



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Capacidade antioxidante e compostos
fenólicos de madeiras com uso enológico:
influência do grau de tosta**

SOFIA VALDANTAS

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA MARIA JOÃO CABRITA

CO-ORIENTADORA: DOUTORA RAQUEL GARCIA

MESTRADO EM VITICULTURA E ENOLOGIA

ÉVORA, 2013



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Capacidade antioxidante e compostos fenólicos de madeiras com uso enológico: influência do grau de tosta

SOFIA VALDANTAS

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA MARIA JOÃO CABRITA

CO-ORIENTADORA: DOUTORA RAQUEL GARCIA

MESTRADO EM VITICULTURA E ENOLOGIA

ÉVORA, 2013

“ As boas amizades são como o bom vinho: melhoram com o tempo”

Monteiro Lobato

Dedico esta dissertação aos meus pais,
porque a eles devo tudo o que sou hoje.

Os meus agradecimentos por todo o
apoio e confiança depositados em mim e
em todas as minhas decisões
E também dedico à memória do meu avô.

Agradecimentos

O sonho tornado realidade

“Chegar até ao cimo da montanha e contemplar o imenso vazio a partir do cume pode ser gratificante. Mas nada é superior à árdua caminhada desde o baixo terreno e às dificuldades percorridas nessa viagem, para superar os percalços da subida.”

Esta podia ser uma frase retirada de um qualquer livro ou referência de um outro qualquer autor. Mas não, achei pertinente começar de forma mais literária esta minha tese de mestrado. Nem só de coisas concretas se descrevem os dois anos de mestrado, nem se explica o que se aprendeu com tamanha experiência. A caminhada feita nestes dois anos foi, sem dúvida, a experiência mais enriquecedora que alguma vez tive no âmbito da formação académica, não desprezando contudo todo o trabalho desenvolvido anteriormente.

De uma forma geral, pode-se referir que tudo o que foi feito desde a minha entrada para o mestrado de Viticultura e Enologia foi ponto essencial para esta minha tese de mestrado. Foi uma soma de trabalho e dedicação, de objetivos e oportunidades que fui sabendo agarrar.

Inicialmente, tenho a agradecer a Deus, que sem ele não estaria aqui. Aos meus pais, que me apoiaram e incentivaram nas decisões por mim tomadas, mesmo que entre elas viessem possíveis afastamentos temporários, mas que futuramente seriam compensados devido ao aprendizado neles obtidos.

Aos meus avós por todo o apoio e força que transmitiram durante toda a minha aprendizagem. Também ao meu avô que está lá em cima, mas sei que olha por mim...

Depois, sem querer deixar hierarquias definidas, agradeço em geral aos meus colegas de curso os bons momentos passados, as partilhas feitas nas aulas e fora delas.

Aos que me acompanharam durante estes dois anos agradeço o apoio e a ajuda por me aguentar em euforias e desagrados. Por serem portos

de abrigo nas alturas em que quis desistir e nos momentos em que não vi mais nada a não ser o mestrado de Enologia e Viticultura, e agora esta minha dissertação.

Se não fossem essas barreiras e contrariedades, penso que não era tão saborosa esta satisfação de chegar até aqui.

Agradeço com especial carinho a ajuda prestada por todas as pessoas com quem trabalhei durante a minha dissertação.

Em especial à Prof. Maria João Pires Bastos Cabrita pela orientação científica, pelo apoio incansável, pela sua disponibilidade, motivação, paciência e interesse mostrado em me ajudar a realizara minha dissertação; durante o decorrer, não foi apenas uma simples orientadora mas sim uma amiga, nunca esquecerei todos os seus gestos para comigo e por tanta coisa que me ensinou a nível científico como pessoal. Obrigada mais uma vez por me ter “aturado” nestes meses.

Também quero agradecer à Dr^a Raquel Marta Neves dos Santos Garcia por toda a sua dedicação, carinho e por me ter disponibilizado algum do seu tempo, mesmo quando este era curto, e tão pacientemente me ter elucidado.

Ao Pedro Pereira (meu namorado), um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Por tudo, a minha enorme gratidão!

A minha amiga Cristiana Borges, pelo seu apoio e companheirismo, sem o qual teria sido difícil esta etapa na minha vida.

A todos os colaboradores do laboratório de Enologia, em especial a Engenheira Antónia Prates de Oliveira, pela simpatia, disponibilidade e pela forma como me acolheram.

Quero agradecer também de forma especial às minhas melhores amigas, Marta Marujo, Sara Correia, Ana Correia, Linda Madeira, Madalena Cardoso que nestes últimos meses não lhe dediquei o tempo que merecem mas sei que no fundo estão sempre do meu lado e estou

sempre perdoada, porque “a amizade é o ingrediente mais importante da vida”.

E de modo a não me esquecer de ninguém quero agradecer as TODOS que de uma forma ou de outra estiveram presentes nestes meses obrigados mais uma vez por tudo.

Índice

1.Introdução.....	16
2.Revisão Bibliográfica	19
2.1.A Madeira em Enologia	19
2.1.1.Origem da sua Utilização	19
2.1.2.Origem do envelhecimento de vinhos em madeira	20
2.1.3.Processo de envelhecimento	22
2.1.4.Interesse da madeira em Enologia.....	25
2.2.Estrutura e propriedade físicas da madeira.....	26
2.2.1.Características anátomo-estruturais.....	26
2.2.2.Composição química da madeira.....	28
2.3.Factores que influenciam a composição química das madeiras	29
2.3.1.Influencia do processo de secagem.....	30
2.3.2.Influencia do processo de queima	31
2.3.3.Espécies botânicas e distribuição geográfica.....	33
2.3.4. Actividade antioxidante das madeiras	34
2.5. Compostos fenólicos.....	37
2.5.1.Características da estrutura polifenólica.....	37
2.5.2.Compostos de natureza não flavonóide	38
2.5.3. Compostos de natureza flavonóide	39
2.5.4. Antocianinas	39
2.6. As características cromáticas dos vinhos.....	40
2.7. Os compostos fenólicos nos vinhos	45
2.7.1.Propriedades biológicas dos compostos fenólicos	46
2.7.2. Propriedades antioxidantes.....	46
2.7.2.1 Outras propriedades biológicas.....	48
2.7.3.Métodos de determinação da atividade antioxidante	49
2.7.3.1Método de descoloração do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)	50
2.7.3.2 Método de descoloração do radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzolina-6- sulfónico (ABTS).....	52
2.7.4.Actividade antioxidante e stress oxidativo	54
3. Material e métodos	58
3.1.Amostras das madeiras	58

3.2.Soluções hidroalcoólicas	58
3.3.Vinhos	59
3.4. Análises.....	60
3.4.1. Análises espectrofotométricas.....	60
3.5. Análise estatística.....	64
4.Apresentação e discussão de resultados	66
4.1. Análises espectrofotométricas das soluções hidroalcoólicas	66
4.1.1.Espectros de absorvância das soluções.....	66
4.1.2.Polifenóis Totais das soluções analisadas	67
4.2. Análises espectrofotométricas do vinho tinto	68
4.2.1.Polifenóis Totais dos vinhos com aparas	68
4.2.2.Polifenóis Totais dos vinhos com dominós	69
4.2.3.Pigmentos antociânicos	70
4.2.4.Flavonóides Totais.....	72
4.2.5.Flavonóides não antociânicos.....	72
4.2.6.Características da cor nos vinhos	74
4.2.7. Cielab.....	75
4.3.Capacidade Antioxidante das Amostras.....	77
5.Conclusão	89
6.Bibliografia	91

Índice de Figuras

FIGURA 1 - CORTE TRANSVERSAL DO TRONCO DA ARVORE	27
FIGURA 2- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA , ADAPTADA DE MOSEDALE <i>ET AL.</i> , (1998)	29
FIGURA 3 - SECAGEM NATURAL (FONTE : J.M.GONÇALVES)	30
FIGURA 4 – IMAGENS ILUSTRATIVAS DO PROCESSO DE QUEIMA DA MADEIRA (FONTE: JMGONÇALVES.COM)	32
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DE ÁCIDO BENZÓICO E DE ÁCIDO CINAMICO (FONTE: OLEOESSENCIAIS.ORG)	38
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DE FLAVONÓIDES (CABRITA, M.J. (2004))	39
FIGURA 7 - ESTRUTURA DAS ANTOCIANINAS (CABRITA, M.J. (2004))	40
FIGURA 8- SÓLIDO DE MUNSELL (FONTE: ARQ.UFSC.BR)	43
FIGURA 9 - SISTEMA CIELAB(FONTE: DBA.MED.SC.EDU)	45
FIGURA 10 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH (FONTE: CNPAT.EMBRAPA.BR)	51
FIGURA 11- ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL ABTS ⁺ POR UM ANTIOXIDANTE E SUA FORMAÇÃO PELO PERSULFATO DE POTÁSSIO (FONTE: CNPAT.EMBRAPA.BR)	54
FIGURA 12 - SITUAÇÃO DE STRESS OXIDATIVO (ADAPTADO DE ROUSSEL, 2002)	55
FIGURA 13 - SITUAÇÃO DE EQUILÍBRIO (ADAPTADO DE ROUSSEL, 2002)	56
FIGURA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL DPPH COM AS AMOSTRAS	61
FIGURA 15- REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE TROLOX	62
FIGURA 16 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL ABTS ⁺ COM AS AMOSTRAS	63
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE TROLOX COM O RADICAL ABTS ⁺	63
FIGURA 18- ESPECTROS DE ABSORVÂNCIA (250-450NM) DOS EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS DOS QUATRO TIPOS DE MADEIRA SUJEITOS AOS DIFERENTES NÍVEIS DE TOSTA.....	66
FIGURA 19 - POLIFENÓIS TOTAIS EM VINHOS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS	68
FIGURA 20 - POLIFENÓIS TOTAIS EM VINHOS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS	70
FIGURA 21 - ANTOCIANAS TOTAIS (AT) E LIVRES (AL) EM VINHO COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS	71
FIGURA 22 - FLAVÓNOIDES TOTAIS EM VINHOS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS	72
FIGURA 23 - FLAVONÓIDES TOTAIS NÃO ANTOCIANICOS EM VINHO COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTANICAS	73
FIGURA 24 - CARACTERÍSTICAS DA COR (INTENSIDADE E TONALIDADE) DOS VINHOS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS	74
FIGURA 25 - ESPECTRO DE ABSORVÂNCIA DO RADICAL DPPH	78
FIGURA 26 - REAÇÃO CINÉTICA DE UMA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA COM O RADICAL DPPH	79
FIGURA 27 - REAÇÃO CINÉTICA DE VINHO TINTO COM O RADICAL DPPH	79

FIGURA 28 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS SOLUÇÕES HIDROALCOÓLICAS COM APARAS DE ESPÉCIES BOTÂNICAS (RADICAL DPPH)	80
FIGURA 29 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHO COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS (RADICAL DPPH)	81
FIGURA 30 - ESPECTRO DE ABSORVÂNCIA DO RADICAL ABTS	82
FIGURA 31 - REACÇÃO CINÉTICA DE UMA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA COM RADICAL ABTS.....	83
FIGURA 32 - REACÇÃO CINÉTICA DE VINHO TINTO COM O RADICAL ABTS	83
FIGURA 33 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM SOLUÇÕES HIDROALCOÓLICAS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS (RADICAL ABTS).....	84
FIGURA 34 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHO COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTANICAS (RADICAL ABTS).....	85
FIGURA 35 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHO COM DOMINÓS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS (RADICAL ABTS).....	86

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - POLIFENÓIS TOTAIS DAS SOLUÇÕES HIDROALCOÓLICAS (MG (+) CATEQUINA /L)	67
TABELA 2 - CIELAB DOS VINHOS TINTOS COM AS DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS E DIFERENTES GRAUS DE TOSTA.....	76
TABELA 3 - POLIFENÓIS TOTAIS, ANTOCIANAS TOTAIS E LIVRES, FLAVONÓIDES ANTOCÂNICOS E NÃO ANTOCIÂNICOS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICOS.....	102
TABELA 4 - INTENSIDADE E TONALIDADE DA COR EM VINHOS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS	103
TABELA 5 - ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SOLUÇÕES HIDROALCOÓLICAS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTANICAS (RADICAL ABTS E DPPH)	105
TABELA 6 - ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHOS COM APARAS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS (RADICAL ABTS E DPPH).....	106
TABELA 7 - ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHOS COM DOMINÓS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS ..	107

Resumo

A utilização de madeiras em enologia, pressupõe um profundo conhecimento das suas características e das implicações do seu uso nas características dos vinhos, seja na forma de barricas seja na forma de alternativos (aparas, aduelas ou dominós).

Hoje em dia, para além da madeira de carvalho e castanheiro, também as madeiras de acácia e cerejeira começam a ser estudadas.

Actualmente sabe-se que a capacidade antioxidante dos vinhos aumenta aquando do contacto com a madeira de carvalho. Neste contexto o presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento das capacidades antioxidantes de diferentes espécies de madeiras com diferentes graus de tosta e o impacto da sua utilização em vinhos tintos.

Assim, em soluções hidroalcoólicas e em vinhos tintos com as diferentes madeiras em estudo, cerejeira, acácia, carvalho e castanheiro sujeitas a quatro tratamentos térmicos foi avaliada a capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS. Mediu-se espectrofotometricamente o teor em polifenóis totais, antocianas totais e livres, flavonóides totais e não antociânicos e parâmetros da cor.

“Antioxidant capacity and phenolic compounds in wood for oenological use: influence of toasting levels”

Abstract

The use of wood in oenology, requires a thorough knowledge of their characteristics and implications of its use in the characteristics of the wines, whether in the form of barrels or in the form of alternative (chips or staves).

Nowadays, in addition to the oak and chestnut, also acacia and cherry woods are beginning to be studied.

Currently it is known that wine antioxidant capacity increases upon contact with oak. In this context, this work aims to contribute to the knowledge of the antioxidant capacities of different wood species with different degrees of toast and the impact of their use in red wines.

In alcoholic solutions and in red wines with the different woods studied, (cherry, acacia, oak and chestnut subjected to four toasting treatments) the antioxidant capacity by DPPH and ABTS method was evaluated. The content of total polyphenols, total and free anthocyanins, total flavonoids and non-anthocyanin and color parameters were also evaluated.



INTRODUÇÃO

1.Introdução

O vinho e os seus derivados sempre estiveram de alguma forma vinculados à história do homem, seja por serem bebidas com sabor e personalidade próprias seja, também, por trazerem potenciais benefícios à saúde. Com base num importante estudo epidemiológico (Projecto MONICA) levado a cabo pela Organização Mundial de Saúde, nas décadas de 80 e 90, envolvendo 21 países e cerca de dez milhões de pessoas, foi observado pela comunidade científica uma ocorrência baixa de doenças cardiovasculares em França, comparativamente com outros países do norte da Europa, apesar das semelhanças no consumo de ácidos gordos saturados (elevado), hábitos de fumo e falta de exercício físico. Este facto ficou conhecido como o “paradoxo francês”. O paradoxo francês foi explicado e sustentado pela chamada dieta mediterrânica, caracterizada por ter um padrão alimentar saudável, devido ao consumo regular e elevado de alimentos ricos em compostos fenólicos - vegetais, frutas, frutos secos, azeite, chá e vinho tinto - com reconhecida atividade antioxidante e com efeitos benéficos para a saúde.

Essencialmente motivado pelo paradoxo francês, nos últimos anos desenvolveu-se um grande interesse da indústria alimentar e da comunidade científica pelos alimentos e bebidas nutracêuticos, que contêm compostos com elevada atividade antioxidante, o que significa que podem ter efeitos positivos tanto na conservação de alimentos e bebidas, como na preservação da saúde humana quando presentes regularmente na dieta.

Pela dificuldade de se avaliar o efeito da atividade antioxidante de certos alimentos e bebidas sobre a fisiologia e a saúde humana, torna-se necessário encontrar nestes alimentos indicadores que se correlacionem com os seus efeitos biológicos *in vivo*. Um destes indicadores é a composição fenólica. Outro indicador é a atividade antioxidante em relação à captação de radicais livres.

Assim, com o presente trabalho pretende-se definir o perfil da capacidade antioxidante de quatro tipos de madeiras com potencial interesse enológico (acácia, cerejeira, castanheiro e carvalho) com diferentes graus de tosta (sem tosta, tosta ligeira, tosta média e tosta forte), de forma a avaliar se a sua aplicação aos vinhos pode modificar a sua actividade antioxidante.

Atendendo a este objetivo, o trabalho é estruturado em quatro capítulos, sendo o primeiro capítulo relativo ao estado atual do conhecimento no respeitante aos fatores que condicionam o envelhecimento; um segundo capítulo descritivo do vinho e das madeiras estudadas e das determinações analíticas efetuadas (teor de polifenóis totais, teor de flavonóides e características cromáticas, atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH• ABTS•; um terceiro em que são apresentados e discutidos os resultados obtidos nestas condições experimentais; e um quarto, com as principais conclusões.



Revisão Bibliográfica

2.Revisão Bibliográfica

2.1.A Madeira em Enologia

2.1.1.Origem da sua Utilização

Pensa-se que as técnicas de tanoaria foram introduzidas na Península Ibérica pelos celtas no século VI a.C.. Existem referências ao transporte de vinho em vasilhas de madeira no ano 41 a.C., altura que se julga ter havido um considerável desenvolvimento em tanoaria, que adquiriu um carácter semi-industrial, mas sem perda da sua vocação artesal, aspecto que permaneceu ao longo do tempo (Canas e Caldeira, 2009).

No domínio da vitivinicultura, cedo se reconheceu a influência da madeira na qualidade dos vinhos (Ribéreau-Gayon, 1931; Marché *et al.*, 1975; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1976; Monties, 1987; Dubois, 1989; Moutounet *et al.*, 1999).

Existem referências a que, para além do carvalho (*Quercus*), diversas espécies florestais, como o Pinheiro bravo (*Pinus pinaster*), o Eucalipto (*Eucalyptus*), o Mogno (*Swietenia macrophylla*), a Macacaúba (*Platymiscium pinnatum*) (Nobre da Veiga, 1954) e a Acácia (Nobre da Veiga, 1954; Chatonnet *et al.*, 1997; Parodi, 2000) eram utilizadas no fabrico de vasilhas para o transporte e a conservação de vinhos. Também a madeira de castanheiro era muito apreciada para tanoaria, sendo utilizada em vasilhas destinadas à expedição de vinhos da Europa (Nobre da Veiga, 1954; Taransaud, 1976).

Por outro lado, razões de ordem económica e a “moda” também contribuíram para a alteração das espécies florestais usadas em tanoaria, provocando a exclusão quase completa do castanheiro e o destaque da madeira de carvalho. Taransaud (1976) referia mesmo que a madeira de carvalho era a única apropriada para a vinificação e conservação de vinhos considerados finos. Muitos autores

consideravam que apenas a madeira de carvalho apresentava aptidões para a obtenção de vinhos e aguardentes de qualidade (Monties, 1987; Puech e Sarni, 1990, Viriot *et al.*, 1993; Singleton, 1995; Cutzack *et al.*, 1997, Haluk e Irmouli, 1998).

Nos últimos anos assistiu-se a um aumento considerável da procura de carvalho americano, tanto nos países tradicionalmente vitícolas como nos novos países vitícolas (Austrália, Chile, Argentina, entre outros), motivado pelo menor preço, mais rápida disponibilização (Schahinger, 1992; Mosedale, 1995), e reconhecimento das suas aptidões, mas sem nunca pôr em causa a supremacia do carvalho francês.

As madeiras de carvalho de origem francesa e americana foram, nas últimas décadas, objeto de aprofundado estudo na perspetiva da sua utilização em tanoaria, o qual levou ao reconhecimento das suas potencialidades para o envelhecimento de vinhos e de aguardentes. Já em relação às espécies de castanheiro e de carvalho cultivadas em Portugal assistia-se até recentemente a um quase total desconhecimento das suas características químicas e das potencialidades para o uso enológico.

Com efeito, no caso da madeira de castanheiro, a pesquisa tem incidido sobretudo na composição em taninos hidrolisáveis, pelo importante aproveitamento pelas indústrias de curtumes, de tintas, farmacêutica e alimentar (Salagoity *et al.*, 1986; Scalbert *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1991; Krisper *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 1992; Vivas *et al.*, 1993a; Viriot *et al.*, 1994; Berrocal del Brio *et al.*, 1998)

2.1.2. Origem do envelhecimento de vinhos em madeira

A origem do envelhecimento do vinho coincide com a necessidade de transportá-lo desde as zonas de produção até aos pontos de consumo.

O primeiro testemunho que comprova este facto data do terceiro milénio a.C., na Mesopotâmia, onde não existiam vinhas, e o vinho como um produto de luxo se importava das "montanhas", isto é, da zona norte-noroeste, atual Síria e Arménia, região de origem da videira e onde o vinho se produzia desde há muito tempo. O vinho viajava desde esta zona de produção até ao sul, em ânforas de barro cozido, sendo transportado em caravanas ou por via fluvial (Togores, 2003).

Posteriormente, os mercadores fenícios que comercializavam o vinho por toda a bacia do Mediterrâneo, alteraram os recipientes vinários para volumes mais pequenos, não superiores a 200-300 kg de peso, para que fossem manejados por uma ou duas pessoas perante a ausência de meios mecânicos, e construídos com materiais resistentes aos frequentes golpes e quedas que estes sofriam durante a sua manipulação (McGovern *et al.*, 1996).

A evolução dos recipientes de transporte nos países do sul do Mediterrâneo, pela lógica consequência do comércio, foi desde a estática jarra de barro, até à leve e esbelta ânfora fenícia, grega e inclusivamente romana. A fragilidade destes recipientes solucionou-se com a utilização de couros, fabricados a partir de peles curtidas e impermeabilizadas com resinas, de grande ductilidade e resistência ao transporte mas que, inevitavelmente, prejudicavam a qualidade dos vinhos uma vez que lhes conferiam odores e sabores estranhos, provenientes do couro e da sua preparação e impermeabilização (Togores, 2003).

Contudo, nos países do norte, os depósitos de grande volume onde se elaboravam e armazenavam os vinhos, eram construídos em madeira, material relativamente abundante no meio circundante e que podia ser trabalhado com grande facilidade. No entanto, estes depósitos evoluíram para recipientes de transporte de pequeno volume, construídos com a mesma madeira, surgindo então um grande número de recipientes como: barricas, barris, pipas, tonéis e outros similares, todos eles com capacidades compreendidas entre os 200 e 500 litros.

Possivelmente, este tipo de recipiente já se utilizava no tempo dos romanos, como reservatório de transporte terrestre em carroças, arrastadas por bois ou cavalos, a partir das mesmas regiões vitícolas da Península Itálica, ou zonas produtoras do centro e norte da Gália, assim como da zona romana da vizinha Germânia (McGovern *et al.*, 1996).

Após a queda do Império Romano, e durante bastante tempo, o seu transporte continuou a realizar-se em recipientes de madeira, utilizando-se sobretudo o carvalho, por ser um material abundante na zona de produção dos vinhos, muito pouco permeável e de grande dureza e resistência (Togores, 2003).

2.1.3. Processo de envelhecimento

Durante o processo de envelhecimento, os vinhos sofrem uma série de transformações profundas que ocasionam importantes modificações na vivacidade e intensidade da cor, na sua estrutura e adstringência, e na sua composição aromática. Para além destas alterações ao nível das características sensoriais, o envelhecimento confere limpidez e estabilidade ao vinho (Margalit, 2004).

De um modo geral, os vinhos passam primeiramente por um período de maturação em madeira, podendo optar-se pelo uso de barricas, aparas ou outros materiais, estando em contacto mais ou menos intermitente com o ar. Durante esta fase, o vinho começa a desenvolver as suas qualidades gustativas, adquire estabilidade e limpidez e têm lugar importantes fenómenos de oxidação que ocasionam perdas e transformações de antocianinas e taninos, condensações e polimerizações, oxidação do etanol a acetaldeído, modificações aromáticas através do aparecimento dos aromas terciários, entre outros. Posteriormente, o processo de envelhecimento poderá decorrer na garrafa, onde a entrada de ar é praticamente nula e o vinho envelhece num meio completamente redutor (Benavent e Cano, 2003).

Durante o período no qual o vinho se encontra em contacto com a madeira, a presença de oxigénio é um fator de extrema importância. No caso das barricas, a entrada de oxigénio ocorre de uma forma natural através da porosidade existente, dependendo da natureza da madeira, espessura, idade e volume das barricas. Caso se opte pelo uso de outras alternativas, como por exemplo as aparas, é necessário recorrer à microoxigenação, para que este procedimento traga o efeito desejado (Togores, 2003).

Assim, durante o envelhecimento de vinhos em barrica ocorrem uma série de fenómenos e transformações de carácter físico, químico e inclusivamente biológico, que levam à estabilização natural dos vinhos, e a uma série de transformações e melhorias das suas características sensoriais. Genericamente, estes fenómenos podem resumir-se à entrada de oxigénio e perda de vinho através dos poros da madeira, precipitação de diversas substâncias do vinho, formação de ésteres, transformação de polifenóis e libertação de substâncias constituintes da madeira (Benavent e Cano, 2003).

As madeiras usadas em enologia libertam para o vinho uma série de compostos que vão intervir nas reações que têm lugar durante o envelhecimento, contribuindo desta forma para o bouquet dos vinhos. Neste contexto são de salientar os taninos, os compostos aromáticos e fenólicos e os polissacáridos solúveis.

