relação “Antocianinas/Polifenóis”’. Referem uma atividade enzimática da poligalacturonase de 16000 PECTU/ml com uma densidade de 1,17 g/mL.

Todas as amostras foram inoculadas com um preparado de leveduras da estirpe *Saccharomyces cerevisiae, var cerevisiae*, ICV D254 da Proenol, numa concentração de 0,2 g/hL, de modo a estimular a fermentação alcoólica, juntamente com a adição de fosfato

de diamónio numa concentração de 25 g/hL, de modo a garantir as necessidades de azoto e fosfato das leveduras.

A evolução da fermentação alcoólica, FA, foi controlada através da medição da massa volúmica e temperatura diariamente. Ao fim de três dias sem alterações nestes parâmetros assumiu-se que a fermentação alcoólica estava concluída. A FA demorou sete dias a uma temperatura média de 23 °C. Posteriormente as massas foram separadas do vinho através de prensagem manual. O vinho após prensagem foi transferido para depósitos de 100 L no caso das 2 modalidades de Alf, e para bidons de plástico de 25 L nas 8 modalidades de TN. Os vinhos foram controlados de dois em dois dias até ao final da fermentação maloláctica, FML, recorrendo à análise sumária num sistema FTIR. Após o final da fermentação maloláctica, MaLa, os vinhos foram novamente transferidos para novos depósitos, a borra foi descartada e foi adicionado dióxido de enxofre para obter 40 ppm de SO<sub>2</sub> livre. Os vinhos foram analisados ao 1º e 2º mês após o fim da fermentação maloláctica (**Fig.21**).

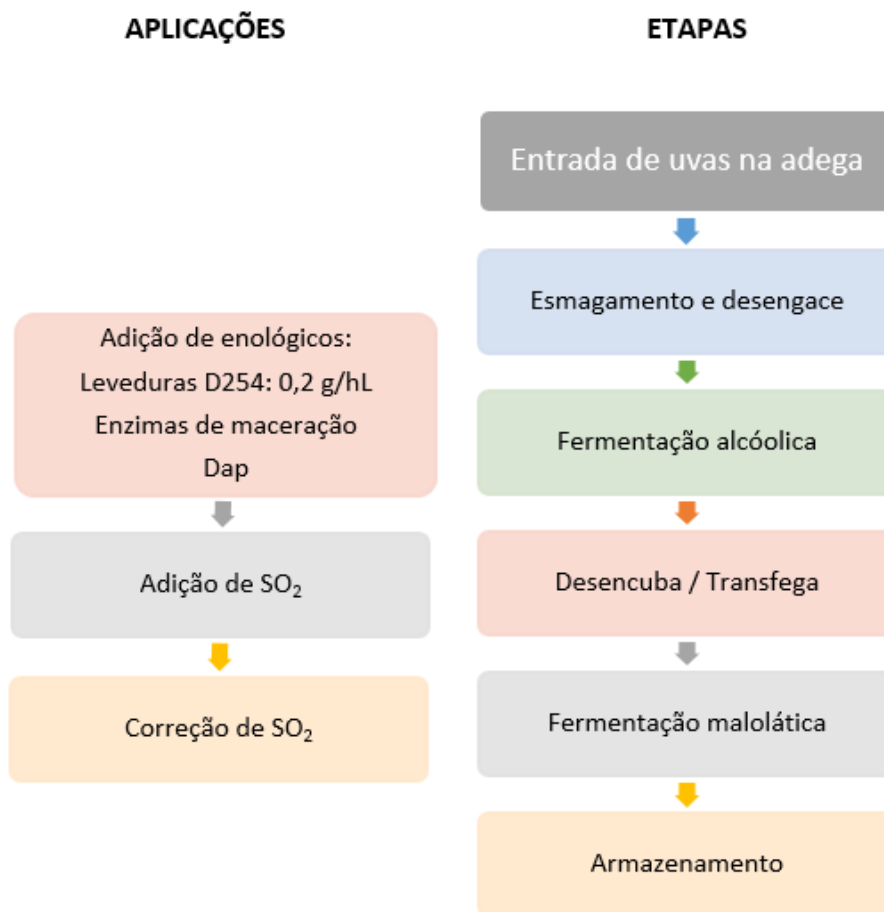


Figura 21: Esquema geral de vinificação, suas aplicações e análises efetuadas. DAP: fosfato de diamónio; SO<sub>2</sub>: dióxido de enxofre.

### 2.2.1 Mosto

Depois da entrada de uvas na adega e após transformação em mosto, foi feita uma análise inicial antes da inoculação. Os parâmetros analisados foram dióxido de enxofre livre (SO<sub>2</sub>L), AT (ponto 2.1.1.1), MV (ponto 2.1.1.2), Açúcares totais (ponto 2.1.1.3), TAP (ponto 2.1.1.4) e pH (ponto 2.1.1.5). Neste caso o SO<sub>2</sub>L deverá ser o mais baixo possível de modo a possibilitar a sobrevivência e eficácia das leveduras.

#### 2.2.1.1 –Dióxido de enxofre livre (SO<sub>2</sub>L)

O SO<sub>2</sub>L foi determinado pelo método de Ripper simples, titulando 50 mL de mosto a que foram adicionados 5 mL de 25% (%v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) com I<sub>2</sub> a 0.03125 N até se obter uma cor roxa, devido à presença de 2 mL do cozimento de amido como indicador.

### 2.2.2 Vinho

De modo a controlar o momento do final da FML, diariamente foi feita uma análise por FTIR, em duplicado. Para que fosse possível analisar os vinhos através desta técnica foi necessária uma filtração por terras diatomáceas com filtros de seringa de fibra de vidro de 40 mm de diâmetro (Munktell, Alemanha) de modo a reduzir os resíduos.

O sistema Bacchus Aquisition (FTIR-UV/Vis Multispec Avatar 380, França com amostrador automático, M.S.U França) permite determinar diferentes parâmetros: TA, AT, AV, pH, Ma, La. Através da passagem de radiação no espectro do infravermelho, visível e ultravioleta, os compostos presentes no vinho emitem radiação com comprimentos de onda de acordo com a sua estrutura sendo possível traçar uma “impressão digital” de cada composto numa determinada concentração. Este aparelho é calibrado recorrendo à utilização de no mínimo cinquenta amostras das diferentes regiões vitivinícolas, por forma a que a amostragem seja a mais heterogénea possível. Os parâmetros em causa foram determinados através dos métodos oficiais descritos pelo OIV (95) .

Nas etapas, final da fermentação alcoólica (Desencuba), final da fermentação maloláctica (final FML), 1º mês após fermentação maloláctica (1º mês após FML) e 2º mês após fermentação maloláctica (2º mês após FML), foram realizados os métodos de Somers (**ponto 2.1.2.1**) e o método metilcelulose precipitável (**ponto 2.1.2.2**) somente no final FML.

### 2.2.3 Análise estatística

A análise estatística foi aplicada aos resultados obtidos no controlo de maturação fenólico. Foi utilizado o programa Statistica 7.0 de modo a determinar se a variância entre resultados das diferentes modalidades no mesmo ponto seria significativa. A variância foi analisada através de testes one-way ANOVA, por forma a avaliar a existência de resultados significativos. Posteriormente, foi aplicado o teste de Fisher LSD de modo a calcular o menor resultado significativo (LSD – *least significant difference*) permitindo uma comparação direta entre dois resultados de modalidades individuais. Qualquer resultado maior que o LSD ou com o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 3. Resultados e Discussão

As uvas da casta Alfrocheiro (Alf) e Touriga-Nacional (TN) foram analisadas ao longo da maturação, distinguindo a poda manual da poda mínima. Foram determinados os parâmetros de teor alcoólico provável (TAP), açúcares totais, acidez total (AT) e pH ao longo da maturação das uvas. No controlo de maturação fenólico foram determinados o índice de fenóis totais, a intensidade de cor, as antocianinas totais e os taninos (somente na casta TN).

### 3.1. Controlo de maturação das uvas

No conteúdo em açúcares totais (**Fig. 22**) verificam-se comportamentos diferentes para as duas castas ao longo da maturação. Na casta Alf, da poda manual os valores mantêm-se constantes ao longo do tempo, obtendo-se valores mais elevados que nas amostras da poda mínima ao longo de toda a maturação. Na casta TN, as uvas de ambas as podas verificam



uma diminuição de açúcares totais, obtendo valores semelhantes ao longo da maturação para as uvas de ambas a podas.

O ano vitícola de 2014 foi muito chuvoso ao longo de quase toda a vindima (98) o que pode levar à diluição de compostos no período final da maturação.

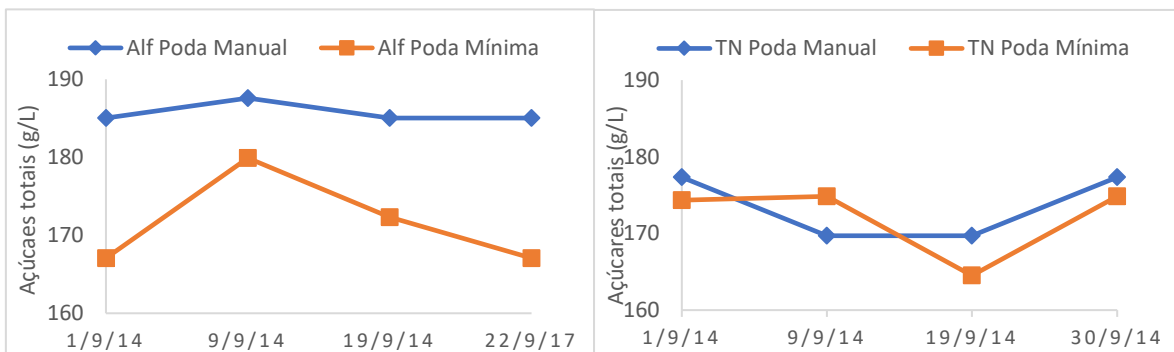


Figura 22: Quantificação de AR (g/L) em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014.

O comportamento do TAP (Fig. 23) em ambas as castas é semelhante ao comportamento dos açúcares totais por estarem diretamente relacionados. No caso do Alf, a poda manual mantém os valores mais constantes com valores de 10,6% na poda manual e 9,6% da poda mínima no final da maturação. Na casta TN, os valores de ambas as podas diminuem ligeiramente ao longo do tempo, apresentando valores semelhantes entre podas uma semana antes da colheita, porém no final da maturação, ambas aumentam os valores sendo que a poda manual apresenta 10,1% de TAP e a poda mínima 9,9%.

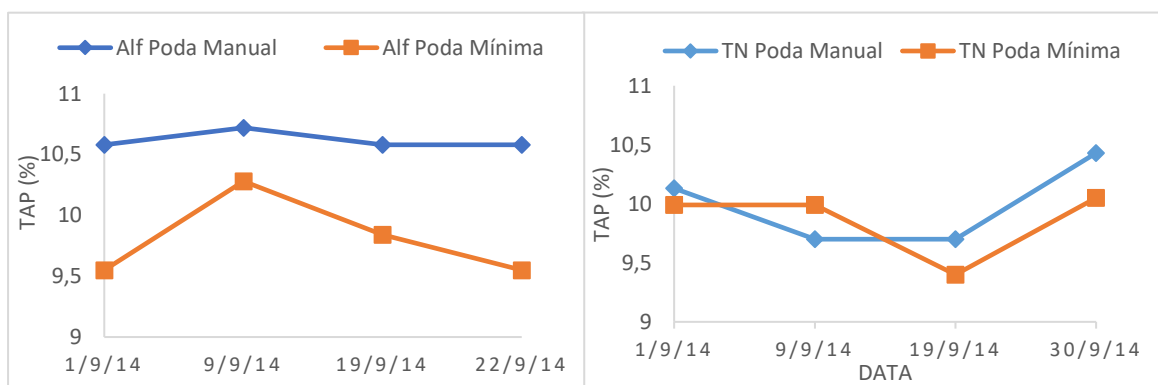


Figura 23: Quantificação do TAP% em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014.

Este comportamento nas uvas de Alfrocheiro provenientes dos dois tipos de poda confirma o que está descrito na bibliografia acerca dos teores alcoólicos serem mais baixos na poda mínima devido a uma menor concentração de açúcares (64,66,68).

Observando o comportamento das duas castas na AT (**Fig.24**), podemos afirmar que em ambos os casos não existem diferenças entre uvas das diferentes podas. O comportamento é também semelhante nas duas castas, ocorrendo uma diminuição ao longo da maturação, sendo de 8,3 g/L no Alf e 8,5 g/L na TN no fim da maturação, devido ao consumo de ácidos orgânicos (maioritariamente málico, tartárico e cítrico) na respiração e produção de energia pela planta (99,100) .

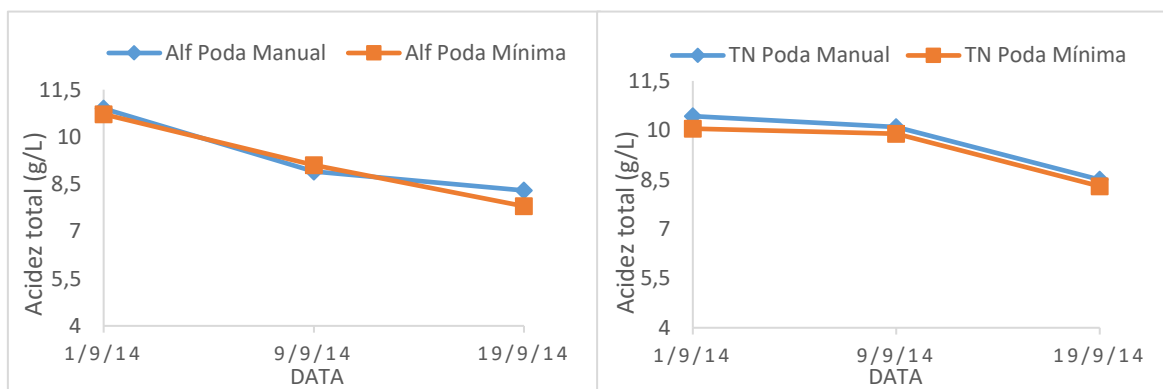


Figura 24: Quantificação do AT (g/L) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014.

Os valores semelhantes entre podas confirmam o que está descrito na bibliografia em que se verifica uma maturação idêntica em ambas as castas no que diz respeito aos ácidos (68).

Nos valores de pH (**Fig. 25**) verifica-se o oposto da AT também em ambas as castas, em que as uvas da poda manual possuem os valores ligeiramente mais elevados que as da poda mínima. Estas variações vão ao encontro às variações de pH descritas ao longo da maturação, onde o pH vai aumentando, inversamente à AT, devido ao consumo dos ácidos tartárico e málico.

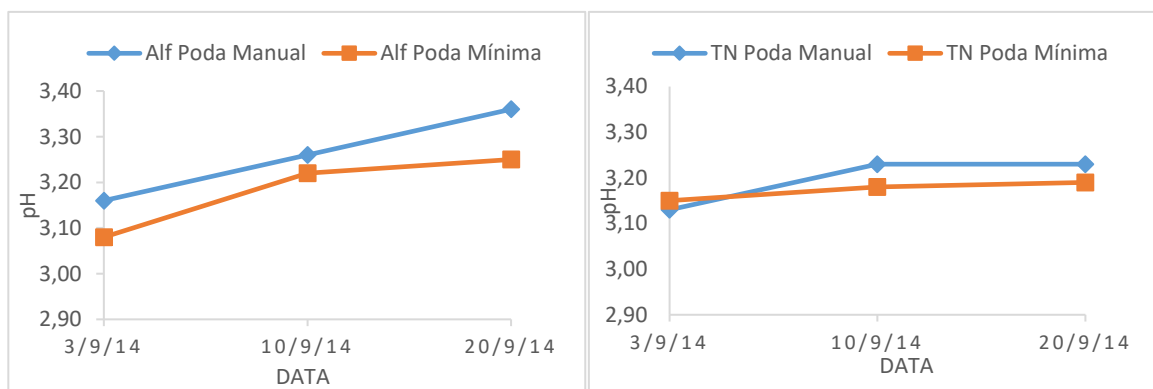


Figura 25:Quantificação do pH em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita) no ano de 2014.

No ano de 2014 a poda manual obteve valores mais elevados em relação à poda mínima tanto na casta Alfrocheiro como na casta Touriga Nacional. Na casta Alfrocheiro verificaram-se maiores diferenças entre podas tal como descrito em trabalhos anteriores (101).

O ano vitícola de 2016 foi caracterizado por grandes amplitudes térmicas (dias quentes e noites frescas), existência de reservas de água provenientes das chuvas de inverno e tempo seco em plena maturação e vindima (102).

Na casta Alfrocheiro, na colheita de 2016, os açúcares totais (**Fig. 26**), as uvas dos dois tipos de poda, possuem a mesma evolução ao longo da maturação em que ambas aumentam os seus valores e a poda mínima obtém valores ligeiramente superiores à poda manual, 236 e 241 g/L, respetivamente. No entanto as uvas da poda mínima sofrem uma diminuição dos seus valores no final da maturação, ao contrário das da poda manual que aumentam para valores de 244 g/L. Na casta TN, ao longo da maturação, a poda manual obtém valores mais elevados que a poda mínima. Porém no final da maturação, ambas possuem valores semelhantes, 249 g/L na poda manual e 254 g/L na poda mínima. No final da maturação, apenas o Alf apresenta valores diferentes entre podas tal como aconteceu no

ano de 2014, em que as uvas da poda manual assumem valores mais elevados devido à elevada produção da poda mínima e consequente atraso na maturação (69).

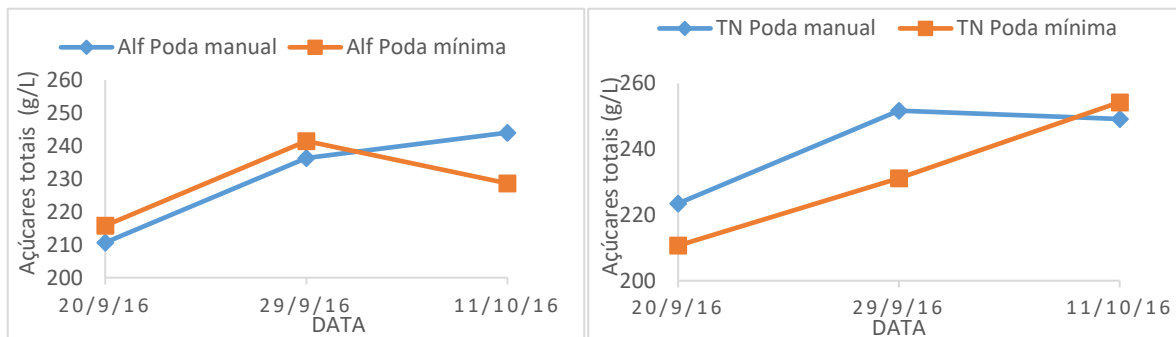


Figura 26: Quantificação dos Açúcares totais (g/L) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016.

O TAP (**Fig. 28**) relacionado com os açúcares totais, apresenta o mesmo comportamento e evolução em ambas as castas. Na casta Alf verificam-se pequenas diferenças entre uvas de podas diferentes ao longo da maturação com a poda manual a apresentar valores superiores à poda mínima apenas no final da maturação, 13,9% e 13,1% respetivamente. Na casta TN as diferenças entre podas são visíveis ao longo de toda a maturação em que as uvas da poda manual obtiveram valores mais elevados. Porém, no final da maturação não existem diferenças no TAP.

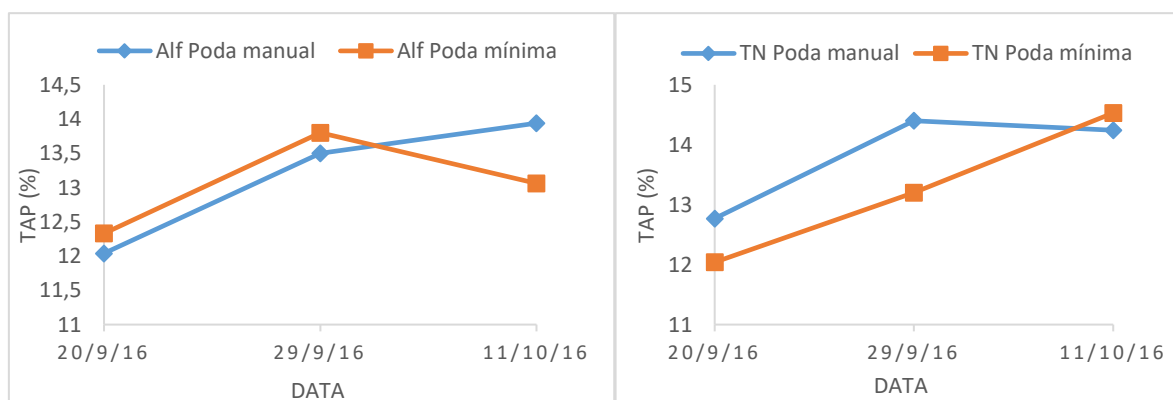


Figura 28: Quantificação do TAP (%) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016.

Na AT (**Fig. 29**) o comportamento entre os diferentes tipos de podas é idêntico nas duas castas, em que a poda manual obteve valores mais elevados que a poda mínima mais evidente na casta Alf.

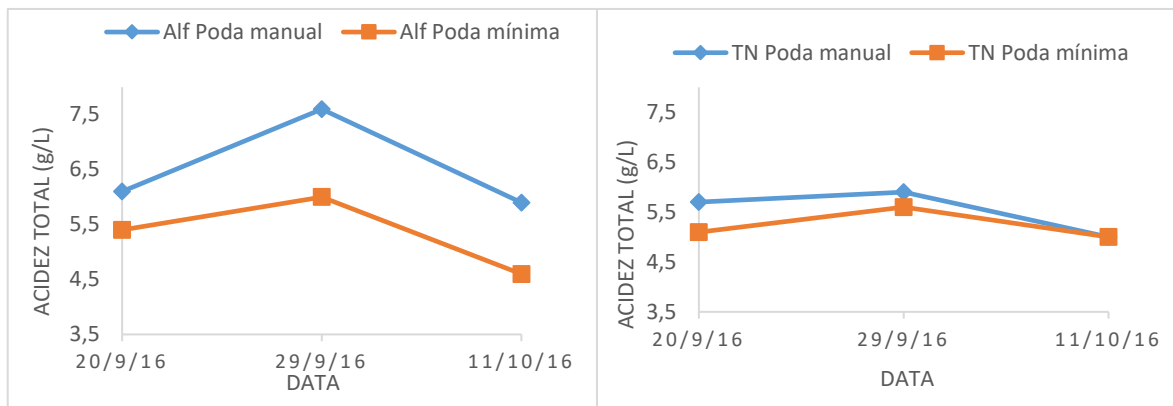


Figura 29: Quantificação dos AT (g/L) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016.

Na casta TN, as diferenças entre podas são menores, obtendo valores semelhantes no final da maturação, tal como se verificou no ano de 2014, sugerindo um nível de maturação semelhante em ambas as podas.

Nos valores de pH (**Fig. 30**), verifica-se o inverso da AT. Na casta Alf, a poda mínima obtém valores ligeiramente mais elevados que a poda manual, no entanto não se verificam variações ao longo da maturação. Pelo contrário, na casta TN as uvas da poda manual apresentam valores ligeiramente mais elevados. No ano de 2014, na casta TN verificou-se o mesmo comportamento entre podas, enquanto na casta Alf, se verificou o oposto, em que

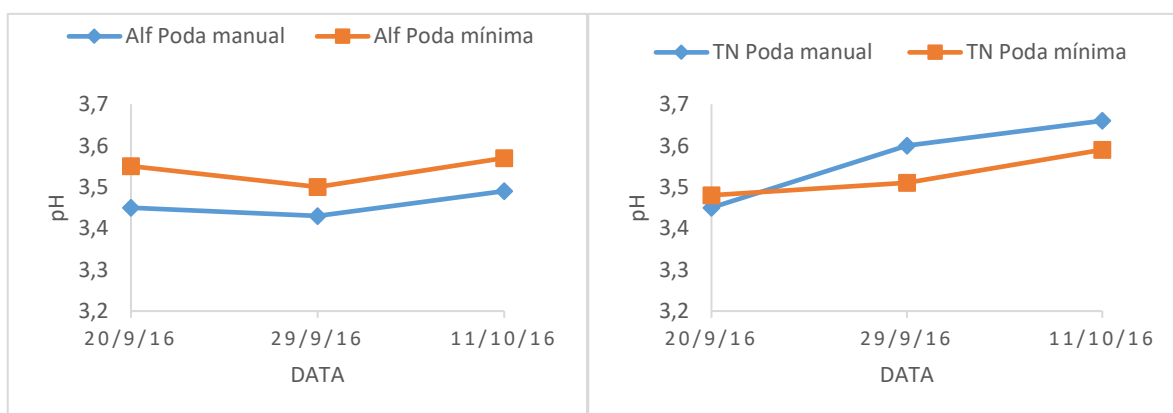


Figura 30: Quantificação do pH em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016.

a poda manual obteve valores superiores à poda mínima, porém uma diferença de valores superior.