A quantidade de taninos libertada pela madeira depende da sua origem, secagem, tosta e idade. Estes contribuem moderadamente para a polimerização e condensação de antocianinas e taninos, e portanto, para a estabilidade polifenólica dos vinhos. Os polissacáridos libertados pela madeira suavizam o sabor áspero e adstringente característico dos taninos, sendo o processo da queima responsável por favorecer a sua libertação a partir da celulose e hemicelulose (Togores, 2003).

Também são libertados pela madeira alguns aldeídos como a vanilina e o siringaldeído, fenóis voláteis, como o guaiacol e o eugenol,

fenilcetonas, lactonas, pirazinas, piridinas, entre muitos outros. O processo de tosta pode ainda levar ao aparecimento de outros aldeídos, os aldeídos furânicos, como o furfural, por exemplo (Benavent e Cano, 2003).

O papel da madeira é crucial no envelhecimento do vinho, uma vez que as mudanças importantes ocorrem durante este processo. Segundo Alañón *et al.*, (2011) essas modificações são:

- a. Complexidade de aromas aumenta devido à extração de alguns compostos presentes na madeira;
- b. Compostos fenólicos solúveis provenientes da madeira melhoram o sabor (gosto); e
- c. Oxidação dos compostos fenólicos através do oxigênio atmosférico, o qual passa através dos poros da madeira levando a alteração da cor e redução de adstringência.

Portanto o envelhecimento do vinho, em madeira altera as suas propriedades organolépticas conduzindo a um produto muito valorizado (Alañón *et al.*, 2011).

O grau de extração de compostos da madeira depende da sua concentração inicial na madeira, que por sua vez depende do tipo de madeira utilizada e da sua composição química (Alañón *et al.*, 2011).

Tradicionalmente utilizam-se diversas madeiras tais como o carvalho, o castanheiro e a cerejeira na forma de barricas para envelhecimento. No entanto, o carvalho é a madeira mais utilizada para envelhecimento, enquanto o uso do castanheiro e da cerejeira é relativamente raro e recente (Vivas, 2002).

Pelas razões expostas anteriormente, o envelhecimento de vinhos em madeiras é cada vez mais uma prática comum e obrigatória no mundo enológico atual. No entanto, para se conseguir atingir os melhores resultados deve realizar-se sob condições apropriadas de temperatura,

humidade, tempo e manipulação. O elevado valor, em qualidade e preço, associado aos vinhos envelhecidos em madeiras leva à necessidade de um exaustivo controlo da sua evolução e ao acompanhamento detalhado das transformações que vão sucedendo, para decidir com exatidão o tempo ideal de envelhecimento e as condições adequadas para cada vinho, as quais podem ser modificadas à medida que o vinho evolui.

2.1.4. Interesse da madeira em Enologia

O uso da madeira durante os processos de fermentação e envelhecimento de vinhos é uma prática comum em todas as regiões produtoras de vinho. Como descrito por diversos autores, o vinho sofre alterações físico-químicas e organoléticas.

Num processo tecnológico a madeira surge nos diferentes processos de produção de vinho: a partir de balseiros de grandes dimensões, barricas e, nos últimos anos, surgiram os alternativos que aparecem no mercado de variadas formas como as aparas, os dominós e as aduelas, pois as barricas tem um elevado custo económico, uma vida útil reduzida de difícil higienização e de difícil manuseamento, ocupando muito espaço de adega (Natali *et al.*, 2006; Jaarsveld *et al.*, 2008a; De Simón *et al.*, 2009). As desvantagens associadas à utilização de barricas levaram ao desenvolvimento de técnicas alternativas de modo a tornar o processo de envelhecimento menos dispendioso, assegurando que a madeira liberte os seus compostos para o vinho (Jaarsveld *et al.*, 2008a; De Simón *et al.*, 2009b) e acelerando o processo de maturação dos vinhos.

Recentemente a OIV (Organização Internacional de la Vigne et du Vin) aprovou o uso de aparas (Resolução Oeno 3/2005) e aduelas (castanheiro e carvalho) como alternativa as barricas, perspectivando-

se a utilização de outras espécies botânicas para além do carvalho no envelhecimento de vinhos.

2.2.Estrutura e propriedade físicas da madeira

2.2.1.Características anátomo-estruturais

O plano transversal do tronco (Figura 1) revela sucessivamente, da periferia para o centro (Carvalho, 1997): *casca ou suber* – constitui a *casca morta ou ritidoma*; *câmbio suberoso ou felogene* – meristema secundário que assegura o engrossamento do tronco, produzindo as células dos tecidos protectores, feloderme para o interior e suber para o exterior. O crescimento do carvalho é promovido essencialmente na direcção centrípeta; *feloderme*; *liber ou floema* – assegura a circulação da seiva elaborada; *câmbio libero-lenhoso ou câmbio vascular* – meristema secundário que garante o engrossamento do tronco, diferenciando xilema para o interior e floema para o exterior; *lenho ou xilema* – tecido secundário constitutivo fundamental das árvores, formado por células arquitectonicamente organizadas e harmonizadas, de modo a desempenharem as funções vitais de transporte, de suporte e de armazenamento ou reserva; *medula* – localizada no centro, com 1-2 mm e formada por tecido parenquimatoso primário, ou seja, por células parenquimatosas remanescentes da estrutura primária da planta.

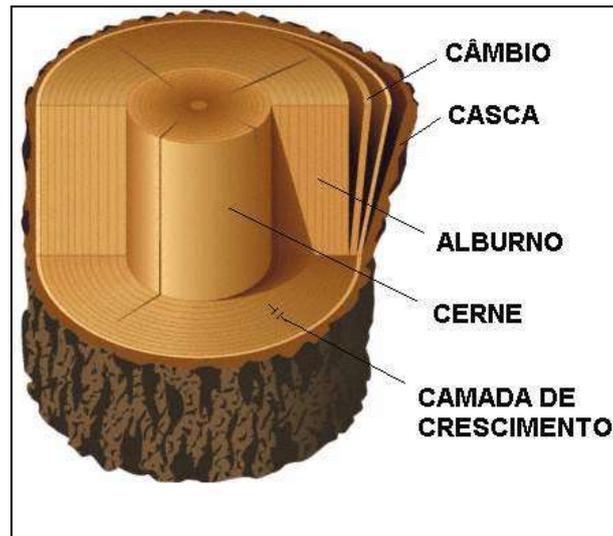


Figura 1 - Corte transversal do tronco da árvore

O lenho é composto por *anéis de crescimento*, resultantes da atividade sazonal do câmbio, e cujo número é indicador da idade da madeira. Sendo as espécies usadas em tanoaria cultivadas em zonas temperadas, em cada anel de crescimento é possível distinguir duas camadas: uma correspondente à formação de Primavera (*lenho de início de estação*) e outra à de final de Verão ou Outono (*lenho de fim de estação*). Quando a distinção entre elas é nítida, sobretudo pela dimensão dos vasos respetivos, diz-se que a madeira possui “porosidade em anel” - caso do carvalho e do castanheiro usados em tanoaria (Fengel e Wegener, 1989; Carvalho, 1996).

Nas árvores adultas a zona mais periférica do lenho é constituída por cerca de 10 a 20 anéis de crescimento, fisiologicamente activos, conduzindo a seiva bruta ascendente, e é designada por borne ou albúrnio. A partir de certa idade, variável com a espécie e com as condições ecológicas, começa a ser possível distinguir o cerne, durame ou coração, localizado mais interiormente e que corresponde ao cilindro de lenho fisiologicamente inativo. A formação do durame resulta do fenómeno de *duramização*.

A duramização traduz-se num conjunto de lentas e progressivas modificações anatómicas, físicas e químicas ocorridas nas camadas

mais antigas, as mais interiores, do borne (Keller, 1987). Os aspectos mais evidentes da duramização são:

- *Obstrução dos grandes vasos e/ou dos capilares das paredes celulares e dos lúmens das células por tilos, que são proliferações membranosas das células parenquimatosas vizinhas (Keller, 1987; Carvalho, 1997);*
- *Deposição ou impregnação das membranas das pontuações e das paredes celulares por quantidades apreciáveis de metabolitos secundários, extraíveis (Keller, 1987; Monties, 1987; Moutounet et al., 1999);*
- *Redução do teor de água da madeira (Hillis, 1984);*
- *Aquisição de uma coloração mais intensa e mais escura (que pode ser rosa, amarelo claro, amarelo acastanhado e castanho) em consequência das modificações químicas ocorridas (Keller, 1987).*

Do ponto de vista tecnológico, as alterações associadas à duramização são de importância capital, uma vez que se encontram na origem de propriedades físicas e mecânicas e de características químicas diretamente implicadas na aptidão da madeira para tanoaria (Keller, 1987; Feuillat e Keller, 1997): fácil fendimento, boa flexibilidade, bom isolamento térmico, suficiente dureza e durabilidade, porosidade ligeira e composição química adequada. O durame é pois, por excelência, a madeira para tanoaria.

2.2.2. Composição química da madeira

A composição química varia em função da zona da planta (raiz, caule ou ramos), tipo de madeira (normal, tensão ou compressão), localização geográfica, clima e condições do solo. (Sarni et al., 1990).

Na madeira existem dois componentes químicos principais: a lenhina (18-35%) e os hidratos de carbono (65-75%), sendo ambos materiais poliméricos e complexos. Também se encontram presentes na madeira

pequenas quantidades de outros componentes (geralmente 4-10%), principalmente na forma de compostos orgânicos extraíveis e minerais inorgânicos (cinzas) (Jaarsveld *et al.*, 2008a ; Alañón *et al.*, 2010)(figura 2).

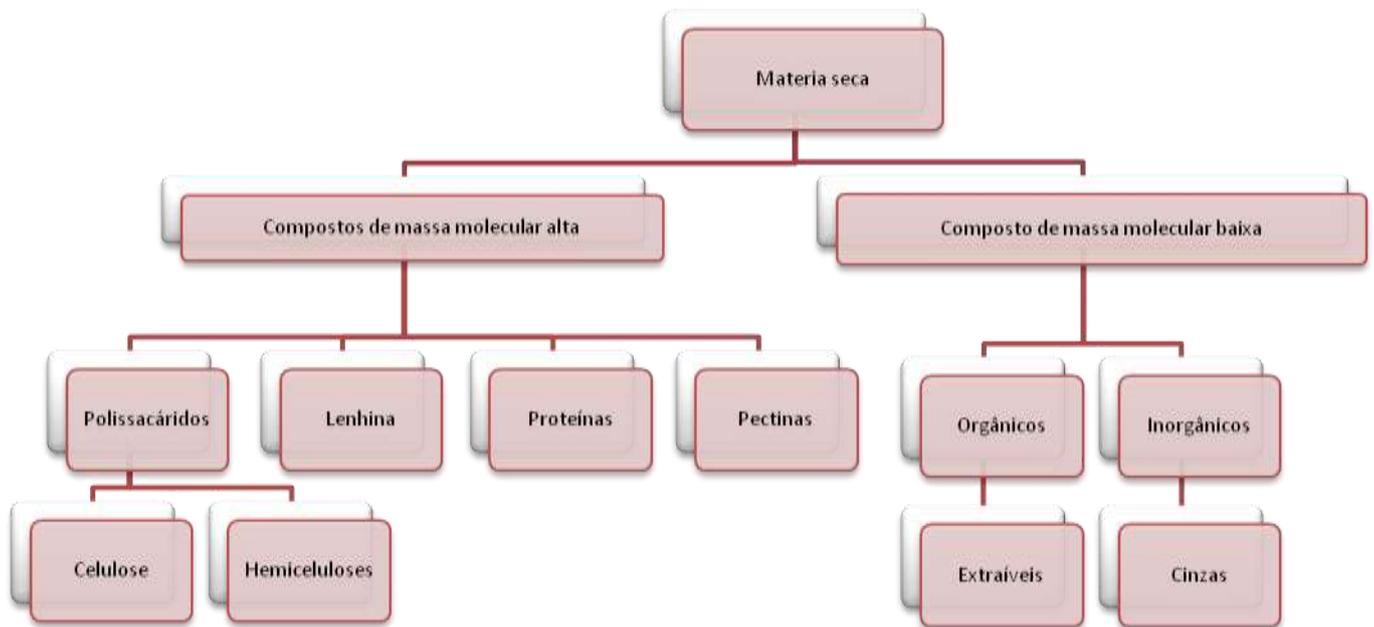


Figura 2- Composição química da madeira , adaptada de Mosedale *et al.*, (1998)

No geral, a madeira tem uma composição elementar de cerca de 50% de carbono, 6% de hidrogénio, 44% de oxigénio, e vestígios de diversos iões metálicos (Pettersen, 1984).

2.3.Factores que influenciam a composição química das madeiras

A madeira apresenta uma composição muito variável. Do ponto de vista quantitativo e qualitativo, esta depende da origem geográfica, do clima e do solo, da espécie botânica, da árvore e da idade da árvore (Garde-Cerdán *et al.*, 2006; Prida e Puech, 2006; De Rosso *et al.*, 2009; Koussissi *et al.*, 2009).

Para além dos fatores anteriormente citados, a composição da madeira varia ainda com as técnicas de tanoaria, principalmente com o tipo de secagem (natural ou artificial) e com o grau de tosta ou queima (Kozlovic *et al.*, 2010) a que todas as madeiras são sujeitas.

2.3.1. Influencia do processo de secagem

O processamento da madeira para tanoaria inclui uma série de etapas que influenciam a sua qualidade enológica, especialmente os tratamentos térmicos a que a madeira é sujeita, como a secagem e a tosta ou queima. Ambos os processos afetam a estrutura e composição química final da madeira que irá estar em contacto com o vinho durante o seu processo de envelhecimento.

A madeira verde não pode ser usada na tanoaria, uma vez que existe uma grande quantidade de água (cerca de 70%) e os seus compostos extraíveis não são compatíveis com o objetivo de melhorar a qualidade dos vinhos, já que contém muitos compostos fenólicos amargos e muitos poucos compostos aromáticos (De Simón *et al.*, 2010).

Em tanoaria, o processo de secagem da madeira ocorre geralmente sob condições naturais (figura 3), realizando-se ao ar livre durante um período de tempo variável entre 18 e 36 meses (De Simón *et al.*, 2010).



Figura 3 - Secagem natural (Fonte : J.M.Gonçalves)

A secagem permite reduzir a percentagem de humidade existente na madeira até se atingir equilíbrio com a humidade ambiente, e reduzir a contração da fibra.

A secagem natural produz a maturação da madeira, diminuindo a amargura e a adstringência, e alterando a composição química desta. Daí resulta a perda de compostos fenólicos hidrossolúveis, como os elagitaninos, que pode resultar de vários mecanismos como por exemplo a lixiviação das aduelas pela chuva (Vivas e Glories, 1996) e a degradação hidrolítica oxidativa (Chatonnet *et al.*, 1994).

A secagem artificial em forno ou estufa ou um método misto que combina a secagem ao ar livre com secagem em estufa produz uma evolução diferente da composição química da madeira, e como tal, o processo de secagem natural é considerado atualmente como um método superior de secagem (Martínez *et al.*, 2008).

Os mesmos processos podem ser válidos para as madeiras destinadas à elaboração de produtos alternativos (aparas, cubos, dominós...) de boa qualidade, tendo em consideração o tempo de secagem (12 meses) e a forma de sobreposição da madeira, por forma a otimizar as trocas entre a madeira e a atmosfera (De Simón *et al.*, 2010).

2.3.2. Influência do processo de queima

Uma prática comum usada em tanoaria e, considerada como o passo tecnológico mais importante, é o processo de queima da madeira (figura 4). No caso das aparas e outros alternativos, a queima é feita em torradores mas o efeito da temperatura é idêntico ao das barricas.

Em todo este processo o aumento da temperatura provoca uma alteração na composição química da madeira originada pela

degradação térmica dos polímeros que a constituem (Kozlovic *et al.*, 2010).

Devido às altas temperaturas durante o processo de tosta, as ligações químicas entre os polímeros são quebradas e a hemicelulose e a lenhina são degradadas uma vez que são menos estruturadas do que a celulose (Jordao *et al.*, 2006).



Figura 4 – Imagens ilustrativas do processo de queima da madeira (Fonte: jmgoncalves.com)

A variabilidade de temperatura durante a tosta é alta, devido a variação na intensidade do fogo e do movimento de convecção do ar. Consequentemente, não existe uma definição universal de níveis de tosta, (Jaarsveld *et al.*, 2008 a , b).

Na bibliografia não se encontram referidos valores de temperaturas e tempos de queima específicos para cada nível de tosta. Este binómio tempo-temperatura, a que as madeiras são sujeitas, é bastante variável originando, portanto, variações significativas na quantidade de compostos extraíveis das madeiras.

2.3.3. Espécies botânicas e distribuição geográfica

As árvores produtoras de madeira com interesse para tanoaria pertencem à Divisão Angiospermae, Classe Dicotyledones, Ordem Fagales e Família Fagaceae (Franco, 1971), sendo vulgarmente designadas por folhosas.

Os carvalhos enquadram-se no Género *Quercus* L., cujas espécies se encontram sobretudo no hemisfério norte (Tutin *et al.*, 1964,1993), com particular incidência nos territórios da América do Norte e da Europa. É ainda conhecido um número razoável de espécies euro-asiáticas, algumas mediterrânicas e algumas na América Central e na América do Sul (Keller, 1987). De todas as espécies, as mais utilizadas para o fabrico de barricas e toneis surgem na Europa, nomeadamente as espécies *Q.sessiliflora* e, sobretudo, *Q.robur*, que ocupam a maior área e constituem a mais importante fonte de madeira para tanoaria (Canas, *et al.*, 1998; Benavent e Cano, 2003; Garde-Cerdán *et al.*, 2006; Clímaco, 2008).

Atualmente, em Portugal existem apenas quatro espécies de carvalho com interesse para tanoaria, que obedecem à seguinte distribuição (Jordão *et al.*, 2006); (Canas e Caldeira, 2009): a noroeste predomina o carvalho roble ou alvarinho (*Q.robur* L.); a nordeste, em zonas mais continentais, domina o carvalho negral ou pardo (*Q. pyrenaica* Willdno centro (Beiras e Trás-os-Montes) predomina o pedamarro (*Q.faginea* Lam.Subsp. *faginea*), espécie endémica da Península Ibérica; da Beira Litoral ao Algarve sobressai o carvalho cerquinho ou português (*Q. faginea* Lam. Subsp. *Broteroi* (Cout.) Samp.)

No entanto, além do carvalho, na bibliografia encontra-se descrita a utilização de madeiras provenientes de várias espécies, tais como: a acácia (De Simón *et al.*, 2009b; De Rosso *et al.*, 2009; Kozlovic *et al.*, 2010), o castanheiro, a cerejeira (De Simon *et al.*, 2009b; De Rosso *et al.*,

2009), a amoreira (De Simón *et al.*, 2009b) a faia, o freixo, a bétula, o álamo, o pinheiro e o abeto (Togores, 2003), entre outras.

O castanheiro pertence ao género *Castanea* (Franco, 1971) e à espécie *Castanea sativa* Mill., que se desenvolve nas regiões temperadas do hemisfério norte e que é a única na Europa (Berrocal del Brio *et al.*, 1998). No passado, o castanheiro (*Castanea sativa*) foi amplamente utilizado na região do Mediterraneo devido à sua elevada disponibilidade e baixo custo. É caracterizado por uma maior porosidade do que o carvalho (De Rosso *et al.*, 2009).

A cerejeira (*Prunus avium*) é o nome dado a varias espécies de árvores originárias da Ásia, algumas frutíferas, outras produtoras de madeira nobre. Estas árvores classificam-se no sub-género *Cerasus* incluído no género *Prunus* (Rosaceae). Esta é caracterizada pela alta porosidade e permeabilidade ao oxigénio e é normalmente usada para tempos curtos de envelhecimento. (De Rosso *et al.*, 2009).

A acácia (*Robinia pseudoacacia*) é nativa do sudeste dos Estados Unidos, mas tem sido amplamente plantada e naturalizada noutras regiões temperadas da América do Norte, Europa, África do Sul e na Ásia. A sua madeira caracteriza-se pela dificuldade em moldar as aduelas para o fabrico de barricas e pela baixa porosidade (Citron, 2005; De Rosso *et al.*, 2009).

2.3.4. Actividade antioxidante das madeiras

Nas últimas décadas houve um crescente interesse na capacidade antioxidante natural entre os consumidores e a comunidade científica. Os antioxidantes naturais parecem desempenhar um papel muito importante na redução da concentração de radicais livres, que são substâncias nocivas e altamente reactivas, são constantemente produzidos devido a inúmeras reacções biológicas (Fernández-Pachón *et al.*, 2008; Señorans, *et al.*, 2003). Os antioxidantes previnem o processo

de oxidação, graças à sua capacidade de captura, de ativação ou de reparação dos danos causados por radicais livres, que estão implicados no desenvolvimento de múltiplas doenças.

O processo de envelhecimento é um passo chave não apenas para a melhoria das características organolépticas das bebidas alcoólicas, mas também para o desenvolvimento de outras propriedades, tais como a capacidade antioxidante. Para além do vinho, verifica-se que outras bebidas (por exemplo conhaques, uísques, aguardentes) aumentam a sua capacidade antioxidante quando em contacto com a madeira (Alonso, *et al.*, 2004; Aoshima, *et al.*, 2004; Canas, *et al.*, 2008; Ávila-Reyes *et al.*, 2010).

Há um grande interesse nos antioxidantes dos alimentos por serem compostos bioativos, com um papel especial na manutenção da saúde e prevenção de doenças. O potencial antioxidante dos vinhos tintos é devido à presença de compostos fenólicos, os quais podem inibir a agregação de plaquetas (Gryglewski *et al.*, 1987), evitar a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Frankel *et al.*, 1993), e diminuir os processos inflamatórios e cancerígenos (Tapiero *et al.*, 2002).

O conteúdo em polifenóis totais, ou seja a capacidade antioxidante ou anti radicalar dos vinhos pode ser afetada por diversos fatores extrínsecos e intrínsecos, tais como variedade de uva utilizada (Bosso *et al.*, 2009), região produtora de vinho e as condições climáticas, as técnicas culturais, a qualidade do vinho e, não menos importante, os processos tecnológicos durante a vinificação, incluindo as técnicas e as condições de armazenamento (Gómez-Cordovés e González-San Jose 1995; Zafrilla *et al.*, 2003; Faitová *et al.*, 2004; De Coninck *et al.*, 2006; Pérez-Magarino e González-Sanjosé 2006; Gonçalves e Jordão, 2009 a, b).

Devido a estes fatores e também devido ao fato de que nem todos os compostos polifenólicos apresentam a mesma capacidade

antioxidante (Alonso, *et al.*, 2004), a sua actividade antioxidante pode variar.

Estudos epidemiológicos têm indicado que a ingestão frequente de antioxidantes naturais está associada a um risco mais baixo de doenças cardiovasculares e cancerígenas (Renaud *et al.*, 1998; Kaur e Dapoor, 2001; Record *et al.*, 2001). Frutas, legumes e todos os alimentos e bebidas derivadas são as principais fontes de antioxidantes naturais devido ao seu elevado teor de polifenóis. O vinho tem sido uma das bebidas mais estudadas devido ao seu potencial antioxidante e aos benefícios de saúde atribuíveis ao seu elevado teor de polifenóis, que estão presentes, com boa biodisponibilidade (Renaud *et al.*, 1998; Tomera, 1999).

O processo de envelhecimento é um procedimento comum usado tecnologicamente na produção de vinho, que parece contribuir para um aumento da capacidade antioxidante de vinhos (Alonso, *et al.*, 2004; Canas, *et al.*, 2008; Larrauri, *et al.*, 1999). Isto é devido a quantidade de polifenóis que é extraído a partir da madeira de carvalho durante o contacto com o vinho em fase de envelhecimento.

Contudo, o contributo da madeira de carvalho para a estimativa da capacidade antioxidante de um vinho é uma tarefa difícil porque os vinhos são misturas complexas, ricas em polifenóis e as práticas enológicas, (Manzocco, *et al.*, 1999), a maceração (Pellegrini *et al.*, 2000), as condições de vinificação (Burns *et al.*, 2001) e microoxigenação (Rivero-Pérez, *et al.*, 2008), podem influenciar a capacidade antioxidante dos vinhos.

2.5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos revestem-se de grande importância em enologia uma vez que estão relacionados, direta ou indiretamente com a qualidade dos vinhos. São eles os responsáveis pela cor, corpo e adstringência dos vinhos e são os grandes responsáveis pelas diferenças entre uvas ou vinhos tintos e brancos, pela presença ou ausência de antocianinas.

São substâncias sintetizadas nas células das uvas em estreita dependência do seu património enzimático, que por sua vez é uma expressão da informação codificada a nível dos genes (Cravero e Di Stefano, 1990). De facto quer as antocianinas quer os ácidos hidroxicinamil tartáricos das películas das uvas, enquanto metabolitos secundários estão diretamente ligados à componente genética varietal (Calò *et al.*, 1994).

As características ambientais sob as quais decorre o desenvolvimento dos bagos têm grande influência na quantidade dos compostos responsáveis pela cor, mas a natureza e as percentagens relativas destas substâncias obedecem a um determinante genético que as torna mais ou menos constantes (Calò *et al.*, 1994)

2.5.1. Características da estrutura polifenólica

Uma das possíveis classificações dos polifenóis das uvas e dos vinhos é a sua divisão em compostos flavonóides e em não flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte as flavanas, os flavonóis e as antocianinas, estas últimas apenas existentes nas uvas tintas, e ao segundo grupo pertencem os ácidos benzóicos e os ésteres tartáricos dos ácidos da série cinâmica. Existem ainda outros compostos fenólicos como os estilbenos e os fenóis voláteis. (Cabrita, M.J. (2004))

A reatividade dos compostos fenólicos advém de uma característica estrutural comum a todos eles que é a presença de um anel aromático

hidroxilado. A forma mais simples deste elemento estrutural é o fenol, que assim dá o nome a esta série de compostos.