No controlo de maturação de 2016, nos parâmetros de açúcares totais e TAP, a casta Alf obteve resultados mais elevados na poda manual comparativamente à poda mínima, no fim da maturação, sendo indicativo de um estado de maturação superior. Na casta TN, as uvas dos dois tipos de poda apresentaram valores semelhantes para todos os parâmetros analisados. Apesar das diferenças encontradas, estes resultados mostram que os diferentes tipos de poda não parecem ter um efeito muito significativo nos parâmetros de maturação das uvas.

### 3.2 Evolução dos compostos fenólicos

Durante a maturação até à colheita, foi efetuado o controlo de maturação fenólico, de modo a quantificar a composição fenólica e correspondente evolução. As amostras para o controlo de maturação fenólico foram recolhidas na mesma data que para o controlo de maturação.

Na intensidade de cor (**Fig. 31**) verificam-se comportamentos diferentes entre as duas castas. Na casta Alf, os dois tipos de poda iniciam a maturação com uma intensidade de cor superior atingindo os seus valores máximos na segunda semana de controlo. Após a segunda semana, as uvas da poda manual sofrem uma diminuição dos seus valores para 11,16, enquanto as da poda mínima aumentam para valores superiores, 9,83. Contudo, os dois tipos de poda obtêm resultados semelhantes no final da maturação, sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Na TN ambos os tipos de poda possuem uma variação de intensidade de cor semelhante ao longo da maturação existindo um aumento de intensidade de cor na segunda semana, diminuindo ligeiramente na terceira semana. A poda mínima apresenta valores superiores aos valores da poda manual ( $p < 0,05$ ) nas duas últimas semanas.

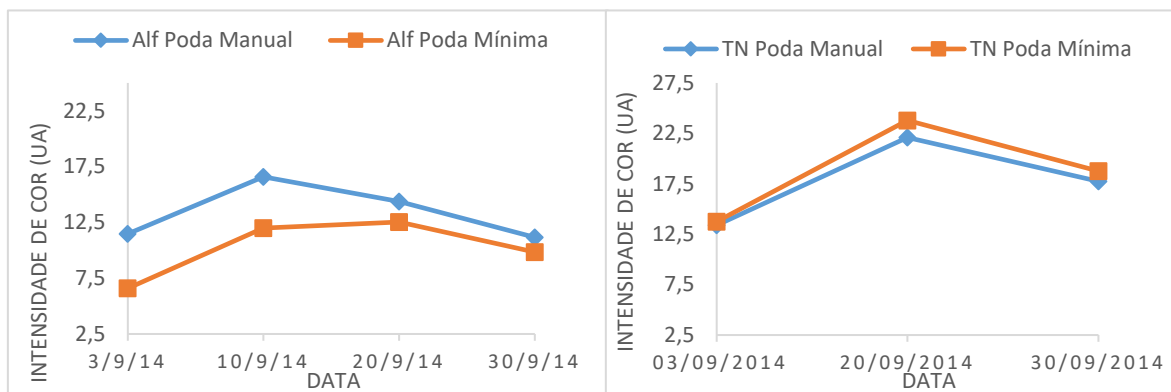


Figura 31: Quantificação da intensidade de cor em pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.

Na casta Alf, o índice de fenóis totais (**Fig.32**) aumenta 50% na primeira semana de maturação, tanto para a poda manual como para a poda mínima, mantendo-se constantes até à terceira semana com valores idênticos nas uvas dos dois tipos de poda. Ambos os tipos de poda decrescem para valores semelhantes sem diferenças significativas ( $p>0,05$ ) na data da colheita. Na casta TN os valores iniciais são superiores nas uvas da poda mínima. O conteúdo em compostos fenólicos aumenta progressivamente até à terceira semana de maturação, mantendo-se constante até ao fim da maturação, em que ambas as podas apresentam valores semelhantes sem diferenças significativas ( $p>0,05$ ) no final da maturação. As duas castas não possuem diferenças significativas entre tipo de poda no índice de fenóis totais, tal como é descrito na bibliografia (68).

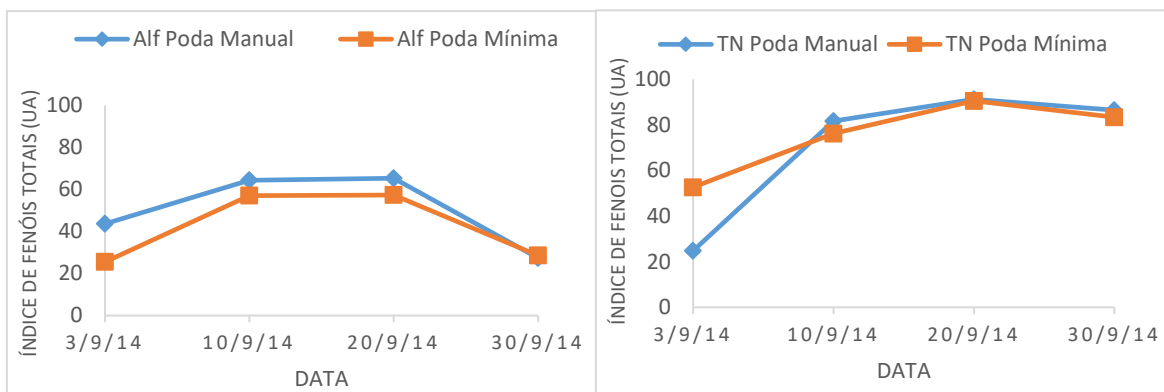


Figura 32: Quantificação do índice de fenóis totais (UA) em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.

Nas antocianinas totais (**Fig. 33**), a evolução ao longo da maturação é semelhante nas duas castas. Na casta Alf, as uvas da poda manual têm valores superiores de antocianinas totais no início da maturação, porém no final da maturação são idênticos à poda mínima. O mesmo acontece com os valores da intensidade de cor. Na casta TN, a poda manual apresenta um aumento do teor em antocianinas totais nas duas primeiras semanas de maturação, diminuindo para valores semelhantes à poda mínima, ainda assim com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Mais uma vez confirma-se que a poda manual possui valores ligeiramente superiores aos da poda mínima (68). No entanto, na intensidade de cor passa-se o oposto, pois os valores da poda mínima são superiores aos da poda manual sugerindo que a poda mínima poderá ter um teor mais elevado de antocianinas coradas.

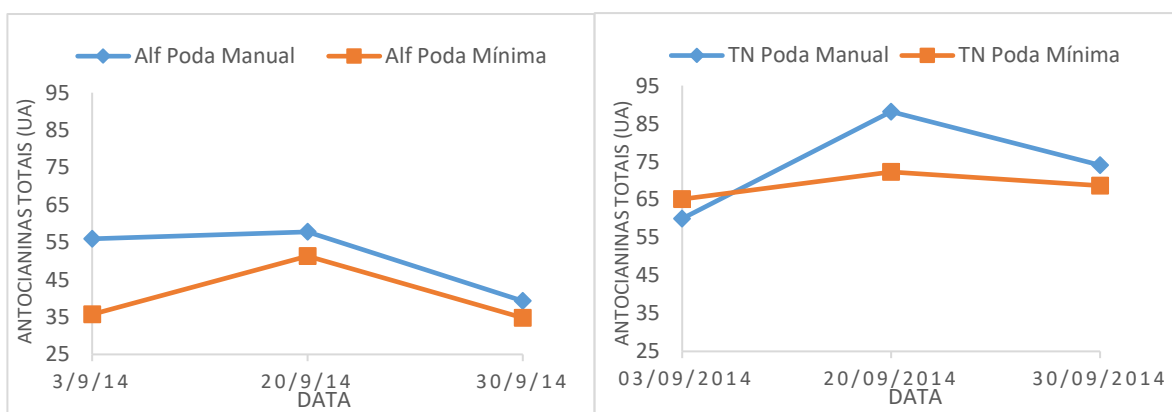


Figura 33: Quantificação das antocianinas totais (UA) em três pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.



Embora o ponto de maturação completo seja quando as antocianinas atingem o seu valor máximo, como foi dito anteriormente, na última semana de maturação houve uma abundância de água derivada da chuva que fez com que estes compostos se diluíssem, diminuindo assim a sua concentração. Um excesso ou deficiência de humidade e irrigação dos solos durante a maturação pode levar a uma diluição de compostos e um conseqüente decréscimo de antocianinas nas uvas (39,103). Avaliando o índice de fenóis totais e o teor de antocianinas totais podemos também verificar que os dois parâmetros possuem o mesmo comportamento nas duas primeiras semanas, sofrendo um aumento significativo, sugerindo uma maior síntese de compostos fenólicos nesta fase de maturação (104). Na casta Alf verifica-se uma diminuição nestes dois parâmetros devido também a uma sobre-maturação das uvas no momento da colheita (53,69).

Os taninos foram quantificados apenas no dia da entrada de uvas na adega em 30-09-2014, isto é, no final da maturação (**Fig. 34**).

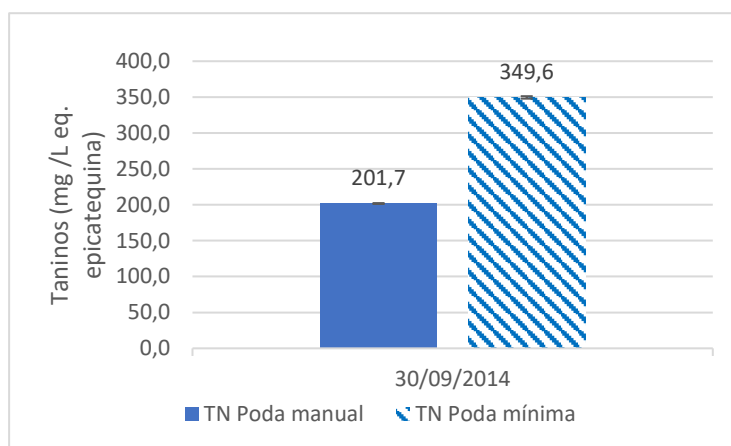


Figura 34: Quantificação dos taninos (mg/L eq. epicatequina) no dia de colheita na casta TN, no ano de 2014.

As uvas da poda mínima apresentam teores de taninos superiores à poda manual. Estes valores vão de encontro ao sugerido na bibliografia (53,66,67,69), onde na modalidade da poda mínima existe uma maior produção de bagos, os quais por sua vez têm uma maior quantidade relativa de película e grainhas, levando a um maior teor em taninos.

No ano de 2016 o ensaio foi novamente realizado em diferentes pontos de maturação, em ambas as castas Alfrocheiro e Touriga-Nacional, para os dois tipos de poda. Na casta Alf, em 2016, os valores da intensidade de cor (**Fig.35**) da poda mínima ultrapassam os

valores da poda manual em quase toda a etapa de maturação das uvas contrariamente ao que se passou em 2014. Os dois tipos de poda apresentam valores de intensidade de cor constantes com valores semelhantes aos obtidos em 2014. Na casta TN, no ano de 2016 a poda manual surge com valores significativamente mais elevados que a poda mínima durante quase toda a maturação com um aumento de 31% na intensidade de cor, contrariamente ao que ocorreu em 2014. O aumento da intensidade de cor nas uvas da poda mínima foi menor, aumentando apenas 11% em relação aos seus valores iniciais de intensidade de cor. Neste caso, os valores de intensidade de cor máximos obtidos em 2016 são superiores aos de 2014 em ambos os tipos de poda.

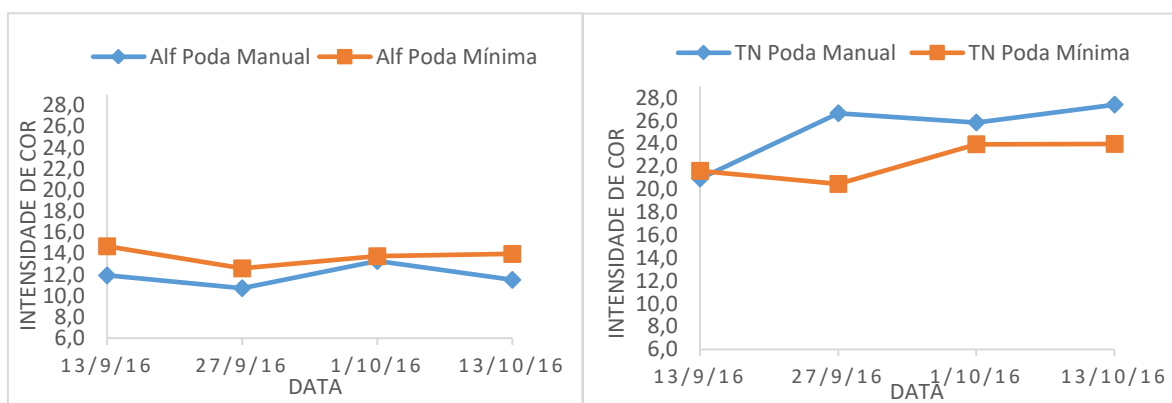


Figura 35: Quantificação da intensidade de cor em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016.

No índice de fenóis totais (**Fig.36**), a evolução das duas castas é semelhante existindo diferenças no que diz respeito ao tipo de poda. Na casta Alf apenas a poda manual varia os seus valores, aumentando 10% em relação aos valores no início da maturação. No entanto não se verificam diferenças significativas entre as uvas provenientes dos dois tipos de poda em nenhum momento da maturação ( $p>0,05$ ). Na casta TN, a evolução é também constante ao longo da maturação sem diferenças significativas com exceção do último ponto (13-10-2016) em que a poda manual apresenta valores significativamente mais elevados ( $p<0,05$ ), superiores 29% em relação aos seus valores iniciais. No geral, os valores máximos atingidos por ambos os tipos de poda no final da maturação foram superiores aos determinados em 2014.

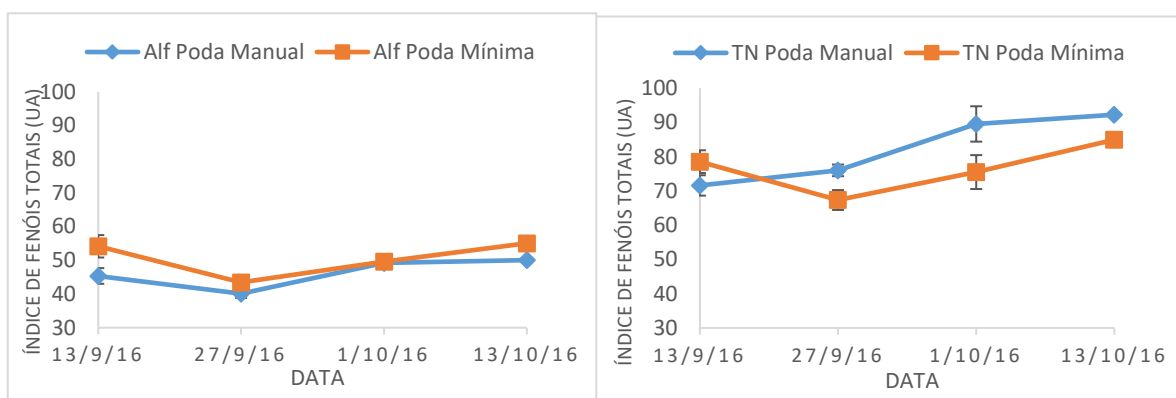


Figura 36: Quantificação do índice de fenóis totais (UA) em quatro pontos diferentes de maturação nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2016.

Neste controlo de maturação de 2016, verificam-se diferenças entre podas, em que o Alf obtém valores de intensidade de cor mais elevados na poda mínima, não obtendo diferenças entre podas no índice de fenóis totais. Na casta TN, a poda manual apresenta os valores mais elevados nos dois parâmetros quantificados.

### 3.3 Efeito do tipo de poda na composição do vinho

As uvas da casta Alf e TN do ano de 2014, poda manual e poda mínima, deram origem aos vinhos correspondentes com os parâmetros analíticos no final da fermentação alcoólica apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 2: Vinhos 2014: teor alcoólico (TA), acidez total (AT) e pH no final da fermentação alcoólica.

	Alf		TN	
	Poda manual	Poda mínima	Poda manual	Poda mínima
<b>TA</b>	9,2	8,9	11,2	11,2
<b>AT</b>	8,2	8,4	7,1	7,4
<b>pH</b>	3,58	3,62	3,9	3,8

Na casta Alf, o teor alcoólico na poda mínima foi ligeiramente inferior em relação à poda manual, o que está de acordo com os dados de açúcares redutores e teor alcoólico provável obtidos para as uvas no final da maturação, assim como com a bibliografia em que os vinhos provenientes da poda mínima têm menores valores de TA e maiores AT comparando com a poda manual (35,68,101). Na TN não se verificaram diferenças entre podas.

O pH dos vinhos foi medido ao longo da maturação do vinho (**Fig. 37**) de modo a avaliar a dependência do pH nas reações que possam ter ocorrido entre os compostos. Tanto nos vinhos da casta Alf, como nos vinhos da casta TN, não se verificam diferenças entre podas, apresentando o mesmo comportamento ao longo da evolução. O pH aumentou desde a desencuba até ao final da FML devido à diminuição de acidez no meio, e posteriormente estabiliza os seus valores.

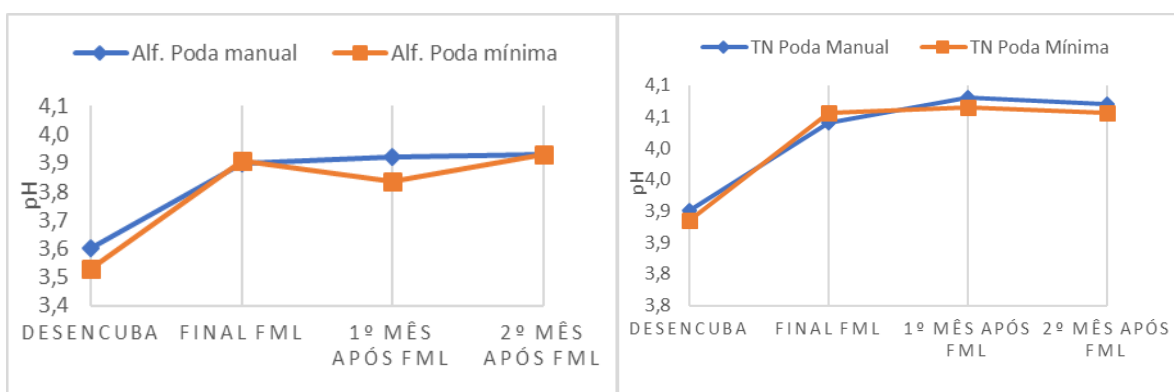


Figura 37: Evolução do pH em quatro diferentes etapas após o final da FA nas castas Alf (esquerda) e TN (direita).

Na intensidade de cor (**Fig. 38**), os vinhos das duas castas têm comportamentos semelhantes, diminuindo ao longo do tempo. Na casta Alf, a poda manual assume valores superiores à poda mínima apenas na desencuba, diminuindo até valores sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre podas, com variações de -28,8% na poda manual e -35,8% na poda mínima. No caso da TN, a poda mínima obteve valores ligeiramente superiores à poda manual, exceto no final da FML, diminuindo os valores da intensidade de cor em ambas as podas ao longo do tempo, cerca de 26%. Esta diminuição da intensidade de cor pode ser devida à formação de pigmentos poliméricos e ao aumento de pH que desloca o equilíbrio das antocianinas da forma *flavylium* para a forma hemicetal (26).

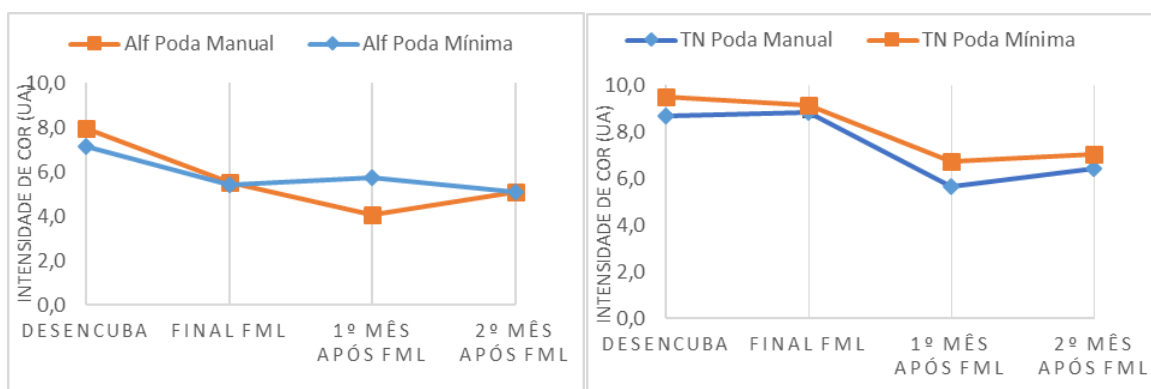


Figura 38: Quantificação da intensidade de cor em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.

Relacionando a intensidade de cor do vinho, quantificada no momento da desencuba, com a intensidade de cor potencial determinada nas uvas, quantificada no dia de colheita, verifica-se uma diferença em ambas as castas e em ambas as modalidades. Na duas castas (Alf e TN), nos os dois tipos de poda, os valores quantificados no dia de colheita foram superiores aos valores posteriormente quantificados no vinho. Estas diferenças podem ser relacionadas com a capacidade de extração da uva. A capacidade de extração é diferente de casta para casta (50,58), verificando-se maiores diferenças nos valores de intensidade de cor entre controlo de maturação fenólico e desencuba na TN sugerindo uma menor capacidade de extração que o Alf.

Os pigmentos poliméricos (**Fig.39**) possuem comportamentos diferentes nos vinhos das duas castas. Nos vinhos da casta Alf não existem diferenças significativas entre modalidades (poda mínima e manual) ocorrendo um ligeiro aumento de pigmentos entre os dois tipos de poda, 16% na poda manual e 9% na poda mínima. Nos vinhos da casta TN, a poda mínima apresenta valores do conteúdo em pigmentos poliméricos superiores ao longo de toda a evolução. Em todos os vinhos analisados não se verifica um aumento gradual de pigmentos poliméricos que justifique a acentuada diminuição da intensidade de cor e de antocianinas.

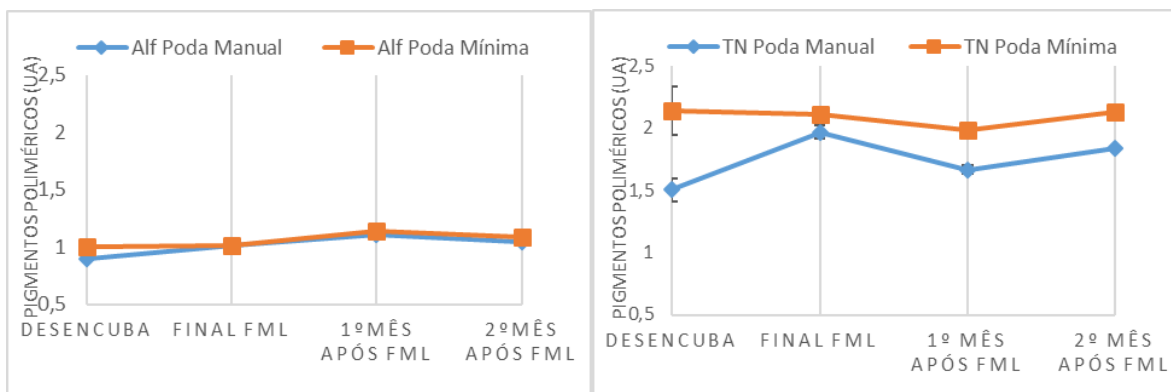


Figura 39: Quantificação dos pigmentos poliméricos (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.