As uvas e os vinhos contêm uma série de compostos fenólicos todos eles derivados desta estrutura básica, sendo que os teores totais de compostos fenólicos são maiores nas uvas que nos vinhos.

2.5.2. Compostos de natureza não flavonóide

Os compostos não flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos. Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxicinâmicos (figura 5) que se encontram nos vacúolos das células das películas e polpas (Ribéreau-Gayon e Stonestreet, 1965), sob a forma de ésteres tartáricos. Estes compostos jogam um papel importante nas oxidações que conduzem ao acastanhamento dos mostos e dos vinhos (Singleton, 1987). Embora não exerçam uma influência direta no gosto dos vinhos, estão implicados no aparecimento de fenóis voláteis com consequentes alterações aromáticas.

No sumo das uvas, obtido por pressão direta das uvas, os compostos fenólicos existentes são maioritariamente os não flavonóides.

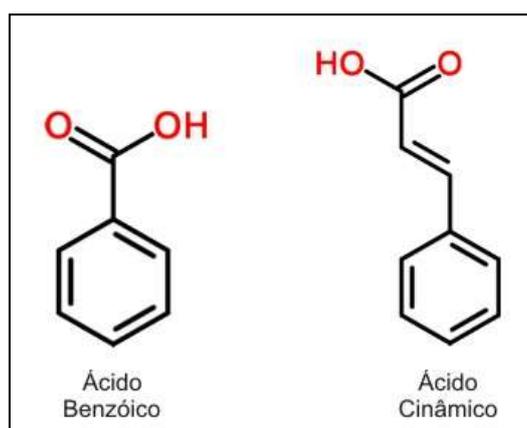


Figura 5 - Estrutura química de ácido benzóico e de ácido cinâmico (Fonte: oleos essenciais.org)

2.5.3. Compostos de natureza flavonóide

Os flavonóides (figura 6) são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico em comum C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano (Zoecklein *et al.*, 1995). Esta classe de compostos fenólicos pode-se dividir em famílias que se distinguem pelo grau de oxidação do anel pirano.

Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos deve-se a esta família de compostos que se encontram nas grainhas, na polpa e na película das uvas. De todos eles, as antocianinas, os flavano-3-ol e as proantocianidinas, principais responsáveis pela cor dos vinhos, são quantitativamente os mais importantes.

Os flavonóides podem encontrar-se no estado livre ou polimerizados com outros flavonóides, açúcares, não flavonóides, ou ainda combinações dos anteriores.

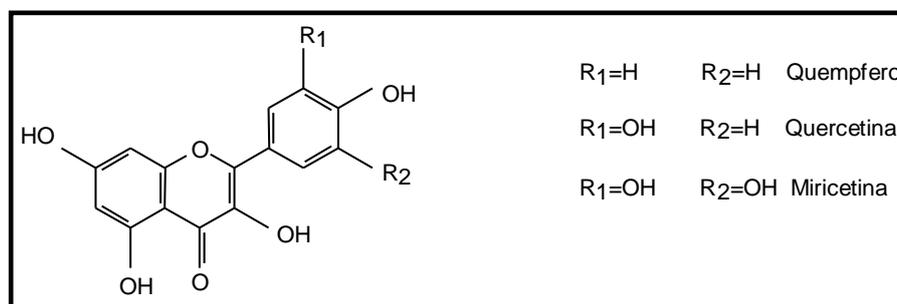


Figura 6 - Estrutura química de flavonóides (Cabrita, M.J. (2004))

2.5.4. Antocianinas

As antocianinas (figura 7) são os pigmentos vermelhos das uvas, localizadas essencialmente na película e, excecionalmente, na polpa (variedades tintureiras). Também estão presentes nas folhas no final do ciclo vegetativo (Ribéreau – Gayon e Stonestreet, 1965).

Estruturalmente são glucósidos de polihidroxi- ou polimetoxi- dos sais de flavilium (2-fenil-benzopirilo). Elas diferenciam-se pelo número de grupos

hidroxilo e o grau de metilação destes grupos presentes no anel lateral, o número e a natureza dos açúcares ligados à molécula, e o número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas com os açúcares.

As formas agliconas das antocianinas chamam-se antocianidinas. Nas uvas e nos vinhos, foram identificados cinco tipos de antocianinas correspondentes aos monoglucósidos de cinco antocianidinas principais (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina) (Cadenas e Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas e Polo, 2009).

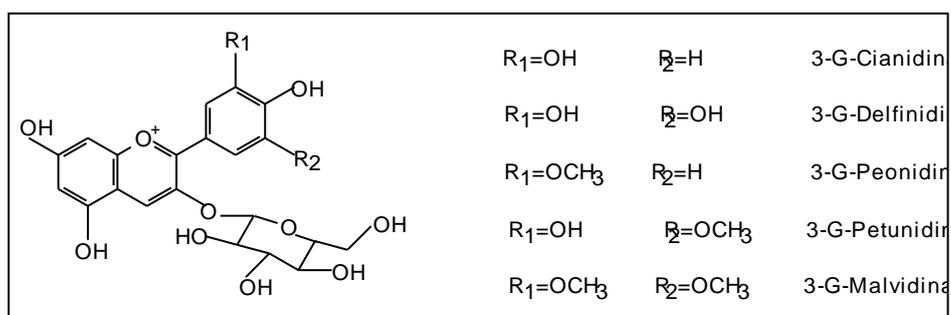


Figura 7 - Estrutura das antocianinas (Cabrita, M.J. (2004))

2.6. As características cromáticas dos vinhos

A cor é um dos atributos mais importantes para avaliar a qualidade dos vinhos, é a primeira característica a ser avaliada. Através desta característica pode-se ter uma ideia da idade, da evolução e também de possíveis defeitos dos vinhos. Como indicativo de qualidade a cor pode inibir ou induzir o consumo. O consumidor espera determinadas características cromáticas em função do produto adquirido (Gonzalez-Neves e Gómez-Cordovès, 1995).

Em certa medida, a cor permite avaliar a qualidade de um alimento. Ela pode influenciar significativamente a apreciação do aroma e do gosto do produto, com uma forte participação na apreciação global (Cristensen, 1983).

A cor dos vinhos é um atributo sensorial que está principalmente relacionada com os compostos fenólicos presentes nos vinhos. A cor varia com as características das uvas (grau de maturação e teor em compostos fenólicos), com as técnicas de vinificação e com as numerosas reações que têm lugar durante o armazenamento dos vinhos. A tonalidade e a intensidade da cor podem dar informação sobre possíveis defeitos ou qualidades de um vinho, tendo sempre em atenção que a cor é um atributo da visão e portanto corresponde a uma sensação psíquica (Hernández-Agero *et al.*, 1993).

No caso particular dos vinhos tintos a cor varia constantemente durante a vinificação e armazenamento, com conseqüentes alterações organolépticas. Todas estas modificações são inevitáveis devido à reatividade dos compostos fenólicos, e ocorrem mais rapidamente durante o primeiro ano (Somers e Evans, 1996).

A cor do vinho vem do facto de ele ser capaz de absorver diferencialmente as radiações que o atravessam. Um vinho é tinto porque absorve as radiações verdes e azul e apresenta a cor complementar. (Peynaud e Blouin, 1997).

Quimicamente, a cor dos vinhos provém de compostos polifenólicos presentes nas uvas e que passam para o vinho durante o processo de vinificação (Melendez *et al.*, 2001). Estes compostos encontram-se sobretudo nas películas e na polpa das castas tintureiras. Os pigmentos derivados de fontes naturais, podem exibir uma vasta gama de cores e são geralmente considerados seguros. Entre estes pigmentos, as antocianinas assumem um papel importante quando se lida com corantes naturais. Estes compostos polifenólicos constituem o maior grupo de pigmentos solúveis em água, em todo o reino vegetal. Estes pigmentos naturais são normalmente associados com frutas vermelhas, mas estão presentes também em vegetais, raízes e cereais (Mazza e Miniati, 1993).

Para além das suas características de cor, as antocianinas tem interesse devido aos seus atributos possíveis à saúde, tais como a redução do risco de doenças coronárias e de acidentes vasculares cerebrais (AVC) (Cao, *et al.*, 1997; Clifford, 2000; Scalbert e Williamson, 2000).

2.6.1. Métodos convencionais

Durante séculos, o homem deu à cor nomes que estavam associados ao meio ambiente que o rodeava, como por exemplo, plantas, minerais e animais. Tem-se assim o vermelho rubi, o azul do céu, o amarelo canário, entre outros.

As primeiras medições da cor eram realizadas pelo olho humano. É um método fácil e elementar. Apresenta graves limitações nomeadamente falta de memória da cor, a inadequada linguagem para descrever e defeitos individuais de detecção. Por outro lado, a luz natural do dia só está disponível durante limitadas horas e varia constantemente ao longo do dia.

Com a crescente necessidade de medir a cor quer qualitativamente quer quantitativamente, foram desenvolvidos ao longo dos tempos diversos sistemas para classificar a cor de uma forma objetiva.

Dos sistemas baseados em dimensões perceptuais da cor destaca-se o sólido de Munsell (figura 8). Este autor americano criou um sólido tridimensional, através do qual é possível mostrar a distribuição da cor ao longo das três dimensões de uma forma uniforme. Escolheu as dimensões tonalidade, cromaticidade e luminosidade (quantidade de claro e escuro). Concebeu as relações como uma árvore: o tronco é o eixo da grandeza valor, as ramificações em vários ângulos são as tonalidades e a distância ao longo do eixo de cada ramificação, a cromaticidade.

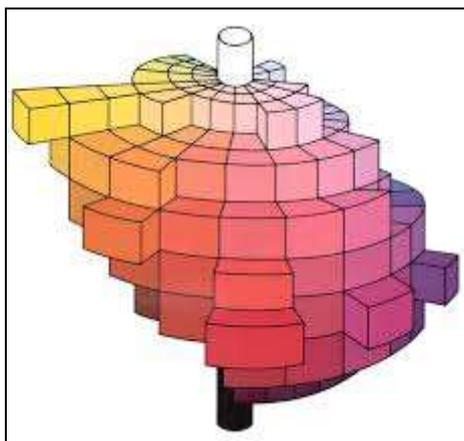


Figura 8- Sólido de Munsell (Fonte: arq.ufsc.br)

O estudo da cor dos vinhos tintos é feito de forma tradicional pela medição da absorvância a dois comprimentos de onda, 420 e 520 nm. O espectro dos vinhos jovens tintos apresenta um máximo de absorvância mais ou menos estreito aos 520nm, devido às antocianinas e às suas combinações sob a forma de ião flavilium (Glories, 1984 b), que diminui com o envelhecimento, aumentando a absorvância aos 420nm, na região dos amarelos/castanhos (Bakker *et al.*, 1986), onde o espectro apresenta um mínimo (Glories, 1984 b).

A intensidade e a tonalidade da cor, definidas por Sudraud em 1958, entram apenas em linha de conta com as contribuições das cores vermelha e amarela para a cor global, mas a componente azul, devida às formas quinonas das antocianinas livres e combinadas não pode ser negligenciada sobretudo em vinhos com valores de pH perto de 4. Por este motivo, Glories em 1984 propõe que a intensidade da cor dos vinhos seja definida pela soma das absorvâncias a 420, 520 e 620nm .

2.6.2 O sistema CIELAB 1976

A Comissão Internationale d'Éclairage (CIE) definiu certos parâmetros para a avaliação da cor nos vinhos. Entre eles destacam-se a intensidade da cor, a tonalidade, a composição da coloração e ainda o brilho dos vinhos tintos (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A intensidade da cor corresponde à quantidade de cor do vinho tendo em conta a contribuição do amarelo, vermelho e azul à coloração total e é calculada através do somatório das absorvâncias aos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A tonalidade é indicativa do desenvolvimento da cor para tons laranja, sendo mais baixa em vinhos novos do que em vinhos envelhecidos e é obtida através da razão entre as absorvâncias medidas aos comprimentos de onda de 420 e 520 nm (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A composição da coloração avalia a contribuição das três componentes na coloração total e é calculada pela razão entre as absorvâncias medidas aos comprimentos de onda respetivos pela intensidade da cor, valor ao qual se aplica um fator de 100 para apresentar os resultados sob a forma de percentagem (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

O brilho dos vinhos tintos refere-se essencialmente à forma do espectro de absorvância, sendo que um máximo aos 520 nm mais estreito e definido está associado a uma coloração vermelha viva enquanto um máximo aos 520 nm mais achatado e alargado está associado a uma coloração vermelha mais intensa (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A cor dos vinhos tintos não depende só do teor em antocianinas mas está intimamente dependente das características físico-químicas dos pigmentos e do meio onde eles se encontram (Ribéreau-Gayon, 1973) (Timberlake e Bridle, 1976).

Com a finalidade de melhorar a determinação da cor começaram a ser utilizados outros métodos como o espaço CIE 1964 e posteriormente o espaço CIE 1976, que hoje em dia tem grande aceitação. Este sistema baseia-se na teoria de percepção de cor opostas que estabelece que uma cor não pode ser verde e vermelha ou amarela e azul ao mesmo tempo (Valdés, 1997).

Assim se estabelece um sistema tridimensional, o espaço CIELAB, constituído por três coordenadas L^* , a^* e b^* , que indicam respetivamente a luminosidade, os tons de vermelho (a^*)/verde($-a^*$), e os tons amarelo(b^*)/azul($-b^*$) (figura 9) . Todas as cores são representadas dentro de um sólido, cujo eixo central L^* varia entre 0 e 100% (completamente opaco a completamente transparente) (Bakker *et al.*, 1986). As coordenadas a^* e b^* formam um plano horizontal dentro deste sólido.

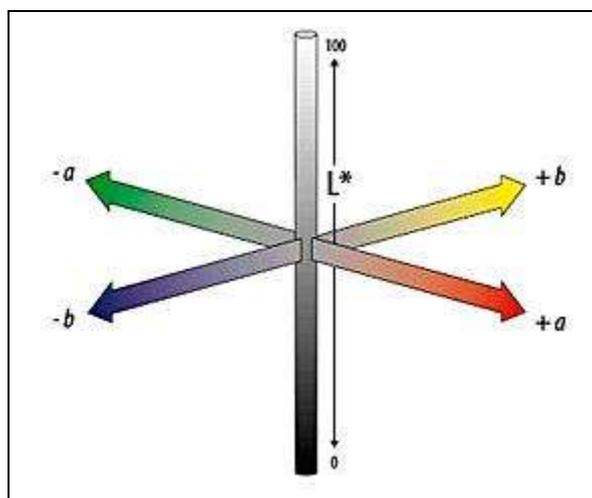


Figura 9 - Sistema Cielab(Fonte: dba.med.sc.edu)

2.7. Os compostos fenólicos nos vinhos

Os compostos fenólicos, as antocianinas e os taninos em particular, são os principais constituintes dos vinhos implicados em fenómenos de oxidação, que se traduzem por alterações de cor (acastanhamento) e por uma evolução do gosto (perda ou aumento da adstringência). Ao longo do envelhecimento de um vinho tinto assiste-se a uma diminuição de antocianinas monoméricas que depende tanto das condições de armazenamento como das características iniciais do vinho.

Durante a fase de maturação dos vinhos tintos, desde o fim da fermentação até ao engarrafamento, a presença de oxigénio é

responsável por transformações químicas dos pigmentos responsáveis pela cor, essenciais ao envelhecimento. Assiste-se a uma auto-oxidação do etanol, que em presença de compostos fenólicos origina pequenas quantidades de acetaldeído, que por sua vez provoca a copolimerização de antocianinas e taninos (Timberlake e Bridle, 1976; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1973).

2.7.1. Propriedades biológicas dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos exibem uma grande variedade de efeitos biológicos incluindo os efeitos antibacterianos, antimicrobiano, anti-inflamatório, antialérgico, anti trombótico, antiviral, anticancerígena, ação vasodilatadora.

Muitas destas funções são atribuídas à sua capacidade de eliminar os radicais livres e à sua atividade antioxidante. (Soobratee, *et al.*, 2005)

2.7.2. Propriedades antioxidantes

A oxidação consiste na transferência de elétrões de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbia e do nosso metabolismo, uma vez que o oxigénio é o ultimo aceitador no sistema de fluxo de elétrões, pelo qual se produz energia na forma de ATP (Tripoli, *et al.*, 2007). Contudo, neste fluxo, podem surgir problemas quando há transferência de elétrões sem pares, formando-se radicais livres de oxigénio, conhecidos como espécies reativas de oxigénio, entre as quais se distinguem o superóxido, peroxil, alcooxil, hidroxilo, e o óxido nítrico. Nos organismos vivos existem ainda outros tipos de espécies reativas de oxigénio (ROS) para além destas mas não radicalares, entre os quais o oxigénio, peróxido de hidrogénio e o ácido hipocloroso.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio têm diferentes funções nos organismos vivos. Algumas são positivas e estão relacionadas com a produção de energia, regulação do crescimento celular ou síntese de compostos biológicos (Tripoli, *et al.*, 2007). Mas pelo contrário e quando estão em excesso podem também provocar danos nos lípidos das membranas celulares, proteínas dos tecidos, enzimas e DNA, uma vez que são capazes de induzir a oxidação destas moléculas. Estes danos têm um papel importante no envelhecimento e algumas doenças degenerativas associadas a eles, como doenças do coração, cataratas, disfunção cognitiva e cancro (Tripoli, *et al.*, 2007).

Existem relatos científicos que os antioxidantes reduzem o risco de doenças crônicas como as doenças coronárias e o cancro. A progressão de várias desordens clínicas agudas e crônicas, sugere que as substâncias antioxidantes podem ter efeitos benéficos para a saúde como agentes profiláticos. Apesar destes efeitos protetores para a saúde terem sido primariamente atribuídos a antioxidantes amplamente conhecidos, as vitaminas A, C, E, e os carotenóides constituem alguns antioxidantes bem conhecidos, obtidos na alimentação. Além destas, outras substâncias contribuem para os benefícios da saúde associados ao consumo de vegetais e frutas.

Podem ser encontradas na bibliografia muitas referências aos estudos que evidenciam a capacidade antioxidante de compostos fenólicos de origem natural (Tripoli, *et al.*, 2007 ; Akkol, *et al.*, 2008). Os humanos evoluíram com sistemas antioxidantes que os protegem contra os radicais livres através de antioxidantes produzidos no corpo. Estes incluem defesas enzimáticas, como a peroxidase, catalase, superóxido dismutase, e defesas não enzimáticas, como glutathione, ácido dihidrolipóico, e melatonina CoQ10 reduzida.

Este sistema endógeno de defesa não é completamente eficiente contra os agentes oxidantes uma vez que existem também outras situações fisiopatológicas que levam a produção de um excesso de ROS no organismo, das quais se destacam: fumo de tabaco, poluentes

do ar, radiação ultravioleta (UV) ou uma dieta rica em ácidos polissaturados. Desta forma os antioxidantes provenientes da dieta alimentar tornam-se bastante importantes na diminuição dos efeitos oxidativos ao longo da vida.

A importância dos fenômenos de oxidação nos seres humanos e nos alimentos tem sido cada vez mais reconhecida pela sua relevância. As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas numa grande variedade de sistemas reguladores normais *in vivo*. Quando se forma um excesso destes radicais livres, estes podem danificar enzimas protetoras como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase, e causar efeitos destrutivos e letais nas células, através da oxidação dos lípidos de membrana, das proteínas celulares, do DNA e das enzimas. A oxidação também pode afetar os alimentos, provocando a sua degradação ao nível nutricional e organoléptico (cor, sabor e textura). A ação das substâncias antioxidantes proporcionam mecanismos de defesa contra oxidação excessiva.

Nos últimos anos, o interesse em compostos naturais antioxidantes tem aumentado significativamente.

2.7.2.1 Outras propriedades biológicas

Para além das propriedades antioxidantes, os compostos fenólicos apresentam também outras propriedades biológicas importantes.

Têm atividade anti-inflamatória, que pode estar relacionada com a capacidade de inibição da atuação das enzimas relacionadas com as respostas inflamatória e de imunidade (Tripoli, *et al.*, 2007 , Akkol, *et al.*, 2008; Miles, *et al.*, 2005)

A atividade antimicrobiana destes compostos é bem conhecida e está relacionada com a capacidade que apresentam para desnaturar proteínas, sendo por isso geralmente classificados como agente ativos

superficiais. Estes atuam provocando a perda dos constituintes citoplasmáticos das bactérias, tais como proteínas, glutamato ou potássio e fosfato, talvez devido à ruptura das peptidogliconas das células ou por estragos na membrana celular das bactérias. Existem na literatura inúmeras referências que confirmam esta atividade. (Tripoli, *et al.*, 2007; Sousa, *et al.*, 2006; Mayachiew e Devahastin, 2008)

2.7.3. Métodos de determinação da atividade antioxidante

Existe uma grande diversidade de métodos para determinar a atividade antioxidante. Estes métodos são baseados em procedimentos químicos ou físico-químicos, que são utilizados para monitorizar o processo de oxidação.

Os vários métodos existentes para avaliar a atividade antioxidante podem ser classificados em três grupos (Almela, *et al.*, 2006;):

- i. Métodos indiretos: fenóis totais; reação de Briggs-Rauscher (BBR- Briggs-Rauscher reaction) e metil linoleato;
- ii. Métodos que utilizam metabolitos da oxidação de lípidos: Rancimat; produtos voláteis, ácido tiobarbiturico (TBA- thiobarbituric acid); e
- iii. Métodos baseados na capacidade para eliminar radicais: parâmetro antioxidante de eliminação total de radicais (TRAP- total radical-trapping antioxidante parameter); capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC- oxygen radical absorbance capacity); poder antioxidante pela redução do ião ferro; ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS); 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); espectroscopia RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

A aplicação de diferentes técnicas na determinação da atividade antioxidante de um extrato pode levar a resultados dispersos,

dependendo da complexidade do extrato que é muita vez constituído por uma mistura de compostos com diferentes grupos funcionais, polaridade e comportamento químico. É então importante num estudo deste tipo aplicar vários métodos de forma a obter resultados mais abrangentes (Tepe e Sokmen, 2007).

No entanto, os métodos mais comuns, para a determinação da atividade *in vitro* de compostos de origem natural, são os que envolvem as reações com radicais e, dentro destes, os mais usualmente utilizados são os que envolvem as reações com os radicais ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzolína-6-sulfónico) e DPPH (radical 2,2'-difeníl-1-picrílhidrazil). Estes métodos são muito populares devido à sua simplicidade e rapidez de reação.

2.7.3.1 Método de descoloração do radical 2,2-difeníl-1-picríl-hidrazil (DPPH)

O método de DPPH é um método simples utilizado para medir a capacidade de antioxidantes de eliminar radicais livres (Torres de Pinedo, *et al.*, 2007). O método original de DPPH foi proposto por Blois em 1958 (Bois, 1958; Brand-Williams, *et al.*, 1995;) mas o método mais utilizado atualmente foi desenvolvido por Brand-Williams *et al.*, em 1995.

O DPPH é um radical livre, estável a temperatura ambiente, devido à deslocalização de um par de eletrões em toda a molécula. Este par de eletrões é responsável pelo facto de as moléculas de DPPH não dimerizarem, como acontece com a maioria dos radicais livres. Apresenta uma solução de cor violeta em metanol ou etanol. Um dos seus máximos de absorção encontra-se por volta dos 515nm (Molyneux, 2004)

Este método baseia-se na transferência de um eletrão ou radical de hidrogénio entre a espécie antioxidante e o radical livre DPPH^{•+}. A redução do radical provoca então a diminuição da absorvância da solução, a qual poder ser seguida por um espectrofotómetro.

Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância com capacidade de doar hidrogénios, a molécula de DPPH passa à forma reduzida e perde a cor violeta característica, passando a exibir uma cor amarela pálida devido a presença do grupo picril. (Molyneux, 2004) (figura 10).

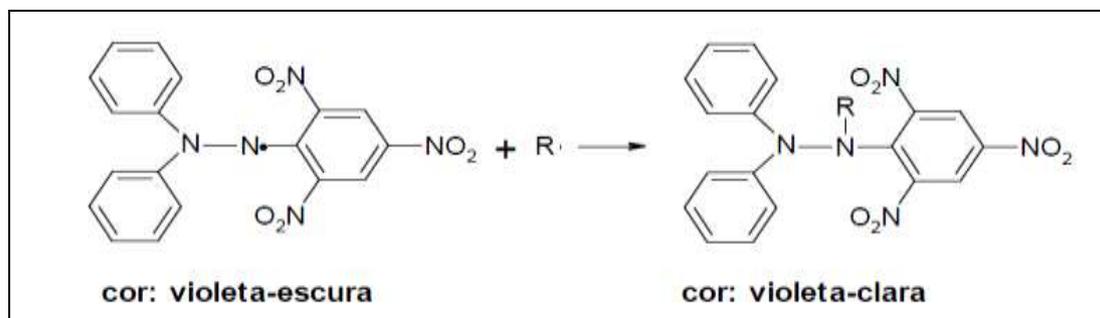


Figura 10 - Estabilização do radical livre DPPH (Fonte: cnpaf.embrapa.br)

Existem inúmeras referências na bibliografia (Bois, 1958; Brand-Williams, *et al.*, 1995; Molyneux, 2004; Torres de Pinedo, *et al.*, 2007) sobre a utilização do método de DPPH para a determinação da atividade antioxidante de substâncias nas mais diversas matrizes.