No índice de fenóis totais (**Fig. 40**), os vinhos das duas castas comportam-se de forma idêntica no que diz respeito às diferenças entre tipos de poda, não existindo diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre podas. Em ambos os casos não se verificam grandes variações de índice de fenóis totais ao longo do tempo. Estes resultados não vão ao encontro ao que está descrito na literatura (68) em que a poda manual obteve valores mais elevados de fenóis totais, bem como de intensidade de cor.

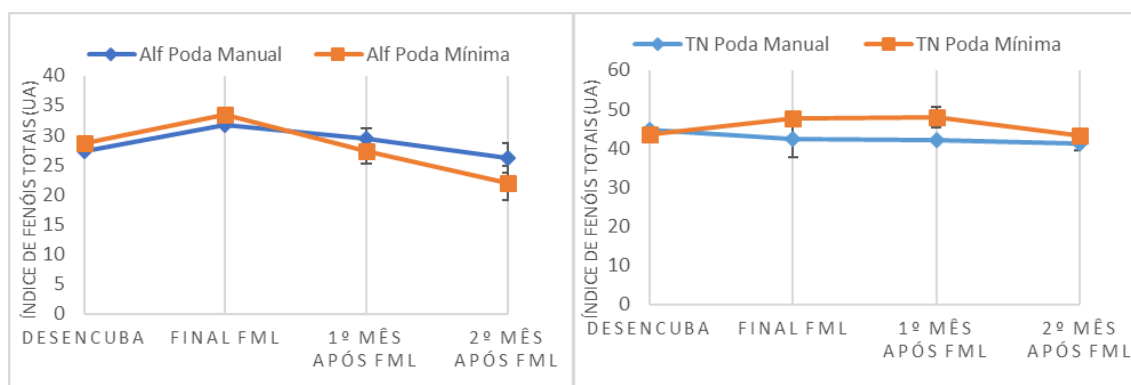


Figura 40: Quantificação do índice de fenóis totais (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.

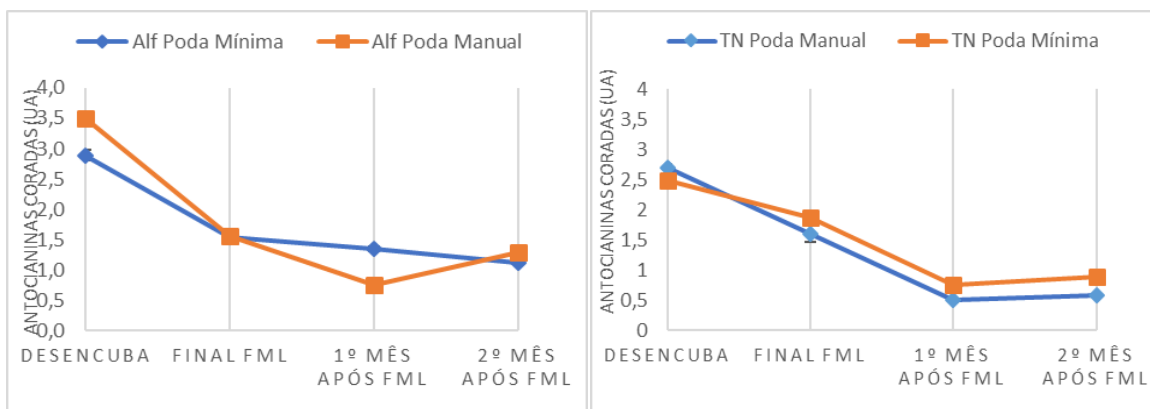


Figura 41: Quantificação das antocianinas coradas (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.

Nas antocianinas coradas (**Fig.41**), verifica-se uma clara diminuição em ambos os vinhos ao longo do tempo de vinificação. Na casta Alf, a variação é visível nos vinhos provenientes dos dois tipos de poda com uma diminuição de 61-63% dos valores totais. Apesar de o vinho da poda manual apresentar valores superiores na desencuba, ao fim de dois meses após a FML não existem diferenças significativas entre os dois tipos de vinho. Na casta TN, os vinhos dos dois tipos de poda apresentam o mesmo comportamento, porém, a poda manual sofre um maior decréscimo (78%) no teor de antocianinas coradas, obtendo valores inferiores aos da poda mínima a partir da desencuba.

As antocianinas coradas alcançam o seu máximo de extração no início da fermentação e tendem a diminuir ao longo do tempo (3,26). A sua associação com outros pigmentos, formação de pigmentos poliméricos, fenómenos de copigmentação e deslocação do equilíbrio das antocianinas devido ao aumento de pH no final da FML leva à sua diminuição (3,42). Esta diminuição geral de antocianinas coradas acompanha a diminuição da intensidade de cor, o que reflete a importância da antocianinas na cor dos vinhos tintos (40).

As antocianinas totais (**Fig. 42**) sofreram também uma diminuição acentuada ao longo do tempo. Na casta Alf, o vinho da poda manual sofre uma diminuição de 46,4% e o da poda mínima de 53,8% justificando os valores da poda manual superiores ao da poda mínima a partir do 1º mês após FML. Na TN os vinhos dos dois tipos de poda sofrem uma

diminuição até ao fim da FML (43-47%), mantendo-se constante ao longo dos dois meses após a FML atingindo valores semelhantes nos vinhos provenientes dos dois tipos de poda sem diferenças significativas ( $p>0,05$ ).

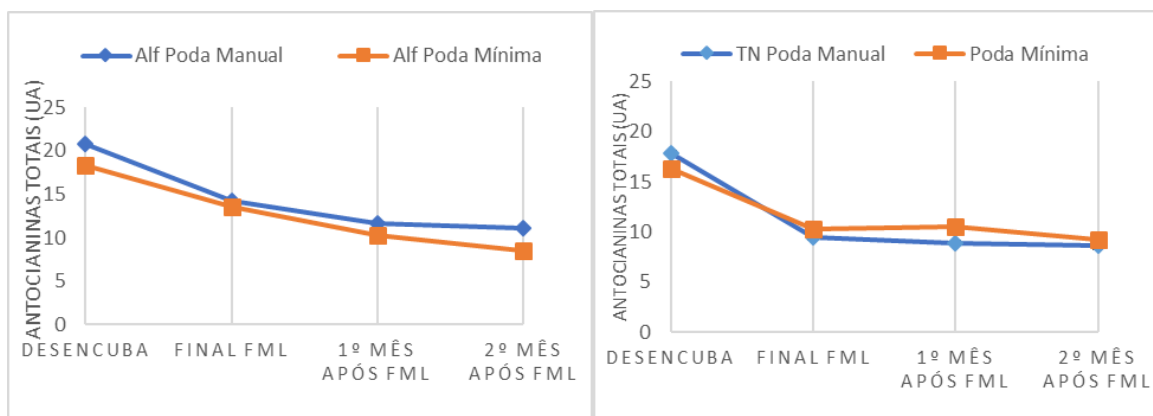


Figura 42: Quantificação das antocianinas totais (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.

Os pigmentos totais (Fig.43) nos vinhos da casta Alf e TN possuem um comportamento semelhante ao observado para o conteúdo em antocianinas totais em que os valores diminuem ao longo do tempo.

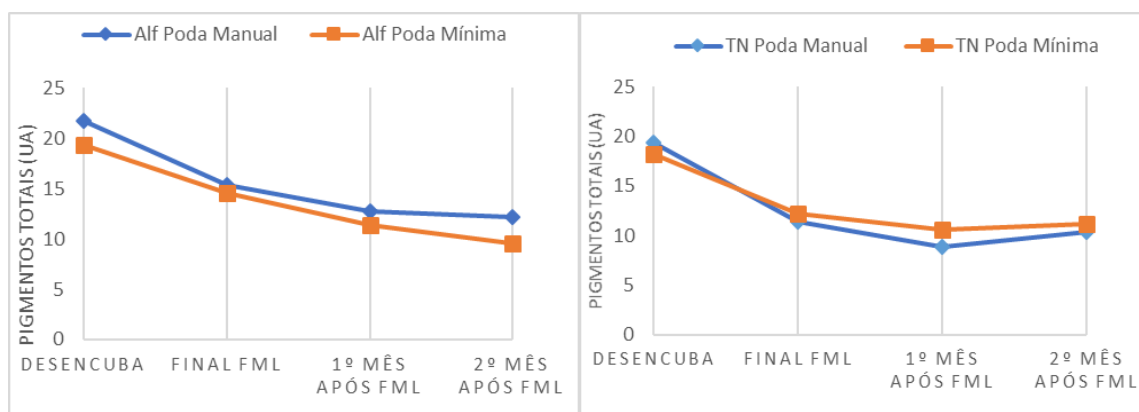


Figura 43: Quantificação dos pigmentos totais (UA) em quatro momentos diferentes após o final da FA nas castas de Alf (à esquerda) e TN (à direita), no ano de 2014.



Tal como acontece nas uvas na altura da colheita, o teor de taninos (**Fig. 44**) no final da FML é maior na poda mínima. Tanto o índice de fenóis totais como a intensidade de cor acompanham os valores mais elevados na poda mínima no final da FML.

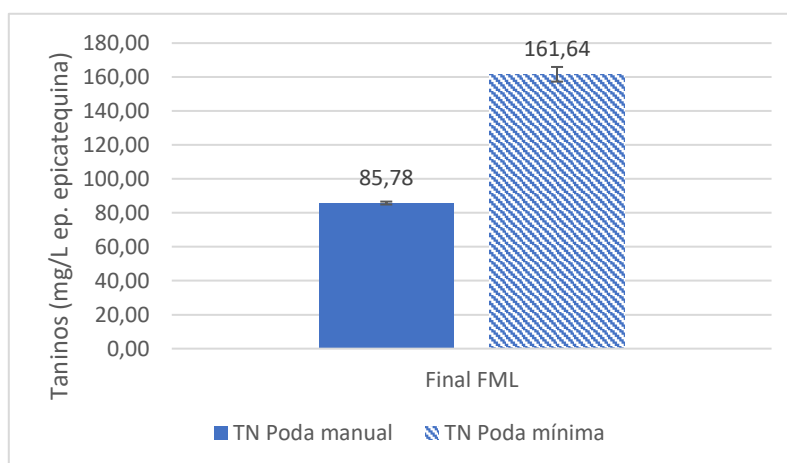


Figura 44: Quantificação de taninos (mg/L eq. epicatequina) na casta TN, no final da FML, no ano de 2014.

Nos vinhos de 2014, verifica-se que na casta TN o vinho proveniente da poda mínima apresenta valores mais elevados na intensidade de cor, antocianinas coradas e pigmentos poliméricos, contrariamente ao que tinha sido verificado em trabalhos anteriores (101) em que os vinhos provenientes da poda manual apresentaram valores mais elevados de índice de fenóis totais, intensidade de cor e antocianinas coradas e totais (35,101). Estes resultados sugerem que o ponto ótimo de maturação fenólica ocorreu anteriormente à maturação tecnológica (52). Assim quando se realizou a colheita possivelmente os compostos fenólicos já se encontravam em decréscimo conforme se pode verificar na Figura 33 (53). Na casta Alf, os valores de antocianinas totais, e pigmentos totais são mais elevados na poda manual estando de acordo com os resultados obtidos em trabalhos anteriores para vinhos da mesma casta e produzidos na mesma região (101).

### 3.3.1 Impacto da adição de enzimas comerciais na composição fenólica dos vinhos

No início da fermentação alcoólica foram adicionadas 3 diferentes enzimas de maceração, Vinoxym (poligalacturonase), Prozym (pectina liase, pectina metil esterase e

poligalacturonase) e Bioenzym (poligalacturonase), com duas concentrações diferentes cada. Todas as enzimas foram comparadas a uma testemunha (TN poda manual sem adição de enzimas). Os vinhos foram analisados ao longo de quatro diferentes fases do processo de vinificação: desencuba (final da FA), final da FML, 1º mês após o final da FML, e 2º mês após o final da FML.

A utilização da enzima Vinozym (**Fig. 49**), apresenta diferenças significativas entre modalidades em todos os parâmetros quantificados, com a exceção do índice de fenóis totais. A Vinozym aplicada na concentração mais baixa obtém valores mais baixos que a testemunha no índice de fenóis totais, nas antocianinas totais, e pigmentos totais, ou valores semelhantes à testemunha nos restantes parâmetros. Estes resultados revelam que a enzima Vinozym quando utilizada numa concentração de 4 g/hL parece ser eficiente na extração dos compostos fenólicos de forma a potenciar a cor do vinho. Segundo o que é descrito na bibliografia (79), concentrações entre 2 e 4 g/hL aumentam a extração em 15% de polifenóis. Na concentração de 4 g/hL, no final do 2º mês após a FML, verificou-se uma extração de 17% superior de fenóis totais em relação à testemunha o que está de acordo com a literatura.

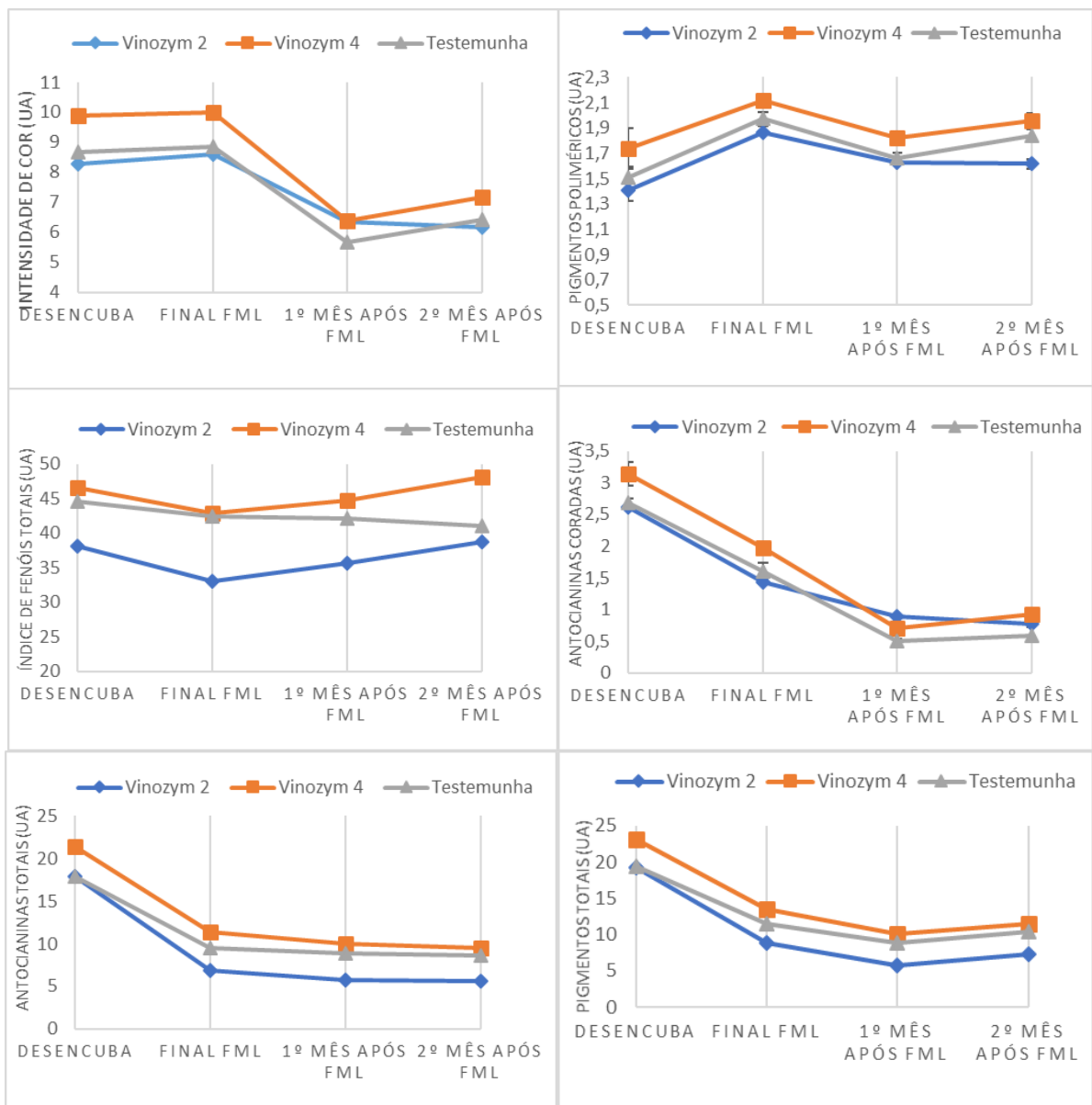


Figura 49: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA)+ na casta TN, com a aplicação da enzima Vinoxym, no ano de 2014.

Com a utilização da Prozym (**Fig. 50**), ao longo da evolução dos vinhos não se verificaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação à testemunha em nenhum dos parâmetros quantificados. Estes resultados revelam que esta enzima, nas concentrações testadas não adequada para aumentar a extração dos compostos fenólicos nas uvas da casta TN.

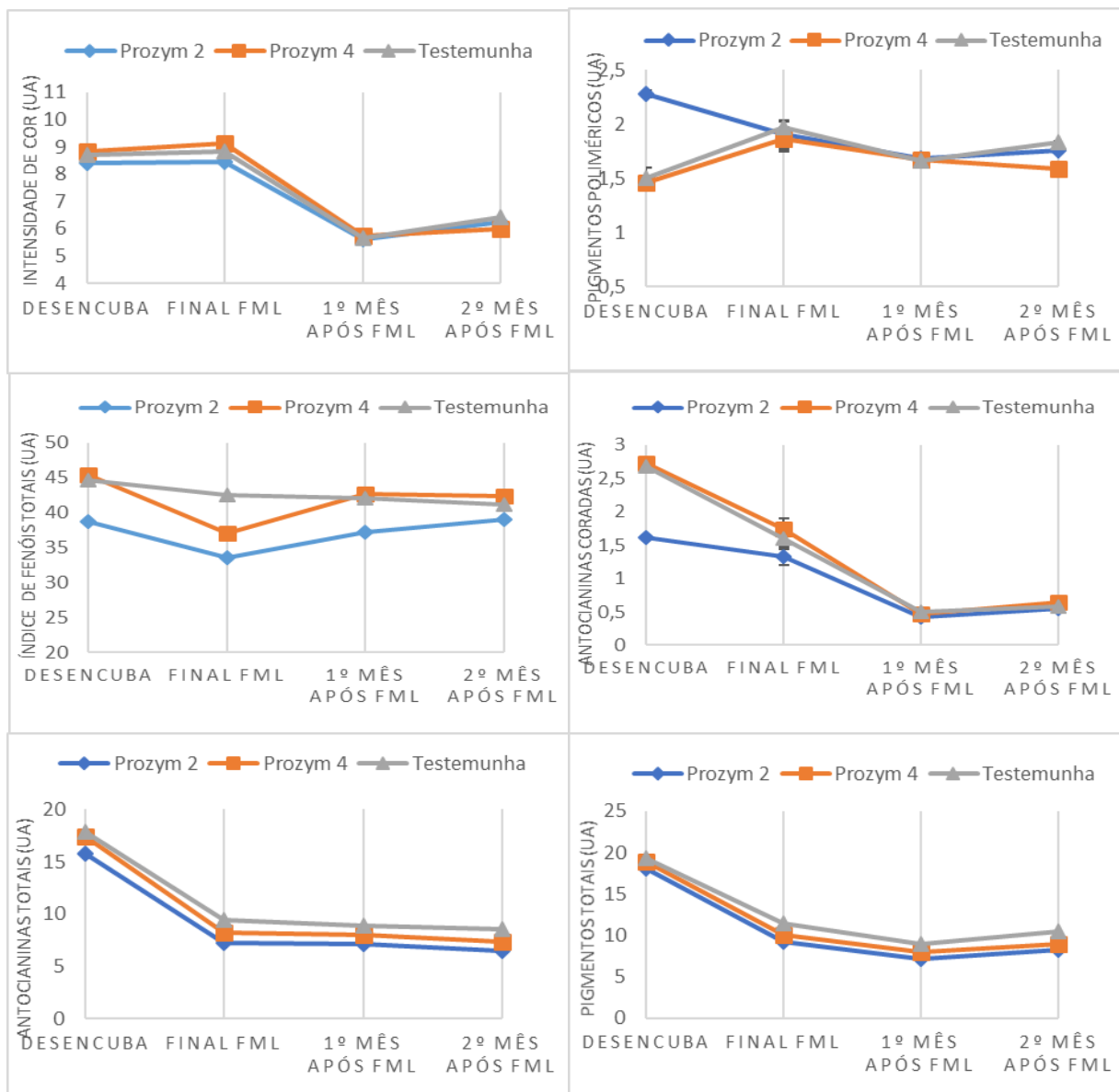


Figura 50: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA) na casta TN, com a aplicação da enzima Prozym, no ano de 2014.

Com a aplicação da Bioenzym (**Fig. 51**), os parâmetros quantificados evoluem da mesma forma que com a aplicação das restantes enzimas. Com a exceção do índice de fenóis totais, até ao final da FML, em que a Bioenzym, aplicada na concentração mais elevada, obtém valores mais elevados, em mais nenhum momento de qualquer parâmetro

existem diferenças significativas entre os vinhos com adição de enzima e a testemunha. Tal como se verificou para a enzima Prozym, a enzima Biozym não parece ser eficiente, nas condições testadas, na para a extração dos compostos fenólicos da casta TN.

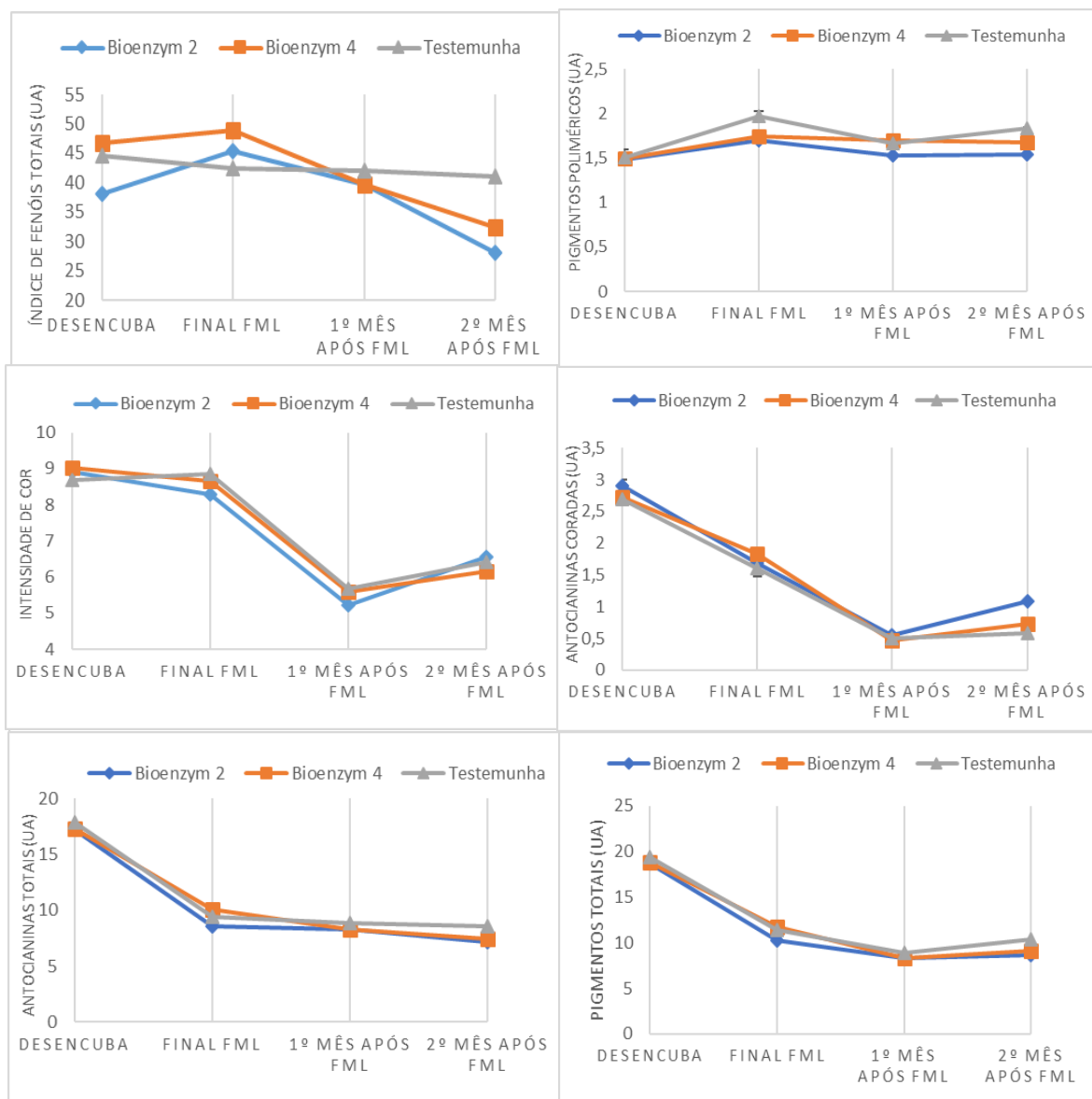


Figura 51: Quantificação do índice de fenóis totais (UA), intensidade de cor, antocianinas coradas (UA), antocianinas totais (UA), pigmentos totais (UA) e pigmentos poliméricos (UA) na casta TN, com a aplicação da enzima Biozym, no ano de 2014.