A determinação da atividade antioxidante individual de todos os componentes de uma amostra é possível, mas é demorada e dispendiosa. Além disso, pode existir sinergismo entre os antioxidantes e a medida da atividade individual pode não refletir a sua ação. É por esta razão que muitas vezes se determina a atividade antioxidante total da amostra, que pode ser quantificada em função de uma substância antioxidante padrão (Arnao, *et al.*, 1996) como o ácido ascórbico ou o trolox.

A simplicidade, rapidez e sensibilidade deste método permite a análise de várias amostras num pequeno espaço de tempo, e a deteção de substâncias capazes de eliminar radicais mesmo quando presentes em pequenas concentrações. (Correia, *et al.*, 2005).

2.7.3.2 Método de descoloração do radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzolina-6-sulfónico (ABTS)

O método de DPPH é talvez o mais comum para a análise da atividade antioxidante de produtos naturais. Contudo, devido a alguns problemas da sua aplicação, utiliza-se também um método alternativo baseado na eliminação do catião radical ABTS^{•+} (ácido radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzolina-6-sulfónico), um centro radical de azoto moderadamente estável. Este método supera algumas das limitações do método DPPH, tais como solubilidade e problemas de interferência espectrais. É também um método mais versátil pois permite analisar amostras polares e não-polares e a interferência espectral é minimizada quando o máximo de absorção utilizado é de 760nm, um comprimento-de-onda pouco encontrado em produtos naturais. Para além disso, com ajuda deste método é possível monitorizar a atividade da amostra ao longo de um determinado período tempo. Desta forma amostras com diferentes taxas de atividade antioxidantes podem ser distinguidas. (Dastmalchi, *et al.*, 2008).

A formação do catião radical ABTS^{•+} é a base deste método espectrofotométrico que é utilizado para medir a atividade antioxidante total de substâncias puras, misturas aquosas ou bebidas. (Re, *et al.*, 1999)

O ABTS é substrato da peroxidase e, quando é oxidado na presença de peróxido de hidrogénio, gera um catião radical metastável com um espectro de absorção característico e um dos máximos de absorção a 414nm. É utilizado devido às suas propriedades físico-químicas: elevada estabilidade química, elevada solubilidade em água e espectro de absorção no ultravioleta-visível. (Arnao, *et al.*, 1996) Para além do máximo de absorção a 414nm possui também outras bandas de absorção secundárias a 645, 734 e 815nm.

O método original de ABTS descrito por Rice-Evans e Miller (Miller e Rice 1994) é baseado na formação do radical ferril mioglobina com o

peróxido de hidrogénio que através da reação com o ABTS, produz um catião radical $ABTS^{\bullet+}$. A acumulação de $ABTS^{\bullet+}$ pode ser inibida pela presença de uma substância antioxidante no meio, numa extensão e num período de tempo dependente da atividade antioxidante da substância. A capacidade relativa da substância antioxidante para doar hidrogénios ao catião $ABTS^{\bullet+}$ pode ser medida espectrofotometricamente a 734nm, comprimento de onda no qual são minimizadas as interferências de outros componentes absorventes e a turbidez da amostra. No entanto, este método original foi muito criticado porque, no caso de antioxidantes com reações rápidas, poderia ocorrer também a redução do próprio radical ferril mioglobina presente em solução. Assim, para contornar este problema, Re *et al* (Re *et al.*, 1999) desenvolveram um método em que o catião $ABTS^{\bullet+}$ é gerado previamente, antes da reação com as substâncias potencialmente antioxidantes. Neste método, o catião radical $ABTS^{\bullet+}$, de cor azul esverdeada é produzido através da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio (figura 11), depois de mantida a solução no escuro de 12 a 16 horas. Através da comparação dos dois métodos, os autores concluíram que os resultados eram semelhantes, o que provava que a ação das substâncias antioxidantes eram exercidas diretamente sobre o radical $ABTS^{\bullet+}$, e não através da inibição da sua formação por redução da ferril mioglobina ou por reação com o peróxido de hidrogénio, presentes em solução no primeiro método. (Teixeira,D.M. (2006))

O método ABTS tem sido amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante de substâncias puras, fluídos corporais e material vegetal (Antolovich *et al.*,2002; Miller e Rice-Evans 1995).

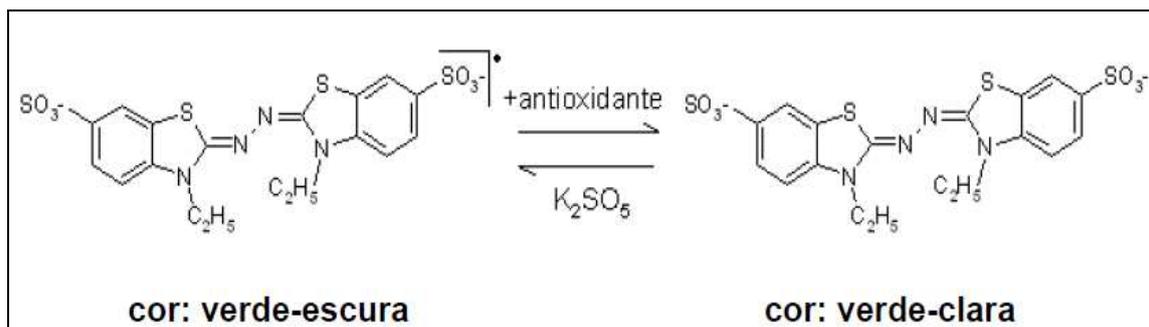


Figura 11- Estabilização do radical ABTS⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (Fonte: cnpat.embrapa.br)

2.7.4. Actividade antioxidante e stress oxidativo

O fornecimento, através da dieta, de compostos com propriedades antioxidantes é essencial para a manutenção do equilíbrio redox celular, devido à formação contínua de oxidantes durante os processos metabólicos. Durante o metabolismo aeróbio podem formar-se diversas espécies reativas de oxigénio (ROS), algumas das quais são radicais resultantes de várias reacções de oxidação-redução (Borguini, 2006). Quando existe um desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes e os sistemas de defesa antioxidante a favor das primeiras, existe stresse oxidativo, e as moléculas biológicas como as proteínas, os lípidos e o DNA são negativamente afetadas, originando lesões celulares (Halliwell, 1999). A condição de stresse oxidativo contribui fortemente para o envelhecimento celular, acelerando o desenvolvimento de várias patologias, tais como doenças cardiovasculares, cancro, doenças neuro-degenerativas, diabetes e declínio do sistema imunitário (Roussel, 2002). No entanto, numerosos fatores de origem exógena também afetam os mecanismos de proteção antioxidante, levando ao stresse oxidativo. São exemplo as drogas, a poluição, a subnutrição, os erros alimentares, o álcool, o fumo e as radiações (Figura 12).

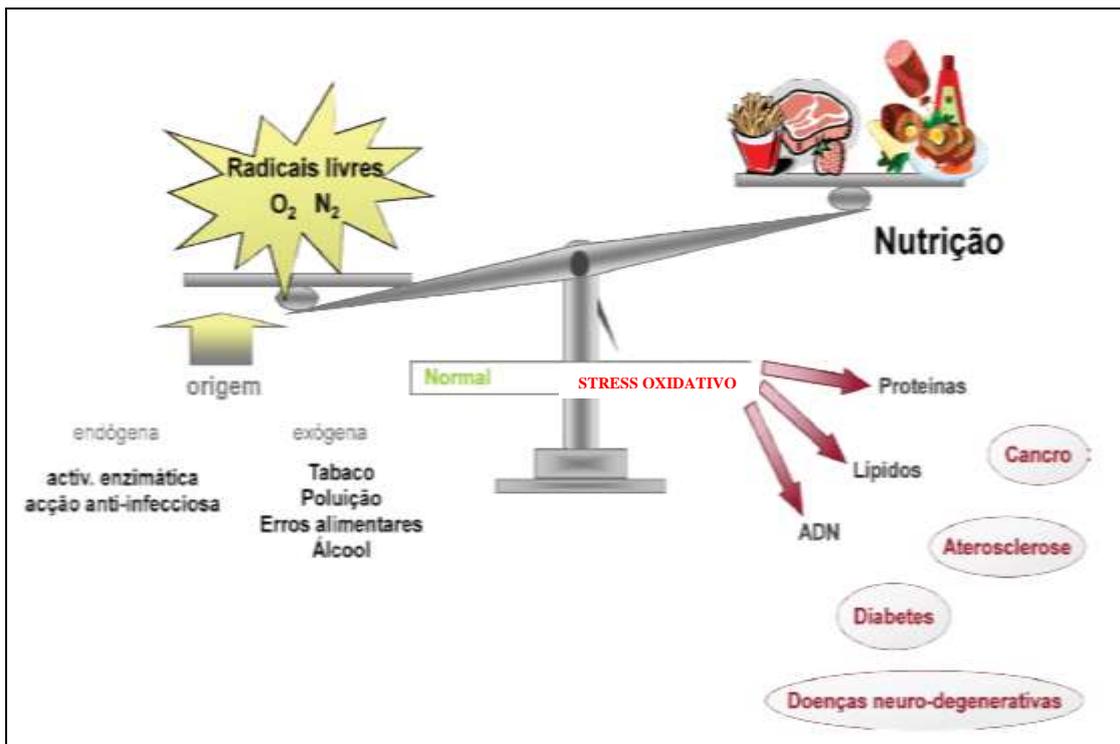


Figura 12 - Situação de stress oxidativo (adaptado de Roussel, 2002)

Existem várias definições para o termo antioxidante mas, a mais utilizada e que abrange todos os substratos oxidáveis como lípidos, proteínas, DNA e glucidos, é a sugerida por Halliwell (1999). Segundo este autor, um antioxidante pode ser definido como uma substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração que o substrato oxidável. Outra definição é a de antioxidante usado na preservação dos alimentos: uma substância, que em pequena quantidade, é capaz de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, como as gorduras (Becker *et al.*, 2004). De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), antioxidantes são substâncias usadas para preservar os alimentos, por retardarem a deterioração por rancidez ou descoloração associada a processos oxidativos.

Existem vários mecanismos de ação antioxidante. Nos organismos aeróbios, a eliminação das espécies reativas de oxigénio pode ser efetuada através de múltiplas linhas de defesa antioxidante que

existem nos espaços intra e extracelulares. Estas defesas incluem enzimas, proteínas extracelulares e pequenas moléculas como a vitamina E, o β -caroteno, o ubiquinol, o ácido ascórbico (vitamina C), que podem ser veiculadas pela alimentação.

O vinho constitui uma importante fonte de produtos naturais bioativos e o seu papel potencial na prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo tem sido atribuído ao seu conteúdo em compostos fenólicos, principalmente flavonóides e ácidos fenólicos (Paixão *et al.*, 2007; Cataneo *et al.*, 2008; Gollucke *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2009). Na condição de stress oxidativo será útil reforçar as defesas antioxidantes endógenas com antioxidantes provenientes de fonte exógena, através de uma dieta saudável, composta por alimentos e bebidas ricas nestes compostos (Figura13).

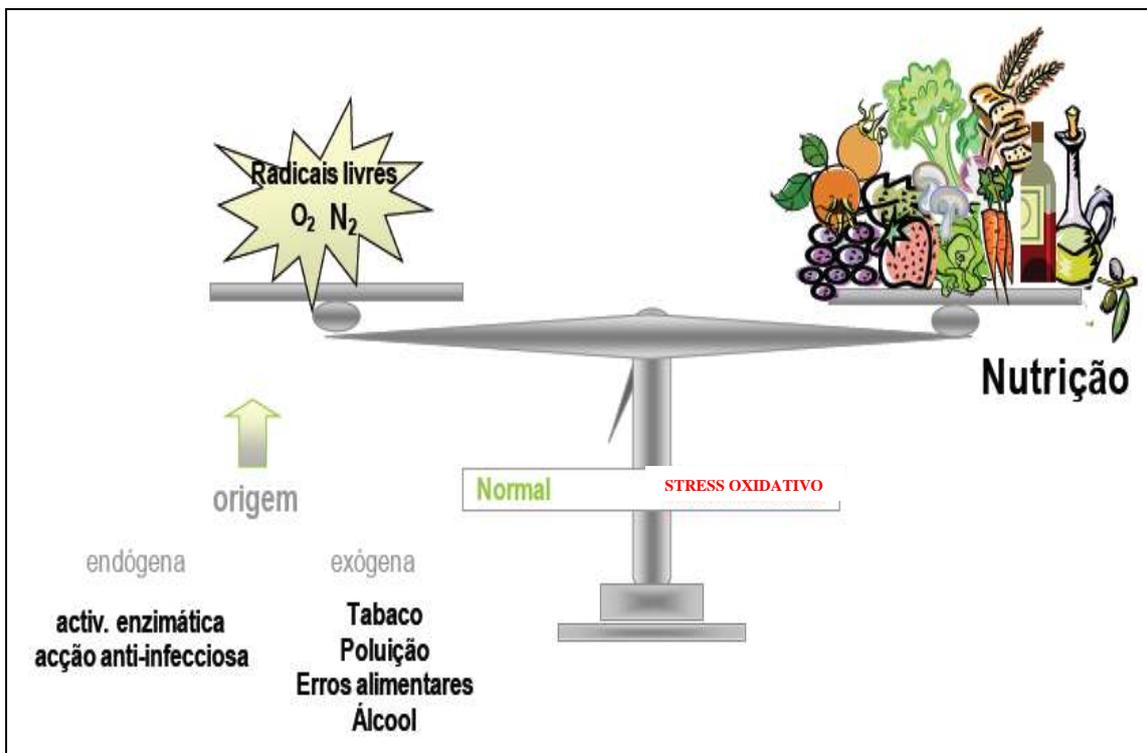


Figura 13 - Situação de equilíbrio (adaptado de Roussel, 2002)



Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Amostras das madeiras

As quatro espécies de madeira estudadas neste ensaio foram fornecidas pela tanoaria J.M. Gonçalves, Lda. As amostras de cerejeira (Cer) (*Prunus cerasus*) e de acácia (A) (origem botânica desconhecida) são provenientes da região centro da França, ao passo que, as madeiras de castanheiro (Cast) (*Castanea sativa*) e carvalho (Car) (*Quercus robur*) são de origem nacional, sendo a primeira proveniente da zona de Carrazeda de Ansiães, e a segunda da região das Beiras. Cada uma destas espécies foi submetida a um processo de secagem natural, embora com tempos distintos: cerejeira e acácia - 25 meses, castanheiro - 22 meses, carvalho português - 32 meses. A tosta foi idêntica para as quatro madeiras e teve a duração de 2 horas, com as seguintes temperaturas: sem tosta (ST) = não sujeita a temperatura, tosta ligeira (TL) = 160°C, tosta média (TM) = 200°C, tosta forte (TF) = 240°C. Todas as amostras foram fornecidas na forma de aparas e dominós.

3.2. Soluções hidroalcoólicas

O ensaio com soluções hidroalcoólicas teve início no dia 19 de Dezembro de 2012. Para tal, preparou-se uma solução hidroalcoólica com 12 % etanol e pH = 3.2 (ácido tartárico) que serviu como meio de extração, simulando uma amostra de vinho. Foram colocados 12 gramas de aparas em 200 mL (60 g/L) dessa solução durante um período de 35 dias, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Para o efeito utilizaram-se frascos de 250 mL de volume, os quais foram agitados regularmente de forma a maximizar a extração de compostos a partir da madeira. Após esse período de tempo, as soluções foram filtradas, de forma a cessar o processo de extração, sendo armazenadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Todas

as extrações foram repetidas duas vezes, o que faz um total de 32 amostras (4 madeiras * 4 níveis de tosta * 2 repetições).

3.3.Vinhos

3.3.1. Ensaio com aparas

O ensaio com a adição de aparas de madeira em vinhos tintos teve início no dia 3 de Janeiro de 2013. Optou-se pela aplicação ao vinho de 5 gramas de aparas por litro. Utilizaram-se frascos de vidro de 500 mL nos quais se colocaram 2,50 gramas de aparas. Neste primeiro dia, todos os frascos foram rotulados e todas as madeiras foram pesadas e colocadas no interior dos referidos recipientes. No dia seguinte (04/01/2013), encheram-se os diversos frascos com vinho tinto proveniente do lote nº 3 da Herdade da Mitra. Os frascos ficaram guardados na adega experimental da Herdade da Mitra, num local fresco e ao abrigo da luz. O ensaio foi realizado em duplicado e com uma testemunha à qual não se adicionaram aparas. O vinho designado lote nº 3 da Herdade da Mitra é um vinho tinto das castas Touriga Nacional, Castelão e Trincadeira, da colheita de 2012, com teor alcoólico de 14° (%v/v), pH de 3,77 e acidez total de 5,72 g/dm³ expresso em ácido tartárico.

3.3.2 Ensaio com dominós

Realizou-se um ensaio semelhante ao anteriormente descrito mas com dominós em que o peso dos dominós oscilava entre as 27,50gramas e as 43gramas por frasco de vinho(500ml). O vinho utilizado para este ensaio foi o lote final para engarrafamento da Herdade da Mitra, proveniente das castas Aragonês, Cabernet Sauvignon, Merlot e Syrah, da colheita de 2012, com teor alcoólico de 13,9 (%v/v), pH de 3,7 e acidez total de 6,25 g/dm³ expresso em ácido tartárico. Neste ensaio apenas foram

determinados os parâmetros polifenóis totais e capacidade antioxidante pelo método do ABTS.

3.4. Análises

3.4.1. Análises espectrofotométricas

Todas as análises espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotómetro Hanch Lange DR 5000.

A determinação dos espectros de absorvância das soluções hidroalcoólicas foi efectuada entre 250 e 450nm, utilizando uma célula de quartzo com percurso ótico de 1cm.

O teor de polifenóis totais das soluções hidroalcoólicas e do vinho foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965) aplicado a vinhos.

As antocianinas totais, as antocianinas livres, os flavonóides totais e os flavonóides não antociânicos foram determinados segundo Di Stefano *et al.*, (1989). As antocianinas totais foram calculadas a partir do máximo de absorvância no visível de uma solução de vinho com etanol clorídrico. As antocianinas livres, previamente separadas por um Sep-Pak C18, foram diluídas em etanol clorídrico, registando-se a sua absorvância máxima no visível.

Os flavonóides totais e flavonóides não antociânicos foram calculados a partir de um varrimento entre 230 nm e 600 nm, com intervalos de 5 nm, frente a um branco com etanol clorídrico.

Para a determinação da intensidade e tonalidade da cor dos vinhos realizou-se um varrimento no espectro visível (380 a 750nm) em cuvetes de 1 mm de percurso ótico. A intensidade da cor vem definida pela soma das absorvâncias a 420, 520 e 620nm (Glories, 1984) e a tonalidade pelo quociente do valor das absorvâncias a 420 e 520 nm (Sudraud, 1958).

A avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* das soluções hidroalcoólicas e dos vinhos foi realizada através da avaliação da captura dos radicais livres DPPH e ABTS de acordo com Brand-Williams et al., (1995) e Re et al., (1999), respectivamente com pequenas alterações.

✓ Método DPPH

Resumidamente, 100 μ L de diferentes concentrações da amostra foram adicionados a 2 mL de solução metanólica DPPH (25 mg/L). De seguida esperou-se 30 minutos ao abrigo da luz (dá-se a mudança de cor, figura 14). A leitura de absorvência de 515nm foi medida em diferentes intervalos de tempo até que a reação atingiu um plateau. Como branco foi utilizado o metanol. Todas as medições foram realizadas em duplicado.

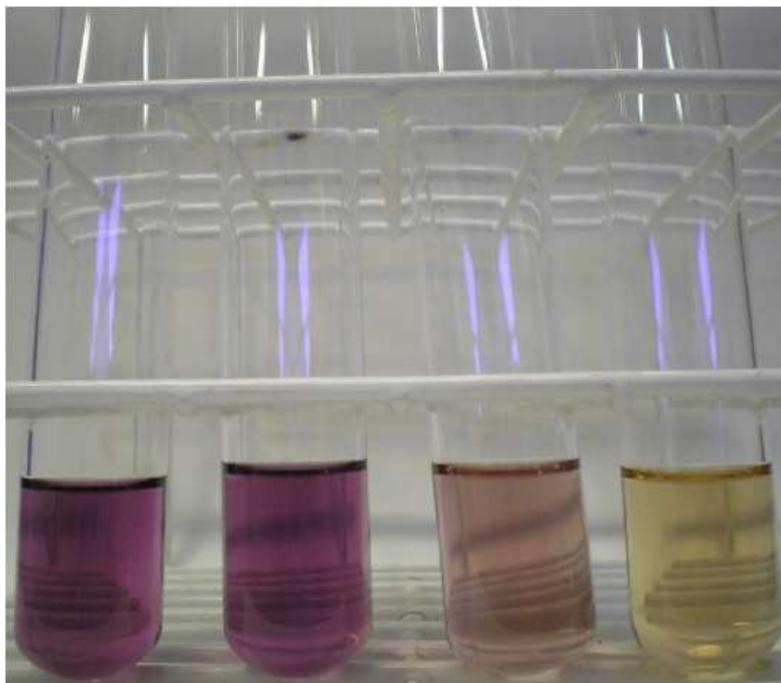


Figura 14 - Atividade antioxidante do radical DPPH com as amostras

Foi necessário efetuar curvas de calibração, em que se utilizou como padrão o Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), de elevado poder antioxidante, com concentrações compreendidas entre os 10,9 mM e 38,9 mM (figura 15).

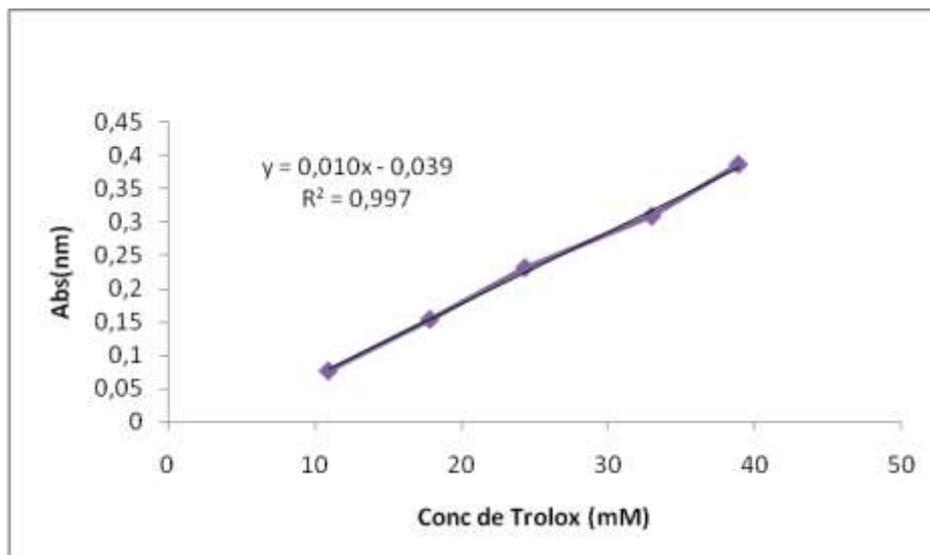


Figura 15- Representação da curva de calibração de Trolox

✓ Método ABTS

Resumidamente, 100 μ L de diferentes concentrações da amostra foram adicionados a 2 mL de solução ABTS⁺ (nesta solução existe 1:1 de uma solução de persulfato de 2,45mM com a solução de ABTS de 7mM de concentração. De seguida, esperou-se 15 minutos ao escuro (dá-se a mudança de cor, figura 16). A leitura de absorvância a 734nm foi medida em diferentes intervalos de tempo até que a reação atingiu um plateau. O metanol foi utilizado como branco. Todas as medições foram realizadas em duplicado.

Em ambos os métodos ABTS e DPPH, o radical foi preparado diariamente e guardado ao abrigo da luz. A absorvância foi registada de modo a verificar a estabilidade do radical em todo o tempo de análise.



Figura 16 - Atividade antioxidante do radical ABTS+ com as amostras

Foi necessário efetuar curvas de calibração, em que se utilizou como padrão o Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), de elevado poder antioxidante, com concentrações compreendidas entre os 16,4 mM e 64,4 mM (figura 17).

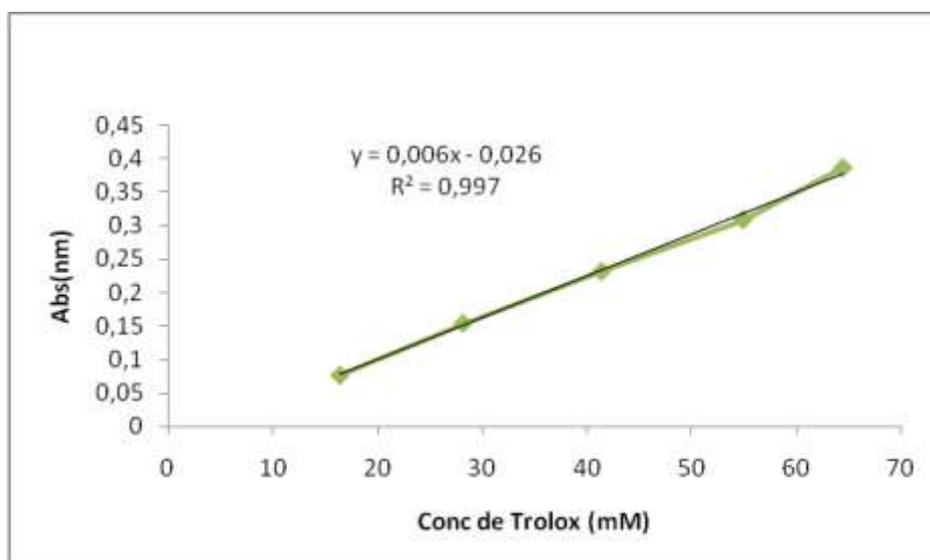


Figura 17 – Representação da curva de calibração de trolox com o radical ABTS+

3.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), considerando apenas como factor de variação o nível de tosta. O teste de comparação de médias utilizado foi o Tukey Multiple-Comparison Test, para um nível de confiança de 95%. A análise foi efectuada com o programa SPSS statistics versão 21.