Avaliando os valores do teor em taninos (**Fig. 52**) dos diferentes ensaios no final da FML, podemos verificar que a Vinozym com 4 g/hL apresenta os valores mais elevados e a Biozym 2 g/hL apresenta os valores mais baixos. A testemunha possui valores de taninos

menores ao dos ensaios tratados enzimaticamente, com a exceção da Bioenzym 2, confirmando uma maior extração de taninos com a adição de pectinases, o que está de acordo com a literatura (3,105).

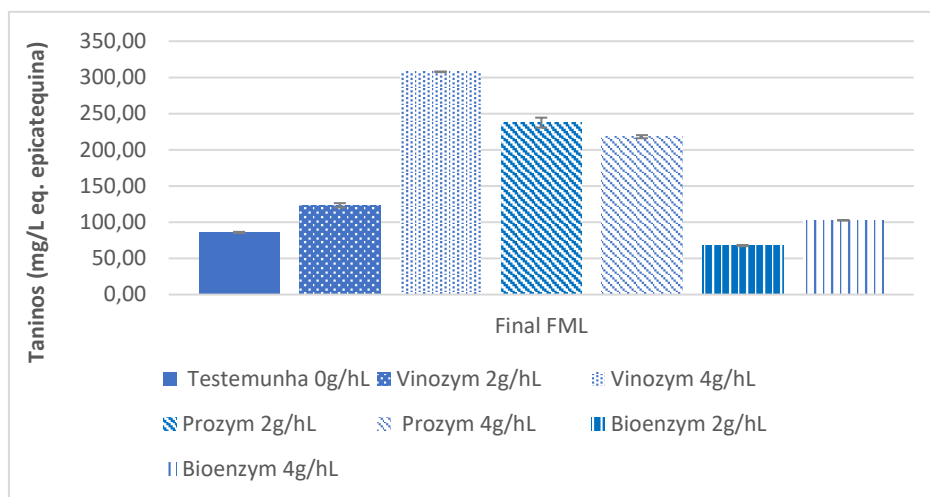


Figura 52: Quantificação de taninos (mg/L eq. epicatequina) na casta TN, com a aplicação das diferentes enzimas nas duas concentrações escolhidas, no final da FML, no ano de 2014.

Nos ensaios apresentados com a aplicação das três enzimas, apenas uma delas, Vinozym, atinge valores mais elevados que a testemunha. Contudo estes valores foram conseguidos apenas na concentração mais alta, 4 g/hL, Vinozym 4. Mesmo com a concentração mais elevada de enzima, nenhuma das restantes enzimas conseguiu ter valores superiores à testemunha. Na literatura descrevem a Vinozym EC como uma das enzimas com melhor extração de polifenóis na vinificação e respetiva estabilização dos mesmos no vinho (79). A utilização de preparações enzimáticas de pectinases leva à produção de vinhos com maiores teores em antocianinas e conseqüentemente com melhor cor (106). Neste caso, as diferenças entre os valores das atividades enzimáticas (**Tabela 3**), podem justificar os valores elevados obtidos pela Vinozym, em relação à Prozym, pois esta tem uma menor atividade enzimática. A Bioenzym, possui a maior atividade enzimática, no entanto não consegue aumentar a extração dos compostos fenólicos nos vinhos. Inclusive, na quantificação de taninos, verifica-se que a concentração mais baixa de Bioenzym aplicada obtém valores inferiores à testemunha. Esta diferença pode estar

relacionada com o grau de pureza das enzimas nas preparações comerciais. No entanto, dever-se-ia aprofundar o conhecimento sobre a composição dos produtos em questão.

*Tabela 3: Enzimas aplicadas e suas pectinases declaradas e correspondentes atividades enzimáticas principais e secundárias descritas nas respectivas fichas técnicas.*

<b>Nome comercial</b>	<b>Pectinases declaradas</b>	<b>Atividade declarada</b>	<b>Atividade secundária</b>
<b>Vinozym Vintage FCE</b>	Poligalacturonase	PG=7500 U/g	-
<b>Prozym Maceração</b>	Pectina Liase	PL>100 U/g	Amilase
	Pectina Metil Esterase	PE>700 U/g	Celulase
	Poligalacturonase	PG>3500 U/g	Proteinase
<b>Bioenzym RG PLUS EXTRACCION LIQUID</b>	Poligalacturonase	PG=13675 U/g	“atividade hemicelulásica ultra concentrada”

Assim sendo, neste estudo, podemos verificar que apenas se justifica a utilização da Vinozym, como enzima de maceração, utilizando uma concentração mais alta, 4 g/hL.

#### 4. Conclusão

A extração de compostos fenólicos pode ser facilitada por auxiliares enológicos, como as enzimas de maceração, e pode também ser influenciada por vários fatores intrínsecos, nomeadamente fatores que influenciam o metabolismo da uva durante a sua maturação, como é o caso de algumas operações vitícolas como o tipo de poda. No controlo de maturação de 2014, a poda mínima não obteve em nenhum parâmetro valores superiores à poda manual, em ambas as castas, obtendo por vezes valores semelhantes, como foi o caso da TN nos AR e TAP e em ambas as castas na AT. Já o ano de 2016, a poda mínima consegue valores mais elevados apenas na casta TN para a AR e TAP. O tipo de casta também influencia os teores de compostos fenólicos extraídos, verificando os comportamentos de acordo com o tipo de poda das duas castas estudadas, Alf e TN, sendo diferentes. Em 2014, no controlo de maturação fenólico a poda mínima na TN atinge resultados mais elevados em alguns dos parâmetros avaliados, como intensidade de cor e taninos, ao contrário da casta Alf, em que a poda manual obteve valores mais elevados ou não se registam alterações significativas entre os dois tipos de poda. As conclusões dos resultados do ano de 2016 são diferentes em relação ao tipo de poda, visto que a casta Alf consegue resultados mais elevados para a poda mínima, contrariamente à casta TN. Os estudos feitos neste âmbito servem para avaliar a evolução e adaptação da planta a novas técnicas de viticultura, como é o caso da poda mínima, ao longo do tempo, conseguindo que a poda mínima obtenha valores semelhantes ou superiores em relação à poda manual nos diversos parâmetros avaliados otimizando custos. A semelhança de valores foi conseguida nos dois anos, em 2014 na TN e em 2016 na casta Alf. Relativamente aos ensaios com tratamentos enzimáticos, verificou-se que apenas uma das enzimas adicionadas, Vinoxym, aplicada na concentração mais alta, obteve valores mais elevados nos parâmetros intensidade de cor, antocianinas coradas e pigmentos poliméricos, em relação aos valores da testemunha. A Vinoxym revelou ser a enzima com maior capacidade de extração, e estabilização da cor até à 2ª semana após o final da FML, concluindo que a eficácia da aplicação de enzimas depende não só do tipo de enzima, mas também da concentração aplicada. Esta diferença de valores obtidos entre preparações enzimáticas poderá dever-se à sua natureza enzimática e à pureza das preparações comerciais.



Neste sentido, mais estudos são necessários para avaliar a eficácia e adaptação da planta à poda mínima, e mais estudos são necessários para avaliar a utilização de enzimas de maceração avaliando a composição destas preparações. A estabilidade destes compostos é, de igual modo, importante estudar a longo prazo com o fim de compreender melhor as reações que ocorrem durante o envelhecimento dos vinhos tintos.

## 5. Bibliografía

1. Alcalde-Eon C, García-Estévez I, Puente V, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. Color stabilization of red wines. A chemical and colloidal approach. *J Agric Food Chem.* 2014;62(29):6984–94.
2. Li Z, Pan QH, Jin ZM, He JJ, Liang NN, Duan CQ. Evolution of 49 Phenolic Compounds in Shortly-aged Red Wines Made from Cabernet Gernischt (*Vitis vinifera* L. cv.). *Food Sci Biotechnol.* 2009;18(4):1001–12.
3. Sacchi KL, Bisson LF, Adams DO. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am J Enol Vitic.* 2005;56(3):197–206.
4. Matus JT, Loyola R, Vega A, Peña-Neira A, Bordeu E, Arce-Johnson P, et al. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J Exp Bot.* 2009;60(3):853–67.
5. Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(2):85–118.
6. Cerpa-Calderón FK, Kennedy JA. Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *J Agric Food Chem.* 2008;56(19):9006–14.
7. Heredia FJ, Francia-aricha EM, Rivas-gonzalo JC, Vicario IM, Santos-buelga C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes-I. pH effect. 1998;63(4):491–8.
8. Dufour C, Sauvaitre I. Interactions between Anthocyanins and Aroma Substances in a Model System. Effect on the Flavor of Grape-Derived Beverages. *J Agric Food Chem.* 2000;48(5):1784–8.
9. Souquet J, Cheyner VIR, Brossaud F, Moutounet M. Polymeric proanthocynidins from grape skins. *Phytochemistry.* 1996;9422(2):509–12.
10. Fulcrand H, Remy S, Souquet J-M, Cheyner V, Moutounet M. Study of Wine

- Tannin Oligomers by On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 1999;47(3):1023–8.
11. Río Segade S, Soto Vázquez E, Díaz Losada E. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *J Food Compos Anal.* 2008;21(8):599–607.
  12. Valls J, Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J Chromatogr A.* 2009;1216(43):7143–72.
  13. Herderich MJ, Smith PA. Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Aust J Grape Wine Res.* 2005;11(2):205–14.
  14. Wilfred Vermerris and Ralph Nicholson. *Phenolic Compound Biochemistry.* 2nd ed. Netherlands: Springer; 2006.
  15. Pina F, Melo MJ, Laia C a T, Parola a J, Lima JC. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. *Chem Soc Rev.* 2012;41(2):869–908.
  16. Pina F, Oliveira J, Freitas V De. Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations. *Tetrahedron.* 2014;1–8.
  17. Pina F. Anthocyanins and related compounds. Detecting the change of regime between rate control by hydration or by tautomerization. *Dye Pigment.* 2014;102:308–14.
  18. Escribano-bailo T, Marta A, Rivas-gonzalo JC. Color and Stability of Pigments Derived from the Acetaldehyde-Mediated Condensation between Malvidin 3- O - Glucoside and ( + ) -Catechin. *J Agric Food Chem.* 2001;49:1213–7.
  19. Leydet Y, Gavara R, Petrov V, Diniz AM, Parola AJ, Lima JC, et al. The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins. *Phytochemistry.* 2012;83:125–35.
  20. Ronald S. Jackson. *Wine Science Principles and Applications.* Fourth ed. USA: Elsevier Inc.; 2014.
  21. Brouillard R, Chassaing S, Fougèrouse a. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry.*

- 2003;64(7):1179–86.
22. Salas E, Fulcrand H, Meudec E, Cheynier V. Reactions of Anthocyanins and Tannins in Model Solutions. *J Agric Food Chem.* 2003;51(27):7951–61.
  23. Berké B, Chéze C, Vercauteren J, Deffieux G. Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Lett.* 1998;39(32):5771–4.
  24. Fulcrand H, Salas E, Cheynier V. Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *Am J Enol Vitic.* 2006;57(3):289–97.
  25. Jurd L. Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins. *J Food Sci.* 1964;29:16–9.
  26. Gao L, Girard B, Mazza G, Reynolds G. Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot noir wines during different vinification processes. *J Agric Food Chem.* 1997;45(6):2003–8.
  27. Boulton R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine : A Critical Review. 2001;2:67–87.
  28. Zhang B, Liu R, He F, Zhou P-P, Duan C-Q. Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations. *Food Chem.* 2015;170:226–33.
  29. Ferna I, Romero-cascales I. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *Int J Food Sci Technol.* 2008;43:1295–305.
  30. Vidal S, Cartalade D, Souquet JM, Fulcrand H, Cheynier V. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *J Agric Food Chem.* 2002;50(8):2261–6.
  31. Malaj N, De Simone BC, Quartarolo AD, Russo N. Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids. *Food Chem.* 2013;141(4):3614–20.
  32. Santiago JL, González I, Gago P, Alonso-Villaverde V, Boso S, Martínez MC. Identification of and relationships among a number of teinturier grapevines that expanded across Europe in the early 20th century. *Aust J Grape Wine Res.* 2008