*Apresentação e
discussão de resultados*

4. Apresentação e discussão de resultados

4.1. Análises espectrofotométricas das soluções hidroalcoólicas

4.1.1. Espectros de absorvância das soluções

A figura 18 mostra os espectros de absorvância obtidos a partir das soluções hidroalcoólicas das quatro madeiras estudadas, sujeitas aos diferentes níveis de tosta.

Pode observar-se que nas madeiras de acácia, carvalho, e castanheiro a tendência da absorvância não varia em função do nível de tosta. O mesmo não se verifica na madeira de cerejeira, observando-se um comportamento diferente na tosta forte em relação aos diferentes níveis de tosta, apresentando uma diminuição por volta dos 280 nm e um pico entre os 300nm e os 400nm.

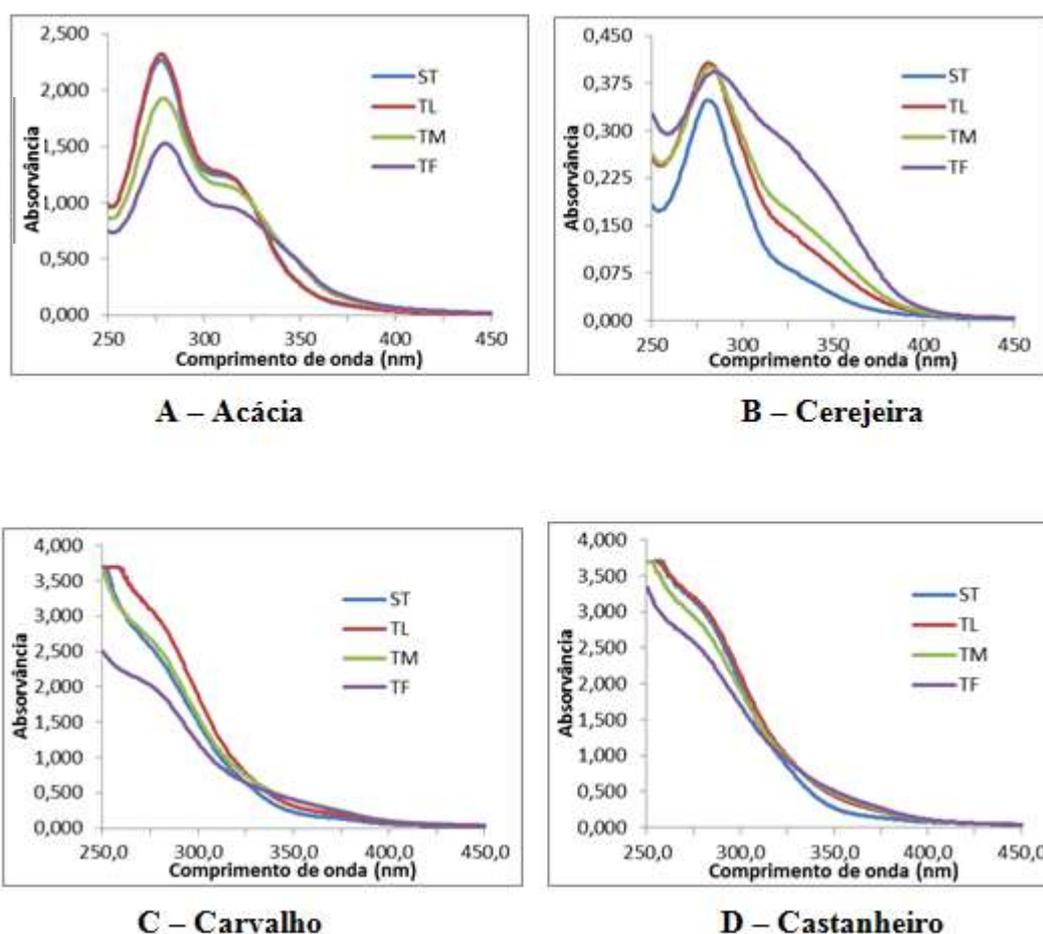


Figura 18- Espectros de absorvância (250-450nm) dos extratos hidroalcoólicos dos quatro tipos de madeira sujeitos aos diferentes níveis de tosta

As figuras mostram ainda um evidente máximo de absorção aos 280nm nas madeiras de cerejeira e acácia, por sua vez, nas madeiras de castanheiro e carvalho é possível observar um ligeiro aumento da absorvância por volta dos 300nm.

As madeiras de carvalho e castanheiro apresentam as absorvâncias mais elevadas, seguindo-se da acácia e por último a cerejeira, sem dúvida a madeira que menos compostos cedeu ao extrato hidroalcoólico.

4.1.2. Polifenóis Totais das soluções analisadas

Na tabela 1 apresentam-se os valores para os polifenóis totais das soluções hidroalcoólicas, onde se pode verificar que a madeira de cerejeira e logo depois a de acácia são as que menos compostos fenólicos cedem à solução hidroalcoólica. Também se pode observar que à medida que o grau de tosta aumenta, os teores em compostos fenólicos cedidos têm tendência a diminuir, com exceção para o extrato obtido com madeira de carvalho, no qual se observa um aumento de concentração quando se passa da amostra de madeira não tostada para a tosta ligeira, seguindo-se um progressivo decréscimo, sendo a madeira com tosta forte aquela que apresenta os teores mais reduzidos.

Tabela 1 - Polifenóis totais das soluções hidroalcoólicas (mg (+) catequina /L)

	Sem Tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte
Acácia	811.28±17.36 ^b	827.13±72.99 ^b	762.79±15.38 ^b	646.22±37.10 ^a
Cerejeira	229.40±9.87 ^b	228.46±5.60 ^b	207.02±22.89 ^b	175.31±6.81 ^a
Castanheiro	2064.56±28.97 ^c	1921.88±137.20 ^c	1644.00±45.11 ^b	1371.71±71.19 ^a
Carvalho	1620.69±41.81 ^c	1919.09±24.65 ^d	1428.59±39.36 ^b	969.80±89.26 ^a

Legenda: letras diferentes na linha significam diferenças significativas entre os diferentes graus de tosta, com p<0,05.

Em termos quantitativos, os extratos das madeiras de castanheiro e carvalho apresentam os teores de polifenóis mais elevados, os extractos com a madeira de cerejeira apresenta os teores mais baixos, enquanto os extratos da madeira de acácia apresentam valores intermédios entres as restantes madeiras usadas no estudo. Estas diferenças quantitativas existentes entre os diferentes extractos justificam as diferenças encontradas nos espectros de absorvância das soluções hidroalcoólicas.

4.2. Análises espectrofotométricas do vinho tinto

4.2.1. Polifenóis Totais dos vinhos com aparas

A figura 19 (Anexo-tabela1) mostra os teores de polifenóis totais no vinho com as diferentes aparas em estudo. Verificaram-se algumas diferenças entre os diferentes níveis de tosta aplicados às madeiras, assim como em relação à testemunha.

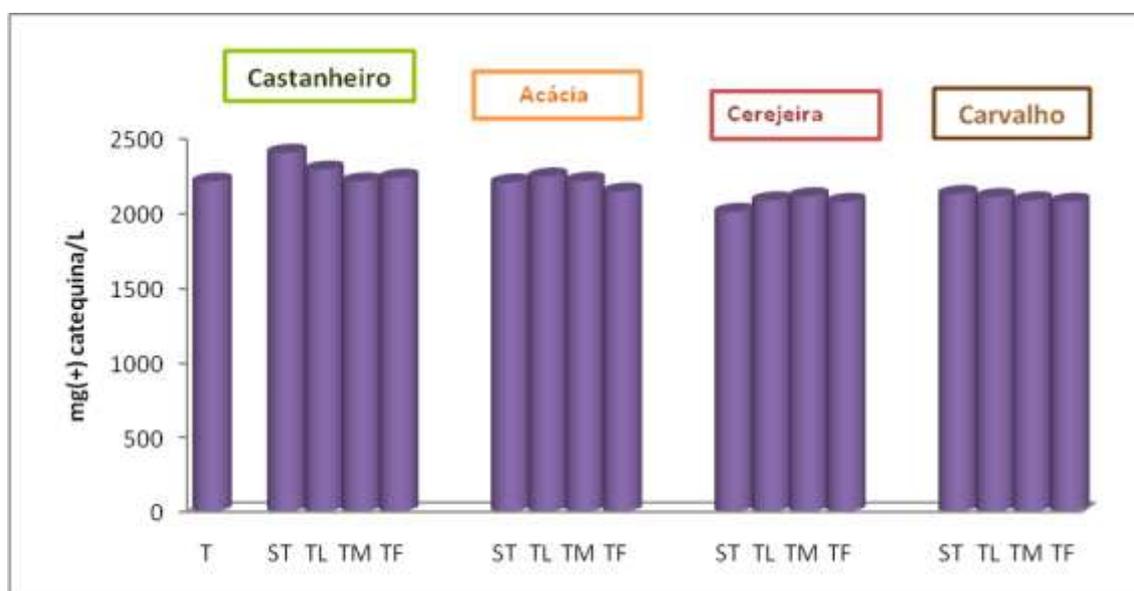


Figura 19 - Polifenóis totais em vinhos com aparas de diferentes espécies botânicas

Pode verificar-se que a madeira de castanheiro e logo depois a de acácia são as que mais compostos fenólicos cederam ao vinho.

Também se pode observar que à medida que o grau de tosta aumenta, os teores em compostos fenólicos cedidos têm tendência a diminuir, com exceção para o vinho com madeira de acácia e de cerejeira, no qual se observa um aumento de concentração quando se passa da amostra não tostada para a tosta ligeira, seguindo-se um progressivo decréscimo, sendo a madeira com tosta forte aquela que apresenta os teores mais reduzidos, no caso da acácia.

No caso da cerejeira, observa-se um aumento da concentração em polifenóis totais quando se passa da amostra não tostada até à tosta média, seguindo-se um decréscimo na tosta forte.

Apenas a madeira de castanheiro parece enriquecer o vinho em compostos fenólicos, visto a testemunha apresentar valores mais elevados quando comparada aos vinhos com as restantes madeiras em estudo.

4.2.2. Polifenóis Totais dos vinhos com dominós

A figura 20 (Anexo – tabela 5) mostra os teores de polifenóis totais no vinho com os diferentes dominós em estudo. Verificaram-se algumas diferenças entre os diferentes níveis de tosta aplicados às madeiras, assim como em relação à testemunha.

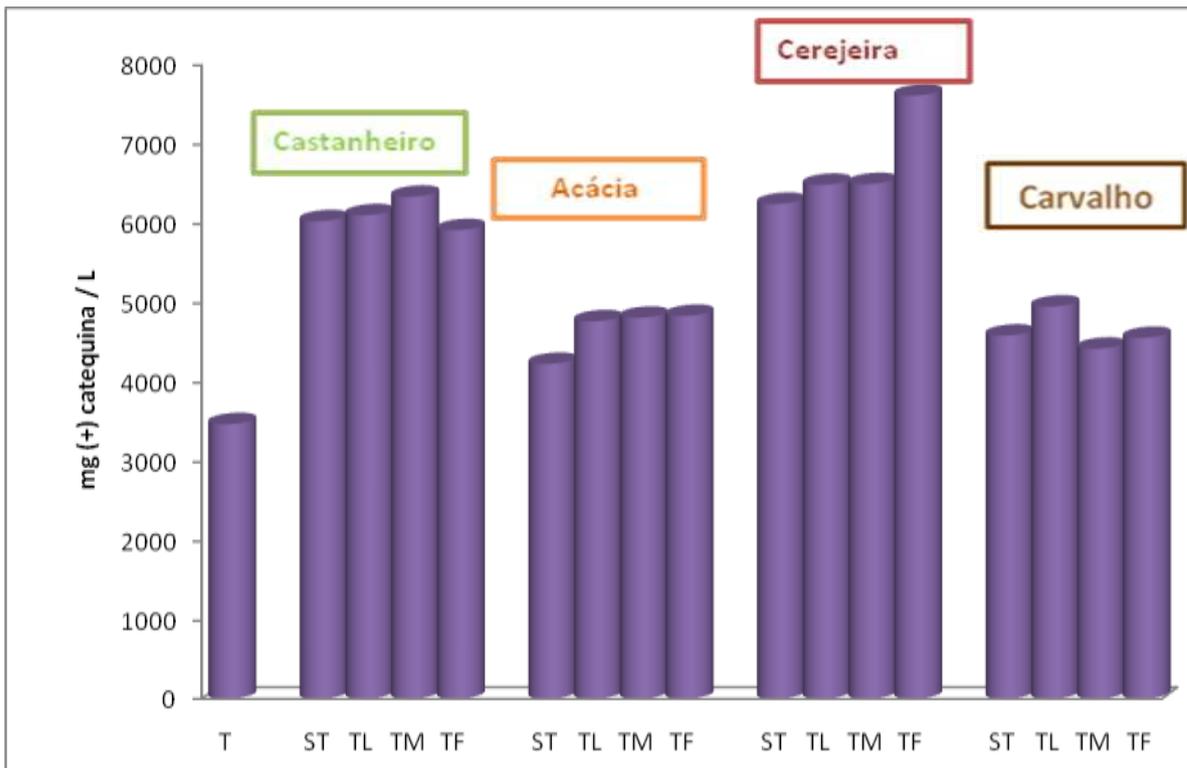


Figura 20 - Polifenóis totais em vinhos com dominós de diferentes espécies botânicas

Pode verificar-se que a madeira de cerejeira e logo depois a de castanheiro são as que mais compostos fenólicos cederam ao vinho. Também se pode observar que, os teores em compostos fenólicos cedidos não são influenciados pelo grau de tosta das espécies botânicas em estudo.

4.2.3. Pigmentos antociânicos

O gráfico da figura 21 (Anexos- tabela 1), mostra tanto as antocianas totais como as antocianas livres, dos vinhos aos quais foram adicionadas as aparas de madeira e do vinho testemunha. O gráfico mostra que as antocianas totais não variam muito de madeira para madeira, e apresentam valores semelhantes à testemunha.

Em relação às antocianas livres, os vinhos com aparas de acácia e carvalho tem um comportamento semelhante e não diferem muito em

relação ao grau de tosta. Nos vinhos com aparas de castanheiro, o teor de antocianas livres diminui com o aumento do grau da tosta, aumentando o teor na tosta forte, e em relação aos vinhos com aparas de cerejeira existe um aumento das antocianas livres na tosta ligeira, decrescendo na tosta média e apresentando o teor mais alto na tosta forte.

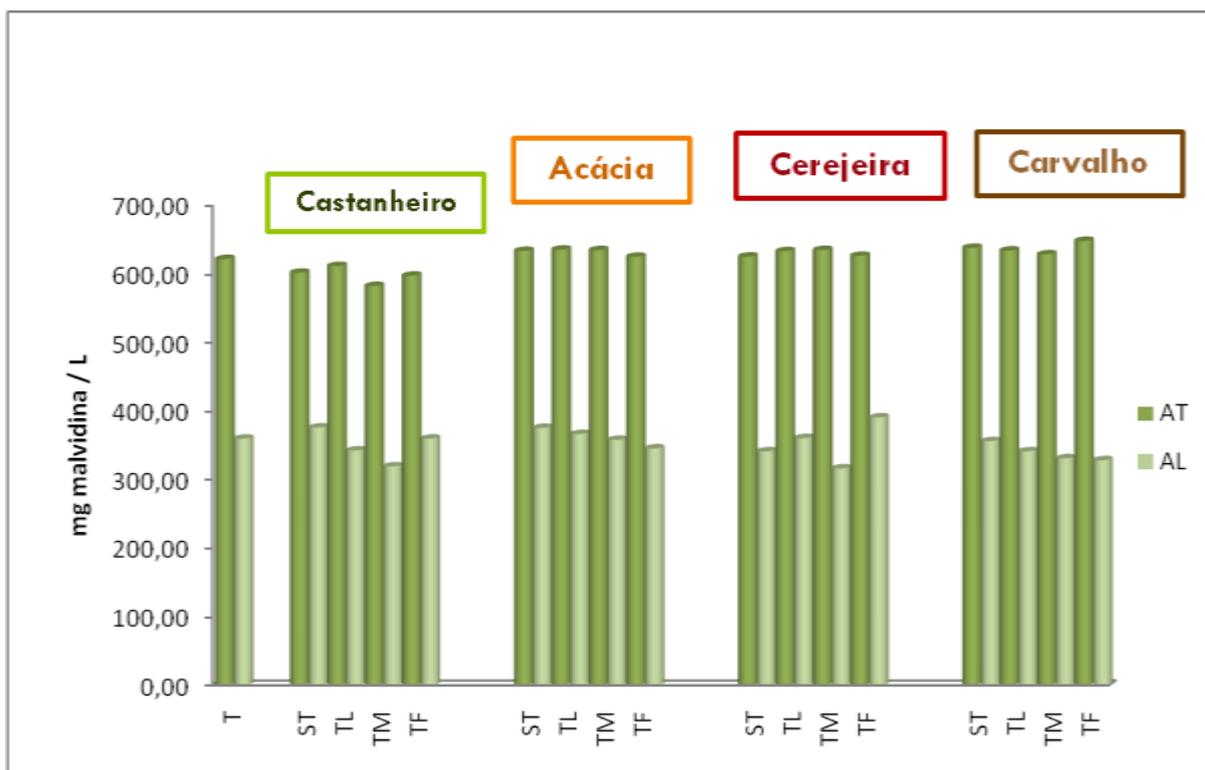


Figura 21 - Antocianas totais (AT) e livres (AL) em vinho com aparas de diferentes espécies botânicas

O teor em antocianas livres mostrou comportamento diferente entre espécies botânicas e níveis de tosta. De modo geral, nos vinhos com adição de madeiras de acácia e carvalho observou-se um decréscimo do teor de antocianas livres com o aumento do grau de tosta. O castanheiro também mostrou comportamento semelhante, excepto na tosta forte, na qual se verificou um aumento do teor em antocianas livres. Em relação aos vinhos com adição de madeiras de cerejeira não é possível definir um comportamento relativamente a este parâmetro.

4.2.4. Flavonóides Totais

A figura 22 (Anexo-tabela1) representa os valores dos flavonoides totais. Após a sua observação pode verificar-se que a acácia é a madeira cujos vinhos apresentam maiores teores e de seguida os vinhos com cerejeira, ao passo que os vinhos com castanheiro e o carvalho apresentam valores muito próximos entre si.

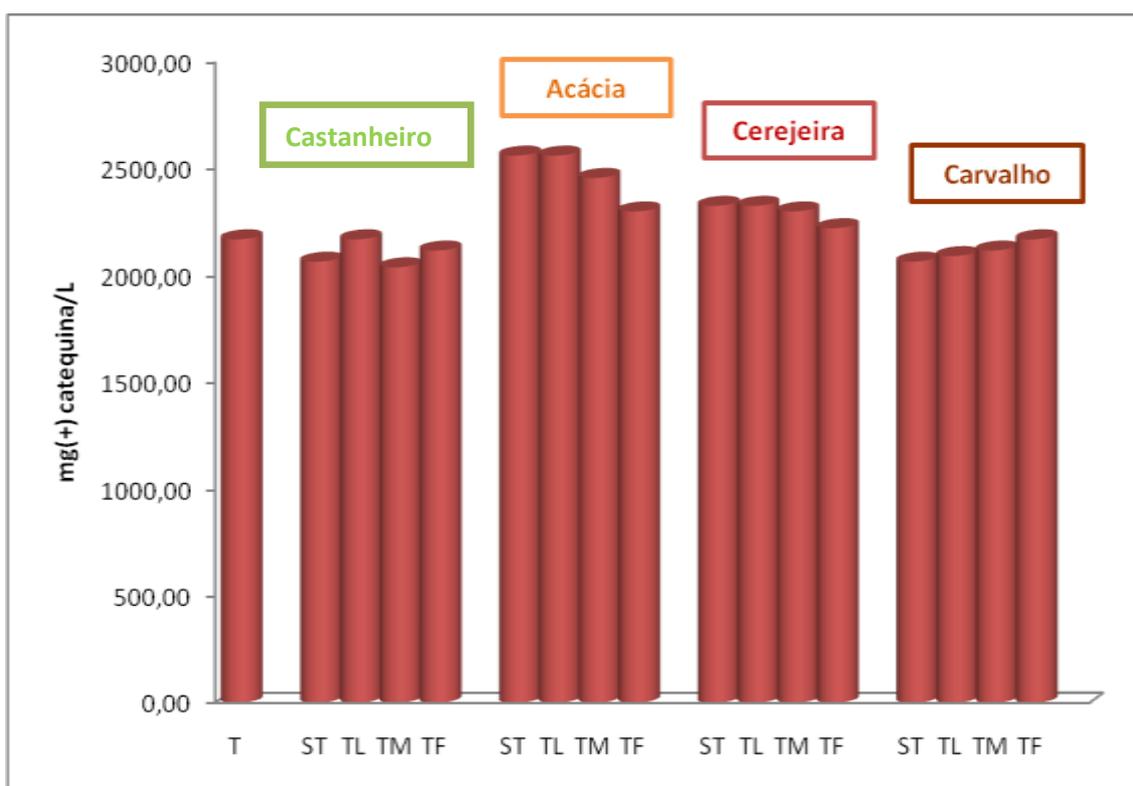


Figura 22 - Flavónoides totais em vinhos com aparas de diferentes espécies botânicas

4.2.5. Flavonóides não antociânicos

A figura 23 (Anexo-tabela1) mostra os valores dos flavonóides não antociânicos, e após a sua observação verificamos que a acácia é a madeira cujo vinho apresenta maior teor de flavonóides totais não antociânicos e de seguida o vinho com cerejeira, ao passo que o vinho com castanheiro e com carvalho apresentam valores muito próximos

entre si. O comportamento dos flavonóides não antociânicos é muito semelhante ao comportamento apresentando pelos flavonóides totais.

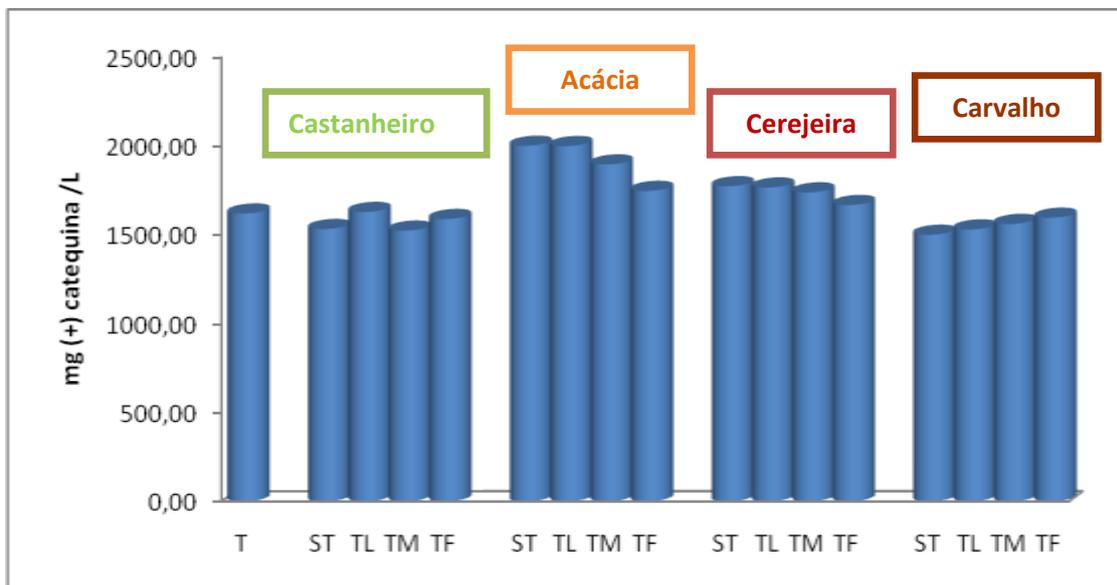


Figura 23 - Flavonóides totais não antociânicos em vinho com aparas de diferentes espécies botânicas

Os valores encontrados nestes vinhos para os polifenóis totais variam entre 2010,47 e 2407,25 mg/L. O teor em flavonóides totais varia entre 2066,54 e 2563,56 mg/L e os flavonóides não antociânicos variam entre 1501,04 e 2002,06 mg/L. As antocianinas totais apresentaram teores variáveis entre 583,07 e 638,93 mg/L e as antocianinas livres entre 316,54 e 376,39 mg/L. Utilizando a mesma metodologia e para vinhos italianos monovarietais encontramos referenciados valores da mesma ordem de grandeza (Di Stefano e Cravero, 1990). Ainda com vinhos italianos Moretti (1992) apresenta resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. Fazendo o estudo ao longo do tempo de engarrafamento, o mesmo autor refere que os valores encontrados para todos estes parâmetros vão diminuindo ao longo do tempo. Valdés *et al.*, (1994) no estudo dos atributos cromáticos de vinhos tintos elaborados na presença de enzimas pectolíticas referem teores de polifenóis totais, antocianinas e flavonóides da mesma ordem de grandeza dos valores aqui apresentados.

4.2.6. Características da cor nos vinhos

No gráfico 24 (Anexo-tabela 2) verifica-se que quer em relação à tonalidade quer em relação à intensidade da cor não existem quaisquer diferenças em relação à espécie botânica e ao grau de tosta.

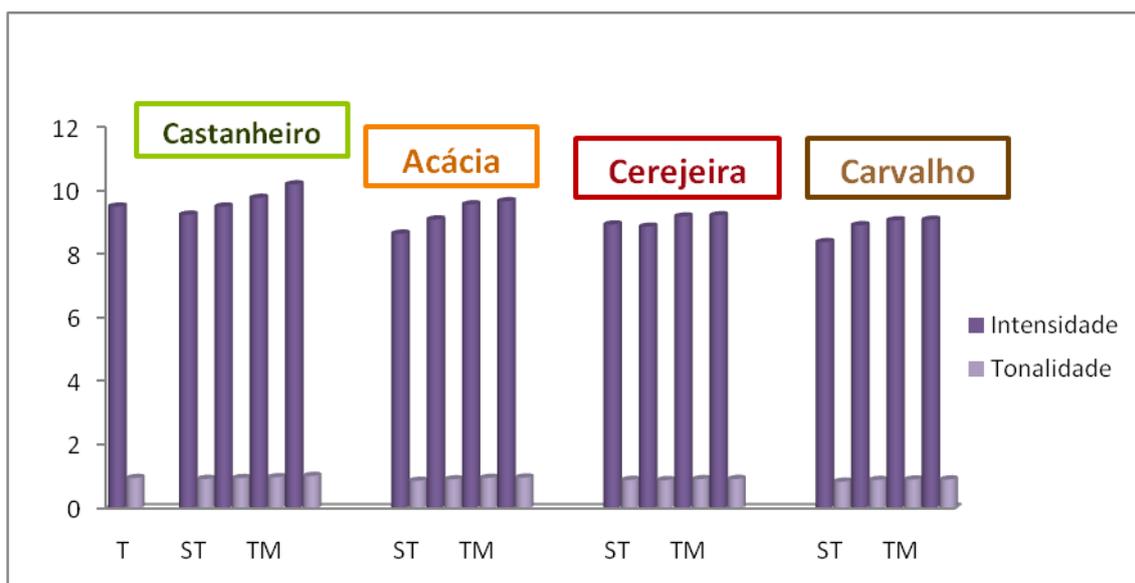


Figura 24 - Características da cor (intensidade e tonalidade) dos vinhos com aparas de diferentes espécies botânicas

A tonalidade é indicativa da idade do vinho pois ao longo do tempo, as antocianinas responsáveis pela cor vermelha reagem com outros compostos, diminuindo a quantidade de antocianinas livres (Pérez-Margariño, S. & M.L. González-San José, 2006), fazendo com que ocorram desvio da absorvância do vinho do comprimento de onda característico do vermelho para o característico do amarelo. De um modo geral, vinhos apresentando uma tonalidade igual ou inferior a 0,6 são considerados vinhos novos com um tempo de maturação relativamente curto (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). Todas as amostras analisadas apresentam uma tonalidade por volta dos 0,6, só a acácia apresenta valores por volta dos 0,7 o que pode estar relacionado com os teores mais elevados em flavonóides encontrados para estes vinhos.

A intensidade da cor dos vinhos permite a monitorização dos compostos com absorvâncias nos comprimentos de onda correspondentes ao amarelo, vermelho e azul. Desta forma, quanto mais elevada for a intensidade de um vinho, maior a quantidade de compostos que absorvem a estes comprimentos de onda, nomeadamente alguns compostos fenólicos. De maneira idêntica à utilização da tonalidade, a intensidade é muitas vezes um parâmetro de monitorização da evolução de um vinho (Tsanova-Savova, S. *et al.*, 2002; Pérez-Margariño & M.L. González-San José, 2006; Pérez-Lamela, C. *et al.*, 2007; Salaha. M.-I., *et al.*, 2008; Burin. V.M., *et al.*, 2010; Caillé. S., *et al.*, 2010; Escudero-Gilete. M.L., *et al.*, 2010; González-del-Pozo *et al.*, 2010; Chira. K., *et al.*, 2011).

4.2.7. Cielab

Em todos os vinhos tintos se verifica que o valor de a^* é muito superior ao valor de b^* , o que significa que os vinhos apresentam uma cor vermelha viva. Os valores de b^* são sempre positivos, a indicar que a componente amarela é superior à componente azul da cor destes vinhos, o que é um resultado normal atendendo a que se trata de vinhos jovens.

Como se observa na tabela 2, o L apresenta valores tendencialmente menores com o aumento do grau de tosta, ao contrário dos parâmetros a^* e b^* . Estes valores permitem-nos verificar que a aplicação das madeiras em estudo aos vinhos afectou a cor dos mesmos.

Tabela 2 - Cielab dos vinhos tintos com as diferentes espécies botânicas e diferentes graus de tosta

L				
Testemunha	76,78± 1.21			
	Sem Tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte
Acácia	78.96±1.48	77.39±0.10	76.42±0.22	76.26±0.55
Cerejeira	77.91±0.15	77.90±0.24	77.25±2.32	77.24±0.01
Castanheiro	77.15±0.10	76.57±0.48	76.12±1.03	75.37±1.40
Carvalho	78.87±0.80	77.82±0.24	77.54±0.14	77.51±0.24
A				
Testemunha	13.74±0.64			
	Sem Tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte
Acácia	12.30±1.01	13.41±0.02	14.28±0.22	14.67±0.33
Cerejeira	12.47±0.00	12.69±0.04	13.32±9.25	13.39±0.01
Castanheiro	13.07±0.20	13.80±0.15	14.15±0.47	14.46±0.70
Carvalho	11.96±0.68	12.85±0.17	13.12±0.11	13.12±0.20
B				
Testemunha	16.49±1.22			
	Sem Tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte
Acácia	14.88±0.99	15.82±0.11	16.25±0.15	16.17±0.45
Cerejeira	15.37±0.02	14.68±0.15	14.67±8.76	15.39±0.02
Castanheiro	15.72±0.16	15.70±0.03	16.43±0.77	17.11±1.15
Carvalho	14.57±0.55	15.21±0.22	15.43±0.09	15.53±0.14

4.3.Capacidade Antioxidante das Amostras

4.3.1.Método DPPH

O método do DPPH• (2,2,di-fenil-1-picrilhidrazil) tem sido o mais utilizado pela comunidade científica para a determinação da atividade antioxidante dos vinhos e aguardentes (Da Porto *et al.*, 2000), por se tratar de um método de fácil controlo, simples e rápido e o DPPH• ser um dos poucos radicais orgânicos estáveis disponíveis no comércio (Niederlander *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2009).

A coloração da solução de DPPH em contacto com as amostras (extracto a analisar) em testes passa da coloração roxa intensa para amarela.

Podem ocorrer três tipos de comportamento cinético entre compostos com atividade antioxidante: substâncias que reagem rapidamente com o DPPH, atingindo-se o final da reação em menos de um minuto (cinética rápida); substâncias que finalizam a reação em até 30 minutos (cinética intermediária) e substâncias de cinética lenta que demoram mais de uma hora para completar a reação (cinética lenta) (Brand-Williams, Cuvelier, Berset, 1995). Por isso, existem amostras com menor ou maior necessidade de se diluir conforme existe maior ou menor actividade antioxidante. Quanto maior a actividade antioxidante de uma amostra mais lenta é a reacção cinética.

Para que as nossas amostras se localizassem numa cinética intermediaria procedemos à diluições das amostras de forma a que em 30 min tivéssemos a certeza que a reacção já tinha terminado. As nossas diluições tanto nos vinhos como nas soluções hidroalcoólicas foram de 25% em aparas e 50% nos dominós.

Na figura 25 representa-se o espectro do radical DPPH que apresenta dois máximos de absorvância a 320 nm e a 517 nm, e possui uma coloração violenta intensa.

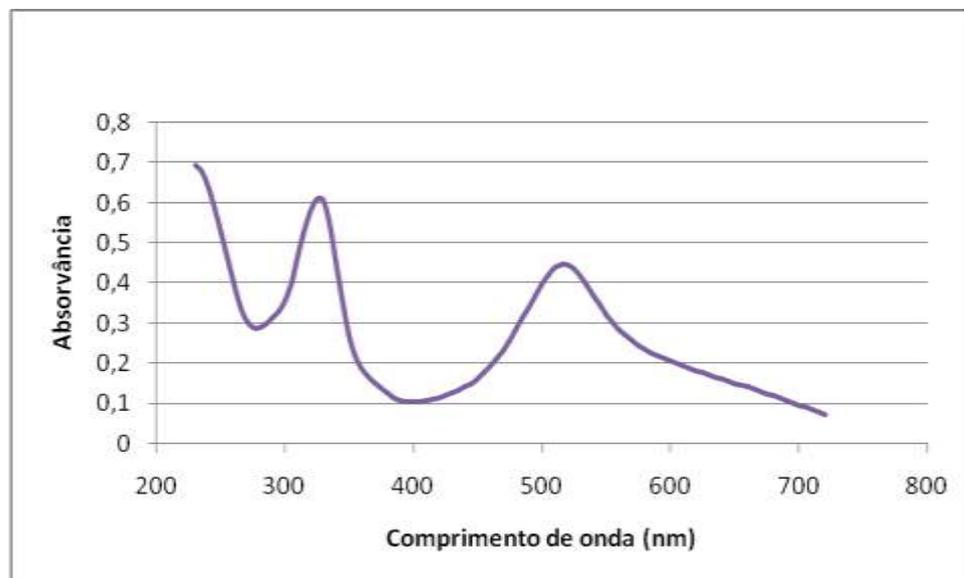


Figura 25 - Espectro de absorvância do radical DPPH

Na figura 26 apresenta-se o espectro do DPPH em contacto com uma solução hidroalcoólica. O estado de equilíbrio da reação entre o radical DPPH e a solução hidroalcoólica em análise foi alcançado em 20 min.

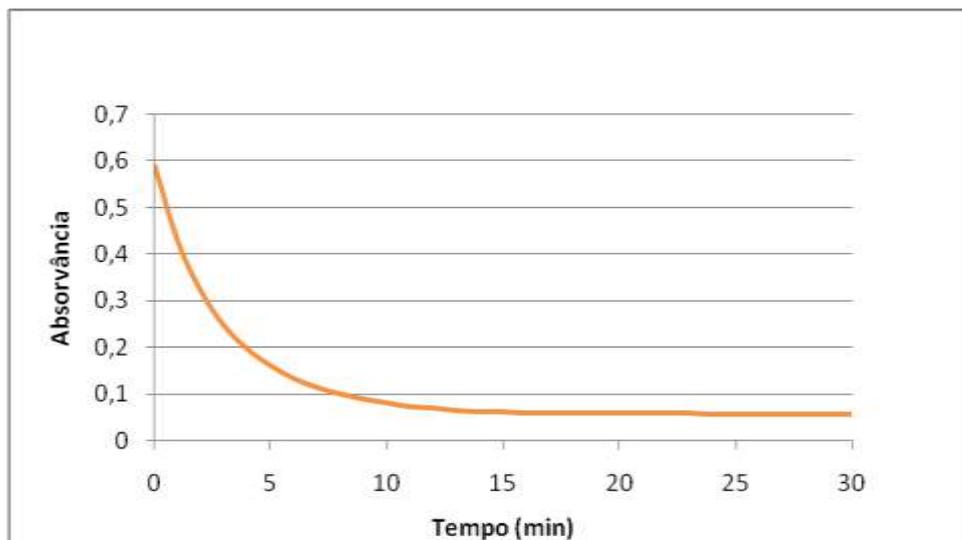


Figura 26 - Reação cinética de uma solução hidroalcoólica com o radical DPPH

Na figura 27 apresenta-se o espectro do DPPH em contacto com o vinho sem qualquer tipo de amostra de madeiras. O estado de equilíbrio da reação entre o radical DPPH e a solução hidroalcoólica em análise foi alcançado em 15 min.

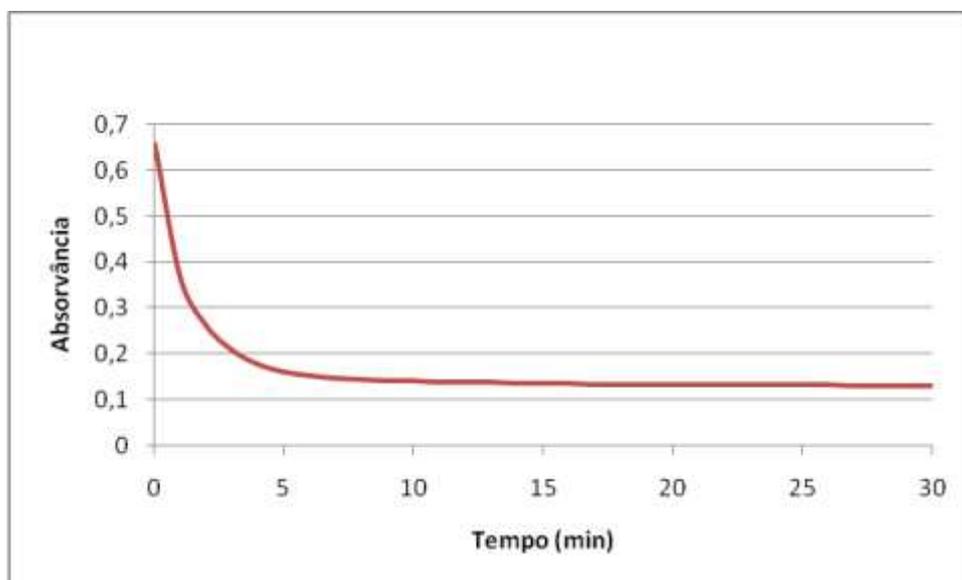


Figura 27 - Reação cinética de vinho tinto com o radical DPPH

✓ **Atividade antioxidante determinada através do método DPPH**

Na figura 28 apresentam-se os valores médios da atividade antioxidante das soluções hidroalcoólicas por madeira e o seu grau de tosta. Nas soluções hidroalcoólicas analisadas, a atividade antioxidante apresenta valores compreendidos entre 1,42mM de Trolox até valores 17,1mM de trolox (Anexo- tabela 3).Pela análise dos resultados obtidos é possível observar que as soluções hidroalcoólicas com maior atividade antioxidante são provenientes da madeira castanheiro enquanto a que apresenta menor atividade antioxidante é a cerejeira: o castanheiro apresenta valores de 17,1 a 14,5 mM de Trolox, a acácia apresenta valores 12,3 a 8,8 mM de Trolox, a cerejeira de 1,6 a 1,2 mM de Trolox, o carvalho 14,8 a 9,2 mM de Trolox.

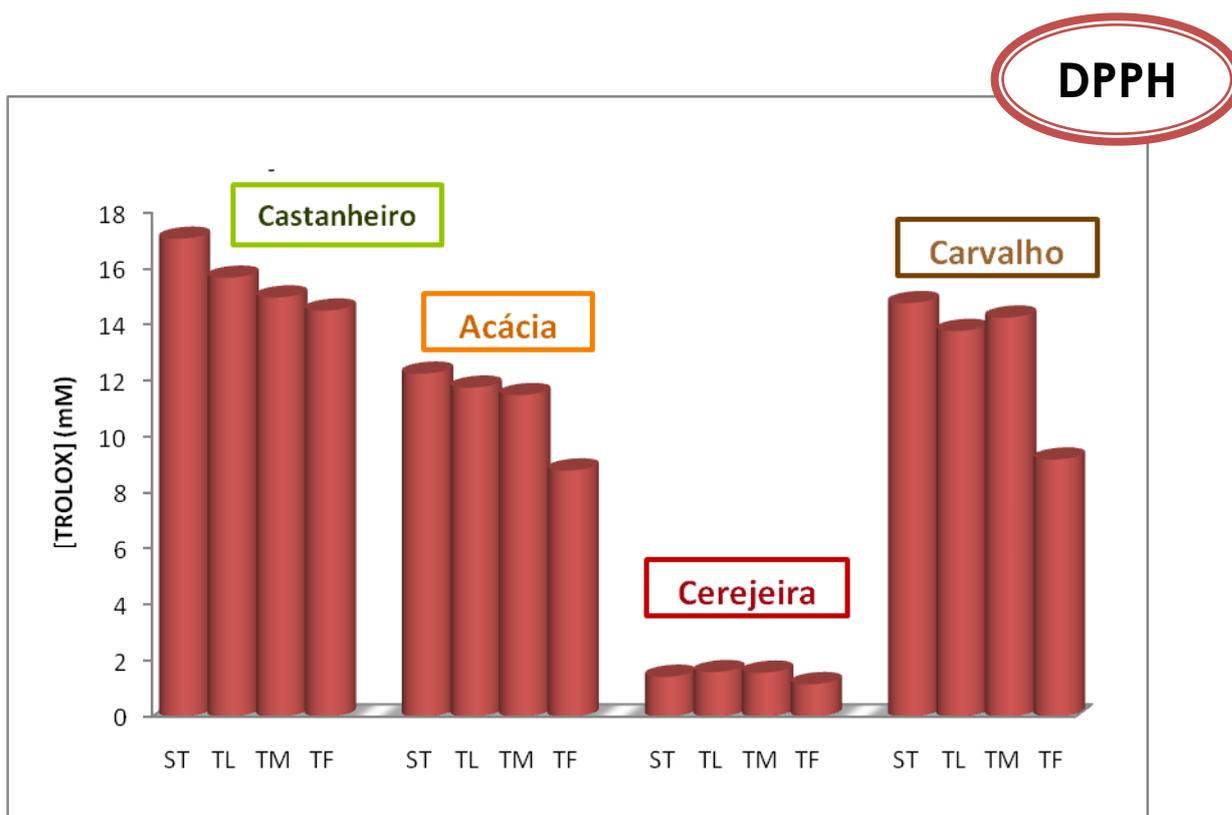


Figura 28 - Capacidade antioxidante das soluções hidroalcoólicas com aparas de espécies botânicas (radical DPPH)

A figura 29 mostra os valores médios da atividade antioxidante dos vinhos analisados com diferentes aparas em estudo. Nos vinhos com aparas de madeira analisados, a atividade antioxidante apresenta valores compreendidos entre 12,8 mM de Trolox até valores 15,5 mM de trolox (Anexo- tabela 4). Pela análise dos resultados obtidos é possível observar que os vinhos com maior atividade antioxidante são os que tiveram em contacto com as aparas de madeira de castanheiro e de acácia enquanto o vinho testemunha é o que apresenta menor atividade antioxidante.

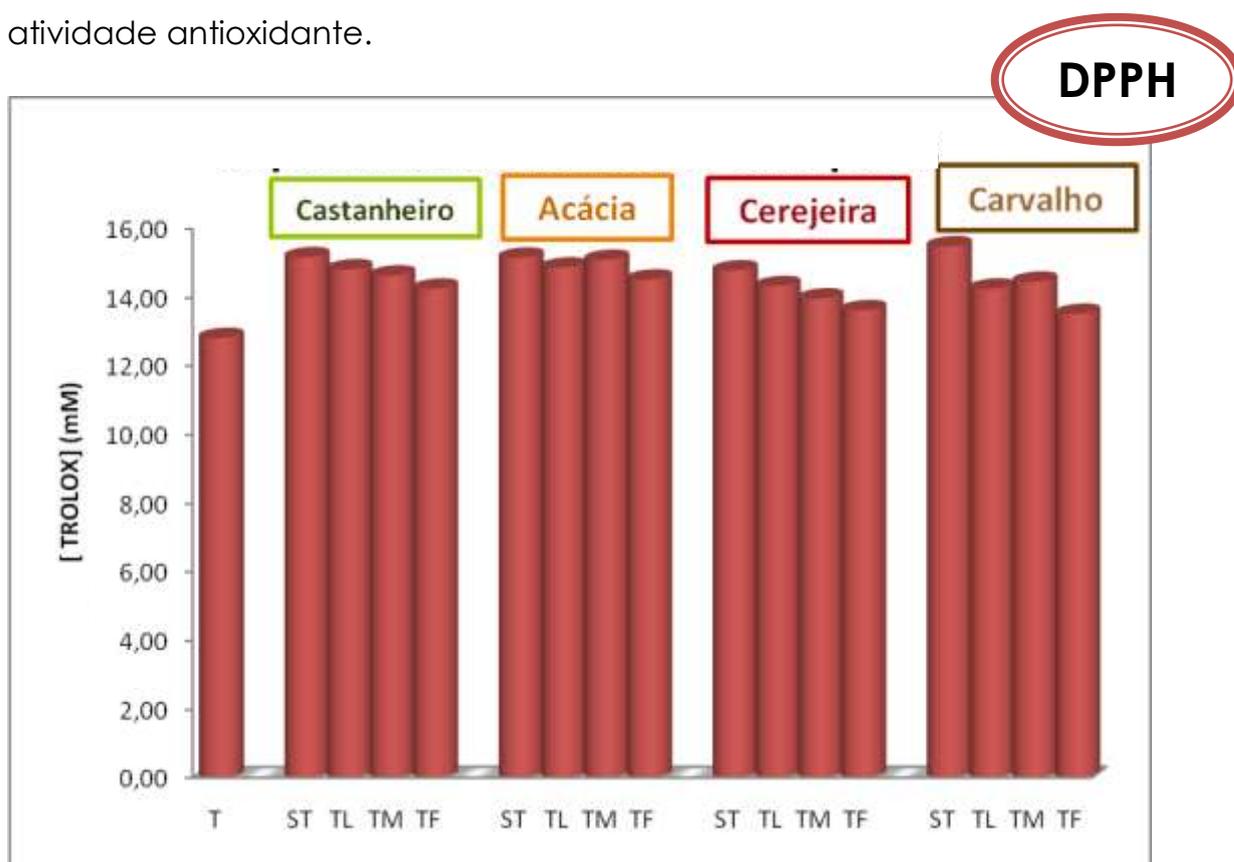


Figura 29 - Capacidade antioxidante em vinho com aparas de diferentes espécies botânicas (radical DPPH)

De uma forma geral, podemos verificar que a atividade antioxidante, quer nas soluções hidroalcoólicas quer nos vinhos em contacto com as diferentes espécies botânicas, diminui com o aumento do grau de tosta. Este resultado está de acordo com Jordão *et al* (2012) que descreve o

mesmo comportamento para diversas aparas e dominós de madeira de carvalho.

Genéricamente, os vinhos com maiores teores em compostos fenólicos são aqueles que apresentam, maiores actividades antioxidantes (Paixão et al., 2007). De facto, observando os valores obtidos para os polifenóis totais e para as actividades antioxidantes das soluções hidroalcoólicas, verificamos que os menores valores foram apresentados pelas soluções hidroalcoólicas com cerejeira e os maiores foram obtidos com o castanheiro.

Embora nos vinhos não seja tão evidente mas todos os vinhos com aparas apresentam valores superiores quer de polifenóis quer de actividade antioxidante.

4.3.2.Método ABTS

Na figura 30 esta representado o espectro de absorvancia do radical do ABTS. No espectro de absorvancia do ABTS verificamos que tem dois picos acentuados 320nm e aos 420nm.

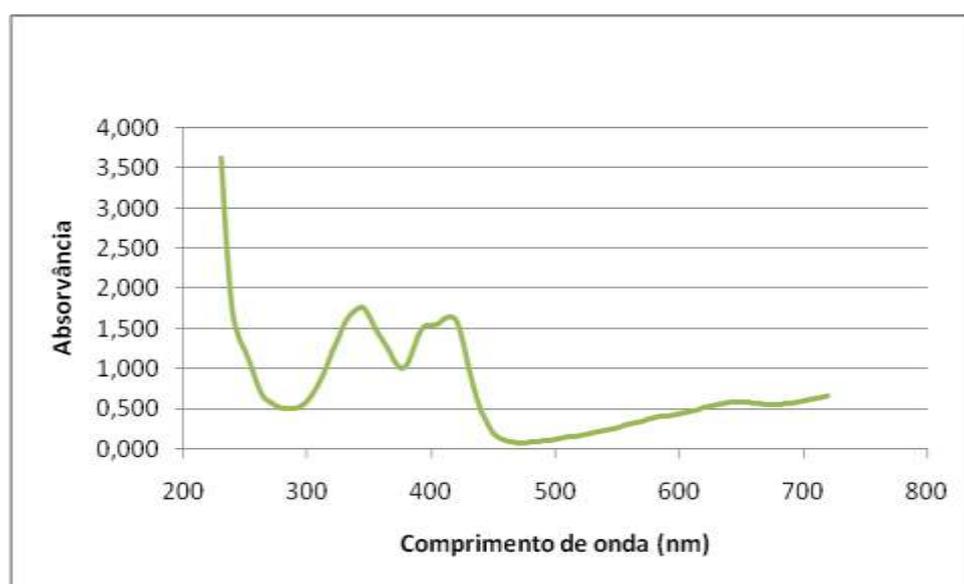


Figura 30 - Espectro de absorvância do radical ABTS

Na figura 31 apresenta-se o espectro do ABTS em contacto com uma solução hidroalcoólica. O estado de equilíbrio da reacção entre o radical ABTS e a solução hidroalcoólica em análise foi alcançado em 10 min.