- Sep;14:223–9.
33. Jauregi P, Olatujoye JB, Cabezudo I, Frazier RA, Gordon MH. Astringency reduction in red wine by whey proteins. *Food Chem.* 2016;199:547–55.
  34. Vivar-Quintana a. M, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Anal Chim Acta.* 2002;458(1):147–55.
  35. Cruz A., Piovene C., Caro A., Rodrigues A. CR. Mechanical Pruning on a Vertical Shoot Positioning System in. 17th Int Symp GiESCO 2011, 2010;1(1):575–7.
  36. González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal Chim Acta.* 2004;513(1):283–9.
  37. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A DD. *Handbook of Enology.* 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Inc.; 2000. 129-183 p.
  38. He F, Liang N-N, Mu L, Pan Q-H, Wang J, Reeves MJ, et al. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules.* 2012;17(2):1571–601.
  39. Mateus N, Machado JM, De Freitas V. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *J Sci Food Agric.* 2002;82(14):1689–95.
  40. Bimpilas A, Panagopoulou M, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chem.* 2016;197:39–46.
  41. Rustioni L, Bedgood DR, Failla O, Prenzler PD, Robards K. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. *Food Chem.* 2012;132(4):2194–201.
  42. Gutiérrez IH, Lorenzo ESP, Espinosa AV. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem.* 2005;92(2):269–83.
  43. Teixeira N, Cruz L, Brás NF, Mateus N, Ramos MJ, Freitas V. Structural Features of Copigmentation of Oenin with Different Polyphenol Copigments. *J Agric Food Chem.* 2013;61:6942–8.

44. Wilfred Vermerris and Ralph Nicholson. Phenolic Compounds Biochemistry. First ed. The Netherlands: Springer; 2006.
45. Tomás-Barberán FA, Espín JC. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric.* 2001;81(9):853–76.
46. Garrido J, Borges F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Res Int.* 2013;54(2):1844–58.
47. Wildman R, Kelley M. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Second ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2007.
48. Mann J. Chemical Aspects of Biosynthesis. First ed. New York: Oxford University Press; 1994.
49. Pérez-Magariño S, González-San José ML. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.* 2006;96(2):197–208.
50. Bautista-Ortín AB, Fernández-Fernández JI, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. The effect of grape ripening stage on red wine color. *J Int des Sci la Vigne du Vin.* 2006;40(1):15–24.
51. Perez-Magarino S, Gonzalez-San Jose ML. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J Agric Food Chem.* 2004;52(5):1181–9.
52. Meléndez E, Ortiz MC, Sarabiab LA, Íniguez M, Puras P. Modelling phenolic and technological maturities of grapes by means of the multivariate relation between organoleptic and physicochemical properties. *Anal Chim Acta.* 2013;761:53–61.
53. Rajha HN, El Darra N, El Kantar S, Hobaika Z, Louka N, Maroun RG. A Comparative Study of the Phenolic and Technological Maturities of Red Grapes Grown in Lebanon. *Antioxidants.* 2017;6(8):1–11.
54. Tregoat O, Van Leeuwen C, Choné X, Gaudillère J. Étude du régime Hhydrique et de la nutrition azotée de la vigne par des indicateurs physiologiques influence sur le comportement de la vigne et la maturation du raisin. *J Int Sci Vigne Vin.* 2002;36(3):133–42.

55. Lorrain B, Chira K, Teissedre P. Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage : Comparison to 2006 , 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.* 2011;126:1991–9.
56. Nogales-Bueno J, Baca-Bocanegra B, Rodríguez-Pulido FJ, Heredia FJ, Hernández-Hierro JM. Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins. *Food Chem.* 2015;172:559–64.
57. Hernández-Hierro JM, Quijada-Morín N, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Anal Chim Acta.* 2012;732:26–32.
58. Ortega-Regules A, Romero-Cascales I, Ros-García JM, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Anal Chim Acta.* 2006;563:26–32.
59. Jordão AM, Ricardo-da-Silva JM, Laureano O. Evolution of Catechins and Oligomeric Procyanidins during grape maturation of Castelão Francês and Touriga Francesa varieties. *Am J Enol Vitic.* 2001;52(3):230–4.
60. Puértolas E, Saldaña G, Condón S, Alvarez I, Raso J. A comparison of the effect of macerating enzymes and pulsed electric fields technology on phenolic content and color of red wine. *J Food Sci.* 2009;74(9):C647-52.
61. Gil J V., Vallés S. Effect of Macerating Enzymes on Red Wine Aroma at Laboratory Scale : Exogenous Addition or Expression by Transgenic Wine Yeasts. *J Agric Food Chem.* 2001;49:5515–23.
62. Poni S, Tombesi S, Palliotti A, Ughini V, Gatti M. Mechanical winter pruning of grapevine: Physiological bases and applications. *Sci Hortic (Amsterdam).* 2016;204:88–98.
63. Clingeleffer PR. Production and growth of minimal pruned Sultana vines. *Vitis.* 1984;23:42–54.
64. Clingeleffer PR. Mechanization in Australian vineyards. *Acta Hortic.* 2013;978:169–77.
65. Clingeleffer PR, Krake LR. Responses of Cabernet franc Grapevines to Minimal

- Pruning and Virus Infection. *Am J Enol Vitic.* 1992;43(1):31–7.
66. Castro R de, Claro A, Teixeira A, Camilo J, Cruz A. Mecanização integral da poda de inverno. Alfrocheiro e touriga nacional na região do dão. In: 1º Congresso Internacional dos Vinhos do Dão. 2009.
  67. Archer E, Schalkwyk D Van. The Effect of Alternative Pruning Methods on the Viticultural and Oenological Performance of Some Wine Grape Varieties. *South African J Enol Vitic.* 2007;28(2):107–39.
  68. Rousseau J, Pic L, Carbonneau A, Ojeda H. Incidence of minimal pruning on wine quality. *Acta Hortic.* 2013;978:309–16.
  69. Camilo J. Poda Mecânica vs Poda Manual na Casta Touriga Nacional na Região do Dão. Instituto Superior de Agronomia; 2009.
  70. Izquierdo-Cañas PM, Mena-Morales A, García-Romero E. Malolactic fermentation before or during wine aging in barrels. *LWT - Food Sci Technol.* 2016;66:468–74.
  71. Husnik JI, Delaquis PJ, Cliff MA, Van Vuuren HJJ. Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *Am J Enol Vitic.* 2007;58(1):42–52.
  72. Osborne J, Burns T. MLF: Malolactic fermentation and red wine colour. *Wine Vitic J.* 2015;30(5):28–30.
  73. Cabrita MJ, Ricardo-da-Silva J, Laureano O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: I Seminario Internacional de vitivinicultura. I SEMINARIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA; 1999. p. 61–102.
  74. Alpuim JP. Aprendendo a Química do Vinho. 1997;13–27.
  75. El Darra N, Turk MF, Ducasse MA, Grimi N, Maroun RG, Louka N, et al. Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. *Food Chem.* 2016;194:944–50.
  76. Lecas M, Brillouet J-M. Cell Wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry.* 1994;35(5):1241–3.
  77. McNeil M, Darvill AG, Fry C, Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:625–63.



78. Ducasse MA, Canal-Llauberes RM, de Lumley M, Williams P, Souquet JM, Fulcrand H, et al. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chem.* 2010;118(2):369–76.
79. Van Rensburg P, Pretorius IS. Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysts for efficient biotransformations- A review. *South African J Enol Vitic.* 2000;21(Special Issue):52–73.
80. Navarre C. *L'Enologie*. Sencond ed. Mem Martins: Publicações Europa-América, Lda; 2008.
81. Mar J, Doco T. Polysaccharide Composition of Monastrell Red Wines from Four Different Spanish Terroirs: Effect of Wine-Making Techniques. *J Agric Food Chem.* 2013;61:2538–47.
82. Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17(11):579–90.
83. Munoz O, Sepulveda M, Schwartz M. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from chilean wine. *Food Chem.* 2004;87(4):487–90.
84. Belda I, Conchillo LB, Ruiz J, Navascus E, Marquina D, Santos A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *Int J Food Microbiol.* 2016;223:1–8.
85. Pardo F, Salinas MR, Alonso GL, Navarro G, Huerta MD. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chem.* 1999;67:135–42.
86. Lang C, Dörnenburg H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;53(4):366–75.
87. Contreras Esquivel JC, Voget CE. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J Biotechnol.* 2004;110(1):21–8.
88. Rehman HU, Aman A, Nawaz MA, Qader SAU. Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21.

- Food Hydrocoll. 2015;43:819–24.
89. Balic I, Ejsmentewicz T, Sanhueza D, Silva C, Peredo T, Olmedo P, et al. Biochemical and physiological study of the firmness of table grape berries. *Postharvest Biol Technol.* 2014;93:15–23.
  90. Martín M, Ambrosini V. Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature. *Int J Food Sci Technol.* 2014;49:1893–901.
  91. Romero-Cascales I, Fernández-Fernández JI, Ros-García JM, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *Int J Food Sci Technol.* 2008;43(7):1295–305.
  92. Zimman A, Joslin W, Lyon M, Meier J, Waterhouse A. “ Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale Cabernet Sauvignon winemaking trials .” *Am J Enol Vitic.* 2002;53:93–8.
  93. Bautista-Ortí AB, Fernández-Fernández JI, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *J Food Compos Anal.* 2007;20:546–52.
  94. Afonso J. *A uva. Revista de vinhos.* 2009.
  95. OIV. *Compendium of international methods of wine and must analysis.* 13th ed. Paris: INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE; 2016.
  96. Chris Somers T, Evans ME. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, “chemical age.” *J Sci Food Agric.* 1977;28(3):279–87.
  97. Mercurio MD, Damberg RG, Herderich MJ, Smith PA. High Throughput Analysis of Red Wine and Grape Phenolics s Adaptation and Validation of Methyl Cellulose Precipitable Tannin Assay and Modified Somers Color Assay to a Rapid 96 Well Plate Format. *J Agric Food Chem.* 2007;(55):4651–7.
  98. Matias J, Amado O, Cunha A. *Declaração de vindima 2014.* Viseu; 2015.
  99. Soyer Y, Koca N, Karadeniz F. Organic acid profile of Turkish white grapes and

- grape juices. *J Food Compos Anal.* 2003;16:629–36.
100. Lamikanra O, Inyang ID, Leong S. Distribution and Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. *J Agric Food Chem.* 1995;43:3026–8.
  101. Calvão J. Efeito da poda e de produtos enológicos na evolução da cor do vinho tinto. Universidade de Aveiro; 2012.
  102. Porto J, Lucas C, Cunha A. Declaração de vindima 2016. Viseu; 2017.
  103. Ojeda H. Rega qualitativa de precisão na vinha. In: *Enoforum 2007.* Piacenza; 2007. p. 13–5.
  104. González-SanJosé ML, Barron LJR, Díez C. Evolution of anthocyanins during maturation of tempranillo grape variety (*Vitis vinifera*) using polynomial regression models. *J Sci Food Agric.* 1990;51(3):337–43.
  105. Nel A, van Rensburg P, Lambrechts M. The extraction of tannins using different winemaking techniques (Part 1) [Internet]. Wineland. 2014. Available from: <http://www.wineland.co.za/the-extraction-of-tannins-using-different-winemaking-techniques-part-1/>
  106. Kelebek H, Canbas A, Cabaroglu T, Selli S. Improvement of anthocyanin content in the cv. Okuzgozu wines by using pectolytic enzymes. *Food Chem.* 2007;105(1):334–9.
  107. Kennedy JA. Grape and wine phenolics : Observations and recent findings. *Cienc e Investig Agrar.* 2008;35:107–20.