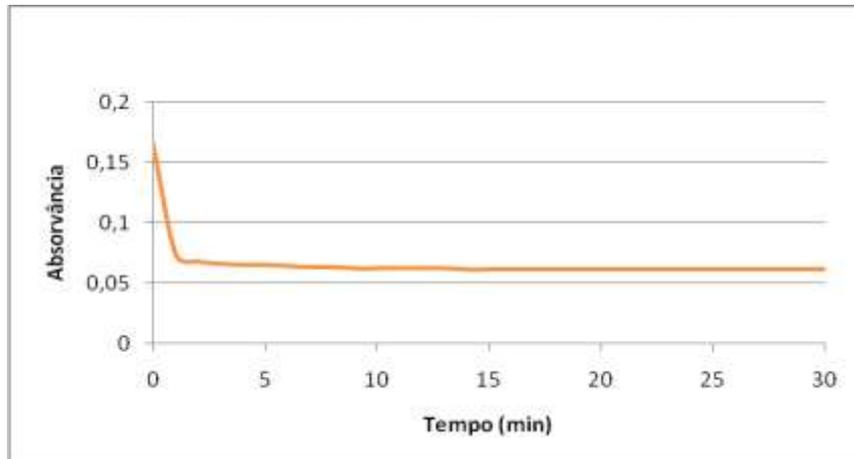


Figura 31 - Reacção cinética de uma solução hidroalcoólica com radical ABTS

Na figura 32 apresenta-se o espectro do ABTS em contacto com o vinho sem qualquer tipo de amostra de madeiras. O estado de equilíbrio da reacção entre o radical ABTS e o vinho que contem aparas de madeira em análise era alcançado em 15 min.

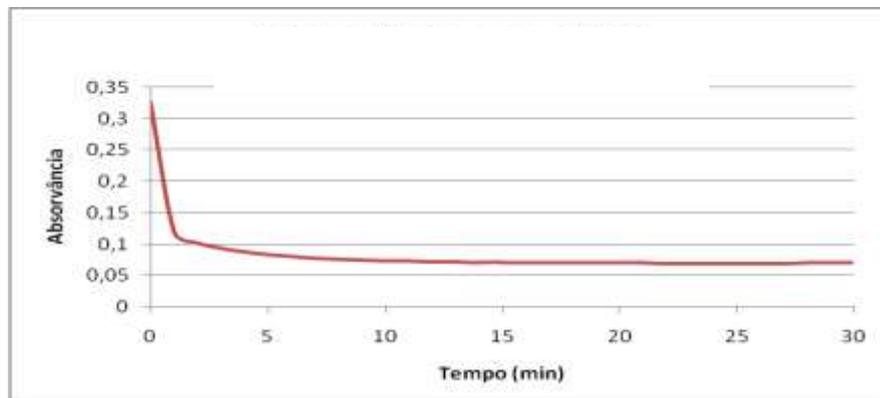


Figura 32 - Reacção cinética de vinho tinto com o radical ABTS

✓ **Atividade antioxidante determinada através do método ABTS**

Na figura 33 apresentam-se os valores médios da atividade antioxidante das soluções hidroalcoólicas por espécie botânica e para diferentes grau de tosta. Nas soluções hidroalcoólicas analisadas, a atividade antioxidante apresenta valores compreendidos entre 1,3 mM de Trolox até valores 32,3 mM de trolox (Anexo-tabela 3). Pela análise dos resultados obtidos é possível observar que as soluções hidroalcoólicas com maior atividade antioxidante são provenientes da madeira de castanheiro enquanto a que apresenta menor atividade antioxidante é a da cerejeira: as soluções com castanheiro apresenta valores de 32,3 a 21,2 mM de Trolox, as de acácia apresentam valores 7,9 a 11,8 mM de Trolox, as de cerejeira apresentam valores de 1,3 a 2,1 mM de Trolox, e as de carvalho 16,7 a 27,4 mM de Trolox.

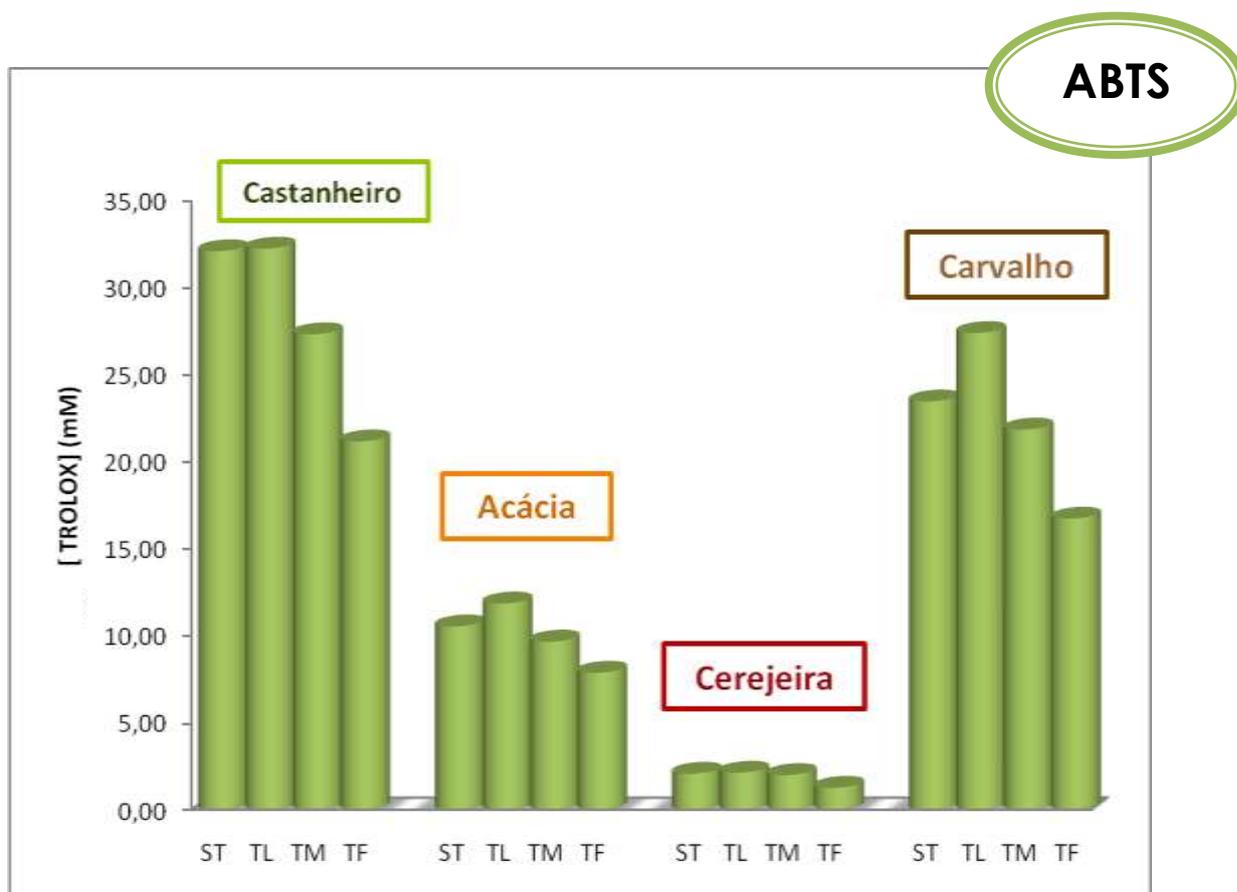


Figura 33 - Capacidade antioxidante em soluções hidroalcoólicas com aparas de diferentes espécies botânicas (radical ABTS)

Na figura 34 apresentam-se os valores médios da atividade antioxidante dos vinhos em estudo por madeira e o seu grau de tosta. Nos vinhos com extratos de madeira analisados, a atividade antioxidante apresenta valores compreendidos entre 8,9 mM de Trolox até valores 13,1 mM de trolox (Anexo- tabela 4). Pela análise dos resultados obtidos é possível observar que os vinhos com maior atividade antioxidante são provenientes da madeira castanheiro enquanto a que apresenta menor atividade antioxidante é a cerejeira: o castanheiro apresenta valores de 10,4 a 13,1 mM de Trolox, a acácia apresenta valores 9,8 a 12,3 mM de Trolox, a cerejeira de 10,8 a 12,1 mM de Trolox, o carvalho 8,9 a 12,3 mM de Trolox.

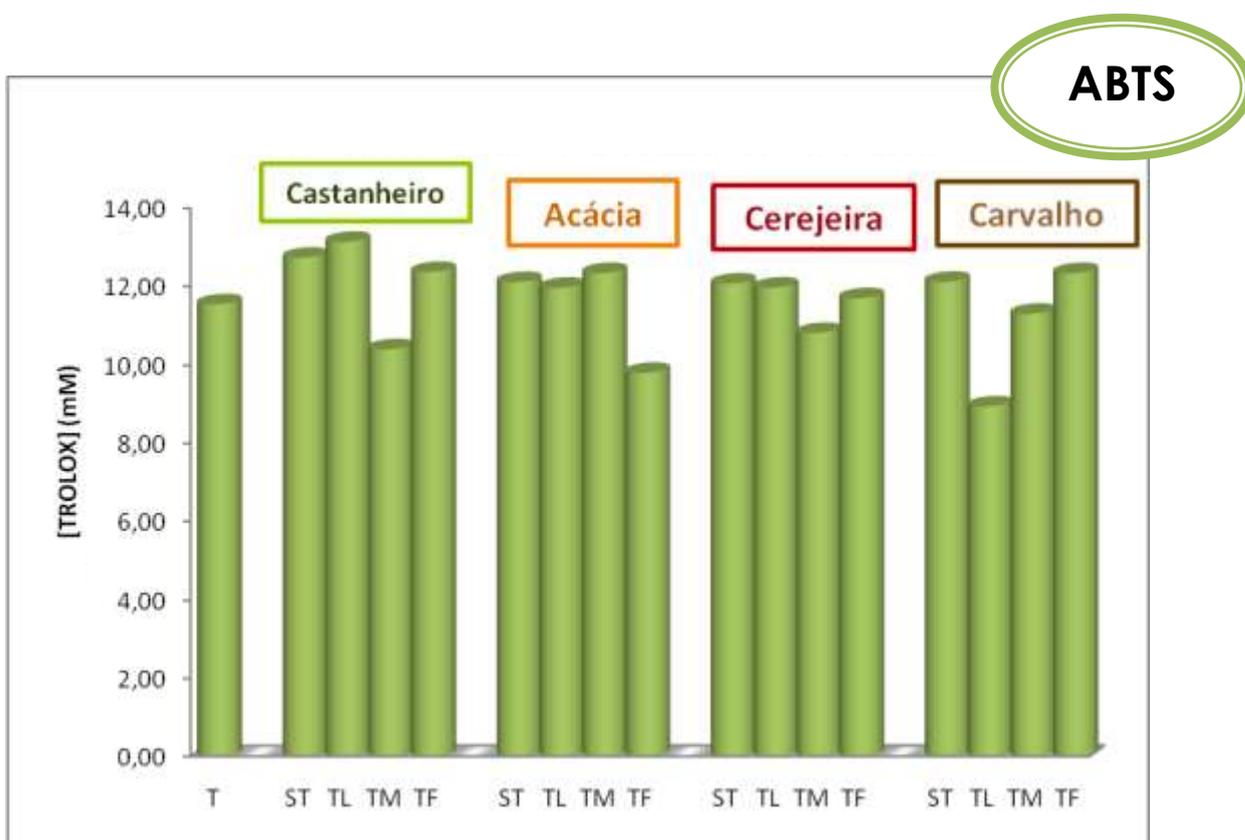


Figura 34 - Capacidade antioxidante em vinho com aparas de diferentes espécies botânicas (radical ABTS)

Na figura 35 apresentam-se os valores médios da atividade antioxidante do vinho tinto com alternativos de madeira (dominós) e o seu grau de tosta. Nos vinhos com alternativos de madeira analisados, a atividade antioxidante apresenta valores compreendidos entre 42,93 mM de Trolox até valores 82,75 mM de trolox (Anexo-tabela 5). Pela análise dos resultados obtidos é possível observar que as amostras com maior atividade antioxidante são provenientes da madeira cerejeira enquanto a que apresenta menor atividade antioxidante é a carvalho: o castanheiro apresenta valores de 31,09 a 33,89 mM de Trolox, a acácia apresenta valores 24,37 a 30,22 mM de Trolox, a cerejeira de 33,29 a 33,89 mM de Trolox, o carvalho 23,86 a 27,55 mM de Trolox.

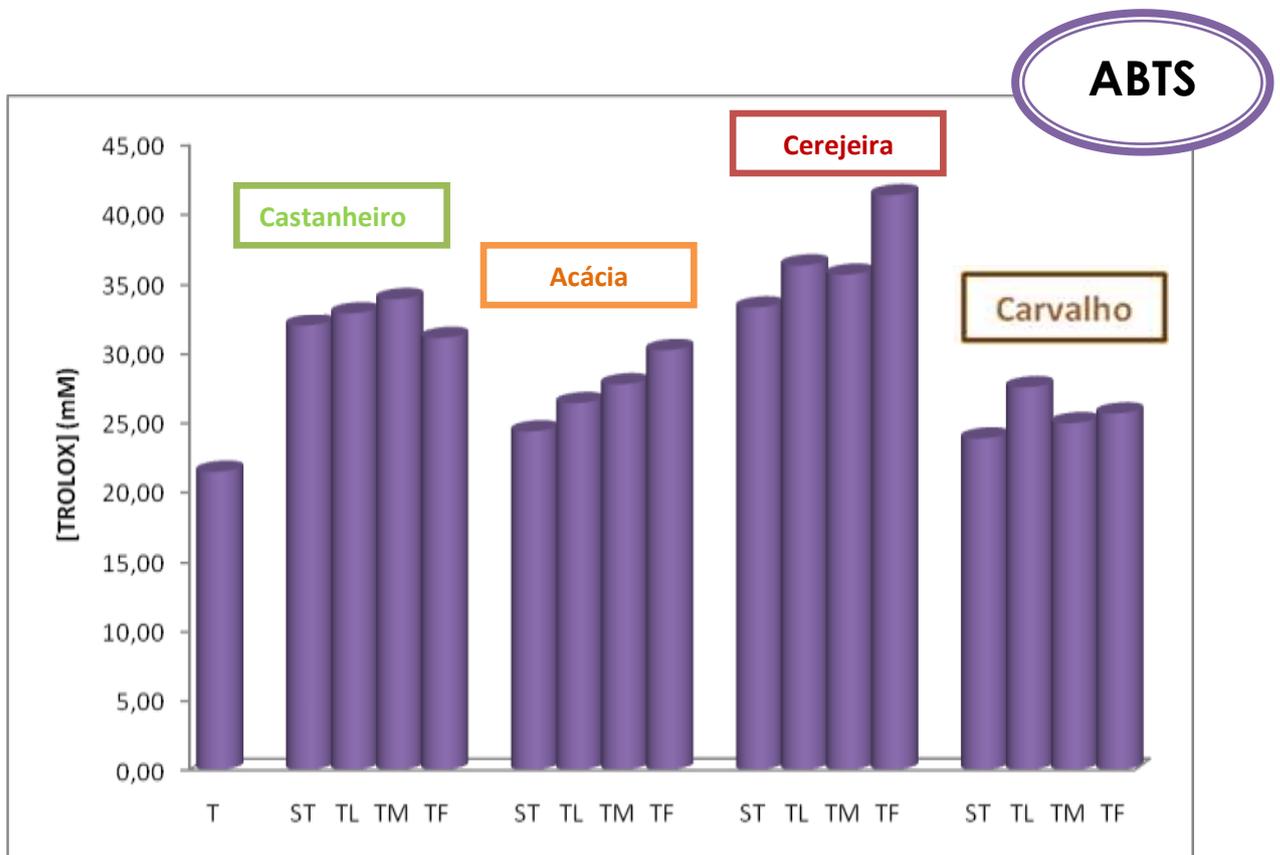


Figura 35 - Capacidade antioxidante em vinho com dominós de diferentes espécies botânicas (radical ABTS)

A relação entre os valores obtidos para os polifenóis totais e para a capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS, para as soluções hidroalcoólicas e para os vinhos com dominós segue a mesma tendência, ou seja, quanto maiores os valores de polifenóis totais, maiores os valores da capacidade antioxidante. Para o ensaio com as aparas esta tendência não é tão evidente.



Conclusão

5. Conclusão

Este ensaio pretende contribuir para o estudo de diferentes espécies de madeiras, sujeitas a diferentes níveis de tosta, com possível interesse enológico.

Através dos resultados obtidos pode concluir-se que as várias espécies botânicas estudadas apresentam diferenças ao nível da sua composição fenólica total, pelo que se pode afirmar que a espécie botânica é um factor de variabilidade.

O efeito da intensidade da tosta foi outro parâmetro analisado neste estudo, e verifica-se que de facto, a tosta provoca alterações significativas na composição química das madeiras, provocando a diminuição de alguns constituintes e o aumento do teor de outros, o que se verifica pelo comportamento dos polifenóis totais.

Em relação à actividade antioxidante, os resultados parecem mostrar que existem diferenças entre as diferentes espécies botânicas mas é mais evidente o efeito que o aumento da tosta tem no decréscimo da actividade antioxidante das soluções alcoólicas onde foram adicionadas as aparas de madeira. Em relação aos vinhos, os resultados parecem demonstrar que, de uma forma geral, a aplicação de alternativos (aparas/dominós) de madeira constitui para o aumento da actividade antioxidantes dos mesmos.



Bibliografía

6. Bibliografía

- Akkol, E.K.; Goger, F.; Kosar, M.; Baser, K.H.C., (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*, **108**, pp.942-949.
- Alañón, M.E., Rubio H., Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coelho M.S. (2010). Monosaccharide anhydrides, new markers of toasted oak wood used for ageing wines and distillates. *Food Chemistry*, **119**, pp.505-512.
- Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Gordon, M. H., & Pérez-Coelho, M. S. (2011). A study on the antioxidant capacity of oak wood in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry*, **128**, pp.997-1002.
- Allen, M. (1994). *Advanced Oenology*. Charles Sturt University
- Almela, L.; Sanchez-Munoz, B.; Fernandez-Lopez, J.A.; Roca, M.J.; Rabe, V (2006). *Journal of Chromatography*, **1120**, pp.221-229
- Alonso, A. M., Castro, R., Rodríguez, M. C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International*, **37**, pp.715-721.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**, pp.183-198.
- António M. Jordão, Ana C. Correia, R. DelCampo, Maria L. González SanJose. (2012) Antioxidant capacity, scavenger activity, and ellagitannins content from commercial oak pieces used in winemaking. *Eur Food Res Technol*, **235**, pp.817-825
- Aoshima, H., Tsunoue, H., Koda, H., & Kiso, Y. (2004). Ageing of whiskey increases 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, pp.5240-5244.
- Arnao, M.B.; Cano, A.; Hernandez-Ruiz, J.; Garcia-Canovas, F., Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry*, **236**, pp.255-261.
- Ávila-Reyes, J. A., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., González-Valdez, L. S., Valencia Del Toro, G., & Durán- Páramo, E. (2010). Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels. *Food Research International*, **43**, pp.296-300.
- Bakker, J.; Bridle, P.; Timberlake, C. F. (1986). Tristimulus measurements (CIELAB 76) of Portwine colour. *Vitis*, **25**, pp.67-78.
- Benavent J. L A., Cano M. I. A. (2003). *Tecnología Enológica*. Editorial Síntesis. Manuales científicos técnicos. España.
- Berrocal Del Brío M., Lancho J. F. G., Herrero J. M. C. (1998). *El Castaño*. 228 pp. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

- Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical . *Nature*, **181**, pp.1199-1200.
- Borguini R.G. (2006). Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.
- Bosso, A., Guaita, M., Panero, L., Borsa, D., & Follis, R. (2009). Influence of two winemaking techniques on polyphenolic composition and color of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **60**, pp.379-385.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, **28**, pp.25–30.
- Burns, J., Gardner, P. T., Matthews, D., Duthie, G. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2001). Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, pp.5797-5808.
- Cabrita, M.J. (2004) Caracterização físico-química de uvas e vinhos de castas tradicionais do Alentejo. Tese de doutoramento Universidade de Évora
- Cadenas, C., & Packer, L. (2002). Handbook of Antioxidants. Chapter 20 – The Phenolic Wine Antioxidants. 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Calò, A.; Tomasi, D.; Cravero, M.C.; Di Stefano, R. (1994). Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoi tartarici della buccia di varietà a bacca rossa. *Annali dell'Istituto Sperimentale per L'Enologia Asti*. Vol **XXV** , pp.47-61
- Canas S., Caldeira I. (2009). O envelhecimento de aguardentes vínicas. A madeira. Instituto nacional de recursos biológicos. I.P., L-INIA/DoisPortos.
- Canas, S., Casanova, V., & Belchior, A. P. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**, pp.626-633.
- Canas S., Leandro M. C., Spranger M. I., Belchior A. P. (1998). Phenolic compounds in Lourinhã brandy extracted from different woods. In: *Proceedings of the XIXth International Conference on Polyphenols*, vol. **1**, pp.373-374.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, **22**, pp.749-760.
- Carvalho A. (1996). Madeiras portuguesas. Estrutura anatómica, propriedades. Utilizações. *Instituto Florestal, Lisboa*. **I**, pp.340.
- Carvalho A. (1997). Madeiras Portuguesas. Estrutura anatómica. Propriedades. Utilizações. *Instituto Florestal, Lisboa*. Vol **II**, pp.415.

- Cataneo B.C., Caliarì V., Gonzaga V.L., Kuskoski M.E., Fett R. (2008). Actividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agro-industrial da produção de vinho. *Ciências Agrárias, Londrina*, **29**, pp.93-102.
- Chatonnet P., Boidron J. N., Dubourdieu D., Pons M. (1994). Evolution of oakwood volatile compounds during seasoning. First results. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **28**, pp.359-380.
- Chatonnet P., Ricardo-Da-Silva J.M., Dubourdieu D (1997). Influence de l'utilisation de barriques en chêne sessile européen (*Quercus petraea*) ou en chêneblancaméricain (*Quercus alba*) sur la composition et la qualité des vins rouges. *R. F. Oenol.*, **165**, pp.44-48.
- Citron G. (2005). Uso del legno in enologia: specie botaniche utilizzate, anatomia e classificazione. *L'Informatore Agrario*. Vol. **599**, pp. 69-72.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins- Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, pp.1063-1072.
- Clímaco M. C., d'Abreu D. C. (2008). Influência da origem da madeira de carvalho no envelhecimento de vinhos tintos. *Ciência Téc. Vitiv.*, Vol **23**, pp.111-117.
- Correia, H.; González-Paramás, A.; Amaral, M.T.; Santos-Buelga, C.; Batista, M.T. (2005). Characterisation of polyphenols by HPLC-PAD-ESI/MS and antioxidant activity in *Equisetum telmateia*. *Phytochemical Analysis*, **16**, pp.380-387.
- Cravero, M. C. e Di Stefano, R. (1990). I composti fenolici e l'origine varietale del leuve. *Riv. Vitic. Enol.*, **1**, pp. 33-44.
- Cristensen C.M. (1983) Effects of color on aroma, flavor and texture judgements of food. *Journal of Food Science*, **48**, pp.787-790.
- Cutzach I., Chatonnet P., Henry R., Dubourdieu (1997). Identification of volatile compounds with a "toasty" aroma in heated oak used in barrel making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, pp.2217-2224.
- Da Porto, C., Calligaris, S., Celotti, E., & Nicoli, M. C. (2000). Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, pp.4241-4245.
- Dastmalchi, K.; Damien Dorman, H.J. ;Oinonen , P.P.; Darwis. Y.; LAAKSO.I.;Hiltunen, R. (2008), *LWT- Food Science and Technology*, **41**, pp.391-400.
- DeConinck, G., Jordão, A.M., Ricardo-Da-Silva, J.M. and Laureano, O. 2006. Evolution of phenolic composition and sensory properties in red wine aged in contact with Portuguese and French oak wood chips. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **40**, 25-34.
- De Simón B. F., Esteruelas E., Muñoz A. M, Cadahía E., Sanz M. (2009b). Volatile compounds in Acacia, Chestnut, Cherry, Ash, and Oak Woods, with a view to their use in cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, pp.3217-3227.

- De Simón B. F., Muiño I., Cadahía E. (2010). Characterization of volatile constituents in commercial oak wood chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, pp. 9587-9596.
- De Rosso M., Panighel A., Vedova A. D., Stella L., Flamini R. (2009). Changes in chemical composition of red wine aged in Acácia, Cherry, Chestnut, Mulberry, and Oak Wood barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, pp. 1915-1920.
- Dubois P. (1989). Apports du fût de chêne-neufal'arôme des vins. *R. F. Oenol.*, **120**, pp.19-24.
- Escudero-Gilete, M.L., González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2010). Implications of blending wines on the relationship between the colour and the anthocyanic composition. *Food Research International*, **43**, pp.745-752.
- Faitová, K., Hejtmánková, A., Lachman, J., Pivec, V. and Dudjak, J. (2004). The contents of total polyphenolic compounds and trans-resveratrol in white Riesling originated in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences*, **22**, pp.215-221.
- Fengel D., Wegner G. (1989). *Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. 612 pp. Walter de Gruyter (Ed.), Berlin.
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Toncoso, A. M., &García-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48**, pp.649-671.
- Feuillat F. , Keller R. (1997).Variability of oak wood (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* Liebl.)Anatomy relating to cask properties. *American Journal Enology and Viticulture*, **48**, pp.502-508.
- Franco J. A. (1971). *Nova Flora de Portugal*. Lisboa. pp – 648.
- Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. and Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**, pp.454-457.
- Garde-Cerdán T., Ancín-Azpilicueta C.(2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, pp. 438-447.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2^a partie: mesure, origineet interpretation. *Connaissance Vigne et du Vin*, **18**, pp. 253-271.
- Golluke A.P.B., Catharino R.R., Souza J.C., Eberlin M.N., Tavares D.Q. (2009). Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage. *Food Chemistry*, **112**, pp. 868-873.
- Gómez-Cordovés, C. and González-Sanjosé, M.L. (1995). Interpretation of color variables during de aging of red wines: relationship with families of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, pp. 557-561.
- Gonçalves, F.J. and Jordão, A.M. (2009a). Changes in antioxidant activity and proanthocyanidin fraction of red wine aged in contact

- with Portuguese (*Quercus pyrenaica* Willd.) and American (*Quercus alba* L.) oak wood chips. *Italy Journal of Food Science*, **21**, pp.51-64.
- Gonçalves, F.J. and Jordão, A.M. (2009b). Influence of different commercial fining agents on proanthocyanidin fraction and antioxidant activity of a red wine from Baga grapes. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **43**, pp.111-120.
 - González-Neves G., Gómez-Cordovés C. (1995) Relaciones entre el color y la composición fenólica de un vino tinto joven con diferentes adiciones de anhídrido sulfuroso y acetaldehído. XXI Congreso Mundial de la Vina y el vino, 75ª Asamblea General de la O.I.V., Uruguay, 27 Noviembre – 4 Diciembre.
 - Gryglewski, R.J, Korbut, R., Robak, J. and Swies, J. (1987). On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, **36**, pp.317-322.
 - Halliwell B. (1999). Antioxidant Defense Mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, **33**, pp.261-272.
 - Haluk J. P., Irmouli M. (1998). The fixed polymer constituents in cooperage oak: cellulose, hemicelluloses and lignin. *J. Sci. Tonn.*, **4**, pp.43-82.
 - Hernández-Agero, A. P. O.; Garcia de la Peña, M. E.; Torogos, J. H.; Priego, P. T.; Rozalen, P. N.; Cuadrillo, J. S. (1993). Contribución al estudio del color de los vinos españoles. *Vitivinicultura*, **11-12**, pp.52-56.
 - Hillis W.E. (1984) High temperature and chemical effects on wood stability. *Wood Science and Technology*, **18**, pp.281-293.
 - Jaarsveld F. P. V., Hattingh S., Minnaarl P., Blom M. (2008a). Rapid induction of ageing character in Brandy- Effects of extraction media and preparation conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, **30**, No. 1.
 - Jaarsveld F. P. V., Hattingh S., Minnaarl P., Blom M. (2008b). Rapid induction of ageing character in Brandy- influence of toasting. *American Journal of Enology and Viticulture*, **30**, No. 1.
 - Jordão A. M., Ricardo-da-Silva R. M., Laureano O., Adams A., Demyttenaere J. R. V., De Kimpe V. (2006). Volatile composition analysis by solid-phase microextraction applied to oak wood used in cooperage (*Quercus pyrenaica* and *Quercus petraea*): effect of botanical species and toasting process. *Journal of Wood Science*, **52**, pp. 514-521.
 - Kaur, C., & Dapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables- The millenium's health. *International Journal of Food Science and Tecnology*, **36**, pp.703-725.
 - Keller R. (1987). Différentes varieties de chênes et leur repartition dans le monde. *Conn. Vigne Vin*, **21**, pp.191-229.
 - Koussissi E., Dourtoglou V. G., Ageloussis G., Paraskevopoulos Y., Dourtoglou A., Paterson A., Chatzilazarou A. (2009). Influence of toasting of oak chips on red wine maturation from sensory and gas

- chromatographic headspace analysis. *Food Chemistry*, **114**, pp. 1503-1509.
- Kozlovic G., Jeromel A., Maslov L., Pollnitz A., Orlic'A. (2010). Use of acacia barrique barrels influence on the quality of Malvazija from Istria wines. *Food Chemistry*, **120**, pp. 698-702.
 - Krisper P., Tisler V., Skubic V., Rupnik I., Kobal S. (1992). The used of tannins from chestnut (*Castanea Sativa*). *Plant polyphenols*, pp.1013-1019.
 - Krizman, M.; Baricevic, D.; Prosek, M., (2007). Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC-MS using a monolithic reversed-phase column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,**43**, pp.481-485.
 - Larruari, J. A., Sánchez-Moreno, C., Rupérez, P., &Saura-Calixto,F.(1999). Free radical scavenging capacity in the ageing of selected red Spanish wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, pp.1603-1606.
 - Maier T., Schieber A., Kammerer R.D., Carle R. (2009). Residues of grape (*Vitisvinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, **112**, pp.551-559.
 - Manzocco, L., Mastrocloa, D., &Nicolí, M. C. (1999). Chain-breeding and oxygen acavenging properties of wine as affected by some technological procedures. *Food Research International*, **31**, pp.673-678.
 - Marché M., Joseph E., Goizet A., Audebert J. (1975). Étudethéoriquesur le cognac et son vieillissement en fût de chêne. *R. F. Oenol.*, **57**, pp.1-17.
 - Margalit Y. (2004). Concepts in winw technology. The wine appreciation guild. USA. San Francisco.
 - Martínez J., Cadahía E., Fernández de Simón B., Ojeda S., Rubio P. (2008). Effect of seasoning method on the chemical composition of oak heartwood to cooperage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56** , pp.3089–3096.
 - Mayachiew, P.; Devahastin, S.,(2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT-Food Science and Technology*, **41**, pp.1153-1159.
 - Mazza, G., &Miniati, E.(1993). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. London: CRC press.
 - McGoover P.E., Fleming S. J., Katz S. H. (1996). The origins and ancient history of wine. Gordon and breach publishers. The university of Pennsylvania museum of archaeology and anthropology. USA. Philadelphia.
 - Meléndez M.E., Sánchez M.S., Iñiguez M., Sarabia L.A., Ortiz M.C. (2001) Psychophysical parameters of colou rand the chemometric characterization of wines of the certified denomination of origin "Rioga". *Analytica Quimica Acta* , **446**, pp.157-167.
 - Miles,E.A. and C.Rice-Evans.(1994) *Methods Enzymol.*, **234**, pp.279-293.

- Miles, E.A. and C. Rice-Evans. (1995). *Journal of Food Science*, **97**, pp.35-40.
- Miles, E.A.; Zoubouli, P.; Calder, P.C., (2005). Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Nutrition*, **21**, pp. 389-394.
- Molyneux, P; Songklanakarin. (2004) *Journal of Science Education and Technology*, **26**, pp.211-219.
- Monties B. (1987). Composition chimique des bois de chêne: composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. *Conn. Vigne Vin*, **22**, pp.169-190.
- Moreno-Arribas, M., & Polo, M. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer. pp.437-529.
- Mosedale J. R. (1995). Effects of oak wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky. *Forestry*, **68**, pp.203-230.
- Moutounet M., Puech J.L., Keller R., Feuillat F. (1999). Les caractéristiques du bois de chêne en relation avec son utilisation en œnologie. L'éphémère de duramisation et ses conséquences. *R. F. Oenol*, **174**, pp.12-17.
- Natali N., Chinnici F., e Riponi C. (2006). Characterization of Volatiles in Extracts from Oak Chips Obtained by Accelerated Solvent Extraction (ASE). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, pp. 8190-8198.
- Neuza Paixão, Rosa Perestrelo, José C. Marques, José S. Câmara. (2007) Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose´ and white wines. *Food Chemistry*, **105**, pp. 204-214.
- Nobre da Veiga J. C. (1954). *Tanoaria e Vasilhame*. *Livraria Sá da Costa, Lisboa*, **28**, pp.259.
- Ortega, T., De La Hera, E., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, P., Naval, M.V., Villar, A. M., Prodanov, M., Vacas, V. B., Arroyo, T., Hernández, T., & Estrella, I. (2008). Influence of grape varieties and their phenolic composition on vasorelaxing activity of young red wines. *European Food Research and Technology*, **227**, pp.1641-1650.
- Paixão N., Perestrelo R., Marques C.J., Câmara S.J. (2007), *105*, 204-214. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, **105**, pp.204-214.
- Parodi G. (2000). A proposito di barriques. *Vigne & vini*, **3**, pp.77-83.
- Pellegrini, N., Simonetti, P., Gardana, C., Brenna, O., Brighenti, F., & Pietta, P. (2000). Polyphenol content and total antioxidant activity of Vini Novelli (young red wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, pp.732-735.
- Peng S., Scalbert A., Monties B. (1991). Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, **30**, pp. 775-778.

- Pérez-Magariño, S. and González-Sanjosé, M. L.(2006). Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* , **96**, pp.197-208.
- Peynaud N., Blouin J. (1997) O gosto do vinho. O grande livro da prova. Litexa Editora, Lisboa
- Prida A., Puech J-L. (2006). Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French; and East European oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, pp. 8115-8126.
- Puech J.L., Sarni F. (1990). Delignification of oak wood with an ethanol-water solution in a flow through reactor. *Holzforchung*, **44**, pp.367-371.
- Re, R.;Pellegrini, N.;Proteggente, A.;Yang, M.;Rice-Evans, C.,(1999). Free Radical Biology and Medicine, **26**, pp.1231-1237.
- Record, I. R., Dreosti, I. E., &McInerney, J.K. (2001). Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with a an antioxidant misture. *British Journal of Nutrition*, **85**, pp.459-464.
- Renaud, S.C., Guegue, R., Schenker, J., &d'Houtaud, A. (1998). Alcohols and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*, **9**, pp.184-188.
- Ribéreau-Gayon J. (1931). Contribution à l'étude des oxydationset reductions dans les vins. Thèse de l'Université de Bordeaux.
- Ribéreau-Gayon, P. (1973). Interprétationchimiques de la couleur des vins rouges. *Vitis*, **12**, pp.119-142
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P.,Sudraud P., (1976). Traitéd'cenologie. *Sciences et techniques du vin*. pp.719.
- Ribéreau-Gayon, P. e Stonestreet E. (1965) Le dosage des anthocyanesdans le vin rouge. *Bulletim de la Société Chimique de France* ,**9**, pp.2649-2652.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A.,&Dubourdieu, D. (2006b). Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex.141-205.
- Rivero-Pérez, M. D., González-Sanjosé, M. L., Muñiz, P., & Pérez-Magariño, S. (2008). Antioxidant profile of red-single variety wines microoxygenated before malolactic fermentation. *Food Chemistry*, **111**, pp.1004-1011.
- Roussel A.M. (2002). Micronutrients et polyphenols antioxydants: une nouvelle voie de préventionnutritionnelle. In: Congrès National de médecineet santé au travail.
- Salagoity-Auguste M. H., Tricard C., Marsal F., Sudraud P. (1986). Preliminary investigation for the differentiation of enological tannis according to botanical origin: determination of gallic acid and its derivatives. *Am.erican Journal of Enology and Viticulture*, **37**,pp.301-303.

- Sarni F., Moutounet M., Puech J. L., Rabier P. (1990). Effect of heat treatment of oak wood extractable compounds. *Holzforschung*, **44**, pp.461-466.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. Supplement: Chocolate: Modern science investigates an ancient medicine. *Journal of Nutrition*, **130**, pp.2073-2085.
- Scalbert A., Duval L., Monties B., Favre J. M. (1998). Polyphenols du Quercusrobur L.: taninsellagiquesd'arbreadulte, calsetmicroplants. Bull. *Liasion Groupe Polyphenols*, **14**, pp. 262-265.
- Schahinger G. (1992). Oak- the worldwide situation. Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker, **343**, pp.19-20.
- Señorans, F.J., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2003). New trends in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **43**, pp.507-526.
- Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, **38**, pp. 69-77.
- Singleton, V. L. (1995). Maturation of wines and spirits: comparisons, facts and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, **46**, pp.98-115.
- Somers, T.C. e Evans, M.E. (1986). Evolution of red wines. I. Ambient influences on colourcomposition during early maturation. *Vitis*, **25**, pp. 31-39.
- Soobratee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A; Aruona, O.I.; Bahorun, T.,(2005). Mutation Research/Fundamental and Molecular. *Mechanisms of Mutagenesis*, **579**, pp.200-213.
- Sousa,A.;Ferreira,I.C.F.R.; Calhelha R.;Andradfe, P.B.;Vlento, P.;Seabra, R.; Estevinho, L.;Bento, A.;Pereira, J.A.,(2006). Phenolics and antimicrobial activity of tradicional stoned table olives "alcaparra".*Bioorganic&Medicinal Chemistry*,**14**, pp. 8533-8538.
- Tang H. R., Hancock E. A., Covington A. D. (1992). Study on the composition and structure of commercial chestnut tanning agent. In: *Plant polyphenols*, pp.221-243, Hemingway R. W., Laks P. E. (Eds.), Plenum Press, New York.
- Tapiero, H., Tew, K. D., Nguyen, B. A. G. and Mathé, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother*, **56**, pp.200-207.
- Taransaud J. (1976). *Le livre de la tonnellerie. La roue à livres diffusion*, Paris.
- Tepe, B.; Sokmen, a.,(2007). Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic Tanacetum subspecies from Turkish flora. *Bioresource Tecchonology*,**98**, pp.3076-3079.

- Teixeira, D.M. (2006) Novos Métodos para a Extração de Compostos Fenólicos de Plantas da Família Moraceae . Tese de doutoramento Universidade de Évora
- Timberlake, C. F. e Bridle, P. (1976). The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines. *Vitis* ,**15**, pp. 37-49
- Togores J. H. (2003). Tratado de enología (2ºvol). 1ª edição. S. a. Mundi-prensaslibros. Madrid.
- Tomera, J. F. (1999). Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. *Trends in Food Science and Technology*, **10**, pp.129-138.
- Torres de Pinedo, A.;Penalver, P.;Morales, J.C.,(2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship.*Food Chemistry*, **103**, pp.55-61.
- Tripoli,E.; Guardia M.L.; Giammanco S.;Majo D.D.; Giammanco, M.,(2007). Flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review.*Food Chemistry*, **104**, pp.466-479.
- Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O., Edmondson J. R., Heywood V. H., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (1993). *Flora Europaea 1 (2nd Edition)*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (1964). *Flora Europaea 1*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Valdés, M. E. (1997). Incidencia de la tecnología empleada en compuestos responsables de la calidad de un vino blanco. PhD, Universidad de Extremadura, Badajoz.
- Viriot C., Scalbert A., Hervé du Penhoat C. L. M., Moutounet M. (1994). Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut. Dimerization and hydrolysis during wood ageing. *Phytochemistry*, **36**, pp.1253-1260.
- Viriot C., Scalbert A., Lapiere C., Moutounet M. (1993). Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, pp.1872-1879.
- Vivas N. (2002). *Manuel de tonnellerie À L'usage Des Utilisateurs De Futaille*, 2ème edition. FéretÉditions, France.
- Vivas N., Chauvet S., Sudraud P., Glories Y. (1993a). Techniques de contrôle et d'évaluation de la qualité des tanins enologiques. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **919**, pp.215-222.
- Zafrilla P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J., Martínez-Cachá, A., Pardo, F. and Nicolás, J. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, pp.4694-4700.
- Zoecklein, B.W. ;Fugelsang, K.C.; Gump, B.H.; Nury, F.S. (1995). *Wine analysis and production*. The Chapman & Hall Enology Library. International Thompson Publishing.



Anexos

	Sem tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte	Testemunha
--	------------------	----------------------	--------------------	--------------------	-------------------

Tabela 3 - Polifenóis totais, antocianinas totais e livres, flavonóides antocânicos e não antocânicos com aparas de diferentes espécies botânicos

	Polifenóis totais (mg/L (+)-catequina)				
Cast	2407,25±114,37 ^b	2293,95±40,92 ^{ab}	2214,69±97,07 ^a	2239,87±40,52 ^{ab}	2213,76±54,07 ^a
A	2207,69±2,35 ^b	2247,33±1,52 ^b	2218,88±3,19 ^b	2146,62±3,41 ^a	2213,76±54,07 ^b
Cer	2010,47±41,45 ^a	2087,40±43,35 ^{ab}	2115,38±9,18 ^b	2077,61±28,97 ^{ab}	2213,76±54,07 ^c
	Sem tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte	Testemunha
Car	2130±38,77 ^a	2109,78±42,70 ^a	2087,40±20,34 ^a	2078,54±4,93 ^a	2213,76±54,07 ^b
	Antocianas Totais (mg/L (+)-catequina)				
Cast	602,49±12,21 ^a	612,33±12,21 ^a	583,07±48,62 ^a	598,23±19,43 ^a	622,44 ± 5,63 ^a
A	634,41±17,51 ^a	636,27±18,81 ^a	635,47±15,16 ^a	625,47±13,94 ^a	622,44 ± 5,63 ^a
Cer	626,16±14,50 ^a	634,14±13,09 ^a	635,74±1,37 ^a	627,23±9,26 ^a	622,44 ± 5,63 ^a
Car	638,93±5,10 ^{ab}	634,94±10,11 ^{ab}	629,04±9,13 ^{ab}	649,04±17,66 ^b	622,44 ± 5,63 ^a
	Antocianas Livres (mg/L (+)-catequina)				
Cast	376,39±10,76 ^d	342,87±2,66 ^b	319,47±1,02 ^a	360,16±3,19 ^c	360,10 ± 8,21 ^c
A	375,86±6,46 ^c	366,81±5,31 ^{bc}	358,30±1,02 ^b	345,80±1,23 ^a	360,10 ± 8,21 ^b
Cer	341,54±3,13 ^b	360,96±2,01 ^c	316,54±1,37 ^a	391,02±1,84 ^d	360,10 ± 8,21 ^c
Car	356,44±5,07 ^c	341,54±5,07 ^b	331,44±1,37 ^{ab}	328,51±6,35 ^a	360,10 ± 8,21 ^c
	Flavonoides Totais (mg/L (+)-catequina)				
Cast	2066,54±52,32 ^a	2171,17±52,32 ^a	2040,38±200,36 ^a	2118,86±52,32 ^a	2171,17±52,32 ^a
A	2563,56±60,41 ^b	2562,56±60,41 ^b	2458,92±60,41 ^b	2301,97±85,43 ^a	2171,17±52,32 ^a
Cer	2328,13±100,18 ^b	2328,13±52,32 ^b	2301,97±0,00 ^{ab}	2223,49±52,32 ^{ab}	2171,17±52,32 ^a
Car	2066,54±100,18 ^a	2092,70±0,00 ^a	2118,86±52,32 ^a	2171,17±52,32 ^a	2171,17±52,32 ^a
	Flavonoides Não Antocianicos (mg/L (+)-catequina)				
Cast	1533,29±49,28 ^a	1629,29±62,23 ^a	1524,32±157,85 ^a	1589,38±61,95 ^a	1620,27±50,64 ^a
A	2002,06±47,06 ^b	2000,41±56,02 ^b	1896,48±65,74 ^b	1748,00±81,62 ^a	1620,27±50,64 ^a
Cer	1773,93±90,54 ^b	1766,87±41,89 ^b	1739,29±1,22 ^b	1668,35±48,08 ^{ab}	1620,27±50,64 ^a
Car	1501,04±95,76 ^a	1530,73±8,95 ^a	1561,83±52,00 ^a	1596,73±43,93 ^a	1620,27±50,64 ^a

Legenda: letras diferentes na linha significam diferenças significativas entre os diferentes graus de tosta, com p<0,05.

Tabela 4 - Intensidade e tonalidade da cor em vinhos com aparas de diferentes espécies botânicas

	Intensidade da cor				
Cast	9,260±0,058 ^a	9,515±0,214 ^a	9,790±0,543 ^a	10,215±0,745 ^a	9,515±0,664 ^a
A	8,660±0,958 ^a	9,110±0,046 ^a	9,585±0,121 ^a	9,685±0,271 ^a	9,515±0,664 ^a
Cer	8,950±0,046 ^a	8,880±0,115 ^a	9,200±0,012 ^a	9,240±0,000 ^a	9,515±0,664 ^a
Car	8,395±0,421 ^a	8,925±0,121 ^{ab}	9,080±0,069 ^{ab}	9,100±0,127 ^{ab}	9,515±0,664 ^b
	Tonalidade da cor				
Cast	0,660±0,003 ^{ab}	0,672±0,005 ^b	0,654±0,011 ^{ab}	0,644±0,014 ^a	0,650±0,021 ^{ab}
A	0,678±0,003 ^b	0,685±0,000 ^{bc}	0,703±0,000 ^{dc}	0,719±0,000 ^d	0,650±0,021 ^a
Cer	0,645±0,002 ^a	0,669±0,002 ^b	0,663±0,002 ^{ab}	0,659±0,002 ^{ab}	0,650±0,021 ^{ab}
Car	0,675±0,011 ^b	0,666±0,003 ^{ab}	0,664±0,001 ^{ab}	0,661±0,003 ^{ab}	0,650±0,021 ^a

Legenda: letras diferentes na linha significam diferenças significativas entre os diferentes graus de tosta, com $p < 0,05$.

Tabela 5 - Actividade Antioxidante em soluções hidroalcoólicas com aparas de diferentes espécies botánicas (radical ABTS E DPPH)

	Sem tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte
	Actividade Antioxidante (ABTS) ([trolox]- mM)			
Castanheiro	32,12±0,42c	32,26±0,21c	27,34±1,90b	21,18±1,00a
Acacia	10,53±0,28b	11,85±0,28c	9,66±0,18b	7,87±0,74a
Cerejeira	2,06±0,00b	2,12±0,09b	1,98±0,07b	1,25±0,01 ^a
Carvalho	23,48±0,81c	27,41±0,74d	21,86±0,21b	16,73±0,14 ^a
	Actividade Antioxidante (DPPH) ([trolox]- mM)			
Castanheiro	17,08±0,13c	15,68±0,16b	14,98±0,09 ^a	14,51±0,18 ^a
Acacia	12,25±0,35c	11,75±0,53bc	11,49±0,07b	8,79±0,11 ^a
Cerejeira	1,42±0,07b	1,59±0,03b	1,57±0,03b	1,16±0,02
Carvalho	14,78±0,13c	13,78±0,02b	14,26±0,09c	9,19±0,22 ^a

Legenda: letras diferentes na linha significam diferenças significativas entre os diferentes graus de tosta, com $p < 0,05$.

Tabela 6 - Actividade antioxidante em vinhos com aparas de diferentes espécies botânicas (radical ABTS e DPPH)

	Sem tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte	Testemunha
	Actividade Antioxidante (ABTS) ([trolox]- mM)				
Cast	12,73±0,10a	13,14±0,19a	10,40±0,10a	12,37±0,09a	11,54±0,09a
A	12,11±0,16b	11,96±0,15b	12,34±0,27b	9,79±0,09a	11,54±0,09b
Cer	12,07±0,21c	11,97±0,04c	10,81±0,12a	11,70±0,06bc	11,54±0,09b
Car	12,12±0,34a	8,93±0,39b	11,30±0,26a	12,34±0,01a	11,54±0,09a
	Actividade Antioxidante (DPPH) ([trolox]- mM)				
Cast	15,17±1,28b	14,81±0,38b	14,63±0,07b	14,25±0,46b	12,81±0,24a
A	15,15±0,39b	14,87±0,18b	15,09±0,09b	14,52±0,34b	12,81±0,24a
Cer	14,78±0,25b	14,32±0,28b	13,96±0,45b	13,62±0,48b	12,81±0,24a
Car	15,48±0,56b	14,25±0,37b	14,45±0,45b	13,52±1,08b	12,81±0,24a

Legenda: letras diferentes na linha significam diferenças significativas entre os diferentes graus de tosta, com $p < 0,05$.

Tabela 7 - Actividade antioxidante em vinhos com dominós de diferentes espécies botânicas

	Sem tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte	Testemunha
	Actividade Antioxidante (ABTS) ([trolox] – mM)				
Cast	32,01±0,44b	32,87±3,20b	33,89±0,98b	31,09±0,61c	21,46±0,27a
A	24,37±0,59b	26,40±0,22c	27,76±0,36c	30,22±3,57d	21,46±0,27a
Cer	33,29±2,24b	36,31±1,25b	35,65±0,80b	41,37±0,66b	21,46±0,27a
Car	23,86±0,12b	27,55±1,91b	24,96±0,52b	25,66±1,20b	21,46±0,27a
	Sem tosta	Tosta Ligeira	Tosta Média	Tosta Forte	Testemunha
	Polifenóis Totais (mg/L (+)-catequina)				
Cast	6025,55±19,78 b	6101,55±35,61 b	6334,68±10,55 b	5913,01±22,42 b	3464,24±14,51 a
A	4224,44±36,93 b	4762,73±30,33 c	4807,20±17,14 d	4830,90±7,91 e	3464,24±14,51 a
Cer	6243,61±39,56 b	6484,49±1,32 c	6493,59±15,83 c	7610,43±2,64 b	3464,24±14,51 a
Car	4582,19±36,93 b	4948,14±83,08 c	4416,53±23,74 b	4552,39±54,07 c	3464,24±14,51 a

Legenda: letras diferentes na linha significam diferenças significativas entre os diferentes graus de tosta, com $p < 0,05$.